



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**UTILIZACIÓN DE FACTORES PLAQUETARIOS AUTÓLOGOS PARA
LA REGENERACIÓN DE TEJIDOS.**

TRABAJO MONOGRÁFICO DE ACTUALIZACIÓN

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

ETHELIA ANA MARÍA VILLAGÓMEZ RIVERA



MÉXICO, D.F.

AÑO 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: RODOLFO PASTELIN PALACIOS

VOCAL: Profesor: PATRICIA ELVIRA BERRON RUIZ

SECRETARIO: Profesor: EVA DELIA CALDERON GARCIDUEÑAS

1er. SUPLENTE: Profesor: ENRIQUE ORTEGA SOTO

2° SUPLENTE: Profesor: ARACELI MENDIETA REGIS

ASESOR DEL TEMA: EVA DELIA CALDERÓN GARCIDUEÑAS

SUSTENTANTE: ETHELIA ANA MARÍA VILLAGÓMEZ RIVERA

Índice

Índice.....	1
Introducción.....	3
Capítulo 1. Reparación y regeneración de tejidos.....	4
Definición de reparación y regeneración.....	4
Mecanismo de Reparación.....	4
Etapas de la reparación de heridas.....	4
Hemostasia.....	5
Inflamación.....	5
Proliferación.....	7
Mecanismos de Regeneración.....	12
Mecanismos de regeneración a nivel tisular.....	13
Vías de transducción de la regeneración de células competentes.....	15
Estrategias de la medicina regenerativa.....	15
Matriz Extracelular.....	17
CAPÍTULO2. Plaquetas.....	19
Formación de plaquetas.....	19
Función plaquetaria.....	19
Gránulos α	21
Formación de los gránulos α	21
Mecanismos moleculares de la liberación de gránulos α	22
Contenido de los gránulos α	23
Roles funcionales de los gránulos α	24
Capítulo 3. Factores de crecimiento y citocinas.....	28
Factor de crecimiento epidérmico (EGF) y Factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α).....	28
Factor de crecimiento endotelial-vascular (VEGF).....	28
Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF).....	28
Factor de crecimiento transformante beta (TGF- β).....	29
Factor de crecimiento fibroblástico. (FGF).....	29
Factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1).....	30
Factor de crecimiento de hepatocitos (HGF).....	30

Factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF).....	30
Factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF).....	31
Eritropoyetina (EPO).....	31
Trombopoyetina (TPO).....	31
Transducción de señales.....	32
Capítulo 4. Inmunidad.....	40
Leucocitos polimorfonucleares.....	41
Monocitos y macrófagos.....	41
Células cebadas.....	42
Células T.....	42
Impacto de la inflamación en la reparación de tejidos bajo condiciones patológicas.....	43
Capítulo 5. Aplicaciones Clínicas.....	44
Formulaciones.....	44
Oftalmología.....	46
Ortopedia, medicina del deporte.....	56
Piel.....	69
Análisis.....	80
Conclusión.....	81
Bibliografía.....	82

Introducción.

Las plaquetas a lo largo de los años se han implicado en procesos más allá de la coagulación como en un principio se había estudiado. La variedad de funciones que pueden desarrollar las plaquetas se basan en las sustancias que contienen en sus gránulos, principalmente en los gránulos α . Las plaquetas al liberar estas sustancias promueven procesos como la reparación de tejidos, la angiogénesis y la inflamación, entre otros.

El hecho de que las plaquetas contengan factores como las citocinas y factores de crecimiento significa que pueden aplicarse de una manera positiva para influenciar situaciones clínicas donde se requiera de una rápida curación y una regeneración de tejidos.

Por lo tanto se realizó una revisión sistemática de los mecanismos de reparación y regeneración, factores que intervienen los procesos de regeneración, los factores plaquetarios, casos clínicos, protocolos, formulación de los factores plaquetarios para evaluar críticamente la utilización de los factores plaquetarios autólogos en la regeneración de tejidos y su seguridad en la aplicación clínica.

Capítulo 1. Reparación y regeneración de tejidos.

Definición de reparación y regeneración.

Las lesiones de las células y los tejidos ponen en marcha una serie de eventos que refrenan los daños e inician el proceso de curación. Este proceso en general se puede entender como regeneración y reparación (1). El proceso de reparación también es conocido como proceso de cicatrización.

La reparación es una adaptación fisiológica a la pérdida de la masa normal de los órganos y conduce a la restauración de la continuidad interrumpida por la síntesis del tejido cicatricial, sin recuperación de la función de los tejidos lesionados. En contraste la regeneración restaura la estructura y función normal del órgano (2).

La biología regenerativa pretende entender las diferencias celulares y moleculares entre la regeneración y la no regeneración de tejidos (la reparación). La medicina regenerativa pretende aplicar este conocimiento para restaurar la estructura y función del tejido dañado (3).

Mecanismo de Reparación.

La reparación de heridas es un proceso biológico complejo. En general, el proceso de reparación de heridas se produce casi en todos los tejidos. La secuencia de eventos que siguen a un infarto de miocardio (ataque cardiaco), por ejemplo, es muy similar a la que sigue después de una lesión de médula ósea, una quemadura o una herida de bala, a pesar de los diferentes tipos de daños y los diferentes órganos afectados. Asimismo, la formación de cicatriz que se produce durante la reparación de heridas conduce a tejido disfuncional similar dondequiera que tenga lugar. (4)

Etapas de la reparación de heridas.

La herida se define como una lesión del cuerpo que, de forma característica, consiste en una laceración o infracción de una membrana, con el daño de los tejidos subyacentes. (5)

El proceso de reparación o cicatrización de heridas está dado clásicamente por 3 etapas: inflamación, proliferación y remodelación (1, 4,5, 8, 9). La hemostasia se menciona como una etapa previa al proceso de reparación de heridas, pero

debido a que brinda una matriz provisional de fibrina y comienzan la secreción de factores de crecimiento con las plaquetas se incluye como una etapa más (6,7). Algunos autores dividen el proceso de cicatrización en tres etapas, hemostasia, inflamación y reparación estructural (formación de tejido de granulación (proliferación) y la remodelación del tejido de granulación para formar la cicatriz (remodelación)) (10).

Hemostasia.

Las plaquetas son las primeras células que responden a la cicatrización de la herida, contribuyendo a esta a través de su adherencia, agregación y degranulación (5), formando un tapón de plaquetas, iniciando así la cascada de la coagulación, la cual resulta en la formación de un coágulo que limita la pérdida de sangre.(7)

El trombo además de impedir el sangrado continuo, establece una barrera protectora y proporciona un reservorio a las sustancias liberadas por la degranulación de las plaquetas. (1,5, 8) La degranulación consiste en la liberación de numerosas citocinas, factores de crecimiento y proteínas de la matriz almacenadas en los gránulos α de las plaquetas. Estas sustancias fomentan una serie de mecanismos celulares y extracelulares importantes para la hemostasia, la quimiotaxis, la proliferación celular, la angiogenia y la remodelación. (5) Sin embargo, la curación puede ocurrir donde no hay hemorragias (y por lo tanto, no hay plaquetas) (7).

El coágulo (que comprende de fibrina, fibronectina, vitronectina, factor de von Willebrand, trombospidina) provee de una matriz provisional para la migración celular. (6, 7, 8)

Inflamación.

Con la hemostasia se inicia de inmediato la etapa de inflamación. La inflamación se refleja en los signos físicos de eritema, calor, edema, y dolor. En el plano celular, la inflamación representa una dilatación de los vasos sanguíneos, con aumento de su permeabilidad, y el reclutamiento de los leucocitos hacia el foco de lesión. (5)

La inflamación puede ser dividida en las fases temprana y tardía dependiendo del tiempo y duración de la respuesta y el tipo célula inflamatoria implicada. (7)

Los episodios inflamatorios de cicatrización de la herida están dominados secuencialmente por dos poblaciones leucocitarias: los neutrófilos y los macrófagos. (5)

Fase temprana inflamatoria. En esta etapa se da la infiltración de neutrófilos que son atraídos a la zona de la herida minutos después de la herida(8) por factores quimiotácticos, tales como prostaglandinas, complemento, TGF- β , IL-1, TNF- α , fragmentos de proteínas de la matriz extracelular y productos bacterianos (5,7). Los neutrófilos llegan a la herida por medio de los procesos de marginación (adherencias a las células endoteliales en los vasos sanguíneos adyacentes) y diapédesis (movimiento a través de la pared del vaso) (7). Estas células alcanzan el lugar de la lesión en gran número pasadas 24 a 48 horas. (5). Una vez en el entorno de la herida, fagocitan bacterias, células del huésped no funcionales y componentes de la matriz (5,7). La función principal de los neutrófilos es reducir al mínimo la contaminación bacteriana, evitando así infecciones, y aportan poco al proceso normal de cicatrización de heridas más allá de esta etapa (7).

Fase tardía. Al llegar al sitio de la herida los monocitos de la sangre sufren un cambio fenotípico para convertirse en macrófagos. Los monocitos son atraídos a la herida por una variedad de factores quimiotácticos, entre ellos el complemento, componentes de la coagulación, fragmentos de inmunoglobulina G, productos de degradación de colágeno y elastina, citocinas (por ejemplo, factor plaquetario IV, PDGF, TGF- β) (7). Entre las 48 a 72 horas después de que se produzca la herida, el tipo predominante de leucocito en ella es el macrófago, los cuales parecen actuar como células reguladoras claves para la reparación (5,7). Funcionan como células fagocíticas, así como productoras de factores de crecimiento y citocinas responsables de la proliferación, reclutamiento, síntesis de la matriz, la angiogenia y la remodelación (5, 7). Además, los macrófagos liberan enzimas proteolíticas que ayudan a desbridar la herida (7).

La presencia de macrófagos en la herida es un marcador de que la fase inflamatoria esta cerca de su fin y que la fase proliferativa está comenzando (6). Al

Migración de fibroblastos.

Los fibroblastos aparecen en la herida de 2 a 4 días después de la herida y las células endoteliales siguen alrededor de un día más tarde (7). La fuente de fibroblastos para la reparación estructural parece ser doble, fibroblastos dermales residentes y fibroblastos diferenciados de células madre mesenquimales circulantes de la médula ósea que entran a la herida por la vasculatura (9). Las primeras señales para el reclutamiento de los fibroblastos provienen de productos derivados de las plaquetas: PDGF, IGF-1 y TGF- β (5). Una vez dentro de la herida, los fibroblastos proliferan y producen la matriz de proteínas fibronectina, ácido hialurónico y, más tarde, el colágeno y los proteoglicanos. Estos componentes ayudan a construir la nueva matriz extracelular, que soporta el crecimiento de las células y es esencial para el proceso de reparación (7). El mantenimiento de los fibroblastos dentro de la herida se logra a través de señales paracrinas y autocrinas. Los macrófagos y fibroblastos liberan factores de crecimiento y citocinas que contribuyen a la migración fibroblástica: FGF, IGF-1, VEGF, IL-1, IL-2, IL-8, PDGF, TGF- α , TGF- β y TNF- α . PDGF es el factor quimiotáctico y mitogénico más potente de los fibroblastos y de sus células musculares lisas progenitoras (5). Interacción crucial existe entre los fibroblastos y la matriz extracelular, la cual ayuda a regular posterior síntesis de matriz extracelular y subsecuente remodelación (7).

Formación y depósito de matriz extracelular.

Además de proporcionar la turgencia a los tejidos blandos y rigidez a los huesos, la matriz extracelular suministra un sustrato para la adhesión celular y regula críticamente el crecimiento, el movimiento y la diferenciación de las células dentro de ella. La matriz extracelular consiste de proteínas estructurales fibrosas (colágeno, elastina) y una matriz intersticial compuesta de glicoproteínas adhesivas incorporado en un gel de proteoglicanos y glicosaminoglicanos. El arreglo aparentemente aleatorio al azar de la matriz intersticial en los tejidos conectivos pronto se convierte altamente organizada alrededor de las células epiteliales, células endoteliales y células musculares lisas, formando la membrana basal especializada (que dirige la polaridad celular y es necesaria para la renovación ordenada del tejido epitelial) (7).

Los colágenos son sintetizados por los fibroblastos y son la familia más abundante de proteínas en el cuerpo. Ellos proporcionan la fuerza y la integridad de todos los tejidos y por lo tanto juegan un papel vital en la reparación de la herida. El factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de fibroblastos tipo 1(FGF1), factor de crecimiento transformante β (TGF- β), interleucina-1(IL-1), factor de necrosis tumoral (TNF) inducen síntesis de colágeno durante las fases de proliferación y remodelación.

Las glicoproteínas adhesivas son estructuralmente proteínas diversas que unen los componentes de la matriz extracelular a otro y a células, e incluyen fibronectina, laminina, y trombospondina (7)

Los proteoglicanos constan de glicosaminoglicanos (por ejemplo, sulfato de dermatán, heparán sulfato) unidas a un esqueleto de proteína; ellos ayudan a regular la estructura y permeabilidad de la matriz extracelular. Los proteoglicanos pueden modular el crecimiento y la diferenciación celular. (7)

Formación de tejido de granulación

Esta fase está caracterizada por el reemplazo del coágulo de fibrina por tejido fibroblástico rico en capilares. La formación del tejido de granulación es iniciada por los factores de crecimiento secretados por los macrófagos, principalmente PDGF y TGF- β (10). Por el 3 al 5 día, el tejido de granulación está bien establecido (7). El tejido de granulación tiene un color rosa, suave, aspecto granular grueso (tal como la que se observa por debajo de la costra de una herida de piel) (7,10). Esta etapa es caracterizada por angiogénesis o formación de nuevos vasos sanguíneos de vasos pre-existente en el sitio de la lesión (neovascularización) (7,10). Cuatro pasos son reconocidos durante este proceso:

- Degradación proteolítica de la membrana basal del vaso portador, permitiendo la formación de un “brote capilar”.
- Migración de las células endoteliales hacia el estímulo angiogénico.
- Proliferación de células endoteliales tras el frente principal de células que migran.
- Maduración de las células endoteliales con organización en tubos capilares. (7).

Varios factores (incluyendo factor de crecimiento endotelial vascular, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento de fibroblastos básico y el factor de crecimiento transformante β) inducen angiogenesis. Los brotes angiogénicos capilares invaden el coágulo de la herida rico en fibrina/fibronectina y dentro de pocos días se organizan una red microvascular en todo el tejido de granulación. La densidad de los vasos sanguíneos disminuye ya que el colágeno se acumula en el tejido de granulación para producir cicatriz; perturbación de este proceso dinámico puede influir en el desarrollo de las heridas crónicas. (7)

Epitelización.

A las pocas horas de la herida, una sola capa de células epidérmicas migra desde los bordes de la herida para formar un recubrimiento delicado a través del coágulo de fibrina para cubrir el área expuesta de la herida (7,10). A partir aproximadamente 12 horas, hay un marcado incremento en la actividad mitótica dentro de las células basales epiteliales de los bordes de la herida. Estas células migran como una lámina, extendiendo lamelipodia a lo largo del avance del borde. Más tarde, aflojan su firme adhesión a la dermis subyacente, permitiéndolas migrar a través de la matriz provisional. Cuando las células epiteliales se encuentran, el movimiento adicional es detenido por "inhibición por contacto" y una nueva membrana basal regenera; un mayor crecimiento y diferenciación de células epiteliales restablece el epitelio estratificado (7).

Remodelación y maduración de la cicatriz (de 1 semana a varias semanas)

La síntesis y la remodelación de la matriz extracelular se inician simultáneamente con el desarrollo de tejido de granulación y continúa durante periodos prolongados. Hay una continua síntesis y degradación de colágeno, equilibrando a un estado estacionario aproximadamente 21 días después de la lesión. La contracción de la herida se produce a través de las interacciones entre los fibroblastos y la matriz extracelular que rodea y está influenciada por una serie de citocinas incluyendo factor de crecimiento transformante β , factor de crecimiento derivado de plaquetas y factor de crecimiento de fibroblastos básicos.

La degradación del colágeno se logra por las metaloproteinasas específicas que son producidas por los fibroblastos, neutrófilos y macrófagos en el sitio de la herida(7).

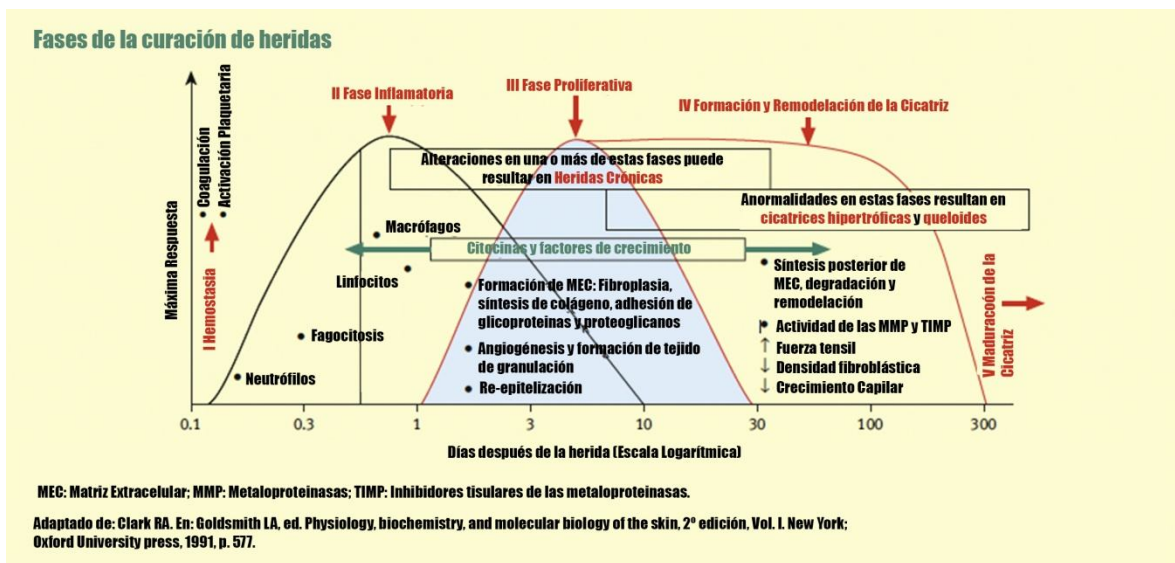
Metaloproteinasas - la síntesis y secreción de las metaloproteinasas es regulada por factores de crecimiento, citocinas, y estímulos fagocítico. Son dependientes de iones de zinc para su actividad (7).

La actividad de las metaloproteinasas está perfectamente regulada porque ellas tienen el potencial de degradar colágeno esencial y por lo tanto alteraciones de la cicatrización. Suelen ser elaborados como precursores inactivos (zimógeno) que deben ser primero activados; esto se logra por ciertas proteasas que están presentes en la herida (7).

Además la remodelación de una herida causa:

- Disminución de la actividad de las metaloproteinasas y un aumento en la actividad de los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas.
- Reducción en la densidad de macrófagos y fibroblastos.
- Un alto en la derivación de los capilares.
- Reducción en el flujo sanguíneo y la actividad metabólica.
- Disminución en el tamaño del tejido conectivo subyacente contráctil.

Por último, el andamiaje del tejido de granulación se convierte en una cicatriz avascular que está compuesto principalmente en los fibroblastos inactivos, colágeno denso, fragmentos de tejido elásticos y otros componentes de la matriz extracelular (7).



Mecanismos de Regeneración.

Todos los organismos regeneran, aunque el grado de capacidad de regeneración varía entre las especies y con el nivel de organización biológica en el organismo individual. Algunas especies, como la planaria y la hidra, pueden regenerar organismos completos a partir de fragmentos del cuerpo. Ciertos anfibios pueden regenerar estructuras complejas, tales como las extremidades y la cola, así como muchos otros tejidos. En comparación con estas formas de vida, la capacidad regenerativa de los mamíferos, incluyendo a los humanos, es limitada, pero no menos vital. Dentro de los organismos individuales, la regeneración se lleva a cabo desde el nivel molecular a los niveles de tejido de la organización biológica.

a. Nivel molecular.

A nivel molecular, la regeneración es ubicua. Todas las células se pueden ajustar el equilibrio de la síntesis de proteínas y la degradación en respuesta a la carga bioquímica o mecánica. Por ejemplo, los cardiomiocitos reemplazan la mayor parte de sus moléculas en el transcurso de dos semanas y ajustan su tasa de síntesis proteica a la alza con un aumento sostenido de la presión arterial, convirtiéndose hipertrofias.

b. Nivel Celular.

En el plano de una sola célula, la capacidad de regeneración es más restringida. Los protozoos unicelulares de vida libre pueden regenerar las células completas después de la eliminación de fragmentos grandes, siempre y cuando el material nuclear está en la parte restante. Por ejemplo, tan poquito como 1/80 de una ameba es capaz de reconstituir a una ameba completa. En los vertebrados, los axones de los nervios sensoriales y motores son capaces de regeneración *in vivo* después de un aplastamiento o corte transversal, siempre y cuando los tubos endoneurales encajonan permanezcan intactos y en el registro en el sitio de la lesión.

c. Nivel Tisular.

Hay tres requisitos para la regeneración en el nivel tisular. En primer lugar, los tejidos deben contener células mitóticamente competentes, es decir, células que tienen los receptores y las vías de transducción de señales para responder a un entorno permisivo para la regeneración. En segundo lugar, el entorno de una lesión del tejido debe contener las señales necesarias para promover la

proliferación y diferenciación de estas células en una forma organizada. En tercer lugar, los factores inhibidores de la regeneración deben estar ausentes desde el entorno de la lesión, suprimidos o neutralizados. La sangre, el epitelial, el hueso y el epitelio renal son ejemplos de tejidos de mamíferos que contienen células mitóticamente competentes que participan en el mantenimiento y la regeneración de las lesiones inducidas. (10)

Mecanismos de regeneración a nivel tisular.

Existen tres mecanismos de regeneración de los tejidos de los vertebrados: hiperplasia compensatoria, la activación de las células madre adultas de reserva, y la desdiferenciación de células maduras.

a. Hiperplasia Compensatoria.

La hiperplasia compensatoria es la proliferación de células diferenciadas para regenerar nuevo tejidos. Las células diferenciadas se liberan de su EMC(matriz extracelular) o complejo sincitial y se dividen mientras se mantiene todas o algunas de sus funciones diferenciadas. El ejemplo de la regeneración por la hiperplasia compensatoria es el hígado. Después de la hepatectomía parcial, los hepatocitos del hígado, así como los tipos celulares no parenquimatosas se dividen para desempeñar sus funciones de regulación de la glucosa, síntesis de proteínas de la sangre, secreción de bilis, y el metabolismo de los fármacos, hasta que la masa original del hígado se restablece.

b. La activación de células madre adultas residentes o circulantes.

A finales de la vida embrionaria o fetal, el subconjunto de células de linaje restringido, pero no totalmente diferenciado, son dejadas de un lado como las células madre adultas (CMA) de reserva. Estas células pueden residir dentro de un tejido o circular en la sangre. Las CMA tienen varias características. Ellas son autorrenovables y típicamente se dividen asimétricamente para dar lugar a una célula con un linaje más restringido y otra célula madre. La regeneración a través de CMA es la vía más común de la regeneración de tejidos en los organismos multicelulares.

Los epitelios, que representan al 60% de los tipos de tejidos diferenciados en el cuerpo, se regeneran a partir de las CMA que residen en el tejido epitelial.

Ejemplos son la epidermis de la piel, folículos del pelo, las paredes ventriculares del cerebro, el epitelio acústico, y el epitelio de las vías respiratorias y del aparato digestivo. El hígado, que es también un órgano epitelial, contiene una población de células madre que se activan cuando el hígado está dañado más allá de la capacidad de regeneración de las células hepáticas diferenciadas.

Las CMA suelen diferenciarse en una amplia gama de fenotipos dentro de su linaje. Por ejemplo, las células madre hematopoyéticas, las cuales residen en la médula ósea, son multipotenciales y dan origen a eritrocitos, células mieloides, y los varios tipos de células del sistema inmune.

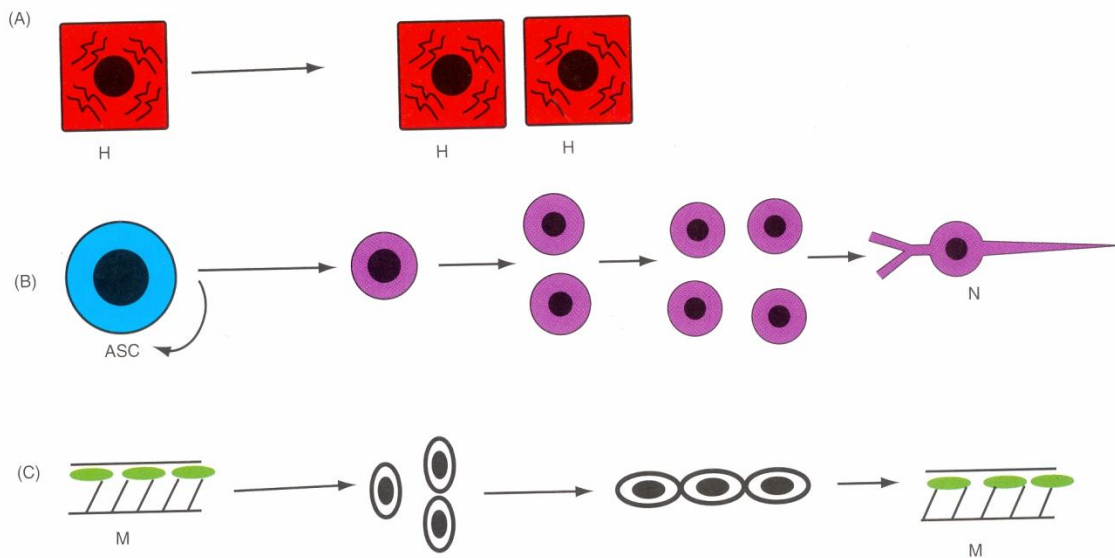
Todas las CMA residen en un micronicho que es el ambiente que mantiene su carácter de células madre. El mantenimiento de las células madre en un estado quiescente requiere la interacción entre las células madre y entre las células alrededor a través de señales solubles e insolubles (factores de crecimiento). En la médula ósea, el mantenimiento de las CMH se basa en su adhesión a los osteoblastos del estroma a través de N-cadherina de las uniones adherentes y las integrinas de unión a fibronectina.

c. Creación de células madre a través de la desdiferenciación.

La diferenciación es una pérdida de especialización fenotípica que convierte las células diferenciadas en células madre adultas, que luego proliferan y se diferencian en tejidos de reemplazo. La desdiferenciación es un mecanismo relativamente común de regeneración en los vertebrados inferiores. Las aletas y bigotes de los peces (teleósteos) se regeneran por desdiferenciación y ciertas especies de lagartijas pueden regenerar la cola por este mecanismo. Las estrellas de la desdiferenciación en el mundo de los vertebrados, sin embargo, son los renacuajos y larvas de anuros y anfibios urodelos adultos. Estos animales pueden regenerar lo mismo tejidos como los mamíferos a través de la hiperplasia compensatoria y CMA residentes, pero usan la desdiferenciación para regenerar una amplia variedad de tejidos y estructuras complejas que los mamíferos no pueden regenerar, incluyendo extremidades, colas, mandíbulas, lentes, médula espinal, retina neural y el intestino.

Vías de transducción de la regeneración de células competentes.

Las células madre residentes interactúan con otras células en el micronicho a través de las vías de señalización que regulan la autorrenovación y la proliferación durante la división asimétrica. Las principales vías de señalización/receptor implicadas tanto en el desarrollo embrionario y el comportamiento de CMA son la vía de señalización Notch, la vía de Wnt, la vía de Hedgehog, la vía del receptor tirosina quinasa, la vía del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) y la vía JAK-STAT. (10)



Los tres mecanismos de regeneración tisular en vertebrados. (A) Hiperplasia Compensatoria. (B) Activación de células madre adultas indiferenciadas residentes. (C) Dediferenciación de células maduras. (10)

Estrategias de la medicina regenerativa.

Tres estrategias principales se están siendo utilizadas para desarrollar terapias clínicas regenerativas. Estos son el trasplante de células, la implementación de construcciones de tejidos bioartificiales (ingeniería de tejidos), y la inducción (farmacéutica) química de la regeneración de tejido en el sitio de la lesión o reclutados de otras partes del cuerpo. Que estrategia se usa depende de cual es más apropiada para la naturaleza del tejido y el grado del daño a reparar.

1. Trasplante de células.

Las células trasplantadas pueden ser autogénicas, alogénicas o xenogénicas, células diferenciadas, células fetales, derivadas de células embrionarias, células madre adultas. Pueden ser normales o genéticamente modificadas para impulsar

la producción de señalizaciones importantes o moléculas de MEC (matriz extracelular), o moléculas que neutralizan factores inhibidores para la supervivencia y proliferación celular.

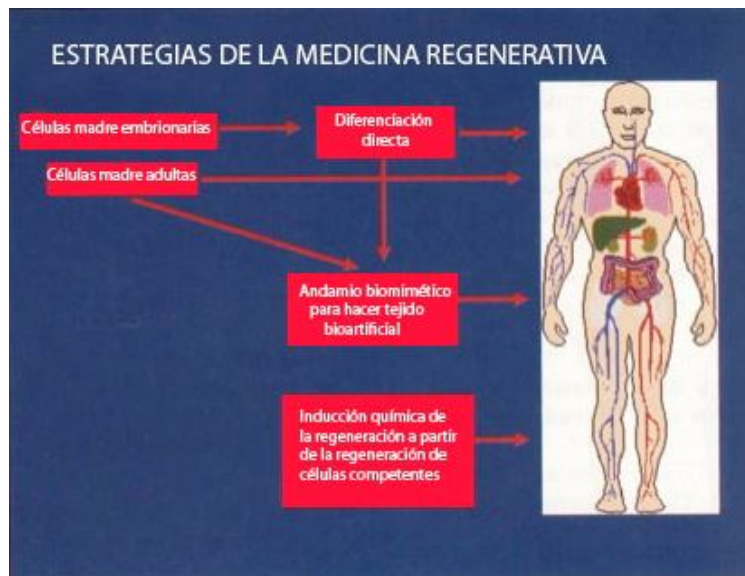
2. Tejidos bioartificiales.

La construcción del tejido bioartificial tiene como objetivo el remplazo de la organización y morfología del tejido antes de la implantación, mediante el uso de andamios en forma de los tejidos u órganos dañados. Idealmente, los andamios de los tejidos bioartificiales imitarían la MEC *in vivo*, proporcionando no sólo la geometría y las propiedades físicas/químicas para maximizar la migración de las células a lo largo del andamios, sino también ser capaces de secuestrar y liberar señales esenciales para la proliferación y diferenciación celular.

3. Inducción de la regeneración *In Situ*.

A pesar que el objetivo inicial del trasplante de células era la diferenciación de las células trasplantadas en nuevo tejido que se convierte en el tejido del huésped, hay evidencia sustancial que las células trasplantadas también secretan factores paracrinos que son protectores para las células del huésped, promoviendo su supervivencia, proliferación, y diferenciación, y elimina las cicatrices. Por lo tanto, una tercera estrategia de la medicina regenerativa es la identificación de estos factores, o pequeñas moléculas que imiten su acción o estimulen sus vías de señalización, y aplicarlos tópicamente por inyección o en plantillas de regeneración en el sitio de la lesión, donde inducirán la regeneración de nuevos tejidos a partir de células de regeneración competentes locales o circundantes. La ventaja de este enfoque es que elimina los problemas asociados con la logística del trasplante de células (cultivo, implantación), inmunorechazo, y problemas bioéticos de un solo golpe y sería relativamente de bajo costo en comparación con otras estrategias.

El éxito de esta estrategia depende de dos cosas. La primera, células regenerativas competentes deben estar presentes en los tejidos no regenerativos o estar circulantes en la sangre, o debemos ser capaces de crearlas mediante la inducción de la desdiferenciación o hiperplasia compensatoria de las células maduras. La segunda, nuestra comprensión de las diferencias de las vías moleculares que distinguen a la regeneración de la cicatrización es limitada e inadecuada. (10)



Estrategias de la medicina regenerativa. (10)

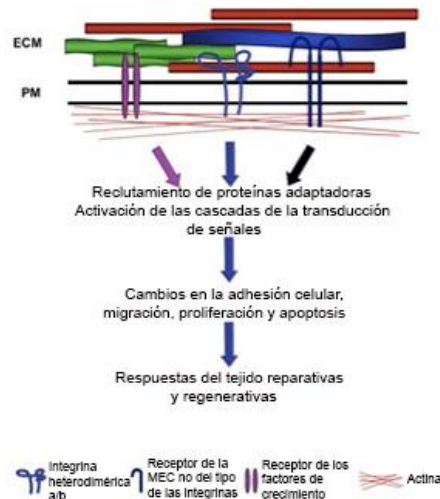
Matriz Extracelular.

La matriz extracelular (MEC) representa una red tridimensional que engloba todos los órganos, tejidos y células del organismo. Entre sus funciones se encuentran la de dar soporte y comunicación entre las células. Constituye un filtro biofísico de protección, nutrición e invasión celular y el terreno para la respuesta inmune, angiogénesis, fibrosis y regeneración tisular. La MEC está compuesta por una compleja mezcla de proteínas, proteoglicanos y glicoproteínas que confieren las propiedades estructurales de las células y los tejidos. Dichas proteínas ejercen a su vez un papel regulados de una extensa variedad de procesos celulares. Cada tipo celular muestra un perfil propio de receptores que constituye la interfaz de comunicación con el microambiente que le rodea. De esta interacción se deriva la morfología celular, su comportamiento y la respuesta a moléculas solubles para los que la MEC sirve de reservorio, como citocinas y factores de crecimiento. De esta manera la MEC activa o deja de hacerlo los procesos celulares de crecimiento, muerte celular, adhesión, invasión, expresión génica y diferenciación. (12)

La MEC es organizada y detectada por las células vía integrinas, receptores de superficie de la célula. (13) Estas interacciones entre las moléculas de ECM y sus receptores pueden transmitir señales directas o indirectamente a moléculas de

señalización dentro de la célula, lo que conduce a una cascada de eventos y la expresión coordinada de una variedad de genes implicados en la adhesión celular, la migración, proliferación, diferenciación, y la muerte

Las interacciones de las células con las moléculas de la matriz extracelular juegan un papel crucial en la cicatrización de heridas y la regeneración. Es la continua interacción entre las células y el ambiente de la matriz circundante que contribuye a los procesos de formación de coágulos, la inflamación, el desarrollo de tejido de granulación, y la remodelación ; y, durante la regeneración, las interacciones de la matriz son importantes en la restauración del tejido dañado. Muchas líneas de evidencia experimental han demostrado que los mecanismos celulares básicos que dan lugar a estos eventos implica la adhesión / de-adhesión, migración, proliferación, diferenciación y apoptosis. Por ejemplo, una lesión al endotelio simultáneamente promueve la adhesión de las plaquetas con el factor von Willebrand (fvW) y a los componentes de la matriz extracelular: estas plaquetas se agregan, se activan, y se adhieren y se encuentran atrapadas dentro del coágulo de fibrina. (14)



Representación esquemática de las interacciones de la célula con la MEC presentes durante las respuestas de curación y regeneración. Tales interacciones entre los receptores de la MEC y sus respectivos ligandos inician cascadas de transducciones de señales que culminan en una variedad de eventos celulares importantes en al reparación y la regeneración, incluyendo cambios en la adhesión celular y la migración y alteración en la tasa de proliferación y la apoptosis. (14)

CAPÍTULO 2. Plaquetas.

Las plaquetas son pequeños fragmentos anucleados que son formados del citoplasma de los megacariocitos y tienen una forma característica discoide. (15)

Formación de plaquetas.

Las plaquetas se forman a partir de los megacariocitos. Para el ensamble y la liberación de las plaquetas, el megacariocito se vuelve poliploide por endomitosis y seguido de un programa de maduración da como resultado la conversión de la mayor parte de su citoplasma en múltiples prolongaciones llamadas proplaquetas. Las plaquetas se forman de manera selectiva en los extremos de las proplaquetas. Mientras que las plaquetas se desarrollan, su contenido de gránulos y organelos es entregado a ellos en una corriente de partículas individuales pasando del cuerpo celular del megacariocito a los brotes nacientes de plaquetas en la punta de la proplaqueta. Una vez que la plaqueta naciente está llena de sus componentes y un microtúbulo se libera a la circulación (15).

Función plaquetaria.

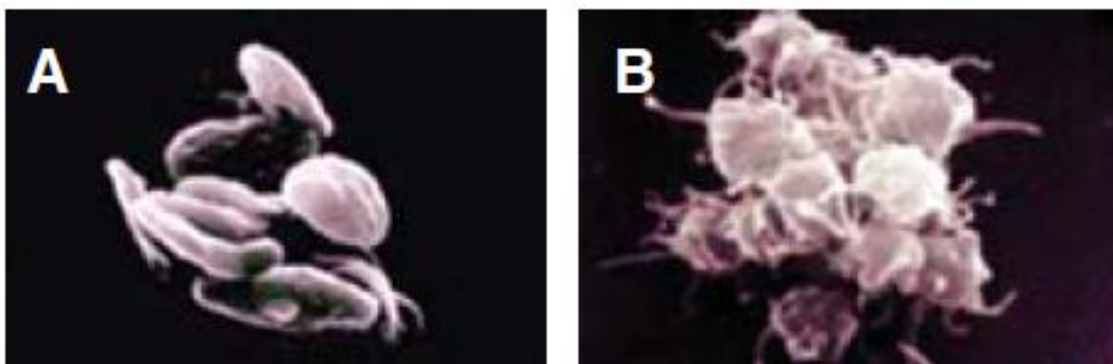
Las plaquetas circulan ordinariamente en los vasos sanguíneos como células individuales que no interactúan con otras plaquetas u otro tipo de células. Una transición de este estado no adhesivo a un estado adhesivo puede ser rápidamente iniciado si las plaquetas son expuestas a un estímulo agonista. La ruptura de la capa de células endoteliales de los vasos expone componentes dentro de la matriz subendotelial, incluyendo una variedad de proteínas de adhesión que pueden apoyar la unión inicial de las plaquetas. Después de la unión, las plaquetas pueden experimentar reacciones que permitan la formación de múltiples y estrechos contactos entre la superficie celular y la matriz. En conjunto con estas reacciones adhesivas, las células encuentran agonistas en el microambiente que pueden desencadenar la secreción de la plaqueta. La respuesta secretora de las plaquetas resulta en la liberación del contenido de los gránulos de almacenamiento intracelular. Estas plaquetas estimuladas interactúan entre sí, durante la agregación de plaquetas, para formar un efectivo tapón que sella la lesión de la pared del vaso y evita la pérdida excesiva de sangre. Esta serie de respuestas de las plaquetas (adhesión, propagación, secreción y agregación) es esencial para la función hemostática de las plaquetas (15).

Adhesión plaquetaria.

Algunas de las principales proteínas de la matriz subendotelial que soportan las reacciones de adhesión y propagación plaquetaria son colágeno, factor von Willebrand (FvW), fibronectina, trombospodina-1, lamininas, microfibrillas. Las plaquetas pueden adherirse a una variedad de sustratos una vez que el endotelio ha sido dañado. El endotelio también debe crear una barrera efectiva para evitar que las plaquetas circulantes lleguen a la matriz e inicien la formación del trombo. Además de servir como una barrera física, las células endoteliales sintetizan y elaboran componentes, en particular la prostanglandina I₂, el óxido nítrico y una enzima llamada CD39 que degradan el ADP, que impiden la activación de las plaquetas y dar un carácter no trombogénico al endotelio normal(15).

Secreción plaquetaria.

Otra función importante de las plaquetas es la liberación de una variedad de sustancias que estimulen o inhiben a las plaquetas o otras células sanguíneas y vasculares, las cuales pueden modificar covalentemente el trombo y afectar sus propiedades mecánicas, así como regular la coagulación, contribuir a los eventos adhesivos celulares, y modular el crecimiento de las células de la pared del vaso. Las plaquetas contienen tres tipos de gránulos: (a) gránulos densos contienen agonistas plaquetarios que sirven para amplificar la activación de las plaquetas, (b) α gránulos que contienen proteínas que mejoran el proceso adhesivo, y (c) gránulos lisosomales que contienen glicosidasas y proteasas que tienen una función no clara en la biología de las plaquetas (15).



A) Plaquetas en Reposos, B) Plaquetas al comienzo de la Activación.

Gránulos Densos.

Las plaquetas contienen aproximadamente de 3 a 8 gránulos densos que son los más rápidos secretados de los organelos de las plaquetas. Los gránulos contienen ADP (el cual es un potente agonista para reclutar otras plaquetas); tras la activación los gránulos liberan ADP así como adenosin trifosfato (el cual es un agonista de otras células de la sangre). Además, liberan aminas biógenas como la serotonina, que puede influir en el tono vascular, y cationes bivalentes (15).

Gránulos α .

Un gran número de proteínas plasmáticas que participan en la adhesión celular y la coagulación están presentes en los gránulos α . Las plaquetas contiene aproximadamente 80 gránulos α que contienen proteínas plasmáticas adhesivas incluyendo vWF, fibrinógeno, fibronectina, y vitronectina así como la proteína adhesiva plaquetaria y celular trombospodina-1 (15).

Los gránulos lisosomales y el citosol de las plaquetas.

Las plaquetas contienen algunos lisosomas primarios y secundarios cuyas enzimas son liberadas. Sin embargo, en comparación con los neutrófilos, las plaquetas son probablemente una fuente menor de hidrolasas lisosomales en la sangre. El factor XII es la principal transglutaminasa contenida en el citoplasma de las plaquetas (15).

Gránulos α .

Aunque en un principio las plaquetas eran conocidas principalmente por su participación en la trombosis y hemostasia, el papel de los gránulos- α en la inflamación, la arteriosclerosis, la defensa del huésped, la curación de heridas, la angiogénesis, y los tumores malignos se ha vuelto cada vez más apreciado como ha sido definida la función de las plaquetas en la fisiopatología de estos procesos (16).

Formación de los gránulos α

El desarrollo de los gránulos α empieza en el megacariocito, pero continúa en la plaqueta circulante. En los megacariocitos, los gránulos- α se obtienen de incipientes vesículas pequeñas que contienen el cargamento de los gránulos α de la red trans-Golgi. El ensamblaje de capa de Clatrina (proteína de cubierta) funciona probablemente en el tráfico vesicular de la red trans-Golgi a los gránulos

α en los megacariocitos. Proteínas adaptadoras asociadas a Clatrina AP-1, AP-2, y AP-3 se encuentran en las plaquetas y son propuestas para la función en la formación de vesículas mediada por clatrina en las plaquetas. La endocitosis mediada por Clatrina también funciona en la entrega de la membrana plasmática hacia los gránulos α . Las vesículas incipientes ya sea de la red trans-Golgi o la membrana plasmática posteriormente puede ser dirigida a los cuerpos multivesiculares (MVBs, multivesicular bodies) (16).

En los megacariocitos, los MVBs sirven en una fase intermedia de la producción de gránulos (16).

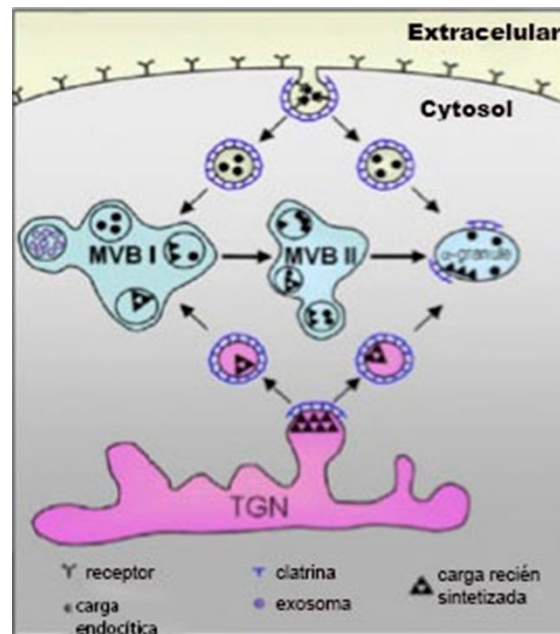


Figura 3. Modelo de la formación de gránulos α . El cargamento de los gránulos α deriva de la red trans-Golgi (TGN) y la endocitosis de la membrana plasmática. Ambos procesos son mediados por clatrina. La endocitosis mediada por receptores se representa en esta figura; sin embargo, pinocitosis de cargamento de gránulos α puede también ocurrir. Las vesículas pueden posteriormente ser liberadas a los cuerpos multivesiculares (MVBs), donde el orden de las vesículas ocurre. Es posible que las vesículas también puedan ser liberadas directamente en los gránulos α . Algunas vesículas dentro de MVBs contienen exosomas. MVBs pueden madurar para producir gránulos α .

Mecanismos moleculares de la liberación de gránulos α .

El contenido de los gránulos α debe ser liberado de su depósito intracelular con el fin de desempeñar su función fisiológica. Los contenidos de los gránulos α son liberados cuando la membrana de los gránulos α se fusiona con una superficie conectada a las membranas de la OCS o la membrana plasmática. SNAREs representan la base de la maquinaria de fusión. Ellas son proteínas asociadas a membrana que están orientadas hacia el citosol. SNAREs asociados con los

gránulos se denomina SNAREs vesiculares (vSNAREs), mientras que aquellas asociadas con el objetivo de la membrana (ejemplo, OCS y membrana plasmática) son denominadas tSNAREs. La asociación de vSNAREs con tSNAREs genera la energía necesaria requerida para la fusión de la membrana.

La función de SNAREs en la secreción de gránulos de las plaquetas debe ser estrictamente regulada para evitar la liberación indiscriminada del cargamento de los gránulos α (16).

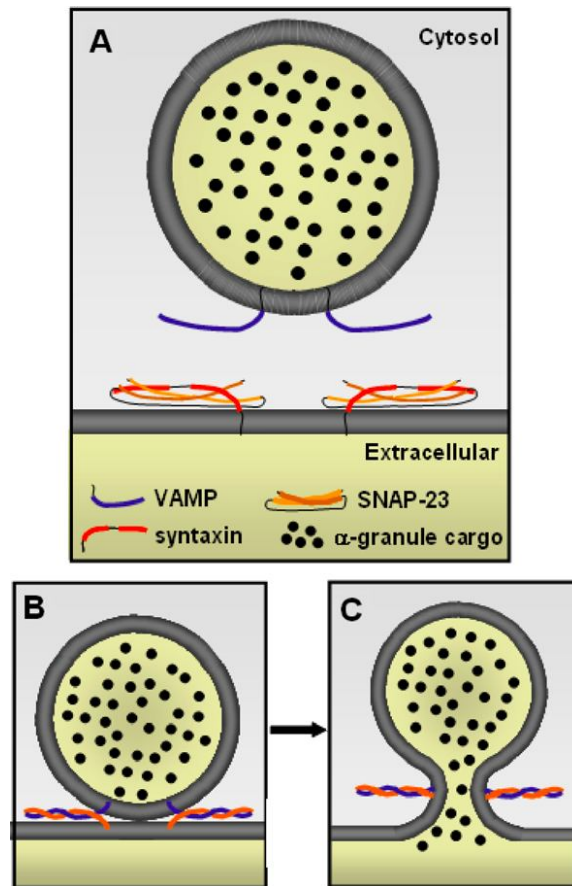


Figura 4. Papel de los SNAREs en la liberación de gránulos α .

Contenido de los gránulos α .

La función de los gránulos α deriva de sus contenidos. El contenido de los gránulos α incluye tanto proteínas unidas a la membrana que se expresan en la superficie de las plaquetas como proteínas solubles que son liberadas en el espacio extracelular (16). Se han detectado más de 300 proteínas en el secretoma de las plaquetas (17, 18).

Además de las moléculas que se sintetizan en el megacariocito y en las plaquetas, las plaquetas pueden introducir moléculas del medio a su interior.

Tabla. Contenido de los gránulos α plaquetarios y sus categorías funcionales.

Proteínas Adhesivas	VWF + pro-péptido, Fg, Fn, Vn, TSP-1, TPS2, laminina-8 (también subunidad laminina- α 5).	Interacciones de contacto de células, hemostasia, constituyentes de la matriz extracelular.
Factores de Coagulación y sus inhibidores	Factor V/Va, factor IX, multimerina, proteína S, quininogeno de alto peso molecular, proteasa nexina 1 y 2, proteína C inhibidora.	Producción del trombo y coagulación. Proliferación celular.
Factores Fibrinolíticos y sus inhibidores	Plasminogeno, Pal-1, u-Pa, α 2-antiplasmina, glicoproteína rica en histidina, inhibidor de la fibrinólisis activado por la trombina (TAFI), α 2- macroglobulina.	Producción de plasmina y modelación vascular.
Proteasas y anti-proteasas	MMP-1, -2,-4, -9, ADAMTS13, ADAM10, ADAM17 (TACE), TIMPs 1-4, inhibidor plaquetario de FIX, inhibidor C1, α 1-antitripsina.	Angiogénesis, modelación vascular, regulación de la coagulación, regulación del comportamiento celular.
Factores de Crecimiento y mitogénicos	PDGF (A, B, y C), EGF, IGF-1,VEGF (A y B), bFGF (FGF-2), HGF, BMP-2,-4, -6, CTGF, SCUBE1, IGFBP3	Quimiotaxis, proliferación celular y diferenciación, angiogenesis.
Quimiocinas, Citocinas y otros	TGF- β 1 y TGF- β 2, IL-1, RANTES (CCL5)IL-8 (CXCL8), MIP-1 α (CCL3),MIP-2 (CXCL2), LIX (CXCL6), GRO- α (CXCL1), ENA-78(CXCL5), SDF-1 α (CXCL12), MCP-1 (CCL2), MCP-3(CCL7), PF4 (CXCL4),**	Regulación de la angiogenesis, quimiotaxis, modelación vascular, interacciones celulares, formación de hueso.
Proteínas Anti-microbiales	Trombocidinas y quinocidinas	Propiedades bactericidas y fungicidas.
Otros	Inmunoglobulinas G y M, albumina, BSDL,	Varias.
Glicoproteínas de Membrana	α IIb β 3, α v β 3, GPIb, PECAM-1, mayoría de los constituyentes de la membrana plasmática, P-selectina, CD63, CD40L, FasL, GLUT3.	Agregación y adhesión plaquetaria, endocitosis de proteínas, secreción, inflamación, generación de trombina, interacciones plaqueta-leucocito y plaqueta-célula vascular.

(17).

Roles funcionales de los gránulos α .

Coagulación.

Las plaquetas secretan muchos mediadores de la coagulación sanguínea. Mientras que los gránulos densos plaquetarios contienen altas concentraciones de compuestos de bajo peso molecular que potencian la activación plaquetaria (ej., ADP, serotonina, y calcio), los gránulos α contienen polipéptidos de gran tamaño

que contribuyen a la hemostasia primaria y secundaria. Los gránulos α secretan fibrinógeno y factor von Willebrand (FvW), proteínas adhesivas las cuales median interacciones plaqueta con plaqueta y plaqueta con endotelio. Receptores adhesivos encontrados en los gránulos α también participan en la adhesión plaquetaria. Componentes del complejo de receptor FvW, GPI-b α -IX-V, el mayor receptor para fibrinógeno, integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, y el receptor de colágeno, GPVI, se encuentran en los gránulos α . A pesar de que estos receptores se expresan de manera constitutivamente en la membrana plasmática de plaquetas, se estima que la mitad a dos tercios de $\alpha_{IIb}\beta_3$ y una tercera parte o más de GPVI residen en las membranas de los gránulos α de las plaquetas en reposo y se expresan después de la activación(16).

Los gránulos α plaquetarios contienen un número de factores de coagulación y cofactores los cuales participan en la hemostasia secundaria. Los factores V, XI, XIII cada uno se localiza en los gránulos α y son secretados en la activación plaquetaria.

Los gránulos α también contienen el precursor inactivo de la trombina, la protrombina, e importantes depósitos de quininógenos de alto peso molecular, los cuales aumentan la cascada de coagulación intrínseca (16).

Además, las plaquetas liberan proteasas inhibitoras, como activador-inhibidor de plasminógeno (PAI-1) y ALFA₂- antiplasmina, la cual limita la fibrinólisis mediada por plasmina (16).

Las plaquetas también contribuyen al balance hemostático mediante la secreción de numerosas proteínas que limitan la progresión de la coagulación. Los gránulos α almacenan antitrombina, que rompe los factores de coagulación activados tanto en la vía intrínseca y extrínseca, e inhibidor C1, el cual degrada calicreína plasmática, factor Xia, y factor XIIIa. Las plaquetas secretan inhibidor de la vía de factor tisular (TFPI, tissue factor pathway inhibitor), proteína S, y proteasa nexina-2 (proteína amiloide β - A4), la cual inhibe los factores Xia Y IXa (16).

Inflamación.

La evidencia acumulada demuestra que las plaquetas contribuyen a la iniciación y propagación del proceso inflamatorio. La función de los gránulos α en la inflamación tanto por expresar receptores que facilitan la adhesión de plaquetas

con otras células vasculares y por la liberación de una amplia gama de quimiocinas. P-selectina, la cual se transloca de los gránulos α a la membrana de la superficie de la plaqueta seguida de la activación plaquetaria, participa en la interacción de la plaqueta con células endoteliales, monocitos, neutrófilos, y linfocitos (16).

Los gránulos α también influyen en la inflamación al secretar altas concentraciones de factores pro-inflamatorios y moduladores inmunes. Estos mediadores inducen el reclutamiento, activación, secreción de quimiocinas, y diferenciación de otras células vasculares y hematopoyéticas. Los gránulos α contienen una amplia gama de quimiocinas incluyendo CXCL1 (GRO-ALFA), CXCL4, CXCL5 (ENA-78), CXCL7 (PBP, BETA-TG, CTAP-III, NAP-2), CXCL8 (IL-8), CXCL12 (SDF-1ALFA), CCL2 (MPC-1), CCL3 (MIO-1ALFA), y CCLA5(RANTES). Entre estos, CSCLA y CACL7 son los más abundantes (16).

Defensa antimicrobial del huésped.

La inmunidad innata es crucial para la sobrevivencia del huésped durante una infección. Las plaquetas tienen un papel temprano en la vigilancia inmune y actúan como células centinela. Ellas reaccionan y envuelven bacterias y virus, liberan proteínas antimicrobiales y antifúngicas, producen especies reactivas de oxígeno y juegan un papel importante en la modulación de las citocinas inflamatorias. Las plaquetas se dice que poseen TLR1, 2, 4, 6, y 9 (17).

Numerosos estudios han demostrado que las plaquetas se encuentran entre los primeros componentes de la sangre en reconocer endotelio dañado por la colonización microbiana y se acumulan en sitios de lesiones endovasculares infectadas. Las plaquetas interactúan directamente con virus, bacterias, hongos y protozoarios (16).

Los gránulos α contienen proteínas con propiedades microbicidas directas, un grupo referido colectivamente como proteínas microbicidas de plaquetas (16).

Las plaquetas también contienen proteínas de complemento y de unión al complemento, que facilitan la eliminación de los microorganismos de la circulación. Los gránulos α secretan complemento C3 y precursor del complemento C4, que participan en la activación de la cascada del complemento. P-selectina se une al C3b, localizando la respuesta inflamatoria a los sitios de daño vascular (16).

Angiogénesis.

Que las plaquetas apoyan la angiogénesis está bien establecido. Sin embargo, el mecanismo molecular de esta función apenas está empezando a ser entendido. Los gránulos α contienen variedad de proteínas pro- y anti-angiogénicas. Factores de crecimiento almacenados en los gránulos α incluyen el factor de crecimiento vascular (VGF, vascular growth factor), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, platelet-derived growth factor), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF, fibroblast growth factor), factor de crecimiento epidérmico (EGF, epidermal growth factor), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF, hepatocyte growth factor) y factor de crecimiento insulínico (IGF, insuline-like growth factor). Estos activadores angiogénicos colectivamente promueven la permeabilidad de la pared del vaso y reclutamiento, crecimiento y proliferación de células endoteliales y fibroblastos. A pesar de que estos factores de crecimiento son secretados por una variedad de células inflamatorias, la rapidez con la cual las plaquetas se acumulan en el sitio del daño vascular las hace una fuente relevante de mediadores mitogénicos. Los gránulos α contienen otros mediadores pro-angiogénicos, incluyendo la angiopoyetina, CXCL12 (SDF-1 α), y metaloproteinasas de la matriz (MMP-1, -2, -9) (16).

Los gránulos α también contienen inhibidores establecidos para la angiogénesis. TSP-1, uno de los principales constituyentes de los gránulos α , actúa como un potente inhibidor de la proliferación de células endoteliales y estimula la apoptosis de células endoteliales. Además contiene otras proteínas anti-angiogénicas, incluyendo angiostatina, endostatina, e inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TMPs-1 Y -4) (16).

Capítulo 3. Factores de crecimiento y citocinas.

Además de la importancia de las interacciones célula con célula y célula con matriz, todas las etapas del proceso de reparación son controladas por una amplia variedad de diferentes factores de crecimiento y citocinas. (19).

Factor de crecimiento epidérmico (EGF) y Factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α)

El EGF pertenece a una familia de factores que ejercen sus funciones al unirse a cuatro receptores de alta afinidad, EGFR/ErbB1, HER2/ErbB2, HER3/ErbB3, y HER4/ErbB4. (19) Serie de experimentos y estudios clínicos han demostrado que EGF y otros miembros de la familia, TGF- α y HB-EGF, tienen efectos positivos en la reparación de heridas. (19)

EGF es mitogénico para una variedad de células epiteliales, hepatocitos y fibroblastos, y está ampliamente distribuido en secreciones de tejidos y fluidos. En la curación de heridas de la piel, EGF es producido por queratinocitos, macrófagos y otras células inflamatorias que migran al área dañada. TGF- α tiene homología con EGF, se une a EGFR, y comparte la mayoría de las actividades biológicas del EGF. (22)

Factor de crecimiento endotelial-vascular (VEGF)

Los VEGF son una familia de proteínas homodiméricas que incluye VEGF-A (que es la que se designa normalmente al hablar de VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y PlGF (Factor de crecimiento placentario). (22) VEGF es un potente inductor la formación de vasos sanguíneos en el desarrollo temprano (vasculogénesis) y tiene un papel fundamental en el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) en los adultos. Los miembros de la familia de VEGF señalizan a través de tres receptores tirosina quinasa: VEGFR-1, VEGFR-2, y VEGFR-3. El VEGFR-2, localizado en células endoteliales y muchos otros tipos celulares, es el principal receptor de los efectos vasculogénicos y angiogénicos del VEGF. (22)

Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)

PDGFs comprende una familia de factores de crecimiento homo o heterodiméricos, incluyendo PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC, y PDGF-DD. Ellos ejercen sus funciones al unirse a tres diferentes receptores tirosina

quinasa transmembranales, los cuales son homo o heterodímeros de cadenas α o β . (19)

Fue el primero que se demostró ser quimiotáctico para la migración de células a la herida, como neutrófilos, monocitos, y fibroblastos. Promueve la proliferación de fibroblastos y la producción de la matriz extracelular por estas células. Promueven la proliferación de los fibroblastos y la producción de la matriz extracelular por estas células. Finalmente induce el fenotipo miofibroblasto en los fibroblastos. (19)

Factor de crecimiento transformante beta (TGF- β)

TGF- β pertenece a una superfamilia de cerca de 30 miembros que incluye tres isoformas de TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3) (22) Esta superfamilia abarca un rango diverso de proteínas, muchas de las cuales juegan importantes papeles durante el desarrollo, homeostasia, enfermedades y reparación. (19)

Las tres isoformas son sintetizadas como precursores latentes, por lo general secretado como un complejo con una proteína unida a TGF- β latente, la cual se elimina a través de un corte proteolítico extracelular. Los TGF- β s activos después ejercen sus funciones biológicas a través de la unión a un complejo receptor heteromérico, constituido por un receptor tipo I y un receptor tipo II, ambos de los cuales son serina-treonina quinasa. (19) In vitro, han mostrado ser mitogénicos para fibroblastos, pero inhiben la proliferación de la mayoría de otras células, incluyendo queratinocitos. Además, TGF- β s son potentes estimuladores de la expresión de proteínas de matriz extracelular e integrinas.(19)

Inmediatamente después de la lesión, TGF- β 1 es liberado en grandes cantidades de las plaquetas. (19)

Factor de crecimiento fibroblástico. (FGF)

FGFs abarca una familia creciente de factores de crecimiento polipeptídicos estructuralmente relacionados, actualmente consistiendo de 22 miembros. Ellos transducen sus señales a través de cuatro proteínas transmembranales tirosina quinasa de alta afinidad, receptores de FGF 1-4 (FGFR 1-4), los cuales se unen a diferentes FGFS con diferentes afinidades. (19)

La mayoría de la familia de FGF tiene un amplio espectro mitogénico. Estimulan la proliferación de varias células de origen mesodérmico, ectodérmico, y también endodérmico. La única excepción es FGF7, también conocido como el factor de

crecimiento de queratinocitos (Keratinocyte growth factor, KGF), el cual parece ser específico de células epiteliales al menos en los organismos adultos (19,23) y es secretado por fibroblastos dermales y células T (23). Además de sus efectos mitogénicos, FGFs también regulan la migración y diferenciación de sus células diana. (19)

FGF1 y FGF2 son moduladores claves en la respuesta proteolítica de la producción de células endoteliales durante la primera fase de la angiogénesis. FGF2 también modula la angiogénesis por la promoción de la expresión de integrinas. En la curación de heridas tienen un papel en la formación del tejido de granulación, remodelación de las fibras de colágeno y organización de los vasos recién formados. Quimiotaxis y proliferación de muchos tipos celulares incluyendo células epiteliales, fibroblastos y queratinocitos. (20)

Factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1)

Los IGF-I es un potente estimulador de la mitogénesis y supervivencia de muchos diferentes tipos celulares, y ejercen sus funciones en una manera autocrina, paracrina o endocrina. (19)

Factor de crecimiento de hepatocitos (HGF).

Fue descubierto como un poderoso mitógeno para los hepatocitos y como un estimulador de la disociación de las células epiteliales. Debido a estas características ha sido designado como HGF O SF (factor de dispersión, Scatter factor). Es predominantemente producido por células de origen mesenquimal y actúa vía receptores transmembranales de alta afinidad tirosina quinasa en varios tipos celulares. (19) Debido a que HGF estimula la migración, proliferación, y producción de metaloproteinasas de la matriz de los queratinocitos, se ha sugerido que juega un papel en la reparación de heridas cutáneas. (19)

Factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF).

GM-CSF solo o en combinación con otras citocinas estimulan el crecimiento de CFU-G, CFU-M, CFU-GM. CFU-GEMM, CFU-DC, CFU-Eo, CFU-MK y BFU-E. (19) Mejora la migración y la proliferación de células endoteliales y promueve el crecimiento de queratinocitos (19,20,23). Junto con su potente efecto sobre las células hematopoyéticas, se ha sugerido que juega un papel importante en la

reparación de heridas cutáneas. (19) Además influye en la actividad de los fibroblastos y aumenta la producción de VEGF (23).

Factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF).

G-CSF es producido por una variedad de tipos celulares incluyendo células estromales de médula ósea, fibroblastos, células endoteliales y macrófagos activados (20).

Eritropoyetina (EPO).

EPO es el regulador primario de la eritropoyesis, y promueve la supervivencia, proliferación y diferenciación de las células progenitoras eritroides. Se produce en los riñones, hígado y en menor concentración en cerebro, placenta, testículos, vaso y pulmón. (20)

La función de la EPO no está restringida a las células eritroides comprometidas. Receptores de EPO se han detectado en células megacariocíticas, en tejido de placenta, en células endoteliales, en células neuronales y en tumores humanos bronquiales. (20)

Trombopoyetina (TPO)

La TPO es el principal estimulador de la megacariopoyesis y la producción de plaquetas. Es producido principalmente por el hígado, y en menor medida por el riñón, bazo, pulmón, médula ósea y cerebro. Se encuentra en circulación pero también se puede encontrar almacenado en las plaquetas (34). En modelos animales se ha encontrado que la administración de la TPO reduce la fibrosis en el hígado y estimula la regeneración después de una hepatectomía a través del incremento y acumulación de las plaquetas en el hígado cirrótico. (35)

Tabla. Citocinas y actividades biológicas.

Nombre de la citocinas, abreviación, y nombres alternos.	Actividades biológicas.
Factor de crecimiento epidermal (Epidermalgrowth factor, EGF) (urogastrona)	Actividad mitogénica y diferenciación en una gran variedad de tipos de células, tanto <i>in vitro</i> como <i>in vivo</i>
Factor de crecimiento transformante alfa (Transforming growth factor alpha, TGF- α)	Igual a EGF (puede ser la analogía fetal del EGF). La resorción ósea y la curación de heridas
Factor de crecimiento tipo insulínico – I (Insulin-like growth factor - I, IGF-I) (somatomedina C)	Mediador de la actividad de la hormona del crecimiento. Crecimiento/diferenciación de células de tumores

Factor de crecimiento tipo insulínico –II (Insulin-like growth factor -II, IGF-II) (multiplication stimulating activity)	Similar a IGF-I (puede ser análogo fetal de IGF-I)
Factor de crecimiento derivado de plaquetas (Platelet-derived growth factor, PDGF), tres isoformas: PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB	Mitogénico para células de músculo liso y variedad de células tumorales. Estimulador de la quimiotaxis de células de tejido conectivo. Curación de heridas.
Factor de crecimiento vascular endotelial (Vascular endothelial cell growth factor, VEGF) (vasculotropina)	Mitogénico para las células endoteliales vasculares (vasculogénesis, angiogénesis), curación de heridas.
Factor de crecimiento de fibroblasto ácido (Acidic fibroblast growth factor, aFGF) (prostatropina)	Fuerte actividad mitogénica para varios tipos de células, incluyendo fibroblastos, células endoteliales, células neuroectodermal; curación de heridas.
Factor de crecimiento de fibroblastos básico (Basic fibroblast growth factor, bFGF) (otros nombres igual al aFGF)	Igual como para aFGF
Factor de crecimiento de queratinocitos (Keratinocyte growth factor, KGF) (FGF-7)	Actividad mitogénica para queratinocitos; curación de heridas.
Factor de crecimiento de hepatocitos (Hepatocyte growth factor, HGF) (factor de dispersión)	Actividad mitogénica para hepatocitos <i>in vitro</i> . promotor de la motilidad e invasión a la matriz de las células epiteliales.
Factor de crecimiento transformante beta-1 (Transforming growth factor beta-1, TGF-β1) (factor inductor de cartílago-1)	Actividad mitogénica o antiproliferativa dependiendo del tipo de célula. Actividad regulatoria en la formación de matriz extracelular. Antiinflamatoria, curación de heridas, etc.
Factor de crecimiento transformante beta-2 (Transforming growth factor beta-2, TGF-β2) (factor inductor de cartílago-2)	Así como TGF-β1 (As)
Factor de crecimiento de colonias granulocíticas (Granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF)	Estimula principalmente proliferación/diferenciación de neutrófilos (precursores granulocitos y células maduras). Diferenciación de líneas celulares de leucemia
Factor estimulante de colonias granulocitos-macrófago (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF)	Estimula la proliferación de progenitores granulocitos, monocitos y otros progenitores hemapoyéticos. Activa granulocitos y monocitos maduros. Muy pleiotropico.
Factor estimulante de colonias de macrófagos (Macrophage colony-stimulating factor, M-CSF) (factor estimulante de colonias (colony-stimulating factor, C-SF1))	Estimula el crecimiento de colonias monocítica, apoya la sobrevivencia de monocitos <i>in vitro</i> . Activa monocitos maduros.
Eritropoyetina (Erythropoietin, EPO)	Estimula la proliferación de progenitores eritroides comprometidos. Induce la formación de hemoglobina
Trombopoyetina (Thrombopoietin, TPO)	Estimula el desarrollo de los megacariocitos.

(21)

Transducción de señales.

La mayoría de los receptores de los factores de crecimiento derivados de plaquetas pertenecen a la familia de proteínas tirosina quinasa (24).

Características principales de los Factores derivados de Plaquetas

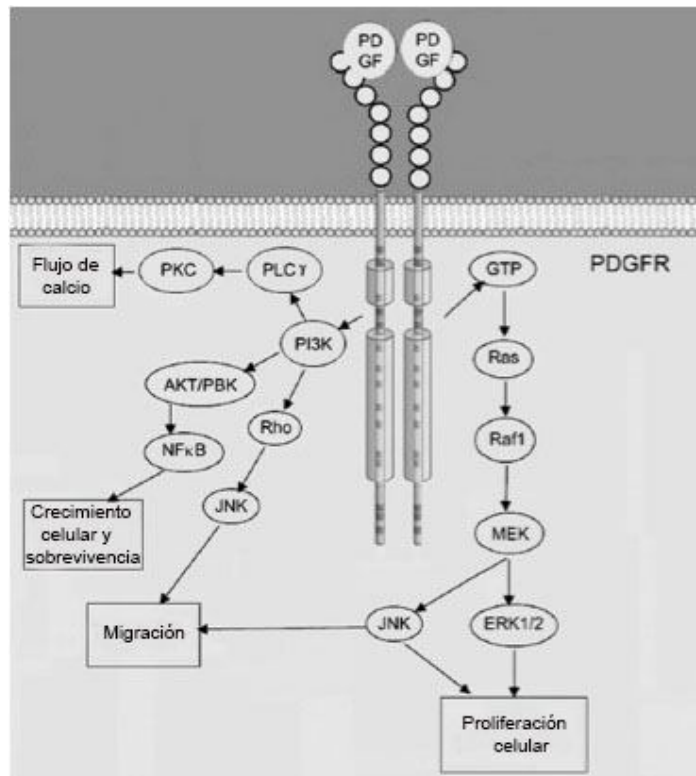
<u>Factor de Crecimiento</u>	<u>Tipo de Receptor</u>	<u>Acción bajo condiciones fisiológicas</u>	<u>Funciones principales</u>
<u>PDGF</u>	<u>Tirosina quinasa</u>	<u>Autocrina y paracrina</u>	<u>Mitogénico; quimiotáctica</u>
<u>VEGF</u>	<u>Tirosina quinasa</u>	<u>Autocrina y paracrina</u>	<u>Mitogénico para células vasculares endoteliales; angiogénico; quimioatravente para monocitos; induce la síntesis de las metaloproteinasas, colagenasa intersiticial; diferenciación de adipocitos</u>
<u>EGF</u>	<u>Tirosina quinasa</u>	<u>Autocrina</u>	<u>Mitogénico, proliferación, diferenciación, angiogénesis</u>
<u>TGF-β</u>	<u>Serina/Treonina quinasa</u>	<u>Autocrina y paracrina</u>	<u>Inhibidor del crecimiento de las células epiteliales, endoteliales, fibroblastos, neuronales, linfoides; angiogénesis; estimula el crecimiento de algunos tipos celulares de origen mesenquimal incluyendo fibroblastos y osteoblastos; induce la síntesis de la matriz del hueso y la MEC</u>
<u>bFGF</u>	<u>Tirosina quinasa</u>	<u>Autocrina y paracrina</u>	<u>Mitógeno; diferenciación; angiogénesis</u>
<u>IGF 1</u>	<u>Tirosina quinasa</u>	<u>Autocrina y paracrina</u>	<u>Mitógeno. Diferenciación</u>

(24)

Las señales extracelulares son transformadas en funciones específicas dentro de la célula a través de una cascada de eventos generalmente conocida como transducción de señales. (24)

Transducción de señales del PDGF.

La estimulación de la transducción de señales del PDGF ocurre a través de los receptores tirosina quinasa (RTKs). Muchos de los genes reguladores de la reorganización de la actina, movimiento celular, y la inhibición de la apoptosis son inducidos por la activación de PI3K. La fosforilación de la PLCγ incluye la activación directa de la proteína y la regulación del flujo de calcio de iones. Un grupo heterogéneo de quinasas mediadoras está implicado en varias y diversas funciones celulares incluyendo la quimiotaxis, migración celular, inflamación, diferenciación y la supervivencia celular. Ellas se pueden subdividir en 3 familias principales: quinasas reguladas por señales extracelulares (extracellular signal-regulated kinase, ERK), quinasa p38, y la quinasa c-Jun N-terminal. (24)



Señalización de PDGF a través de PDGFR. La activación de PI3K es el elemento eje para que la transducción de varios genes ocurra, regulación de la reorganización de actina, movimiento celular, y la inhibición de la apoptosis. El flujo de iones de calcio es regulado por la activación secuencial de PI3K, PLC γ , y PKC. Un grupo heterogéneo de quinasas mediadoras como las ERK, MEK (quinasas MAPK), y quinasas c-Jun N-terminal está involucrado en la quimiotaxis, migración celular y la proliferación.

Transducción de señales de VEGF.

El sistema del VEGF (ligando y receptores) es complejo. Además de los varios miembros de VEGF (A, B, C, D) existen varias isoformas con diferentes actividades biológicas y 3 receptores (VEGFR1-3), los cuales son RTK.

La señalización del VEGF está ampliamente mediada por el VEGFR2.

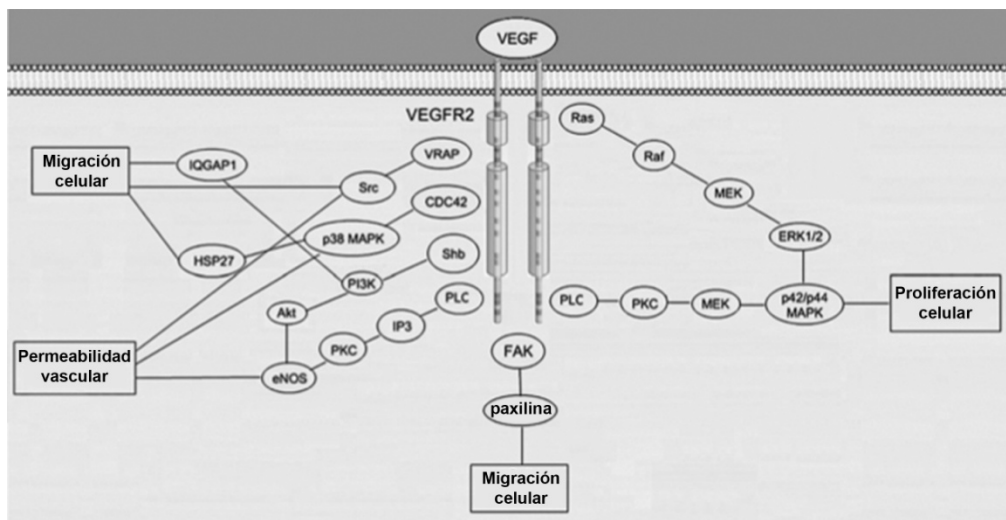
Al menos 6 vías están implicadas en la señalización del VEGFR2 para las 3 funciones principales que se promueven. Las vías para realizar estas funciones (que convergen en una superfunción, la angiogenesis) se resumen como sigue.

La permeabilidad vascular. Cuatro distintas vías son iniciadas por la fosforilación del VEGFR las cuales sustentan la permeabilidad vascular. Una de estas vías es iniciada por la fosforilación de PCL γ que activa la cascada inositol trifosfato, la entrada de calcio, la activación de la proteína C quinasa (PCK) y la sintetasa oxido nítrico endotelial (eNOS). La segunda está asociada a la proteína VRAP (proteína asociada al receptor VEGF) que activa la vía Src/STAT3 que a su vez controla tanto la permeabilidad vascular y/o la migración celular. La tercera es la que es

iniciada por la por la molécula adaptadora Shb que activa la cascada PI3K-AKT-Enos. Finalmente la cuarta vía incluye la activación de CDC42 y p38MAPK.

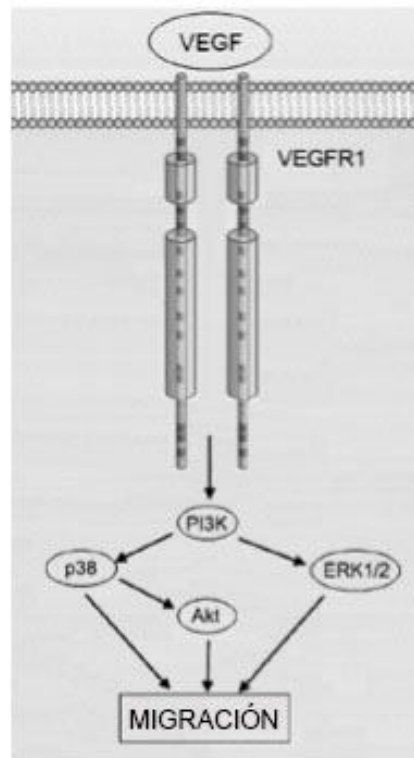
La migración celular. El VEGFR es conocido por provocar la migración celular por medio de 4 vías diferentes. Una es iniciada a través de la activación de CDC42 y p38 MAPK induciendo la fosforilación de la proteína de shock térmico 27 (Hsp27) que regula la reorganización de la actina y la migración celular. La segunda es iniciada por Shb-PI3K que activa a la proteína activadora de la GTPasa (IQGAP1) la cual regla la migración celular. La tercera es iniciada por VRAP anteriormente descrita. La cuarta vía incluye a la quinasa de adhesión focal (FAK) y su sustrato paxilina. La migración celular es también activamente modulada por el receptor VEGFR1 a través de de la fosforilación de PI3Ky varios mediadores involucrados en la transducción de señales.

La proliferación celular. El receptor VEGFR2 activa 2 distintas vías de señalización que llevan a la proliferación celular, y estas vías tienen un factor intermedio común, la MEK1/2. La primera y más importante vía es la iniciada por PLCy que lleva a la activación de PKC, MEK1/2, p42/p44 MAPK. La segunda vía es la clásica cascada de Ras-Raf-MEK1/2-MAPK. (24)



Síntesis esquemática de la señalización moderada por el VEGFR2. La permeabilidad vascular es sustentada por 4 vías.

Una es iniciada por PCLy que activa la cascada PI3K, PKC, y eNOS. Una es iniciada por VRAP que controla tanto la permeabilidad vascular como la migración celular. Una es iniciada por la molécula adaptadora Shb que activa la cascada PI3K-AKT-eNOS. Otra vía incluye la activación de CDC42 y p38 MAPK. Cuatro vías también sustentan la migración celular. Una es la que es iniciada por la activación de CDC42 llevando a la fosforilación de HSP27 que regula la reorganización de la actina y la migración celular. Otra es la iniciada por Shb-PI3K; después PI3K activa a IQGAP1 que regula la migración celular. Otra es la iniciada por VRAP previamente descrita. Y la ultima que incluye la activación de FAK y su sustrato paxilina. La proliferación celular está sustentada por dos distintas vías de señalización que tienen un común un factor intermedio, la quinasa MAPK (MEK 1/2).



Señalización a través de VEGFR1. La activación de PI3K es el elemento clave para la transducción de señales que lleva a la migración celular inducida a través de la activación de 3 diferentes quinasas: p38, AKT, y ERK 1/2.

Transducción de señales del EGF.

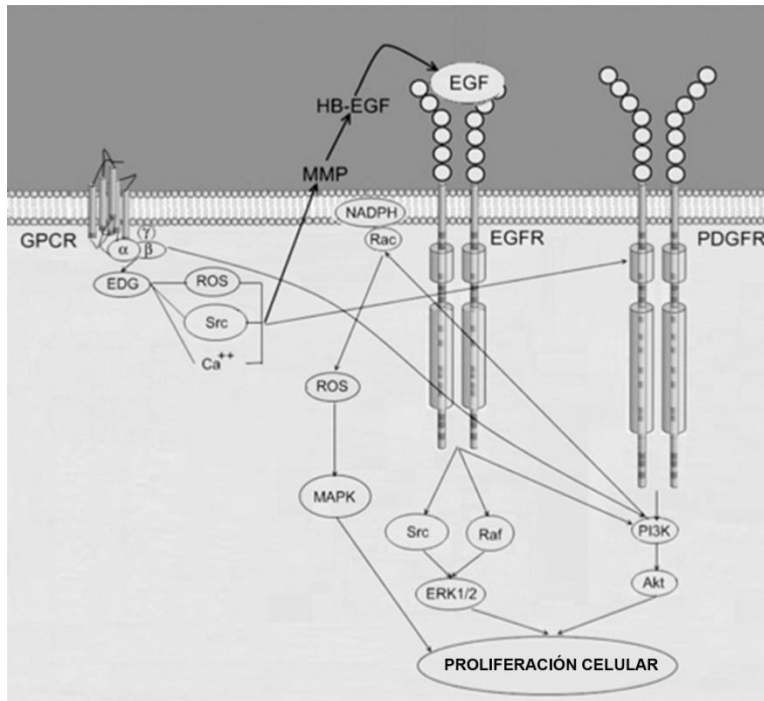
El EGFR se comunica/coopera con otros receptores de membrana celular, particularmente con los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs).

Los GPCRs y RTKs se modulan y transactivan mutuamente, por lo tanto, cooperan en la activación y difusión de las vías de señalización de sus propios cursos.

Los receptores de los factores de crecimiento derivado de plaquetas pueden directamente transactivarse a través de la activación de GPCR. Al contrario, los EGFR son indirectamente transactivados a través de la activación de las metaloproteasas de la matriz, que a su vez disocian HB-EGF haciendo a EGF soluble y disponible para unirse al EGFR para su vía de señalización.

Las señalizaciones mediadas por RTK y GPCR comparten varias vías relacionadas incluyendo Rac, especies reactivas de oxígeno (ROS), PI3K y MAPK.

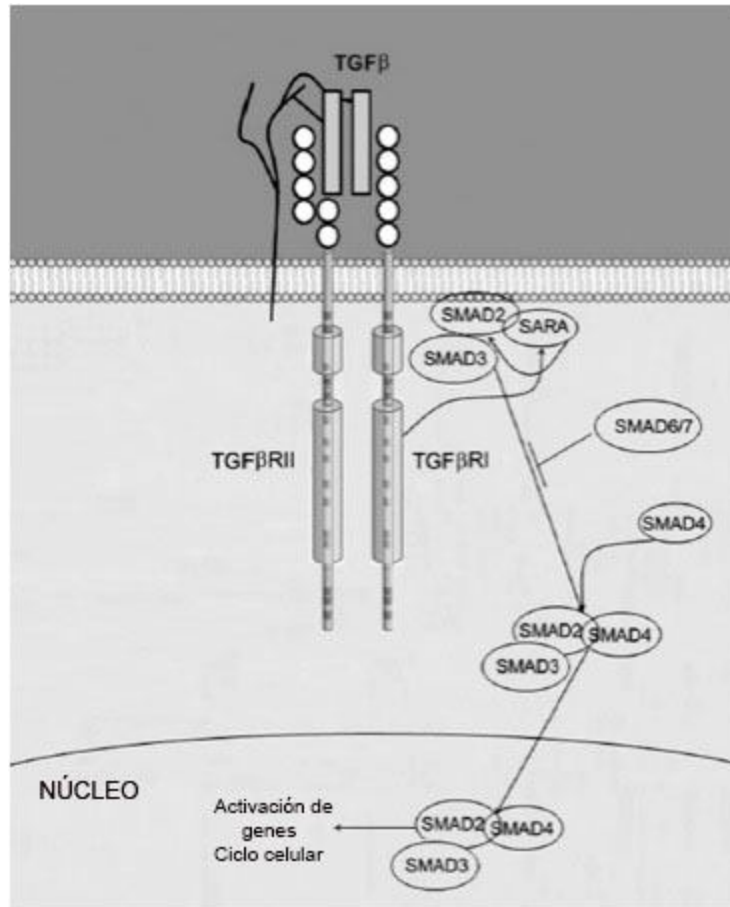
(24)



Señalización del EGF y la transactivación del receptor. En la interacción de EGF con su receptor (EGFR), este se somete a una dimerización y autofosforilación. La proliferación celular es inducida ya sea a través de la activación de ERK 1/2 por medio de complejos adaptadores y de la vía Ras/Raf o a través de la activación de PI3K y Akt. Los EGFR se comunican con otros receptores de membrana celular, particularmente con los GPCRs.

Transducción de señales del TGF- β

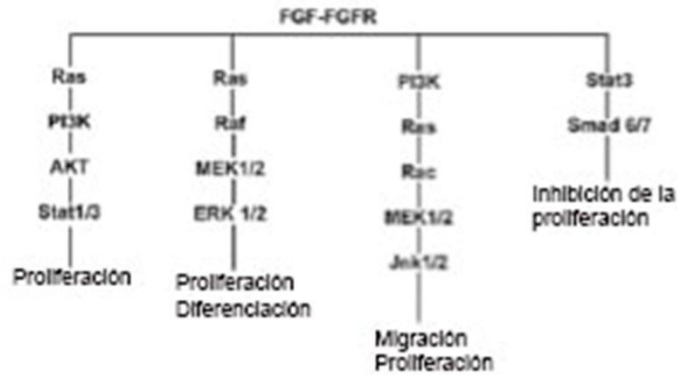
El receptor para TGF- β es tipo serina/treonina quinasa. Una vez que el TGF- β se une, los receptores tipo I y tipo II se asocian en tetrámeros. Los receptores tipo II fosforilan a los receptores tipo I. tal fosforilación activa los dominios quinasas que a su vez activan las Smads. Smads2,3 y 4 transducen las señales de TGF- β , mientras que Smad6 y 7 modulan/inhiben tal cascada de señalización. La vía de señalización de TGF- β mantiene comunicación activa con otras vías de señalización. (24)



Señalización de TGF- β . Al unirse TGF- β , los receptores tipo I y tipo II se asocian en tetrámeros y el receptor tipo I se fosforila. El receptor por lo tanto es activado y a su vez activa las Smads. Smads2, 3 y 4 transducen las señales de TGF- β , mientras que SMAD6 y 7 modulan/inhiben tal cascada de señalización.

Transducción de señales del FGF.

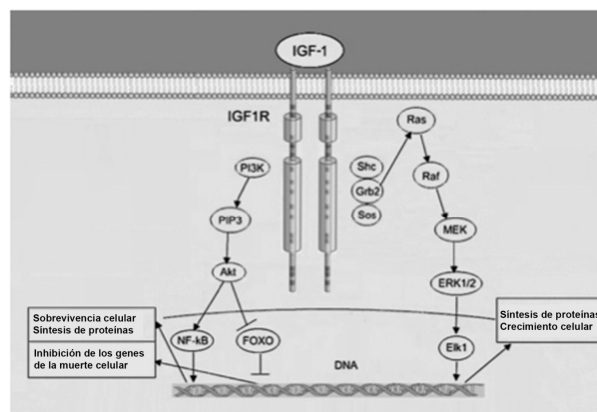
Ellos transducen sus señales a través de cuatro receptores RTK de alta afinidad, FGFR1-4. Los FGF tienen una alta afinidad por la heparina, sulfato de heparina y proteoglicanos, los cuales estabilizan estructuras tetraméricas formadas por 2 moléculas de bFGF y 2 moléculas de FGFR. (24)



Vías de transducción de señales del FGF. Los receptores del FGF comparten la mayoría del repertorio de las quinasas (PI3K, AKT, MEK, ERK, Jnk) con otros RTK.

Transducción de señales del IGF-1.

La unión del ligando induce una autofosforilación del residuo de tirosina del receptor del IGF-1 (IGF1R), activando múltiples cascadas de vías de señalización, incluyendo las vías de señalización de Ras, Raf, MEK, ERK, Elk, y la vía de PI3K-Akt. Estas vías están involucradas en el crecimiento celular y la inhibición de la apoptosis. La vía de PI3K-Akt desencadena 2 principales mecanismos efectores a un nivel de transducción de genes. Uno, mediado por la activación del factor de transcripción NF-kb, llevando a la síntesis de proteínas, y el otro mediado por la inhibición del factor de transcripción FOXO, que lleva a la supervivencia celular a través de la inhibición de la apoptosis. (24)



Señalización de IGF-1. La unión de IGF-1 con su receptor de membrana celular (IGF1R) activa múltiples cascadas de señalización reclutando las quinasas habituales de los RTK y sus intermediarios como Ras, Raf, MEK, ERK, Elk y la vía de PI3K-Akt.

Capítulo 4. Inmunidad.

Una característica fundamental de la condición de la no curación y la cicatrización excesiva es una respuesta inflamatoria exagerada y prolongada en el sitio de la herida. El papel que desempeñan las células inflamatorias en la reparación de los tejidos fisiológicos y patológicas, hasta hoy, no ha sido claramente definido.

Entre los vertebrados, anfibios y peces son excepcionales en su capacidad para regenerar tejidos y órganos anatómicamente completos y totalmente funcionales en la edad adulta. En particular, los anfibios urodelos pueden regenerar una diversidad de órganos y tejidos. En los anfibios urodelos, la regeneración implica desdiferenciación de células en el sitio de la lesión de amputación, seguido por su proliferación para producir un blastema que finalmente reforma el tejido perdido. La excelente capacidad de regeneración puede estar relacionado con el hecho de que la respuesta regenerativa induce solamente inflamación mínima en estas especies. Sin embargo, hasta la fecha pocos estudios han abordado la interrelación de la respuesta inmune y la regeneración de extremidades en los peces y anfibios.

Evidencia sugestiva de un papel negativo de la respuesta inflamatoria local en la capacidad de regeneración se obtiene de estudios realizados en especies de anuros, en particular *Xenopus laevis*. La pérdida gradual de la capacidad regenerativa de los tejidos en desarrollo y la maduración simultánea del sistema inmunológico cuando se acercan y pasan por una metamorfosis (transición de larva a adulto) está bien documentada. La pérdida regenerativa es paralela a la maduración progresiva del sistema inmunológico. Las diferencias entre el sistema de defensa más primitivo de larvas y el refinado sistema inmune después de la metamorfosis son significativas e incluso resultan en histoincompatibilidad entre tejidos de larvas y adultos. Por lo tanto, es intrigante especular que el desarrollo del sistema inmunológico puede ser responsable de la pérdida gradual de la capacidad de regenerarse.

Los efectos de la inflamación también han sido estudiados en diversos sistemas de modelos mamíferos. Durante la vida posnatal, la respuesta reparadora de la mayoría de los organismos mamíferos no da como resultado la regeneración del tejido sino la formación de cicatrices con pérdida parcial de la función del órgano. Por el contrario, al respuesta de reparación durante el periodo fetal temprano es

regenerativa y sin cicatrices. La característica de la reparación fetal es la falta de una respuesta inflamatoria típica, lo que sugiere que la ausencia de inflamación es un requisito previo de la regeneración y reparación sin cicatrices.

La respuesta inflamatoria tras una lesión involucra no sólo las diferentes clases de tejidos residentes y tipos de células hematopoyéticas reclutadas sino también las células del estroma y parénquima son capaces de adoptar un fenotipo inflamatorio y contribuir a la inflamación mediada por la lesión.

Leucocitos polimorfonucleares.

El reclutamiento de los neutrófilos comienza el desbridamiento del tejido desvitalizado y ataca agentes infecciosos. Para realizar esta tarea, ellos liberan un gran variedad de sustancias antimicrobiales altamente activas (especies reactivas de oxígeno, péptidos catiónicos, eicosanoides) y proteasas. Una liberación descontrolada de estos factores puede causar un daño severo en los tejidos del huésped. Estudios han demostrado que la reparación no es afectada por neutropenia y la reepitalización fue significativamente acelerada. En contraste, pacientes con enfermedades caracterizadas por la deficiencia en la función de PMN, como LAD1, exhiben problemas de cicatrización. Por lo tanto, adicionales estudios son requeridos para entender el papel de los neutrófilos en la reparación.

Monocitos y macrófagos.

Además de sus funciones como célula presentadora de antígeno y fagocítica, los macrófagos se cree que desempeñan un papel integral en una respuesta de curación exitosa a través de la síntesis de factores de crecimiento, como TGF-beta, TGF-alfa, bFGF, PDGF, VEGF, los cuales en conjunto promueven la proliferación celular y la síntesis de moléculas de la matriz extracelular por las células de la piel residentes. Una reducción de los macrófagos utilizando antisueros resultó en un retraso significativo de la curación. Estudios más recientes han apoyado y extendido estas observaciones. (25)

A medida que los monocitos extravasan desde el vaso sanguíneo se activan y se diferencian en macrófagos tisulares maduros. Esta transformación implica cambios mayores en la expresión de genes y en la función celular (25).

Dependiendo del estímulo, los macrófagos activados adquieren actividades microbicidas, pro-inflamatorias, y anti-tumorales, pero también pueden contribuir a

la reparación de tejido, la resolución de la inflamación, y el crecimiento de células tumorales y la metástasis. Estos dos extremos del espectro de activación de los macrófagos han sido acuñados como activación “clásica”/M1 y activación “alternativa”/M2 y desempeñan papeles/características opuestos durante las respuestas inmunes e inflamatorias. A pesar de que el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) y el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) contribuyen a la diferenciación del macrófago, como citocina promueve la adquisición de distinta susceptibilidad a patógenos y funciones inflamatorias. Los macrófagos derivados del GM-CSF (M1) son proinflamatorios y potencian las respuestas Th1, mientras que los macrófagos derivados del M-CSF (M2) secretan IL-10 en respuesta a patógenos y no activan las respuestas de Th1. (26)

Células cebadas.

Las células cebadas son un subtipo adicional de leucocitos representado en la mayoría de los tejidos. Son una importante fuente de mediadores proinflamatorios y citocinas que pueden promover la inflamación y los cambios vasculares. Por estas razones, se sospecha que las células cebadas juegan un papel en la respuesta de la lesión tisular. (25)

Células T.

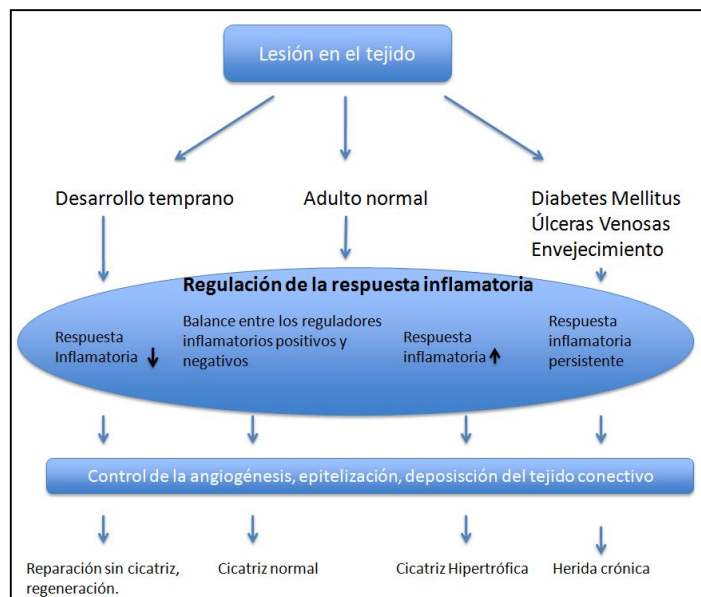
Durante la fase de maduración de tejido, cuando el cierre de la herida se ha completado, y las infecciones locales ya han sido superadas, las células de la respuesta inmune adaptativa, en particular las células T constituyen el subconjunto de leucocitos más frecuentes en las heridas de la piel humana.

Definitiva comprensión de la función de las células T, en particular la función de los distintos subtipos de células T durante la reparación requiere más investigación. Es probable que los subtipos celulares Th1 y Th2 regulen diferencialmente el microambiente de la herida por los distintos perfiles de secreción de citocinas. Las células T podrían también influenciar en la respuesta de la curación por las interacciones directas célula-célula con células residentes y no residente en el sitio de la herida. Interacciones entre CD40 y CD40L han sido reportadas en desempeñar un papel importante en estas interacciones. El CD40L expresado en células T puede interactuar con el CD40 expresado en

queratinocitos, fibroblastos, plaquetas, y macrófagos, y por lo tanto alterar sus perfiles de expresión de los mediadores inflamatorios, y consecuentemente, funciones de reparación (25).

Impacto de la inflamación en la reparación de tejidos bajo condiciones patológicas.

La incidencia y prevalencia de heridas crónicas está incrementando como resultado del envejecimiento de la población y el incremento de los factores de riesgo como la aterosclerosis, la obesidad y la diabetes. La comprensión avanzada de las bases moleculares en la reparación y la inmunidad ojala lleve al desarrollo de enfoques terapéuticos eficaces para mejorar la calidad de la reparación. (25)



Este modelo hace hincapié a que la respuesta inflamatoria seguida de un daño determina la calidad de la respuesta de reparación. (25)

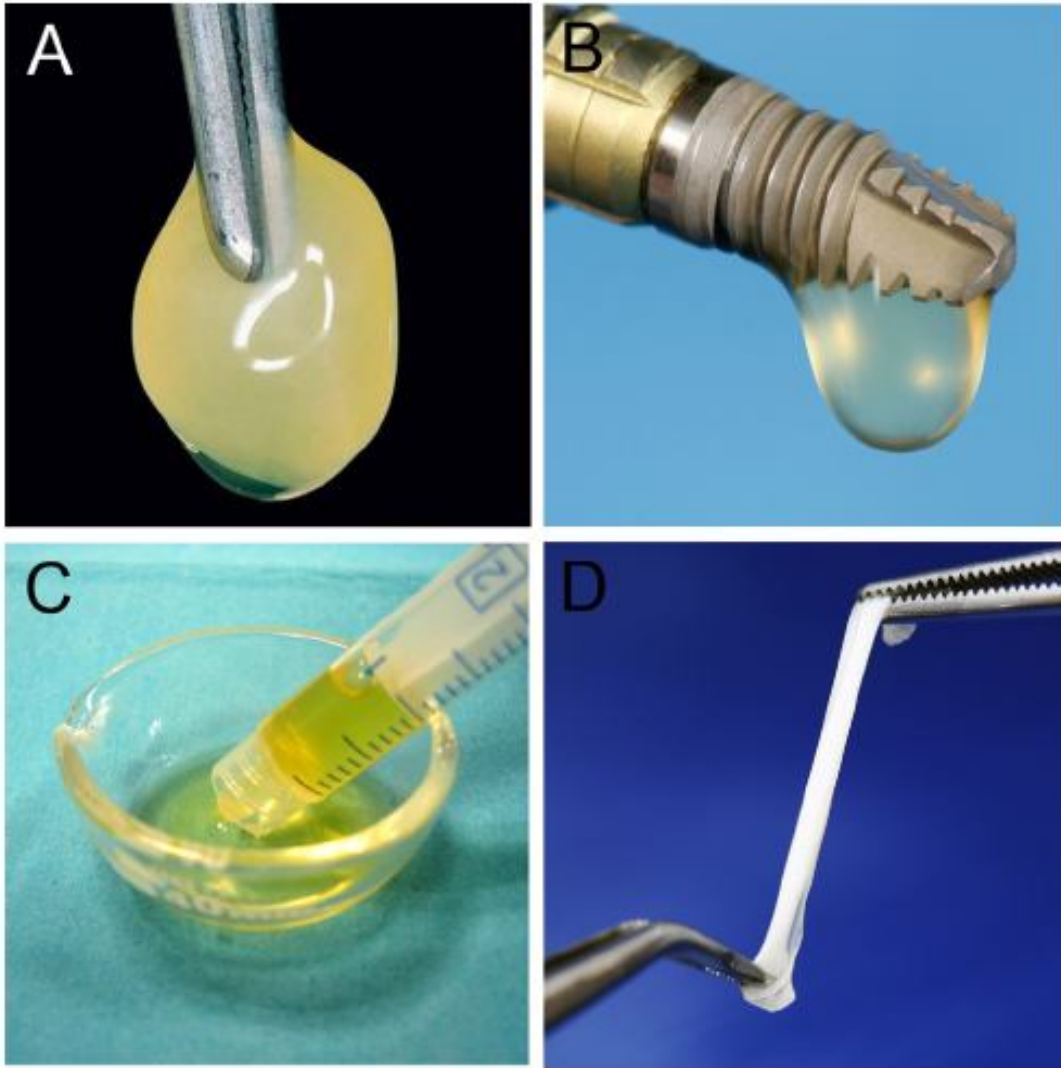
Capítulo 5. Aplicaciones Clínicas.

Como se analizó anteriormente, las plaquetas contienen gran cantidad de moléculas que no solo sirven para la hemostasia, sino también contribuyen para el proceso posterior de reparación y regeneración. Las plaquetas se pueden obtener fácilmente por medio de una toma de sangre.

Formulaciones.

Cuatro diferentes formulaciones ricas en factores plaquetarios autólogos con potencial terapéutico son obtenidas de la sangre del paciente, dependiendo del tipo de activación de las muestras. Estas formulaciones pueden ser utilizadas para diferentes fines terapéuticos:

- 1.- Coágulo, es una matriz tridimensional, contiene factores de crecimiento autólogos, tanto del plasma como de proteínas de plaquetas y componentes fibrilares y celulares. Puede ser usada en el tratamiento de úlceras, defectos de regeneración de hueso, y para métodos de ingeniería de tejidos, entre otros.
- 2.- Líquida, con concentrado de plaquetas no activadas, las cuales se activan minutos antes de su aplicación. Tiene un estado líquido inicial, pero progresará en una matriz de fibrina tridimensional rica en factores de crecimiento y proteínas una vez aplicada. Algunos de los usos potenciales de esta solución líquida incluyen diferentes modalidades de cirugías e infiltraciones de tejido.
- 3.- Sobrenadante, compuesto principalmente de plasma y factores de crecimiento plaquetarios y proteínas usadas como gotas para los ojos y cultivo celular.
- 4.- Membrana de fibrina. Al final del proceso de coagulación, el coágulo de fibrina se retracta. En esta etapa, la membrana de fibrina puede ser moldeada con pinzas o instrumentos similares para obtener una membrana elástica, densa y suturable. Este biomaterial natural es biológicamente activo como diferentes factores de crecimiento derivados de plaquetas y proteínas están encerrados dentro de la red de fibrina proporciona una excelente herramienta para sellar los defectos quirúrgicos, y promover la epitelización completa en tejidos blandos. (27, 28)



Las 4 formulaciones ricas en factores plaquetarios autologos: (A) Coágulo, (B) la formulación líquida, activada en el momento, en una superficie de titanio, (C) el sobrenadante, y (D) la membrana de fibrina. (27)

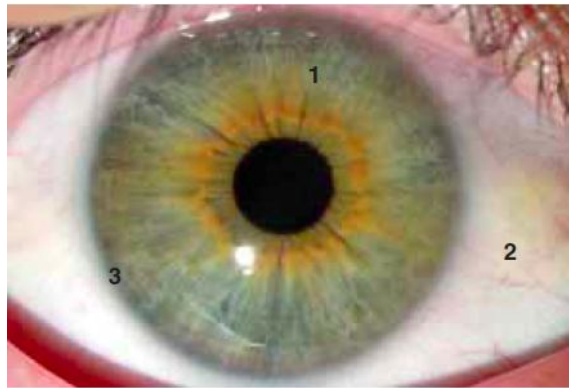
Los productos de plaquetas autólogas tienen un alto potencial terapéutico y pueden ser usados en varias formulaciones y en varios campos de la medicina e ingeniería de tejidos. En la actualidad, hay más de 40 de estos productos con diferentes características, en términos de enriquecimiento de plaquetas, presencia de leucocitos, tipo de activador, y volumen final entre otros. Esta gran variabilidad hace difícil la estandarización de protocolos y comparar resultados. (27)

Oftalmología

Desde que por primera vez Fox et al describiera el uso de suero con factores plaquetarios autólogo en pacientes con queratoconjuntivitis lacrimonal, ojo seco, su utilización ha ido en aumento, de forma que se está utilizando como una nueva forma de terapia en el manejo de enfermedades de la superficie ocular. (29)

Anatomía de la superficie del ojo.

La superficie del ojo está compuesta por la córnea, la conjuntiva (membrana delgada que cubre la esclerótica (parte blanca del ojo)) y limbo esclerocorneal.



Anatomía de la superficie ocular. 1. Córnea. 2. Esclerótica (su superficie está cubierta por la conjuntiva bulbar). 3. Limbo esclerocorneal.

La córnea es un tejido transparente que tiene una función refractiva así como de barrera química y mecánica entre el ojo y el medio ambiente.

La córnea puede dividirse en 5 capas: epitelio, capa de Bowman, estroma, membrana Descemet y endotelio. (33)

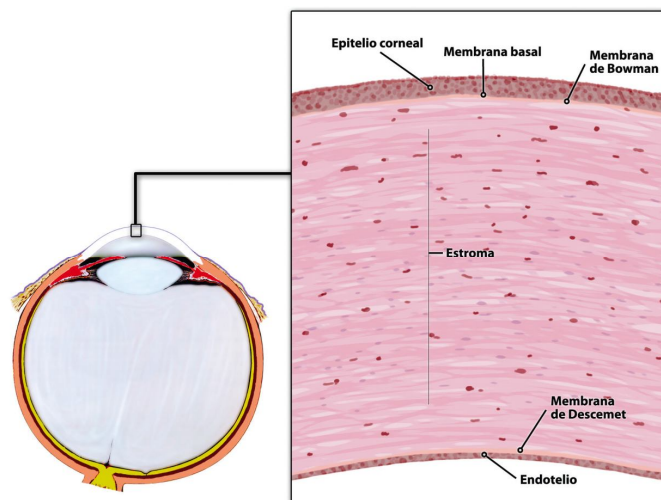


Imagen histológica de córnea normal (200x) (33)

La superficie ocular está compuesta de tres epitelios distintos: corneal, limbar y conjuntival. Todos ellos son epitelios estratificados, escamosos y no queratinizados procedentes de la superficie ectodérmica. Sin embargo, difieren en sus características y sus funciones. Estas diferencias están reflejadas en sus patrones únicos de expresión genética. (33)

Epitelio conjuntival.

El epitelio conjuntival es un epitelio estratificado escamoso no queratinizado al igual que el epitelio corneal pero contiene células calciformes secretoras de mucina que contribuyen a mantener la capa lagrimal de la superficie ocular y que se encuentran intercaladas entre las células epiteliales.

Está muy bien vascularizado. La diferencia entre los fenotipos epiteliales conjuntival y corneal se basa en la expresión de diferentes queratinas, mucinas y glicocaliz. Los epitelios corneal y conjuntival son continuos y componen la superficie ocular. Sin embargo, sus perfiles de expresión genética son bastante diferentes. (33)

Epitelio limbar.

El epitelio limbar es la zona transicional entre los epitelios corneal y conjuntival. Morfológicamente es diferente de la córnea en que posee células de Langerhans y melanocitos y de la conjuntival en que carece de células calciformes. El epitelio limbar se encuentra sobre un estroma altamente vascularizado, de donde le llega el aporte sanguíneo. (33)

La película lagrimal está formada por tres capas principales:

- 1.- lipídica
- 2.- acuosa
- 3.- de mucina. (32)

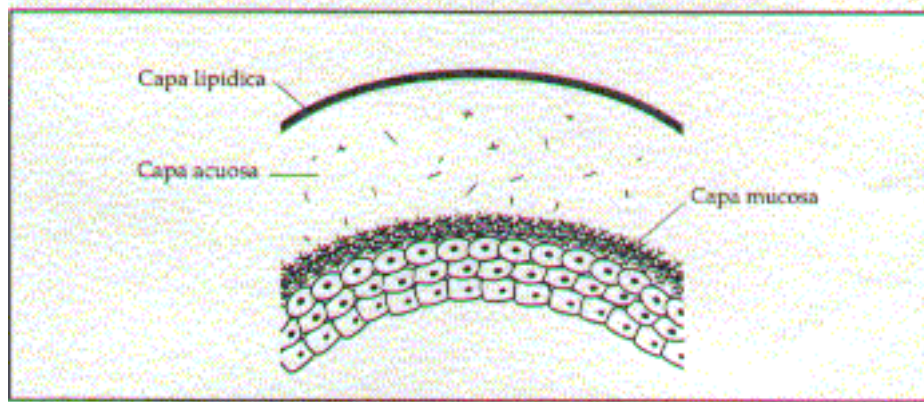


Figura 1. El film lagrimal.

La capa externa lipídica.

Su función consiste en reducir la evaporación de la capa acuosa, aumentar la tensión superficial y contribuir a la estabilidad vertical de la película lagrimal; y lubricar los párpados. (32)

La capa media acuosa.

Sus funciones son aportar oxígeno atmosférico al epitelio corneal avascular, funciones antibacterianas, reducir irregularidades de la superficie anterior de la córnea; y eliminar restos. (32)

La capa interna de mucina.

Convierte al epitelio corneal de hidrófobo en hidrófilo. (32)

La capacidad de la película lagrimal de formar una cubierta continua sobre la córnea y la conjuntiva depende de la energía de adhesión entre la película lagrimal y las superficies epiteliales. (32)

La utilización de los factores de crecimiento plaquetario autólogo en oftalmología viene marcada por la necesidad de encontrar sustitutos lagrimales que, además de humidificar y tener una acción lubricante, aporten otros componentes presentes en la lágrima. En el suero autólogo no existe riesgo de transmisión de enfermedades y además carece de antigenicidad. (30)

Propiedades.

- Contiene algunos componentes implicados en la proliferación, migración y diferenciación de las células epiteliales de la superficie ocular. Dentro de los componentes del suero, los que se cree que tienen una mayor importancia son el factor de crecimiento epitelial (EGF), el factor β transformante (TGF-

β), vitamina A, la fibronectina, la albúmina, la α2 macroglobulina. factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-AB), sustancia P, Factor de crecimiento tipo insulina 1.

- Contiene inmunoglobulina como la IgG, lisozima, y factores del complemento que le aportan cierto efecto bactericida y bacteriostático. (30)

	Tears	Serum
pH	7.4	7.4
Osmolality	298±10	296
EGF (ng/ml)	0.2-3.0	0.5
TGF-β	2-10	6-33
NGF (pg/ml)	468.3±317.4	54.0
SP (pg/ml)	157.0±73.9	70.9±34.8
IGF-1 (ng/ml)	0.031±0.015	105
PGDF	0-1.33	15.5
Vitamin A (mg/ml)	0.02	46
Albumin (mg/ml)	0.023±0.016	35-53
Fibronectin (μg/ml)	21	205
Lactoferrin (ng/ml)	1,650±150	266
Lysozyme (mg/ml)	2.07±0.24	0.001
SIgA (μg/ml)	1,190±904	2,500

Propiedades Bioquímicas y biofísicas del suero sin diluir y lágrimas humanas normal. (31)

Importantes parámetros del proceso de producción.

Un número de parámetros en la producción del suero pueden significativamente influir en la composición de los productos derivados de sangre. Estos pasos críticos en la producción del colirio de suero deberían por lo tanto de estandarizarse.

Estos incluyen: (31)

- La fase de coagulación: duración y temperatura.
- Centrifugación: fuerza centrifuga y duración.
- Dilución: factor de dilución y diluyente.
- Almacenamiento: contenedor, temperatura, duración (31)

En la ausencia de cualquier ensayo clínico controlado evaluando el impacto de estas diferencias en la producción, modelos in vitro han sido de ayuda en la evaluación de un gran número de variaciones de protocolos. (31)

Procedimiento de operaciones estandarizado de la Universidad de Lübeck. (31)

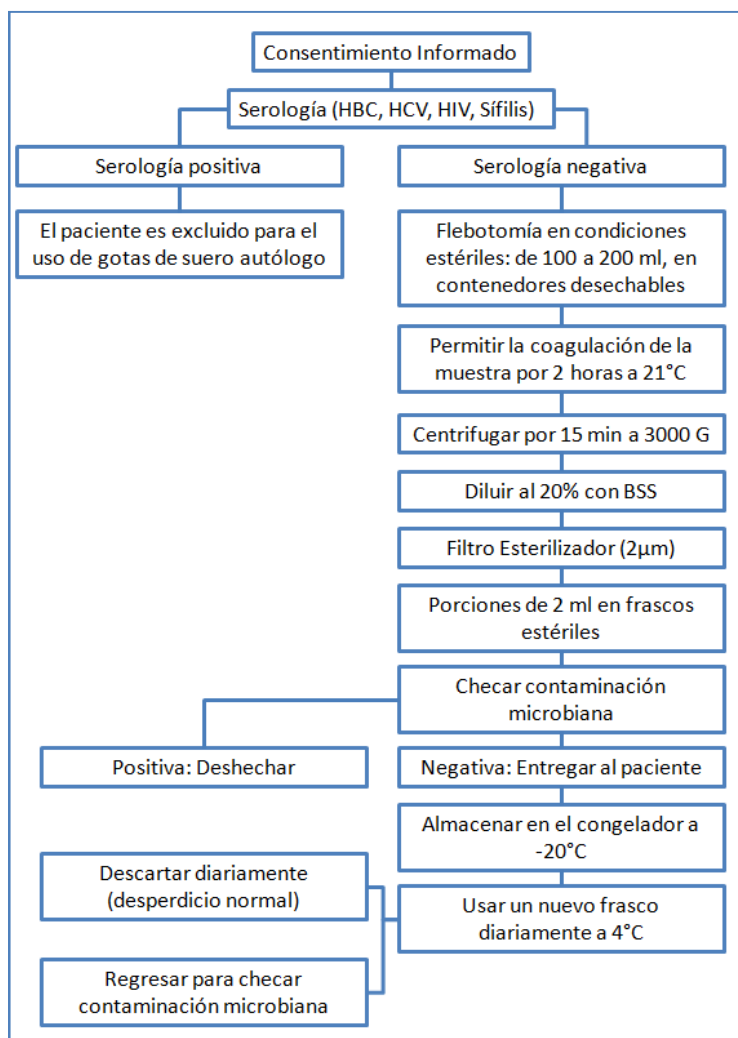
Siguiendo los principios de Buenas Prácticas de Manufactura (Good Manufacturing Practice, GMP) y basado en una evaluación extensa in vitro, los siguientes procedimientos de operaciones estandarizados son actualmente usados en la Universidad de Lübeck.

Los pacientes son evaluados para determinar su idoneidad para donar. Esto les exige estar en una razonable buena salud, con no enfermedades significativas cardiovasculares o cerebrovasculares, y libre de infecciones bacterianas. La anemia ($Hb < 11g/dl$) es una contraindicación. Los pacientes que sufren de una sospechosa septicemia no se les deberá de tomar una muestra de sangre. Para excluir infecciones de transmisión, pacientes deberán de hacerse pruebas serológicas para hepatitis B/C, sífilis y HIV antes de que la sangre sea donada para la producción del colirio. Una serología positiva excluye al paciente de la donación de sangre autóloga para la producción de colirio de suero rico en factores plaquetarios. Previo a la venipunción, el paciente deberá estar informado por escrito acerca de la planeación de la terapia, su naturaleza experimental, los riesgos implicados (contaminación bacteriana, por ejemplo) y los métodos alternativos de tratamiento. El consentimiento del paciente deberá ser contenido y guardado con las notas.

La venipunción es realizada en condiciones asépticas. Dependiendo en la duración esperada del tratamiento, 100-200mL del total de sangre es colectada dentro de contenedores estériles. Unos 100mL de sangre donada producirán de 30 a 35mL de suero rico en factores plaquetarios, los cuales se diluyen a 20% es suficiente para al menos 3 meses de colirio de suero 8 veces al día. Volúmenes grandes son recomendados en pacientes quienes requieren tratamientos a largo plazo, con el fin de minimizar la producción intensiva de mano de obra. Los contenedores son dejados en posición vertical por 2 horas a temperatura ambiente para asegurar la coagulación completa antes que sean centrifugados a 3,000 por 15 minutos. El suero sobrenadante es removido bajo condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar con jeringas estériles desechables de 50mL. El volumen recuperado se determina y se diluye 1% con BSS estéril. Una agitación suave garantiza la homogeneización antes de que porciones de 2mL se distribuyan a través de un filtro de 0.2 mico en frascos de cuentagotas estériles.

Los frascos son sellados y etiquetados con el nombre y fecha de nacimiento del paciente, la fecha de producción y la instrucción “Suero de sangre autólogo para uso tópico en el ojo”. Almacenar congelada y usar dentro de los 3 meses después de su fecha de producción. Desechar 24 horas después de abrir.” Dos milímetros de la solución mandados para la evaluación microbiológica.

El producto está disponible aproximadamente 6h después de la venipunción, pero sólo se envían una vez que la serología y la microbiología del donador y la del producto negativas son confirmadas. Usualmente las gotas se aplican 8 veces al día. Un frasco nuevo se abre cada día. Es recomendable almacenar los a 4°C y desecharlos después de 16 horas de una con los desperdicios domésticos. Los frascos que sobran son almacenados congelados (idealmente a una temperatura de -20°C) por los siguientes 3 meses. (31)



Protocolo de la preparación, almacenamiento y uso del colirio de suero. (31)

Aplicación en el tratamiento de:

- Defectos epiteliales persistentes (DEP)
- Ojo seco grave
- Manejo de la queratopatía neurotrópica
- Erosiones corneales recurrentes
- Asociado a cirugías de reconstrucción de la superficie ocular como trasplante de Limbo, trasplante de membrana amniótica
- Enfermedad injerto contra huésped. (30)

Ojo seco.

El ojo seco es un trastorno provocado por la inadecuada relación entre la película lagrimal y el epitelio de la superficie ocular. (32)

Estudios clínicos.

Seguido del reporte inicial de Fox en 1984, tomó 15 años hasta que Tsubota en 1999 y posteriormente un número de estudios reportaran sobre el uso de las gotas de suero con factores plaquetarios para los ojos secos (tabla). Fox trató 30 ojos de 15 pacientes con 50% de suero en 0.9% de solución salina y encontró que signos y síntomas de la enfermedad mejoraban en todos los pacientes, hasta que este medicamento fue sustituido por 0.5% de suero o puro diluyente. Tsubota se centró en el ojo seco debido al síndrome de Sjögren. Cuando trató con 20% de suero de 6 a 10 veces al día durante 4 semanas los síntomas mejoraron solo el 34%; sin embargo, las tinciones con bengala y fluoresceína disminuyeron por 55% y 68% de la referencia, mientras que el tiempo de ruptura lagrimal se mantuvo sin cambios. Dos grupos de autores describieron hallazgos similares en pacientes con ojo seco debido a la enfermedad de injerto contra huésped con mejora en los síntomas en cuestión de días, pero la tinción epitelial punteada mejora sólo después de meses. Ogawa también reportó que - a pesar de la deficiencia acuosa en sus pacientes era menos severa (≤ 10 mm, Prueba de Schirmer) - en el 50% los síntomas recurrieron mientras que el paciente continuaba aplicando las gotas de suero y 43% requirió oclusión del punto lagrimal adicional. En un estudio prospectivo controlado con placebo, de ojos secos severos con una puntuación de

la prueba de Schirmer de menos de 1mm, el suero al 20% 6 veces al día no se encontró ser significativamente más eficaz en mejorar síntomas y signos que una solución salina del 0.9%, la cual fue usada como diluyente, aunque una tendencia hacia la reducción de tinciones con fluoresceína y rosa bengala se observó después de 2 meses de tratamiento. (31)

Dos estudios han reportado el uso de altas concentraciones de suero. Poon et al. encontró una mejora de los criterios subjetivos y objetivos de los ojos secos severos (Prueba de Schirmer<5mm) en solo tres de ocho ojos que recibieron suero al 50% pero en todos los tres ojos que recibieron suero al 100%. Noble et al. comparó la eficacia de 3 meses de suero autólogo al 50% diluido en solución salina al 0.9% en un estudio prospectivo clínico cruzado contra el lubricante comercial utilizad anteriormente y demostró que 10 de 16 pacientes habían mejorado síntomas, y que había hallazgos en la impresión citológica en 6, no cambios en 10 y mejora en 9 de 25 ojos tratados.

La eficacia parece ser dosis dependiente ya que el 94% de los pacientes que recibieron ocho aplicaciones diarias reportaron la reducción de síntomas comparado con solo el 58% de aquellos que recibieron cuatro gotas. El total de la eficacia de las gotas de suero en los ojos secos varió entre el 30% y el 100% para el alivio sintomático, entre el 39%y el 61% para la reducción de la fluoresceina y entre el 33% y el 68%para la tinción positiva de rosa de bengala. Sin embrago, la variación en la población del estudio, producción y el protocolo de tratamiento son de nuevo significativas. En algunos estudios, el suero fue usado como un aditivo más que un substituto para los lubricantes y en otras terapias, lentes de contacto terapéuticos o la oclusión del punto lagrimal, se aplicaron además de la terapia de lágrimas de suero. La comparación de los datos publicados es por lo tanto es difícil y tiene que llegar a la conclusión de que no existen pruebas definitivas que apoyen el uso de colirio de suero en ojos secos está disponible hasta el momento. (31)

Tabla. Estudios clínicos usando gotas de suero para tratar ojos secos severos. El éxito fue definido tanto como el número/porcentaje de todos los ojos/pacientes con mejora/reducción media basal para objetivo (fluoreseína (FI) o rosa de bengala (RB) positivo para epitelopatías o citología de impresión (IPC) o subjetivas (síntomas)

Autor	Concentración	Diluyente	Centrifugación	Duración	Tiempo de Coagulación	Frecuencia de Aplicación	Ojos (pacientes)	Éxito objetivo	Éxito subjetivo
Fox	33%	0.9% NaCl	500g	10 min	NR	2- cada hora	30 (15)	RB 41%	51%; 100%
Noble	50%	0.9% NaCl	NR	NR	48-72 h	reemplazo	32(16)	IPC 36%	63%
Ogawa	20%	0.9% NaCl	1,500rpm	5 min	NR	x10	28 (14)	FI: 61%; RB: 40%	30%
Poon	50-100%	0.5% clorafe-Nicol	4,000rpm (2,200g)	10 min	2 h	x8	11 (9)	FI: 55%; RB: 45%	55%
Rocha	33%	0.9% NaCl	500g	10 min	NR	Cada hora	4 (2)	100%	100%
Takamura	20%	0.9% NaCl	3,000rpm	10 min	NR	x4-8	NR (26)	"Mejorado"	77%
Tananuvat	20%	0.9% NaCl	4,200rpm	15 min	NR	x6	12 (12)	FI:39%; RB: 33%; IPC 44%	36% (NS)
Tsubota	20%	NaCl	1,500rpm	5 min	NR	x6-10	24 (12)	FI: 55%; RB:68%	34%

Defectos Epiteliales Persistentes.

Un defecto epitelial persistente (DEP) es definido como un defecto del epitelio corneal que – en la ausencia de una queratitis microbiana – falla en sanar dentro del tiempo esperado (ej. 2 semanas) a pesar de los lubricantes tópicos. Un DEP puede ocurrir como el resultado de muchas patologías diferentes, incluyendo artritis reumatoide, queratopatíaneurotrófica u ojo seco. El “éxito” del tratamiento es mejor definido como el porcentaje de defectos curados en un tiempo determinado o como el tiempo total para completar el cierre de heridas epiteliales. (31)

Estudios clínicos.

En cinco series de casos prospectivos, 20% de suero diluido en solución salina al 0.9% se ha utilizado de 5 a 14 veces al día para esta indicación (tabla). En 1999 Tsubota fue el primero en reportar una serie de 16 ojos (15 pacientes) en los cuales los DEP habían persistido a pesar de tratamiento médico con lubricantes o lentes de contacto terapéuticos con una media de 7.2 ± 9.4 meses. Diez de estos 16 defectos sanaron completamente dentro de 4 semanas después de la iniciación de la terapia. García- Jiménez reportaron una curación de herida epitelial completa en 6 de 11 ojos con defectos epiteliales persistentes con la curación iniciando dentro de 3 a 4 semanas del tratamiento con gotas de suero. En un grupo de 9

pacientes con queratitis neurotrófica predominantemente diabética o postherpética, todos los 12 defectos epiteliales sanaron dentro de 15.8 ± 7.9 días y esto fue asociado con 9 ojos con una mejora de la sensibilidad corneal. (figura). (31)

Una concentración diferente de suero fue usado en otros dos estudios. Poon et al. sustituyeron lubricantes farmacéuticos con conservadores con gotas de suero del 50-100% de concentración y observaron el cierre de unos DEP con una duración media de 7.5 ± 5.8 (1-24) semanas en 9 de 15 ojos después de 3.6 ± 2.5 semanas (3 días a 8 semanas). De Souza et al. trató 70 defectos epiteliales con suero sin diluir cada hora además de la medicación de rutina, 45 de los cuales se había producido poco después de la queratoplastia penetrante y había persistido durante una media de 15 ± 17 días. El ochenta y uno por ciento de estos defectos con una historia relativamente corta sanaron dentro de 14 ± 12 días.

La curación generalmente empieza dentro de las 2 semanas después de la iniciación de la terapia con suero. Hasta el momento ningún estudio ha sido capaz de demostrar una correlación entre el tamaño o la localización del defecto con el éxito o el fracaso, pero los defectos mayores y más profundos del estroma tienden a sanar con menos éxito. También, cuando las gotas de suero se cambian de nuevo por lubricantes farmacéuticos los defectos epiteliales pueden recurrir, como ocurrió en 6 de los 9 ojos del grupo de Poon y 9 de los 70 ojos en el grupo De Souza. Estas cifras son difíciles de comparar ya que ninguno de los estudios fue controlado con placebo y la población de estudio parece diferir significativamente en términos de patogénesis y la duración del DEP.

Tabla. Estudios clínicos usando gotas de suero para tratar defectos epiteliales persistentes. Parámetros de producción y resultados. El éxito esta definido como el porcentaje de ojos/pacientes con una completa epitelialización. Tenga en cuenta que la escala usada para medir estos cambios, así como el nivel de línea basal varía entre estudios. (NA, no aplicable; NR, no reportado; rpm, revoluciones por minuto).

Autor	Concentración	Diluyente	Centrifugación	Duración	Tiempo de Coagulación	Frecuencia de Aplicación	Ojos (pacientes)	Éxito objetivo
Alvarado	20%	0.9% NaCl	5000 rpm	10 min	NR	NR	17 (14)	83%
De Souza	100%	NA	NR	NR	NR	Cada hora	70 (63)	81%
García	20%	0.9% NaCl	5000 rpm	10 min	NR	10X	11 (11)	55%
Matsumoto	20%	0.9% NaCl	3000 rpm	10 min	NR	5-10X	14 (11)	100%
Poon	50-100%	0.5% clorafenicol	4000 rpm (2200 g)	10 min	2 h	8X	15 (13)	60%
Tsubota	20%	0.9% NaCl	1500 rpm	5 min	NR	6-10X	16 (15)	63%
Young	20%	0.9% NaCl	1500 rpm	5 min	NR	6-14X	10 (10)	75%

(31)

Ortopedia, medicina del deporte.

La cirugía ortopédica es la rama de la medicina relacionada con la restauración y la preservación de la función normal del sistema músculo esquelético. (36) El sistema músculo esquelético está compuesto de varios diferentes tejidos, los cuales tienen diferentes composiciones, estructuras y propiedades físicas. (37) Como tal, se centra en los huesos, articulaciones, tendones, ligamentos, músculos, y tejidos especializados, tales como el disco intervertebral. (36)

Los tejidos básicos músculo esqueléticos (37)

Hueso.

El hueso está compuesto por las células del hueso y una matriz. Los osteoblastos producen colágeno tipo I para formar el hueso, mientras que los osteoclastos degradan el hueso. Los osteocitos son las células residentes en la matriz que mantiene el hueso. La matriz está compuesta principalmente por colágeno tipo I y asociada a compuestos inorgánicos, el más frecuente de los cuales es la hidroxiapatita de calcio, y compuestos orgánicos. Los dos tipos generales histológicos del hueso son el cortical y el esponjoso. Los huesos corticales están compuestos de las osteonas y mantienen la mayor parte del estrés, mientras que los huesos esponjosos están compuestos de hueso inmaduro, conocido como las trabéculas. (37)

Cartílago Articular.

El cartílago articular, compuesto por cartílago hialino, puede soportar años de uso. Sin embargo una vez que el daño ha ocurrido el cartílago articular raramente se recupera por completo. El tejido del cartílago puede ser dañado por trauma directo, procesos inflamatorios, enfermedades infecciosas o procesos degenerativos como la osteoartritis. (37)

Músculo esquelético.

El músculo esquelético está compuesto por unidades conocidas como el sarcómero, el cual es el elemento contráctil del tejido. Ese está compuesto por miosina y actina, mejor conocidos como los filamentos gruesos y delgados, respectivamente, ordenados en un patrón ordenado. La miofibrilla está

compuesta por sarcómeros separados por la línea Z. Las miofibrillas constituyen una fibra muscular que constituye un fascículo muscular.

Las lesiones al músculo pueden ocurrir a través de isquemia y laceraciones, o procesos genéticos. (37)

Ligamentos y tendones.

Los tendones y los ligamentos tienen estructuras y propiedades similares. Ellos están compuestos por arreglos de colágeno tipo I en filas paralelas uniformes, y por fibroblastos que producen las fibras de colágeno. Los tendones unen al músculo con el hueso y se insertan dentro del hueso a través del fibrocartílago. El fibrocartílago previene al tendón de flexión o compresión, protegiendo las fibras del desgaste. Las fibras de Sharpey son fibras de colágeno que se extienden dentro del hueso a un ángulo para conectar el tendón con el hueso. Los ligamentos difieren de los tendones en que ellos son conexiones entre los huesos, a diferencias del hueso con el músculo, y ellos tienen más sustancia fundamental compuesta de glicosaminoglicanos, principalmente sulfato de condroitina y sulfato de queratina, que los tendones y menos porcentaje de colágenos.

Meniscos.

Los meniscos son anillos de fibrocartílago unidos a la meseta tibial. El anillo medial es una forma semicircular y el lateral es circular. El menisco es un componente vital de la rodilla que funciona para extender el área de superficie de contacto articular de la tibia y el fémur. El menisco funciona principalmente para distribuir el estrés y proporcionar amortiguación durante la carga de peso, estabilizar la articulación y proporcionar la lubricación de la articulación. El menisco está compuesto mayormente por arreglos de colágeno tipo I en tres diferentes capas: superficial, laminar y central. (37)

Medicina del Deporte.

La medicina del deporte se desarrolló en la década de 1970 como una especialidad ortopédica centrada en atletas competitivos. Hoy en día, la medicina del deporte incluye la atención general de atletas de muchos niveles de habilidades. El enfoque inicial de la medicina del deporte en lesiones de rodilla ahora también incluye otras lesiones músculo-esqueléticas, incluyendo el hombro, el codo y el tobillo. Además del sistema músculo-esquelético, se hace hincapié en

los sistemas cardiovascular y pulmonar, y en técnicas de entrenamiento, nutrición y deporte de las mujeres. (36)

Aplicación de factores de plaquetarios autólogos en Ortopedia.

En la cirugía ortopédica, los factores plaquetarios son usados especialmente en la administración a lesiones de ligamentos y tendón. Se ha observado que facilitan la curación dentro del tejido y la curación del hueso mientras mejora la respuesta inflamatoria a la lesión.

Se han utilizado en patologías de ligamento y tendón, curación del hueso, cartílago o lesiones músculo esquelético, así como en heridas agudas por trauma, como por ejemplo:

Cirugía de ligamento anterior cruzado.

Rupturas del tendón de Aquiles.

Lesiones del maguito rotador.

Tendinopatías.

Daño muscular, derivado por un golpe, tensión o laceración.

Degeneración del cartílago (degeneración condral y osteoartritis).

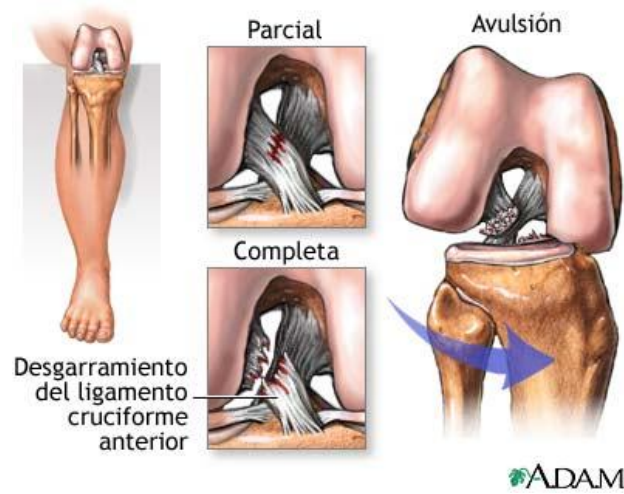
Curación del hueso (38)

Ruptura del ligamento anterior cruzado.

La ruptura del ligamento cruzado anterior (LCA) es una lesión frecuente de observar en la medicina del deporte (39). La reconstrucción artroscópica del LCA ha demostrado en el tiempo mejores resultados que el tratamiento conservador y es casi de rutina en deportistas de alto rendimiento. (39)

En la última década un mejor conocimiento de la biomecánica de la rodilla, un desarrollo importante en la tecnología e instrumental y nuevas formas de rehabilitación han permitido a los deportistas de alto rendimiento volver a su práctica deportiva a igual nivel de rendimiento que presentaban al momento de su lesión. El retorno al deporte profesional es de 6 a 7 meses aproximadamente, dependiendo del tipo de deporte a practicar. En medicina del deporte ese lapso muchas veces es muy largo para el atleta afectado, por lo que se ha intentado buscar acciones que permitan acortar el tiempo biológico requerido, para que el

injerto adquiera propiedades biomecánicas cercanas a la que tenía el ligamento cruzado original en el menor tiempo posible.



Un estudio realizado por Radice el at. comparó dos grupos donde la única variable fue la administración de factores plaquetarios autólogos, manteniendo un equipo de 3 cirujanos estables, protocolos postoperatorios y de rehabilitación únicos, y evaluación imagenología según protocolo validado ciego simple. Se utilizó RM como herramienta cualitativa para determinar el momento de la maduración del injerto. (1)

El grupo A es el que se adicionan los factores plaquetarios autólogos. Se obtuvieron los factores plaquetarios autólogos a través de un equipo automatizado. La activación del concentrado plaquetario se da al momento de aplicarlo sobre el injerto.

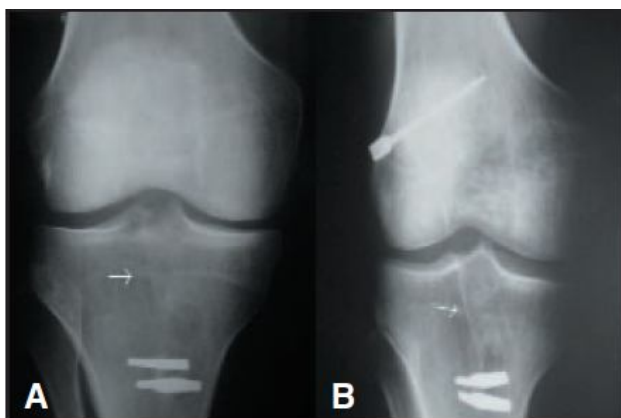
Encontraron que se acortan en forma significativa el tiempo de maduración biológica del injerto, en al menos un 49%. Esto significa que el injerto utilizado podría tener su proceso completo en la mitad del tiempo requerido en forma natural. Gran noticia ya que un deportista profesional podría retornar al deporte entre 4 y 5 meses. (39)



Gráfico. Comparación de los injertos maduros
 Grupo A: con Factores Plaquetarios Autólogos vs. Grupo B: control

Otro estudio realizado en la reconstrucción del ligamento anterior cruzado por Sánchez et al. tenía como objetivo agregar factores de plaquetarios para mejorar la evolución quirúrgica, reforzando y potenciando el proceso de reparación fisiológica, además de permitir una regeneración más rápida y de mayor calidad en los tejidos conjuntivos dañados. (40)

Los datos clínicos indicaron que la utilización de los factores plaquetarios favorecen la minimización de hematomas y de signos inflamatorios en el período postoperatorio; el proceso de recuperación es mejor tolerado, ya que disminuye el dolor, y además es más rápido. También pareció que aceleraba la integración de la plastia, hecho que podemos observar al valorar la integración de los túneles en las radiografías simples (Fig. 1 A) y en las resonancias. (40)



Radiografía postoperatoria, al mes de la intervención. Se observa la diferente integración de los túneles tibiales (Flechas).
 A) Con factores de crecimiento plaquetarios; B) Sin factores de crecimiento plaquetarios.

Osteoartritis.

La osteoartritis (OA) es una condición progresiva, crónica que conduce a dolor y pérdida de la función que reduce la calidad de vida del paciente. Tiene una

etiología multifactorial y ocurre como el resultado de varios factores bioquímicos, biomecánicos, inflamatorios e inmunológicos. (41)

En el cartílago sano, un balance entre los procesos anabólicos y catabólicos mantienen una integridad en la MEC, sin embargo en la OA, la actividad catabólica prevalece. El desarrollo de la OA comienza con la pérdida de la integridad de la MEC. Esto causa la inestabilidad de la red de colágeno e induce además la degradación de la MEC. Las fuerzas mecánicas y citocinas encontradas en el cartílago de la OA y sustancias de la degradación de la matriz estimulan a los condrocitos a sintetizar enzimas que promueven además la degradación de la MEC del cartílago. (42)

La prevalencia de OA de rodilla entre atletas es más alta que en la población no atlética, en particular el desarrollo de la OA temprana y la participación intensa en deportes de alto impacto y alta tensión a una edad temprana pueden asociarse. Los síntomas clínicos de la OA so dolor de la articulación, limitación del rango del movimiento y la rigidez en las articulaciones. (41)

Muchos estudios se han enfocado en el análisis de la aplicación de inyecciones intraarticulares en la OA de rodilla, algunos de ellos se analizan a continuación.



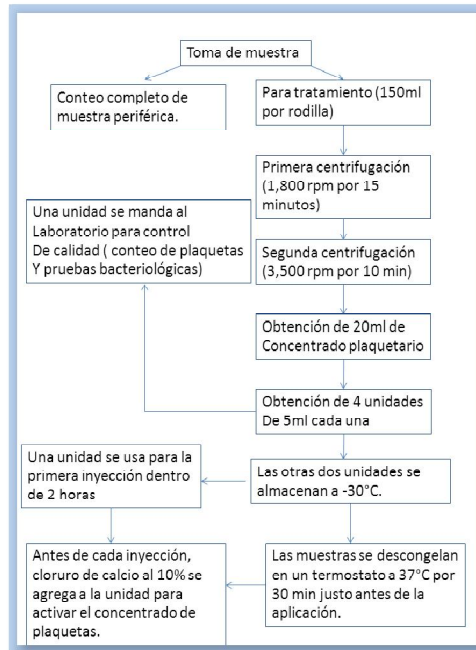
Protocolo del Instituto de Ortopedia de Rizzoli

El siguiente protocolo fue realizado en el Instituto de Ortopedia de Rizzoli para realizar un estudio en lesiones degenerativas de cartílago y osteoartritis.

Criterios para la selección de paciente: historial de dolor crónico (de al menos 4 meses) o hinchazón de las rodilla y hallazgos imagenológicos (rayos X o resonancia magnética) de los cambios degenerativos de la articulación. Criterios de exclusión: enfermedades sistémicas como diabetes, artritis reumatoide, importante desviación axial, enfermedades hematológicas (coagulopatía), enfermedades cardiovasculares severas, infecciones, inmunodepresión, pacientes en terapia con anticoagulantes o antiagregantes, el uso de AINES dentro de los 5 días antes de la recolección de sangre y pacientes con valores de Hb < 11 y valores de plaquetas de <150,000/mmc.

Se toma una muestra de 150 ml de sangre (recolectada en una bolsa que contenga 21 ml de citrato de sodio) por cada lesión a tratar. Al principio de la donación se toma una muestra para un conteo completo de sangre periférica total. Se centrifuga dos veces la sangre (la primero a 1,800 rpm por 15 minutos para separar eritrocitos, y la segunda a 3,500 rpm por 10 min para concentrar las plaquetas) para producir una unidad de 20 ml de concentrado plaquetario. Esta unidad se separa en 4 pequeñas unidades de 5 ml cada una. Todos los procedimientos abiertos se realizan en cabina de flujo laminar estéril tipa A. Una unidad se manda al laboratorio para el análisis de calidad (conteo de plaquetas y pruebas bacteriológicas), otra unidad se usa para la primera inyección dentro de 2 horas y las otras dos unidades se almacenan a -30°C.

Las inyecciones se administran cada 21 días, para los tratamientos 2 y 3, las muestras se descongelan en un termostato a 37°C por 30 min justo antes de la aplicación. Antes de cada inyección, cloruro de calcio al 10% se agrega a la unidad para activar el concentrado de plaquetas. (43, 44)



Protocolo de obtención, almacenamiento y uso de concentrados plaquetarios del Instituto de Ortopedia de Rizzoli.

Estudios clínicos.

Sampson et al. evaluó los efectos clínicos de inyecciones intraarticulares de factores plaquetarios autólogos en 13 pacientes con OA primaria y secundaria en un estudio piloto prospectivo, no aleatorizado de inscripción abierta. Los pacientes recibieron una inyección cada 4 semanas por 12 semanas. Se realizó un seguimiento a estos pacientes por 52 semanas. Las medidas de resultados, puntuación VAS Brittberg-Peterson y la lesión de la rodilla y KOOS (osteoarthritis outcome score), fueron determinados en una visita preinyección y a la semana 2, 5, 11, 18 y 52 semanas. A un año del seguimiento los pacientes también completaron un cuestionario con respecto a la satisfacción del tratamiento. Un ultrasonido fue usado para medir el grosor del cartílago articular femoral antes de la inyección y a los 6 meses de seguimiento. A pesar de que las mediciones del cartílago con el ultrasonido no fueron significativas durante los primeros 6 meses, 6 de los 13 pacientes mostraron un incremento en el cartílago articular femoral. Hubo mejoras significativas y lineales en los puntajes de KOOS y VAS a un año de seguimiento comparados con los valores antes de las inyecciones. Ocho pacientes estuvieron satisfechos al final del tratamiento. (41)

Kon et al. realizó un estudio piloto, donde 115 rodillas en 91 pacientes fueron tratadas con inyecciones de factores plaquetarios autólogos cada 21 días por 2

meses, y fueron evaluadas prospectivamente después del tratamiento, al final del tratamiento, y a 6 y 12 meses después del tratamiento. De las 115 rodillas, 58 mostraron una lesión degenerativa condrial (puntaje de 0 en Kellgren-Lawrence), 33 mostraron OA temprana (puntaje de I-III en Kellgren-Lawrence), y 24 mostraron OA avanzada (puntaje IV en Kellgren-Lawrence). Los puntajes de IKDC (Subjective International Knee Documentation Committee) (tanto subjetivos y objetivos) y de EQ VAS fueron utilizados para la evaluación clínica. La satisfacción del paciente también fue registrada. Una mejora estadísticamente significativa en todas las puntuaciones clínicas fue obtenida de las evaluaciones basales hasta el final del tratamiento. Estas mejorías se mantuvieron a 6 meses pero los puntajes tendieron a empeorar a un año, pero el 80% de los pacientes estuvieron satisfechos. Los puntajes objetivos del IKDC mostraron una disminución estadísticamente significativa entre los 6 y 12 meses y los puntajes del IKDC fueron significativamente peores a los 12 meses. Pacientes mayores tuvieron una mejora inferior a los 6 meses que los pacientes jóvenes, y mostraron cambios graves en las articulaciones.

De las 115 rodillas evaluadas, 114 estuvieron disponibles para un seguimiento de 2 años. La evaluación realizada a los 2 años confirma la misma tendencia con un empeoramiento global de los resultados obtenidos, a pesar de que siguió siendo mejor que el nivel basal. El nivel de satisfacción se confirmó en la evaluación de 24 meses. La mediana de la duración del efecto beneficioso fue de 9 meses. (41)

Kon et al. en un estudio prospectivo comparando la eficacia de inyecciones intraarticulares de factores plaquetarios y ácido hialurónico (AH) para el tratamiento de la OA en rodilla, dividió a 150 pacientes en grupos tres grupos de 50 pacientes. En diferentes centros cada grupo fue tratado con tres inyecciones de factores plaquetarios, de AH de alto peso molecular, o de AH de bajo peso molecular administrado cada 14 días. Todos los pacientes fueron evaluados a los 2 y 6 meses. Los puntajes de IKDC y EQ VAS fueron utilizados para la evaluación clínica. Mejoras estadísticamente significativas en todos los puntajes clínicos relativos a la evaluación basal a los 2 y 6 meses fueron observados en todos los grupos de tratamiento, con los peores resultados obtenidos en pacientes mayores y en aquellos con un alto grado de degeneración del cartílago.

Los puntajes de IKDC y EQ VAS a los 6 meses mostraron mejores resultados en el grupo de factores plaquetarios que en los grupos otros grupos. En pacientes de 50 años o menos, los factores plaquetarios fueron más eficaces que los grupos con AH de bajo y alto peso molecular. En pacientes mayores de 50 años los resultados fueron equivalentes tanto a los 2 y 6 meses. Los factores plaquetarios fueron superiores a los 6 meses en aquellos con degeneración de cartílago y OA temprana. Ninguno de estos procedimientos resulto en mejoras importantes en la progresión de la OA. Las inyecciones de factores plaquetarios muestran una eficacia mayor y más larga que las inyecciones del AH en reducir el dolor y los síntomas y para la recuperación de la función articular. (41)

Napolitano et al. en un estudio piloto dividió a 27 pacientes en dos grupos, aquellos con artritis de las rodillas (13 pacientes con una puntuación Kellgren-Lawrence de I-III) y aquellos con enfermedades del cartílago (primero y segundo grado de lesiones de acuerdo con la clasificación de Outherbrigde). Los pacientes recibieron tres inyecciones de factores plaquetarios (para un total de aproximadamente 15 ml) a intervalos semanales y se evaluaron prospectivamente antes del tratamiento y 7 y 180 días después del final del tratamiento (un seguimiento de 6 meses), usando cuestionarios específicos: la escala de calificación numérica (NRS, NumericalRatingScale) y la puntuación de WOMAC. Ambos grupos estudiados tuvieron mejorías a largo plazo y el dolor disminuyo sustancialmente desde el momento de la primera infiltración y de acuerdo con los hallazgos de otros estudios publicados, este tratamiento dio mejores resultados en pacientes jóvenes con degeneración de las articulaciones menos graves. (41)

Autor	No. De pacientes	Inyecciones	Seguimiento	Medidas de Resultados
Samposon	13	3 a intervalos de 4 semanas	52 semanas	VAS; KOOS;
Kon	91	3 a intervalos de 21 días	12 meses	IKDC; VAS
Filardo, Kon	90	3 a intervalos de 21 días	24 meses	IKDC; VAS

Kon	150	3 de factores plaquetarios o AH de alto peso molecular o de bajo peso molecular cada 14 días	6 meses	IKDC; EQ VAS
Napolitano	27	3 a intervalos semanales	6 meses	NRS, WOMAC

Tendopatías.

Las lesiones y desordenes en los tendones se presentan en varias formas. El término genérico, tendinopatía, es el mejor usado para describir estas varias formas. El espectro de los problemas va desde la tendinitis aguda a tendinosis crónica a un desgarre completo. (48) La tendinopatía, caracterizada por dolor, debilidad y rigidez, describe una lesión en común que afecta a una gran variedad de tendones. Con frecuencia es multifactorial, su etiología está relacionada con la mecánica articular anormal o rigidez, con repetidos traumatismos que conducen a la degeneración intrasustancias, microlesiones y el fracaso de la curación. (45)

Tendinopatía rotuliana.

Esta es una condición común caracterizada por el dolor anterior de la rodilla y dolor alrededor del polo inferior de la rótula (45). También conocida como tendinitis de rotula, o rodilla de saltador, es una condición presente bastante en atletas.

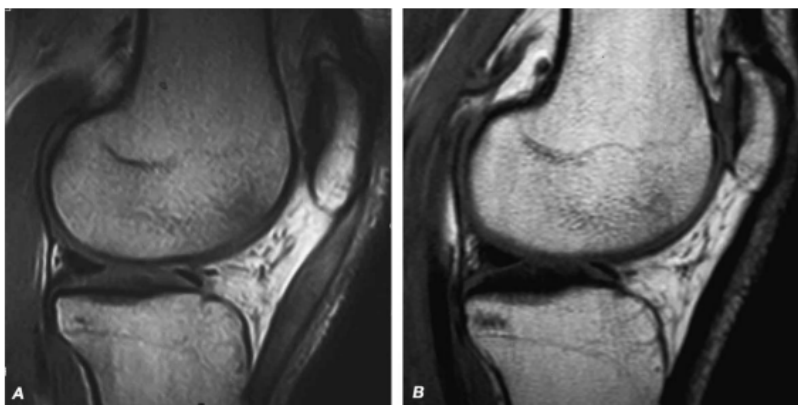
La mayoría de los atletas con esta condición son adultos jóvenes, quienes tienen que reducir sus entrenamientos y evitar ciertas actividades, como saltos excesivos. (46)

Un estudio realizado por Kon et al. analizó la aplicación de factores plaquetarios autólogos en la tendinopatía crónica de rotula. 20 atletas de sexo masculino con antecedentes de una media de 20.7 meses de dolor recibieron tratamiento, y los resultados fueron evaluados prospectivamente a los 6 meses de seguimiento. El tratamiento constó de 3 inyecciones con un intervalo de 15 días entre cada una.

Los cuestionarios de Tegner, EQ VAS y SF36 fueron utilizados para la evaluación clínica. No hubo complicaciones relacionadas con las inyecciones o algún evento adverso severo se observó durante el tratamiento o el periodo del seguimiento. En la mayoría de los casos se registró dolor y rigidez moderada por algunos días, solo en un caso el dolor persistió durante 3 semanas.

El análisis estadístico mostró una mejoría significativa en los resultados del cuestionario SF36 en todos los parámetros evaluados al final de la terapia y a los 6 meses de seguimiento mejoraron, y en los resultados del EQ VAS de la evaluación basal al final del tratamiento y a los 6 meses de seguimiento. En cada caso de la actividad deportiva, la cual fue evaluada usando el puntaje de Tegner, mostró una mejoría estadísticamente significativa desde el nivel de pre-tratamiento a los 6 meses de seguimiento. Se obtuvo una satisfacción del paciente de un 80%.

(46)



La imagen de resonancia magnética muestra un tendón rotuliano (A) antes del tratamiento y (B) a los 6 meses de seguimiento después de las inyecciones de factores plaquetarios autólogos, demostrando la mejora del tendón. (2)

En el estudio realizado por Filardo et al. evaluó la eficacia de múltiples inyecciones de factores plaquetarios autólogos en la curación de la tendinopatía rotuliana crónica refractaria después de que varios tratamientos clásicos anteriores habían fallado. Se trataron a 15 pacientes afectados con tendinopatía rotuliana, que habían fallado previamente a tratamientos no quirúrgicos y quirúrgicos. Se comparó con un grupo control de 16 pacientes, que no habían realizado ningún tratamiento (por al menos 2 meses) y fueron tratados principalmente solo con el protocolo de fisioterapia. Múltiples inyecciones de factores plaquetarios autólogos se aplicaron en tres ocasiones en intervalos de dos semanas en el sitio de la tendinopatía rotuliana a los 2 grupos. Tegner, EQ VAS y el nivel de dolor fueron

usados para la evaluación clínica antes, al final del tratamiento y a los seis meses de seguimiento. Los resultados de los pacientes con tendinopatía rotuliana crónica refractaria mostraron una mejoría estadísticamente significativa en el puntaje de EQ VAS (basal = 52.7 ± 22 , al final el tratamiento = 68 ± 13.9 y a los 6 meses de seguimiento = 78.3 ± 13.3), en el nivel del dolor (evaluación basal = 6.6 ± 1.4 , al final del tratamiento = 4.3 ± 1.7 y a los 6 meses de seguimiento = 3.1 ± 1.2) y el puntaje Tegner (antes del tratamiento = 3.7 ± 1.8 , a los 6 meses de seguimiento = 6.6 ± 2.4). La evaluación de la recuperación funcional mostró cinco pacientes con recuperación completa, seis con una mejoría notoria, y dos con una mejoría media, mientras que en dos casos no se obtuvo alguna mejoría. La satisfacción del paciente fue de 86.7% (13/15). Por otra parte, se obtuvieron resultados comparables con respecto a los casos menos graves (el grupo control) en el puntaje de EQ VAS (evaluación basal = 50.6 ± 22.3 , al final del tratamiento = 72.5 ± 24.7 y a los seis meses de seguimiento = 73.5 ± 26.3), la evaluación del nivel de dolor (evaluación basal = 6.7 ± 1.5 , al final del tratamiento = 3.2 ± 2.4 y a los seis meses de seguimiento = 3.7 ± 2.8), y el puntaje Tegner (antes del tratamiento = 5.3 ± 1.8 , a los 6 meses de seguimiento = 6.8 ± 1.6). La evaluación de la funcionalidad recuperada mostró cuatro pacientes con una completa recuperación, cuatro con una recuperación marcada, y cinco con una recuperación media, mientras que en tres casos no hubo mejoría. La satisfacción del paciente fue de un 68.8% (11/16). Cuando se comparan los dos grupos, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en las evaluaciones de EQ VAS, la evaluación del nivel del dolor, satisfacción del paciente, mientras una gran mejoría en el puntaje de Tegner fue logrado en el grupo de tendinopatía refractaria con respecto al grupo control. (47)

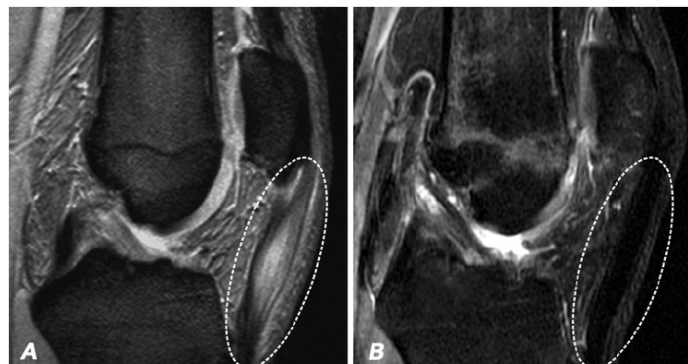


Imagen de resonancia magnética muestra el tendón rotuliano antes del tratamiento (A) y la mejoría de la estructura del tendón después de las inyecciones de factores autólogos plaquetarios a los seis meses de seguimiento (B) (47)

Piel.

La piel es el órgano más largo del cuerpo, cubriendo un área de 1.7 m²: pesa alrededor del 15% del peso total del cuerpo. La piel nos protege contra el ambiente externo. El grosor, la pigmentación y la distribución de los apéndices de la piel varían en diferentes partes del cuerpo, dependiendo de la función y de las necesidades de la zona.

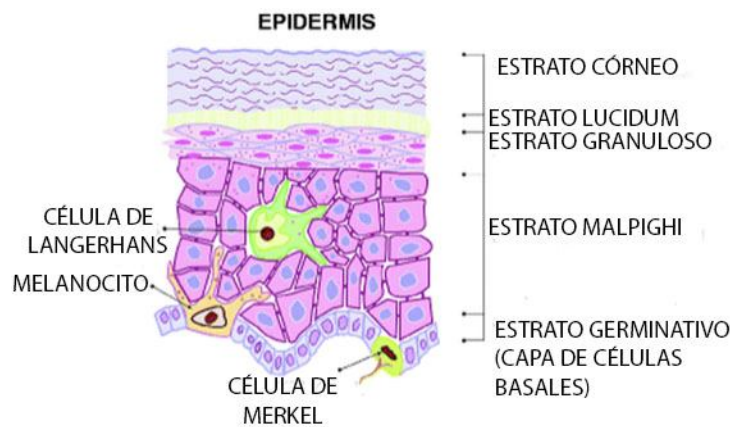
Estructura.

La piel consiste en la epidermis, dermis y por debajo de ellas está la capa subcutánea.

Epidermis.

La epidermis consiste de muchas células, cerca del 95% son queratinocitos, y las otras células prominentes son los melanocitos, las células de Langerhans y la células de Merkel. La epidermis no tiene ningún vaso sanguíneo; obtiene sus nutrientes de los vasos sanguíneos de la dermis difundidos a través de las uniones dermoepidermales.

La epidermis está conformada por varios estratos que son el estrato germinativo (capa de células basales), estrato espinoso (estrato de Malpighi), estrato granuloso, estrato lucidum (solo en las palmas y plantas del pie) y el estrato córneo.

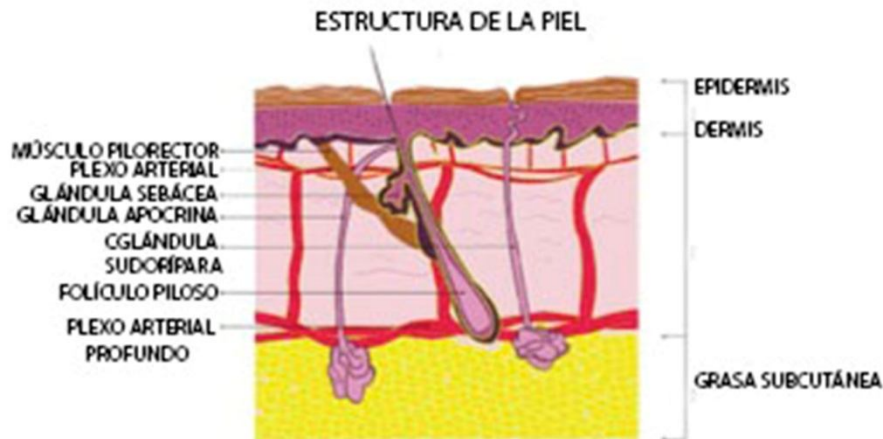


Estructura de la epidermis.

Dermis

Esta es la capa fibrosa dura de la piel; consiste en fibras de colágeno, fibras elásticas, sustancia fundamental (glucosaminoglicanos), fibroblastos, dendrocitos

dérmicos (células dendríticas con una probable función inmune), células cebadas, histiocitos, vasos sanguíneos, nervios y vasos linfáticos.



La dermis consiste en una parte superior llamada la dermis papilar y la parte inferior, la dermis reticular. No hay una demarcación clara entre los dos.

Las fibras de colágeno (fibras de colágeno 1 y 3) dan el duro soporte mecánico a la piel; corren horizontalmente en la dermis reticular. Las fibras elásticas ayudan en el retroceso elástico de la piel; daño en estas fibras por la luz ultravioleta es responsable de la formación de las arrugas. Las fibras elásticas están libremente arregladas en todas direcciones.

La sustancia fundamental soporta los tejidos de colágeno y el elástico; tiene una capacidad notable para contener el agua, y ayuda en el paso de los nutrientes, hormonas y moléculas de fluido a través de la dermis.

Los vasos sanguíneos de la dermis tienen dos propósitos, el suministrar los nutrientes y ayudar a mantener la temperatura del cuerpo.

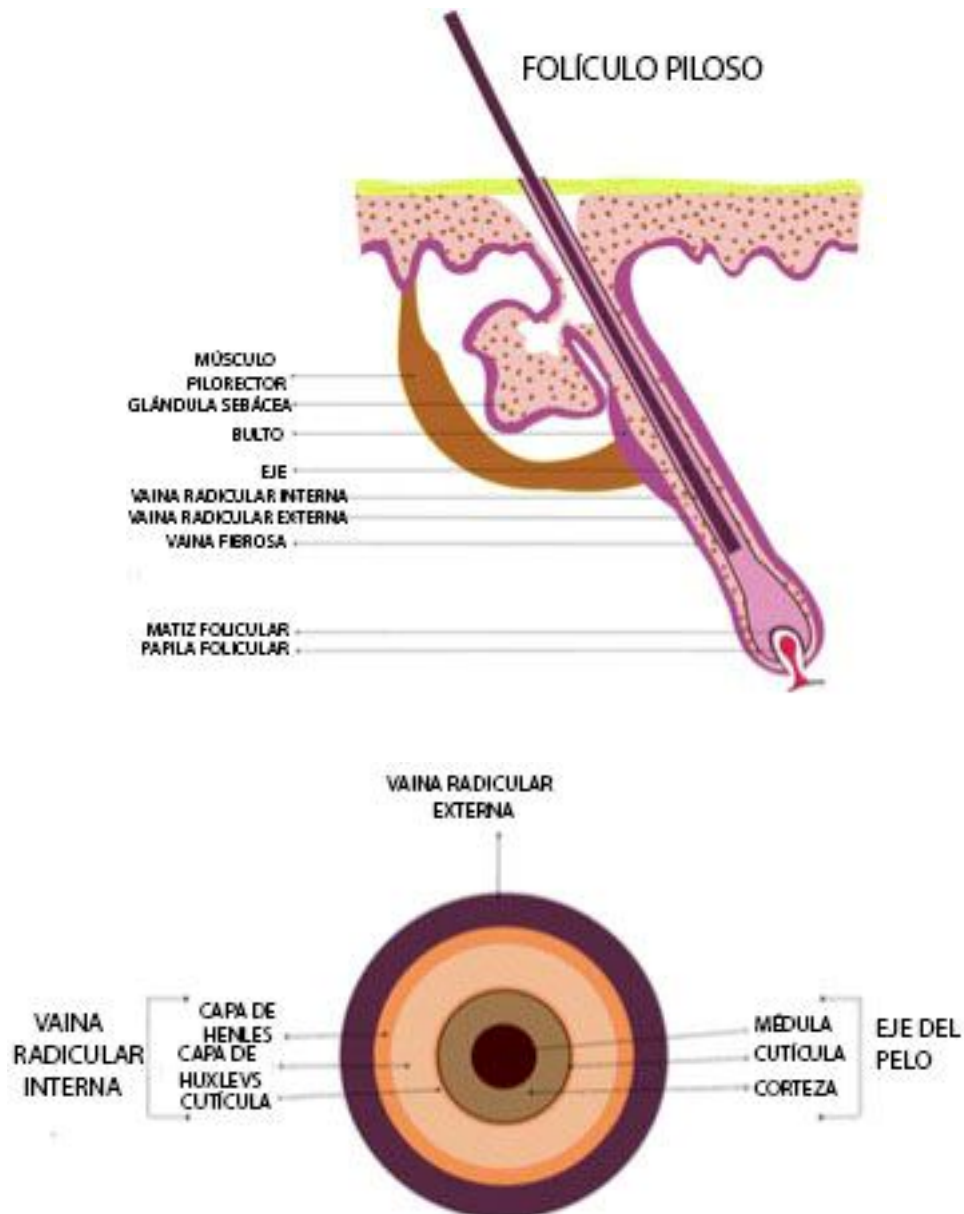
Los nervios cutáneos son tanto mielinizados y no mielinizados. Las fibras no mielinizadas se extienden a la epidermis hasta la capa granular. Las fibras mielinizadas terminan en órganos especializados terminales en la dermis. Estas fibras nerviosas son responsables de las sensaciones cutáneas y nos previene del daño debido al calor, frío, dolos, presión, etc.

Apéndices epidérmicos.

Estos comprenden los folículos pilosos, las glándulas sebáceas, las glándulas apocrinas, las glándulas ecrinas (sudor), y las uñas.

Los folículos pilosos.

Los folículos pilosos están distribuidos por toda la superficie del cuerpo, excepto en las palmas y en las plantas. El pelo en el cuerpo humano es de dos tipos; pelo veloso y pelo terminal. Los pelos velosos son finos, cortos, y poco pigmentados, están presentes en todo el cuerpo. Los pelos terminales son gruesos, pigmentados y más largos que los pelos velosos, por ejemplo, el pelo del cuero cabelludo, las cejas, las pestañas, las axilas y el pubis.



Cada folículo piloso consiste en un tallo del pelo y el bulbo. La parte superior del tallo del pelo es llamada infundíbulo. En el tallo del folículo piloso los ductos de las

glándulas sebáceas y apocrinas se abren. Por debajo de la abertura de la glándula sebácea es la inserción del músculo erector del pelo.

El bulbo del pelo se compone de las células (matriz) las cuales son responsables de la división celular, similar a la de las células basales de la epidermis; las células después se diferencian para formar el tallo. El tallo está formado de fuerte queratina. La tasa mitótica de la matriz del pelo es mayor que la de cualquier otro órgano en el cuerpo. (49)

El cabello es una extensión epidérmica compleja y sintetizada en el folículo piloso. El ciclo del crecimiento del cabello consiste en periodos de crecimiento y latencia. El ciclo del cabello humano empieza con la fase anágena, durante la cual el folículo desarrolla y el cabello es producido. La duración de la fase anágena varía ampliamente y continúa generalmente durante un período de 7-94 semanas, pero puede durar varios años, dependiendo de la región anatómica. Durante la transición de la fase anágena a la catégena, la proliferación para, la diferenciación disminuye, y la apoptosis comienza en el “bulbo”. En la fase catégena, la actividad de los folículos “bulbo” cesa y la “papila dermal” se contracta a medida que los folículos se aproximan a la fase telógena, donde no se observa una proliferación, apoptosis o diferenciación significativa. Al final de la fase telógena, el cabellos se cae (la fase exógena), y un nuevo ciclo se inicia con la formación de una nueva “bombilla/bulbo” y la diferenciación de la vaina interna de la raíz y el tallo del pelo. (55)

Úlceras.

Las úlceras cutáneas son caracterizadas por la pérdida del tejido que involucra la epidermis, dermis y algunas veces el tejido adiposo y la fascia muscular; no hay un proceso de reparación espontáneo y la interrupción del tejido a menudo resulta en una cicatriz fibrosa. La etiología de las heridas son varias: enfermedades vasculares periféricas, enfermedades infecciosas; secundarias a traumas, a desordenes neurológicos, inmunológicos, neoplásicos, de coagulación o metabólicos, y lesión iatrogénica. Todos estos son capaces de comprometer los mecanismos de reparación del tejido. (50)

Las heridas crónicas se pueden clasificar en úlceras vasculares (por ejemplo, úlceras venosas y arteriales), úlceras diabéticas, y úlceras por presión. Algunas

características en común compartidas por cada una de estas incluyen una prolongada o excesiva fase inflamatoria, infecciones persistentes, formación de una biopelícula microbiana resistente a los fármacos y la incapacidad de las células dermales y/o epidermales para responder a los estímulos reparativos. En conjunto, estos fenómenos fisiopatológicos resultan en el fracaso de estas heridas en sanar. Las patologías subyacentes, sin embargo, se desvían en diferentes tipos de heridas crónicas. (51)

Los concentrados de factores plaquetarios autólogos han sido utilizados en miles de heridas por más de un periodo de 10 años en los Estados Unidos. (52)

Un caso estudiado por McAleer et al. realizado en el Hospital Mount Sinai de Queens, Astoria, NY, aplicó un protocolo de desbridamiento quirúrgico seguido por la aplicación de un concentrado de factores plaquetarios, debido a que tratamientos previos habían fallado y el tamaño de la herida había incrementado. El concentrado de factores plaquetarios se aplicó al lecho de la herida quirúrgicamente desbridada. Un vendaje de compresión postoperatorio se aplicó y se mantuvo limpio, seco e intacto durante 7 días. La inspección de la herida, seguido del posterior desbridamiento y la reaplicación del gel de plaquetas, se realizó semanalmente. A la semana 1, el diámetro de la herida fue reducido al 50%. Continuó mejorando con las subsecuentes aplicaciones hasta que se logró cerrar completamente a la semana 4 del tratamiento. (52)



Evolución del tratamiento con factores plaquetarios en una úlcera. La primera imagen es la herida antes del desbridamiento. La segunda imagen es la herida desbridada. Y por último el dedo curado después de 4 semanas de tratamiento. (52)

En el estudio realizado por Burón Alvarez et al. utilizaron factores plaquetarios autólogos en 5 pacientes con 12 úlceras crónicas o con mala respuesta a tratamientos convencionales. Antes del tratamiento se eliminó los esfacelos necróticos. Realizaron 2 técnicas para la utilización de los factores plaquetarios: a) la inyección intralesional, en el seno de la úlcera. b) la colocación del coágulo de las plaquetas en el seno de la úlcera, cubriendo posteriormente con gasa estéril.

En el paciente 1 se presentó a consulta con múltiples lesiones. Ante una mala evolución con tratamientos convencionales se decidió utilizar un tratamiento con factores plaquetarios. Utilizaron las 2 técnicas. A los 10 días de la primera dosis se observaron una detención en el crecimiento de las úlceras y aparición de epitelización en el borde de la misma. Aplicaron una sesión cada 10-15 días. En este paciente se obtuvo una epitelización total del 100% de sus lesiones en un tiempo variable entre 2 y 3 meses de tratamiento.

El paciente 2 presentaba una úlcera en la región pretibial, secundaria a un traumatismo, de meses de evolución, que no cerraba a pesar de los tratamientos habituales. Aplicaron las 2 técnicas en 2 ocasiones y se obtuvo el cierre de la úlcera.

Los pacientes 3 y 4 fueron muy similares. Los dos presentan úlceras en la región pretibial, provocadas por traumatismos leves. Se administraron los factores plaquetarios de manera intralesional en el paciente 3 con una sesión de sueroterapia y se obtuvo una respuesta rápida. En el paciente 4 se aplicaron 2 sesiones separadas por un intervalo de 15 días.

En el paciente 5, que tenía una úlcera por una cirugía por rotura de tendón de Aquiles con un año de evolución, se realizó un único tratamiento con los factores plaquetarios, con cierre de la herida cutánea en un mes. (53)



Paciente 1.

Paciente 3.

Paciente 4.

Evolución del tratamiento de úlceras en varios pacientes con factores plaquetarios. Las imágenes A muestran las lesiones previas al tratamiento, las imágenes B curaciones de las lesiones. (53)

Alopecia.

El término significa pérdida de cabello y la alopecia tiene muchas causas y patrones. Una división conveniente es en tipos localizados y difusos. También es importante darse cuenta si la alopecia es cicatricial o no cicatricial. Algunas de las causas de alopecia localizada no cicatriciales son la alopecia areata, la androgenética, el hábito de tirar el cabello, dentro de las cicatriciales están las quemadas, necrobiosis y sarcoidosis, entre otras. (54)

La alopecia androgénica o calvicie de patrón masculino es la causa más común de la pérdida de cabello tanto en hombre como en mujeres. La pérdida difusa del cabello es un malestar común y angustia emocional particularmente en las mujeres. (55)

Un estudio retrospectivo realizado por Betsi EE et al. evaluó la seguridad, la eficacia y la viabilidad de inyecciones de factores plaquetarios autólogos para el tratamiento de la alopecia. 42 pacientes fueron incluidos (8 mujeres y 34 hombres). Un volumen de entre 8 y 12cc fue inyectado en cada sesión. El tratamiento fue repetido 5 veces en un periodo de 2 meses. Antes del tratamiento,

el 90.5% de todos los pacientes tuvieron una prueba de tracción del cabello positiva con una media de ocho cabellos. Después de la tercera sesión, la prueba de tracción del cabello fue negativa en todos los pacientes con un promedio de tres cabellos. Una disminución significativa de la pérdida del cabello (25%) fue observado entre la primera y la última inyección. Imágenes globales mostraron una mejora significativa en la calidad y el volumen del cabello. Todos menos cuatro pacientes notaron un mejor crecimiento de cabello y fuerza 3 semanas después del primer tratamiento. Después de un seguimiento promedio de 3 meses, el volumen del cabello se mantuvo estable y hubo un alto grado de satisfacción con un resultado promedio de 7 en una escala de 1 a 10. (55)



Las imágenes A son previas al tratamiento con inyecciones de factores plaquetarios. Las imágenes B son después del tratamiento con inyecciones de factores plaquetarios. Se puede observar que en las imágenes B hay más abundante cabello que en las imágenes A

Un estudio realizado por Uebel et al. comparó dos áreas donde se realizó un procedimiento de injerto de cabello, una tratada con factores de crecimiento

plaquetario antes de injertarlas y la otro no, el control. Observó una diferencia significativa en el rendimiento de las unidades foliculares cuando comparo el experimento con las áreas de control del cuero cabelludo. Las áreas tratadas con los factores de crecimiento plaquetario demostraron un rendimiento de 18.7 unidades foliculares por cm^2 , mientras que el rendimiento de las áreas de control fue de 16.4 unidades foliculares por cm^2 , un incremento en la densidad folicular del 15.1 por ciento. Algunos pacientes sólo experimentaron un 3 por ciento y otros experimentaron un aumento del 52 por ciento de la densidad. (56)

Estética facial.

El envejecimiento es un fenómeno multifactorial que afecta todos los niveles del organismo y que no siempre coincide con la edad, ya que la influencia de factores externos es importante. La estética facial ofrece a los pacientes tratamientos que preservan su buena imagen y autoestima tales como: peeling físico y químico, intradermoterapia con medicamentos reestructurantes, bioestimulación con factores autólogos de crecimiento y el uso de aparatología (radiofrecuencia y láser). (57)

La bioestimulación es un conjunto de procedimientos para activar biológicamente las funciones anabólicas del fibroblasto, fundamentalmente, la producción de colágeno tipo III, elastina y ácido hialurónico a partir de sus precursores, prolina, lisina y glucosamina, respectivamente. (58)

La bioestimulación con factores plaquetarios autólogos es una técnica ambulatoria para la prevención y manejo del envejecimiento cutáneo, se basa en la fisiología de la piel y funciona muy bien sola o dentro de un plan terapéutico combinado. Los factores plaquetarios autólogos estimula la producción de colágeno, elastina y tejido epidérmico, lo que se traduce en piel más tersa, luminosa y de mejor calidad. Son mínimos los riesgos de formación de hematomas, infección, transmisión de enfermedades o reacciones alérgicas. (57)

Las formas de tratamiento con que se pueden aplicar los factores plaquetarios autólogos son:

- Terapia tópica (gel plaquetario) para reparación cutánea o luego de exfoliación química.

- Terapia subdérmica como coadyuvante en implante adiposo por déficit de volumen, ya que provoca una mayor y más rápida revascularización del implante y un aumento de la multiplicación de la células pluripotenciales (abundantes en tejido graso).
- Terapia intradérmica para bioestimulación cutánea.(58)

Un estudio realizado por Escobar et al. aplicó un protocolo de factores plaquetarios autólogos a 30 pacientes, 28 de sexo femenino y 2 de sexo masculino (a 4 se les realizó bioestimulación facial y capilar), comprendidos entre los 41 y los 82 años, con una media de 55,6. Antes de la aplicación de los factores plaquetarios autólogos hubo una estimulación previa (de 2 a 4 semanas). La adhesión al tratamiento fue satisfactoria, con un solo abandono luego de la segunda sesión, en la que se le aplicó el plasma. La cantidad media de sesiones necesarias, para observar los primeros signos de mejoría fue de tres (20 días después de aplicar los factores plaquetarios autólogos). No se reportaron reacciones adversas, ni complicaciones.

Satisfacción subjetiva (paciente):

Alto 73,33% Medio 23,33% Indeterminado 3,33%

Satisfacción objetiva (profesional):

Alto 33,33% Medio 53,33% Bajo 6,66%

Los resultados son apreciables desde los primeros días y es máxima a los 20/30 días. Los cambios más evidentes se dieron en la tersura y luminosidad, contorno facial, en tercio medio facial hubo atenuación importante de los surcos nasogenianos, labiomentonianos, arrugas peribucales y en la disminución de la flaccidez cervical. Se recomienda realizar tres sesiones el primer año y sesiones de mantenimiento, cada 6-12 meses para bioestimulación con factores plaquetarios autólogos no combinada con otras técnicas. Asistieron a la aplicación adicional de factores plaquetarios autólogos a los seis meses, el 43,33% de los pacientes y cumplido el año el 73,33%, más por la recomendación hecha que por deterioro facial. (57)



Fig 1: antes.



Fig 2: después.



Fig 3: antes.



Fig 4: después.

Otro estudio realizado por Fernández-Tresguerres et al. aplicó inyecciones de mesoterapia de factores plaquetarios autólogos en 10 mujeres entre 45-60 años en la cara, el cuello y el escote. Realizaron 3 sesiones mensuales y valoraron los resultados finales un mes después de la última sesión. Se hicieron otros antes y después del tratamiento, así como una ecografía cutánea de la misma zona de la cara antes y después del tratamiento. Todos los pacientes notaron mejoría en la calidad de la piel: más luminosa, hidratada, compacta y turgente. Ecográficamente se vio un aumento del grosor dérmico y una disminución del SLEB (Subepidermic Low Echogenic Band), marcador ecográfico del envejecimiento cutáneo. La mejoría no fue estadísticamente significativa, probablemente por el pequeño tamaño de la muestra. (59)



Fig. 1 Foto clínica pretratamiento



Fig. 2 Foto clínica postratamiento. (59)

Análisis.

A lo largo de la vida nuestro organismo está expuesto a situaciones que pueden causar daño en alguno de nuestros tejidos. El proceso natural de cicatrización ayuda a contener los daños en diversos tejidos, que en situaciones óptimas, daño agudo o autolimitado, puede llegar a recuperar la función de un órgano en particular, pero que en otros casos, solo permite recuperar la estructura y no la funcionalidad. La regeneración se ha visto que se genera en los seres vertebrados como un proceso natural bajo condiciones específicas, como por ejemplo, la presencia de células madres adultas en los tejidos. Ayudar con la presencia de moléculas que apoyen estos procesos es lo que se busca al aplicar factores plaquetarios autólogos.

Los factores plaquetarios autólogos ya están probados en varias ramas de la medicina como en cirugía maxilofacial, tratamiento para úlceras recalcitrantes, osteoartritis de rodilla y condropatías, reparación de tejidos músculoesqueléticos.

Aunque no hay efectos secundarios per se, por tratarse de un producto autólogo, no todas las personas son candidatas. Por lo tanto se tienen criterios de exclusión para el uso de los factores plaquetarios dentro de los cuales tenemos los siguientes: enfermedades cardiovasculares o cerebrovasculares, desordenes circulatorios, pruebas serológicas positivas (hepatitis B/C, sífilis, y HIV), enfermedades hematológicas (coagulopatía), enfermedades cardiovasculares severas, infecciones, inmunodepresiones, pacientes con terapia con anticoagulantes o antiagregantes, el uso de AINES dentro de los 5 días antes de la recolección de sangre y pacientes con valores de Hb < 11g/dl y valores de plaquetas de < 120,000/mm³, enfermedad autoinmune, antecedentes de neoplasias activas.

Proceso de los productos y la seguridad.

El procesamiento de las muestras debe hacerse en condiciones de esterilidad, esto ya sea en un equipo automatizado o utilizando campanas de bioseguridad para evitar la contaminación del producto por el ambiente. El proceso de la muestra hoy en día se puede separar en dos, utilizando anticoagulantes o no.

Cuando se utilizan anticoagulantes por lo general se busca mantener integras las plaquetas antes de la aplicación, y se activa previamente a la aplicación agregando sustancias que promueven la activación plaquetarias minutos antes de su aplicación en los tejidos a tratar. En el procesamiento con no anticoagulantes se usa la activación fisiológica para la liberación de los factores plaquetarios. Se realiza una centrifugación lleva a la formación del coagulo de fibrina, creando un producto tipo suero libre de células que contienen factores de crecimiento.

El uso de los factores plaquetarios se ha extendido más allá que para el uso de la regeneración de tejidos. Se ha visto que tienen propiedades anti-inflamatorias, las cuales reducen el dolor y mejoran el proceso de curación. Y no solo eso, el interés del uso de factores de crecimiento plaquetarios para la terapia celular basada en células madre mesenquimales, obtenidas de médula ósea, tejido adiposo o sangre de cordón umbilical, para la expansión ex vivo está incrementando.

Conclusión.

Los estudios de los contenidos de las plaquetas han llevado su uso más allá de los primeros propósitos clínicos que tenían, transfusión de concentrados plaquetarios para trombocitopenias.

Los factores de crecimiento plaquetario autólogos han mostrado efectividad en la regeneración de tejido de enfermedades músculo-esqueléticas, hueso, córnea, y heridas, en donde los tratamientos convencionales no ofrecen una curación verdadera.

Las medidas de seguridad que se implementan en torno a investigar la historia clínica del paciente, pruebas de laboratorio hematológicas, serología y microbiología, así como el procesamiento bajo condiciones de esterilidad, convierten al tratamiento de factores de crecimiento plaquetario* en un procedimiento seguro y sin efectos adversos para el pacientes.

El efecto anti-inflamatorio encontrado en los factores de crecimiento plaquetarios, abrirá en un futuro muy cercano nuevas aplicaciones clínicas y disminuirá seguramente la utilización de medicamentos analgésicos y anti-inflamatorios sobre todo en las patologías crónicas musculo-esqueléticas.

Bibliografía.

1. – Kumar. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*. 8th ed. Saunders (Elsevier). Chapter 3, *Tissue Renewal, Regeneration, and Repair*. p. 79, 102.
2. - **Regenerative Medicine I. Theories, Models and Methods**. Series: Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, Vol. 93. Yannas, Ioannis V. (Ed.) 2005. p. 3.
3. - Stocum, DL. **Regenerative biology and medicine**. *J Musculoskel Neuron Interact* 2002; 2(3):270-273.
4. – Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. **Wound repair and regeneration**. *Nature* 453, 314-321 (15 May 2008). doi:10.1038/nature07039; Published online 14 May 2008.
5. - Teller P, White TK. **Fisiología de la cicatrización de la herida: de la lesión a la maduración**. *Clínicas quirúrgicas de Norteamérica*. Vol. 3, 2009 (Ejemplar dedicado a: Cirugía cutánea e intervenciones menores), págs. 599-610.
6. – Diegelmann RF, Evans MC. **Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing**. *Frontiers in Bioscience*. 2004 Jan; 1 (9): 283-9.
7. – Enoch S, Leaper DJ. **Basic Science of Wound Healing**. *Surgery*. 2008 Feb; 26 (2): 31-37.
8. – Werner S, Grose R. **Regulation of Wound Healing by Growth Factors and Cytokines**. *Physiol Rev*. 2003 July 1; 83 (3): 835-870.
9. - Nauta A, Gurtner G, Longaker MT. **Wound healing and regenerative strategies**. *Oral Dis*. 2011 Sep;17(6):541-9.
10. – Stocum David L. *Regenerative biology and medicine*. 1st Edition. Academic Press. 2006. p. 4-16, 23, 25, 28, 29.
11. - Tsirogianni AK, Moutsopoulos NK, Moutsopoulos HM. **Wound healing: Immunological aspects**. *Injury*. 2006 Apr; 37 Suppl 1:S5-12.
12. - Naranjo TA, Noguera-Salvá R, Guerrero FF. **La matriz extracelular: morfología, función y biotensegridad (parte I)**. *Rev Esp Patol*. 2009; 42 (4): 249-261.
13. - Dutta RC, Dutta AK. **Comprehension of ECM-Cell dynamics: A prerequisite for tissue regeneration**. *Biotechnol Adv*. 2010 Nov-Dec; 28(6):764-769.

- 14.- Atala, Anthony; Lanza, Robert; Thomson, James A.; Nerem, Robert. *Principles of Regenerative Medicine*. Second Edition. Academic Press. 2011. p. 19, 24.
15. – Hoffman, Ronald. *Hematology: basis principles and practice*. 6th ed. Saunders. 2012. p. 1771-1777, 1781, 1784-1787.
16. – Blair P, Flaumenhaft R. **Platelet α -granules: Basic biology and clinical correlates**. Blood Rev. 2009 Jul; 23(4):177-89.
17. – Nurden AT. **Platelets, inflammation and tissue regeneration**. Thromb Haemost. 2011 May; 105 Suppl 1:S13-33.
18. – Whiteheart SW. **Platelet granules: surprise packages**. Blood. 2011 Aug 4; 118 (5):1190-1.
- 19.- Werner S, Grose R. **Regulation of Wound Healing by Growth Factors and Cytokines**. Physiol Rev. 2003 July 1; 83 (3): 835-870 .
- 20.- Thomson, Angus W.; Lotze, Michael T. *The Cytokine Handbook*. 4th edition. Academic Press. 2003. Volumen 1. p. 149, 151, 153, 501, 512, 513, 533, 747, 757, 761, 797, 959.
21. – Meager, Anthony. *The molecular Biology of Cytokines*. Wiley. 1998. p. 5-8, 146, 149, 151, 170-172.
22. - Kumar. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*. 8th ed. Saunders (Elsevier). Chapter 3, *Tissue Renewal, Regeneration, and Repair*. p. 79, 102.
23. – Kiwanuka E, Junker J, Eriksson E. **Harnessing Growth Factor to Influence Wound Healing**. Clin Plast Surg. 2012 Jul; 39 (3):239-48.
24. – Mazzucco L, Borzini P, Gope R. **Platelet-Derived Factors Involved in Tissue Repair – From Signal to Function**. Transfus Med Rev. 2010 Jul; 24 (3):218-34.
25. - Eming SA, Hammerschmidt M, Krieg T, Roers A. **Interrelation of immunity and tissue repair or regeneration**. Semin Cell Dev Biol. 2009 Jul; 20 (5):517-27.
- 26.- Puig-Kröger A, Sierra-Filardi E, Domínguez-Soto A, Samaniego R, Corcuera MT, Gómez-Aguado F, Ratnam M, Sánchez-Mateos P, Corbí AL. **Folate Receptor β Is Expressed by Tumor-Associated Macrophages and Constitutes a Marker for M2 Anti-inflammatory/Regulatory Macrophages**. Cancer Res. 2009 Dec 15; 69 (24):9395-403.
- 27.- Anitua E, Prado R, Sánchez M. **Platelet-Rich Plasma: Preparation and Formulation**. Operative Techniques in Orthopaedics. 2012 March; 22 (1): 25-32.

- 28.- Anitua E, Sánchez M, Orive G. **Potential of endogenous regenerative technology for in situ regenerative medicine.** Adv Drug Deliv Rev. 2010 Jun 15; 62 (7-8):741-52.
- 29.- Jover Botella A, Márquez Peiró JF, Márques K, Monts Cambero N, Selva Otaolaurruchi J. **Evaluación de la efectividad del colirio de suero autólogo en el tratamiento de patologías oculares.** Farm Hosp. 2011; 35 (1): 8-13.
- 30.- López-García JS, García-Lozano I, Rivas L, Martínez-Garchitorena J. **Aplicación de suero autólogo en oftalmología.** Arch Soc Esp Oftalmol. 2007; 82: 9-20
31. – Reinhard, Thomas. *Corneal and external eye disease.* Springer. p. 1-20.
- 32.- Ashok, Garg; Sheppard, John; Donnenfeld, Eric. *Ojo seco y otros trastornos de la superficie ocular.* Médica Panamericana. 2008. p. 30, 31
33. – Fernández A, Moreno J, Prósper F, García M, Echeveste J. **Regeneración de la superficie ocular: stem cells/células madre y técnicas reconstructivas.** Anales Sis San Navarra. 2008. Ene – Abr 31(1)
34. - Wolber EV, Jelkmann W. **Thrombopoietin: The novel hepatic hormone.** Physiology. 2002 Feb 1; 17 (1): 1 6-10.
35. - Murata S, Hashimoto I, Nakano Y, Myronovych A, Watanabe M, Ohkohchi N. **Single Administration of Thrombopoietin Prevents Progression of Liver Fibrosis and Promotes Liver Regeneration after Partial Hepatectomy in Cirrhotic Rats.** Ann Surg. 2008 Nov; 248 (5):821-8.
36. – Skinner, Harry B. *Current diagnosis and treatment in orthopedics.* 4th edition. McGraw – Hill. 2003.
37. – Pietrzak, William S. *Musculoskeletal Tissue Regeneration.* Human Press. 2008. p. 1-23.
38. - Steinert AF, Middleton KK, Araujo PH, Fu FH. **PRP in Orthopedic Surgery and Sport Medicine: Pearls, Pitfalls, and New Trends in Research.** Operative Techniques in Orthopaedics. 2012 Jun; 22 (2): 91-103.
- 39.- Radice F, Yanez R, Gutierrez V, Pinedo M, Rosales J, Coda S. **Uso de concentrado autólogo rico en factores de crecimiento en la reconstrucción del LCA.** Artrosc. (B. Aires). 2008 Mayo; 15 (1): 31-40.
- 40.- Aplicación de plasma autólogo rico en factores de crecimiento en cirugía artroscópica.

41. – Frizziero A, Giannotti E, Ferraro C, Masiero S. **Platelet rich plasma intra-articular injections: a new therapeutic strategy for the treatment of knee osteoarthritis in sport rehabilitation. A systematic review.** Sport Sci Health. 2012 July; 8 (1): 15-22.
42. - Gerter R, Kruegel J, Miosge N. **New insights into cartilage repair — The role of migratory progenitor cells in osteoarthritis.** Matrix Biol. 2012 Apr; 31(3):206-13.
43. - Kon E, Buda R, Filardo G, Di Martino A, Timoncini A, Cenacchi A, Fornasari PM, Giannini S, Marcacci M. **Platelet-rich plasma: intra-articular knee injections produced favorable results on degenerative cartilage lesions.** Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2010 Apr; 18 (4):472-9.
44. - Filardo G, Kon E, Buda R, Timoncini A, Di Martino A, Cenacchi A, Fornasari PM, Giannini S, Marcacci M. **Platelet-rich plasma intra-articular knee injections for the treatment of degenerative cartilage lesions and osteoarthritis.** Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2011 Apr; 19 (4):528-35.
- 45.- Kampa RJ, Connell DA. **Treatment of tendinopathy: is there a role for autologous whole blood and platelet rich plasma injection?** Int J Clin Pract. 2010 Dec; 64 (13):1813-23.
- 46.- Kon E, Filardo G, Delcogliano M. **Platelet-rich plasma: new clinical application: a pilot study for treatment of jumper's knee.** Injury. 2009 Jun; 40 (6): 598–603.
- 47.- Filardo G, Kon E, Della Villa S, Vincentelli F, Fornasari PM, Marcacci M. **Use of platelet-rich plasma for the treatment of refractory jumper's knee.** Injury. Int Orthop. 2010 Jun; 40 (6): 909-915.
- 48.- Mishra A, Woodall J Jr, Vieira A. **Treatment of tendon and muscle using platelet-rich plasma.** Clin Sports Med. 2009 Jan; 28(1):113-25.
- 49.- Dermatology in Clinical Practice. Authors: S.W Lanigan, Zohra Zaidi. Pages 1-15, 364-371. Springer. eBook.
- 50.- Crovetto G, Martinelli G, Issi M, Barone M, Guizzardi M, Campanati B, Moroni M. **Platelet gel for healing cutaneous chronic wounds.** Transfus Apher Sci. 2004 Apr; 30 (2):145-51.
51. - Demidova-Rice TN, Hamblin MR, Herman IM. **Acute and Impaired Wound Healing: Pathophysiology and Current Methods for Drug Delivery, Part 1:**

- Normal and Chronic Wounds: Biology, Causes, and Approaches to Care.** Adv Skin Wound Care. 2012 Jul; 25(7):304-14.
52. - McAleer JP, Sharma S, Kaplan EM, Persich G. **Use of Autologous Platelet Concentrate in a Nonhealing Lower Extremity Wound.** Adv Skin Wound Care. 2006 Sep;19 (7):354-63.
- 53.- Burón Alvarez I, Fernández-Tresguerres A, Calvo M, Alfageme F, Villegas C, Fernández R. **Tratamiento de úlceras cutáneas crónicas con plasma autólogo rico en plaquetas.** Piel. 2012 Oct; 27 (8): 429-434.
- 54.- Clinical Dermatology, Fourth Edition. Richard P. J. B. Weller, John A. A. Hunter, John A. Savin, Mark V. Dahl. Página 179
- 55.- Betsi EE, Germain E, Kalbermatten DF, Tremp M, Emmenegger V. **Platelet-rich plasma injection is effective and safe for the treatment of alopecia.** Eur J Plast Surg. Published online: 14 March 2013. DOI 10.1007/s00238-013-0816-5
56. - Uebel CO, da Silva JB, Cantarelli D, Martins P. **The role of platelet plasma growth factors in male pattern baldness surgery.** Plast Reconstr Surg. 2006 Nov; 118 (6):1458-66.
57. - Escobar HM. **Terapia de bioestimulación con plasma rico en plaquetas para el envejecimiento cutáneo.** Rev. argent. dermatol. 2012 Marzo, vol.93, n.1
58. – García Gímenez JV, González JA, Albandoa N. **Tratamiento del envejecimiento cutáneo mediante bioestimulación con factores de crecimiento autógenos.** Inter J Cosmet Med Surg. 2005; 7 (2): 8-14.
59. - Fernández-Tresguerres A, Alfageme Roldán F, Burón Álvarez I, Rodríguez Sánchez R, Villegas Fernández C. **Bioestimulación cutánea con plasma rico en plaquetas autólogo. Estudio controlado con ecografía.** Piel. 2013 Feb; 28 (2):69-74.
- 60.- Whiteheart SW. **Platelet granules: surprise packages.** Blood. 2011 Aug 4; 118(5):1190-1.
- 61.- Friedman SL, Sheppard D, Duffield JS, Violette S. **Therapy for fibrotic diseases: nearing the starting line.** Sci Transl Med. 2013 Jan 9; 5(167):167sr1