



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



**Universitat Autònoma de Barcelona**

**Validar el uso de fibrina rica en plaquetas y leucocitos (L-PRF) en caballos para  
aumentar los procesos de regeneración tisular.**

**Tesis Doctoral**

**Román Fulgencio Jiménez Aristizabal**

**Dirigida por**

**Dra. Marta Prades Robles**

**Dr. Jorge Uriel Carmona**

**Departamento de Medicina y Cirugía Animal**

**Facultad de Medicina Veterinaria**

**Bellaterra, 2017**

**Marta Prades Robles**, Profesora Titular Del Departamento de Medicina y Cirugía animal, de la facultad de veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona,

**Jorge Uriel Carmona**, Profesor del Departamento de Sanidad Animal, de la Facultad de Veterinaria, Universidad de Caldas, Manizales, Colombia.

## **CERTIFICAN**

Que la tesis doctoral con el título “**Validar el uso de fibrina rica en plaquetas y leucocitos (L-PRF) en caballos para aumentar los procesos de regeneración tisular**” presentada por **Román F. Jiménez Aristizabal** para optar al grado de Doctor, ha sido realizada bajo nuestra dirección, y considerándola finalizada, autorizamos su presentación para que sea juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, firmamos el presente certificado.

Bellaterra, el 15 de junio del 2017.

---

**Marta Prades Robles**

---

**Jorge Uriel Carmona**

Con todo mi cariño a mi madre, mi esposa e hijos....

## **Agradecimientos**

## Contenido

Lista de tablas .....	8
Lista de figuras .....	9
Nomenclaturas .....	12
1. Introducción .....	16
1.1. Qué son las plaquetas (PLTs).....	16
1.1.2. Formación de las plaquetas.....	16
1.1.3. Estructura .....	17
1.1.4. Activación plaquetaria.....	20
1.1.5. Modificación de la forma de las plaquetas.....	21
1.1.6. Agregación.....	21
1.1.7. Secreción .....	22
1.2. Leucocitos y quimioquinas .....	23
1.3. Factores de crecimiento (GF).....	25
1.3.1. Factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF) .....	27
1.3.2. Factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) .....	28
1.3.3. Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) .....	29
1.3.4. Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF).....	30
1.3.5. Factor de crecimiento derivado de fibroblastos (FGF) .....	31
1.3.6. Interleuquina 4 (IL-4) y el receptor antagonista de la interleuquina 1 (IL-1ra) .....	31
1.3.7. Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ).....	31
1.4. Concentrados plaquetarios (CP) .....	32
1.4.1. Clasificación de los concentrados plaquetarios.....	34
1.4.2. La fibrina rica en plaquetas y leucocitos (L-PRF) .....	35
1.5. Células troncales mesenquimales (MSC) .....	41
1.5.1. Parámetros para la clasificación de las células troncales mesenquimales .	42
1.5.2. Células troncales mesenquimales equinas .....	44
2. Hipótesis .....	48
3. Objetivos .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
3.1. Objetivo general .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
3.2. Objetivos específicos .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
4. Artículos .....	51
<b>4.1. Microscopic characterization and the temporary release of 4 Growth factors from equine leukocyte and platelet rich fibrin clots</b> .....	51
4.1.1 Introduction .....	52

4.1.2. Materials and methods .....	53
4.1.3. Results.....	57
4.1.4. Discussion .....	62
4.1.5. References .....	65
4.2. Long term cytokine and growth factor release from equine platelet-rich fibrin clots obtained with two different centrifugation protocols .....	68
4.2.1. Introduction .....	69
4.1.2. Methods .....	70
4.2.3. Results.....	72
4.2.4. Discussion .....	77
4.2.5. Conclusions .....	80
4.2.6. References .....	82
5. Evaluaciones anexas .....	86
5.1. Evaluación de 4 factores de crecimiento del exudado del coágulo de L-PRF en tubo Proteal® .....	86
5.1.1. Introducción .....	86
5.1.2. Metodología .....	86
5.1.3. Análisis Estadístico.....	89
5.1.4. Resultados.....	89
5.1.5. Conclusion .....	90
5.2. Evaluación de TGF-β1 del exudado del coágulo de L-PRF elaborado en tubo Falcón™ (cilindro de L-PRF).....	91
5.2.1. Introducción .....	91
5.2.2. Metodología .....	91
5.2.3. Evaluación histológica .....	92
5.2.4. Análisis Estadístico.....	93
5.2.5. Resultados.....	93
5.2.6. Conclusion .....	95
5.3. Comparación del factor de crecimiento TGF-β1 obtenido del exudado del coágulo y la membrana de L-PRF de dos protocolos de producción diferentes.....	95
5.3.1. Introducción .....	95
5.3.2. Metodología .....	96
5.3.3. Análisis Estadístico.....	99
5.3.4. Resultados.....	100
5.3.5. Conclusion .....	101
5.4. Evaluación piloto del cilindro de L-PRF (cPRF) como andamio para la proliferación de células troncales mesenquimales.....	102

5.4.1. Introducción .....	102
5.4.2. Localización .....	102
5.4.3. Factores de inclusión de la muestra para la elaboración del cPRF.....	103
5.4.4. Metodología .....	103
5.4.5. Resultados.....	107
5.4.6. Conclusion .....	109
6. Caso clínico .....	110
6.1. Uso de una plastia muscular en combinación con fibrina rica en plaquetas y leucocitos para la reconstrucción de un defecto del seno maxilar .....	110
6.1.1. Reseña. ....	110
6.1.2. Anamnesis .....	110
6.1.3. Examen físico/Observación .....	110
6.1.4. Exámenes complementarios iniciales.....	111
6.1.5. Diagnóstico definitivo .....	111
6.1.6. Tratamiento quirúrgico.....	112
6.1.7. Tratamiento postquirúrgico .....	113
6.1.8. Evolución .....	113
6.1.9. Conclusion .....	114
8. Discusión .....	115
9. Conclusiones .....	126
10. Referencias.....	127



## **Lista de tablas**

### **Introducción**

**Tabla 1.** Factores de crecimiento, tipos de células productoras y su función en heridas agudas y crónicas..... 26

**Tabla 2.** Clasificación de los principales métodos de producción de concentrados plaquetarios disponibles en humanos..... 34

### **Artículo 4.1**

**Tabla 1.** Valores obtenidos al evaluar los diferentes factores de crecimiento..... 61

### **Artículo 4.2**

**Table 1.** La concentración total de citoquinas y factores de crecimiento en lisados sanguíneos, plasma y sobrenadantes de suero a partir de coágulos de PRF obtenidos con ambos protocolos de centrifugación..... 75

**Table 2.** Correlación de Pearson entre las concentraciones globales de citoquinas y factor de crecimiento..... 77

### **Anexo 5.1**

**Tabla 1.** Valores obtenidos al evaluar los diferentes factores de crecimiento elaborado en tubo Proteal®..... 90

### **Anexo 5.2**

**Tabla 1.** Valores obtenidos al evaluar TGF- $\beta$ 1 elaborado en tubo Falcón™ ..... 94

## Lista de figuras

### Introducción

**Figura 1.** Representación esquemática de las diferentes estructuras de las plaquetas..... 13

**Figura 2.** Diferenciación de las MSC de medula ósea..... 40

**Figura 3.** Colonia de MSC procedente de medula ósea de caballo después de ocho días de aislamiento..... 43

### Artículo 4.1

**Figura 1.** Esquema de elaboración del coágulo de L-PRF..... 54

**Figura 2.** Computador para microscopía electrónica de barrido..... 55

**Figura 3.** Microscopio electrónico de transmisión..... 56

**Figura 4.** Representación esquemática y real del L-PRF y su división en el tubo de preparación..... 57

**Figura 5.** Histología del coágulo de L-PRF en el día 0 ..... 57

**Figure 6.** Observación de la base celular del coágulo de L-PRF en el día 0..... 58

**Figura 7.** Observación de la base de fibrina del coágulo de L-PRF durante diferentes días de evaluación ..... 59

**Figura 8.** Plaquetas en el día 0 de incubación..... 60

**Figura 9.** Plaquetas en diferentes tiempos de incubación..... 60

**Figura 10.** Coágulos de L-PRF producidos en tubos vacutainer® ..... 61

**Figura 11.** Grafico de la concentración de diferentes factores de crecimiento del coágulo de L-PRF en picogramos por mililitro, durante 18 días de incubación..... 62

## **Artículo 4.2**

**Figura 1.** Fotografía del PRF equino (PRF)..... 70

**Figura 2.** Concentración media de citoquinas (pg/mL), liberadas por el coágulo de PRF en incubación obtenido de dos protocolos de centrifugación..... 73

**Figura 3.** Concentración media de diferentes factores de crecimiento (pg/mL), liberadas por el coágulo de PRF en incubación obtenido de dos protocolos de centrifugación..... 74

**Figure 4.** Concentración media de factores de crecimiento (pg/mL), en plasma, lisado de sangre, y la liberación del suero sobrenadante, liberadas por el coágulo de PRF en incubación obtenido de dos protocolos de centrifugación..... 76

## **Anexo 5.1**

**Figura 1.** Elaboración del coágulo de L-PRF..... 88

**Figura 2.** Preparación y evaluación de los 4 factores de crecimiento (TGF- $\beta$ 1, IGF-1, VEGF y PDGF-AB)..... 89

## **Anexo 5.2**

**Figura 1.** Grafica de la concentración de TGF- $\beta$ 1 en picogramos por mililitro, durante los 18 días de incubación..... 94

**Figura 2.** Histología del cilindro de L-PRF..... 95

## **Anexo 5.3**

**Figura 1.** Esquema de procesamiento de los coágulos y membranas, para la evaluación del factor de crecimiento TGF- $\beta$ 1..... 98

**Figura 2.** Membranas de L-PRF..... 100

**Figura 3.** Comparación de la concentración de TGF- $\beta$ 1 en picogramos por mililitro, durante 18 días de incubación en dos protocolos diferentes de preparación del coágulo y membrana de L-PRF..... 100

## **Anexo 5.4**

<b>Figura 1.</b> Cilindro de L-PRF (cPRF).....	103
<b>Figura 2.</b> Extracción y aislamiento de células troncales mesenquimales a partir de médula ósea.....	104
<b>Figura 3.</b> Cultivo y expansión de células mesenquimales.....	105
<b>Figura 4.</b> Cultivo de las MSC en el cilindro de L-PRF.....	106
<b>Figura 5.</b> Visualización macroscópica del cultivo de las MSC en los cilindros de L-PRF.....	108
<b>Figura 6.</b> Visualización microscópica del cultivo de las MSC en los cilindros de L-PRF al día 8 de incubación.....	108
<b>Caso clínico 6.1</b>	
<b>Figura 1.</b> Defecto en el seno maxilar derecho.....	110
<b>Figura 2.</b> Radiografía lateromedial de cráneo.....	111
<b>Figura 3.</b> Transposición de periostio y del músculo elevador nasolabial para cubrir la lesión.....	112
<b>Figura 4.</b> Cobertura defecto y aplicación de las membranas de L-PRF.....	113
<b>Figura 5.</b> Fotografía realizada 25 días post-cirugía.....	114
<b>Figura 6.</b> Aspecto del caballo 10 meses post-cirugía.....	114

## Nomenclaturas

- MKs = Megacariocitos
- PLTs = Plaquetas
- IL = Interleuquina
- ADP = Adenosín difosfato
- OCS = Sistema canicular abierto
- TSP = Trombospondina
- GF = Factores de crecimiento
- PDGF = Factor de crecimiento derivado de las plaquetas
- EGF = Factor de crecimiento epidérmico
- TGF = Factor de crecimiento transformante
- VEGF = Factor de crecimiento endotelial vascular
- PF = Factor plaquetario
- $\alpha$  = Alfa
- $\beta$  = Beta
- vWF = Factor von Willebrand
- GP = Glicoproteína
- PAF = Factor activador de las plaquetas
- ATP = Adenosín trifosfato
- ECM = Matriz extracelular
- IGF-1 = Factor de crecimiento semejante a la insulina
- FGF = Factor de crecimiento de fibroblastos
- mRNA = Ácido ribonucleico mensajero
- CP = Concentrados plaquetarios
- FS = Sellantes de fibrina
- PRP = Plasma rico en plaquetas
- PRGF = Plasma rico en factores de crecimiento
- PRF = Fibrina rica en plaquetas
- P-PRP = Plasma rico en plaquetas puro sin leucocitos
- L-PRP = Plasma rico en plaquetas y leucocitos
- P-PRF = Fibrina rica en plaquetas pura sin leucocitos
- L-PRF = Fibrina rica en plaquetas y leucocito
- MSC = Células troncales mesenquimales
- ISCT = Sociedad internacional de terapia celular
- IFN = Interferón

- TNF = Factor de necrosis tumoral
- MHC = Complejo principal de histocompatibilidad
- PAI = Inhibidor de la actividad del plasminógeno
- ADN = Ácido desoxirribonucleico
- CBC = Conteo celular de la sangre
- EDTA = El ácido etilendiaminotetraacético
- Na = Sodio
- g = Fuerza de gravedad de la centrifuga
- IBB = Instituto de biomedicina y biotecnología
- WBC = Células blancas de la sangre
- RBC = Células rojas de la sangre
- Elisa = Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas
- DMEM = Medio Eagle Modificado de Dulbecco
- RT-PCR = Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
- H&E = Tinción hematoxilina y eosina
- DMSO = Dimetilsulfóxido
- SEM = Microscopía electrónica de barrido
- TEM = Microscopía electrónica de transmisión
- MTT = Ensayo de la reducción metabólica del Bromuro
- GLM = Modelo lineal general

## Resumen general

## **Abstract**



## **1. Introducción**

En la actualidad las plaquetas continúan siendo un tema de gran interés por parte de los investigadores en biología molecular, enzimología, hemostasia, farmacología antitrombótica e ingeniería de tejidos entre otras.

### **1.1. Qué son las plaquetas (PLTs)**

Las PLTs son fragmentos citoplasmáticos anucleados con actividad secretora, que se producen como consecuencia de la ruptura de los megacariocitos (MKs) de la médula ósea (García, 2000; Tablin, 2000; Rozman, 2007; Boudreux, 2010; Burnouf, 2013).

El diámetro medio de las PLTs varía entre diferentes individuos, al igual que en el tamaño de las plaquetas de un mismo individuo (White, 2007). Las plaquetas equinas son fragmentos citoplasmáticos discoides, como las PLTs de humanos y su vida media en sangre es de 7 a 10 días (García, 2000; White, 2007; Gentry, 2008, Burnouf, 2013). Tienen un área de  $5,33 \pm 1,34 \mu\text{m}^2$ , un perímetro de  $7,67 \pm 1,37 \mu\text{m}$ , el eje mayor es de  $2,18 \pm 1,16 \mu\text{m}$  y el menor de  $1,76 \pm 1,45 \mu\text{m}$  en su estado normal (Paes-Leme, 2006), aunque es frecuente observar PLTs grandes ( $>20 \mu\text{m}$ ) en el torrente sanguíneo de caballos y conejillos de indias, denominadas proplaquetas (Tablin, 2000, Arguelles, 2006; Gentry, 2008).

Las plaquetas tienen una función hemostática bien conocida (Jurk, 2005; Zamdim, 2012; Burnouf, 2013). Además, son capaces de liberar factores que promueven la reparación de tejidos, la angiogénesis, la regeneración de órganos (Burnouf, 2013) y la inflamación (Rozman, 2007; Jurk 2005). Las PLTs liberan una amplia gama de moléculas inflamatorias y mitogénicas en el sitio de la lesión; involucradas en todas las fases del proceso de cicatrización de heridas (Rozman, 2007).

#### **1.1.2. Formación de las plaquetas**

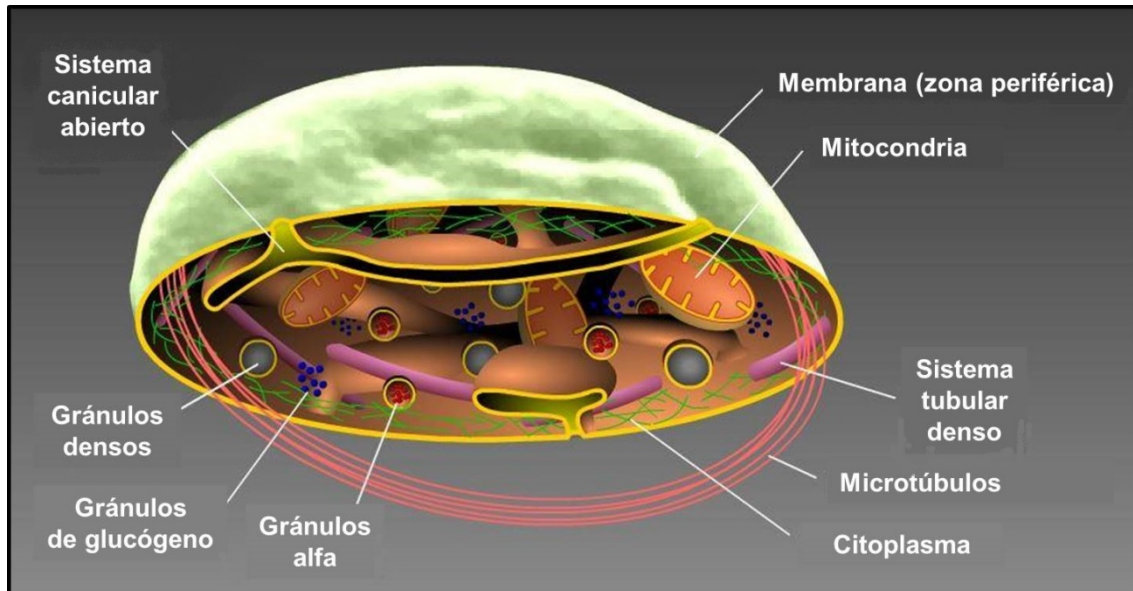
Las PLTs se forman a partir de vesículas que se desprenden en grandes cantidades de las membranas externas de los megacariocitos (MKs) (García, 2000).

Los megacariocitos se desarrollan a partir de células progenitoras multipotenciales (Italiano, 2007), que son células mieloides pertenecientes al tejido hematopoyético y a la sangre circulante (Leven, 2000).

Los MKs producen proyecciones citoplasmáticas que se llenan con las proteínas del citoesqueleto, gránulos específicos y los sistemas de membrana, conocidas como proplaquetas. Estas proyecciones se cortan y liberan las plaquetas en el torrente sanguíneo, aunque, el proceso biológico que conduce a su producción no es aun completamente claro (Hartwing, 2003).

### 1.1.3. Estructura

Las plaquetas poseen organelos inespecíficos, como mitocondrias, lisosomas y peroxisomas, que tienen características y funciones similares a los de otras células, además, portan organelos específicos, que son los gránulos alfa y los gránulos densos (García, 2000) (Figura 1).



**Figura 1.** Representación esquemática de las diferentes estructuras de las plaquetas. Adaptado de <http://www.platelet-research.org/3/morphology.htm>

#### 1.1.3.1. La membrana de las plaquetas

La membrana plasmática es una unidad trilaminar compuesta por una bicapa de fosfolípidos, el glicocálix y la capa submembranosa (Tablin, 2000):

- **La capa central o unidad de membrana:** esta estructura está hecha de una capa doble de fosfolípidos con propiedades anticoagulantes, idéntica a la de otras células, con proteínas transmembranales y proteínas periféricas que actúan como receptores de membrana (White, 2007).
- **El glicocálix:** es la capa exterior que contiene receptores glicoprotéicos involucrados en la adhesión y la activación de las PLTs; al igual interactúa con otros elementos celulares para la formación del coágulo (White 2007). Estas glicoproteínas constituyen los antígenos de membrana, que se dividen en tres clases: integrinas, proteínas ricas en leucina y selectinas (Tablin, 2000).
- **La capa interna de la membrana o capa submembranosa:** es una parte del citoesqueleto que contiene los microtúbulos de actina dando la forma discal de las

PLTs en reposo. Esta membrana se pliega formando una serie de acantilados que constituyen el sistema canicular abierto (OCS) en la mayoría de los mamíferos.

#### **1.1.3.2. El citoplasma**

El citoplasma de las PLTs está compuesto de las mismas proteínas citoplasmáticas de los MKs. En las PLTs, hay dos tipos de actina: la actina globular y la lineal. Los filamentos entrecruzados de actina constituyen una barrera para la exocitosis y actúan como un soporte estructural para diferentes gránulos de las plaquetas y mitocondrias (García, 2000). La respuesta de las plaquetas está mediada por una actividad contráctil gracias a la polimerización de actina-miosina (Hartwig, 2003). Además, contiene partículas de glucógeno diseminadas o aglomeradas que constituyen la fuente energética de esta célula en forma similar a las células musculares (García, 2000).

En el citoplasma de las PLTs también hay movimiento libre de gránulos de glucógeno, siendo este la principal fuente de energía para el metabolismo de las plaquetas inactivadas (Tablin, 2000).

#### **1.1.3.3. Los microtúbulos**

Justo debajo de la membrana de las plaquetas hay una banda circular de microtúbulos. Estos son estructuras cilíndricas compuestas de protofilamentos formados por dímeros de alfa-beta tubulina (Boudreaux, 2010) que miden 25 nm de diámetro (White, 2007).

Los microtúbulos son los responsables de mantener la forma discoidal de las plaquetas circulantes (Boudreaux, 2010). Después de la activación de las PLTs los microtúbulos se reorganizan y ordenan linealmente. El montaje adecuado del citoesqueleto es fundamental para la centralización de los gránulos de las plaquetas, la secreción y la retracción del coágulo (White, 2007).

#### **1.1.3.4. Sistema canicular abierto (OCS)**

Está conectado a la superficie de la plaqueta y se extiende a la profundidad con el citoplasma en un masivo canal abierto interconectado, aunque la ausencia de éste en algunos mamíferos hace dudar sobre su origen (Boudreaux, 2010).

El OCS en las células humanas sirve para expandir la superficie total de la célula y recibir señales de activación para tomar las proteínas del plasma como el fibrinógeno (Tablin, 2000). Es la ruta principal para la extrusión del contenido de los gránulos alfa y el almacenamiento de los productos de los cuerpos densos, después de su estimulación (Gader, 2008).

El OCS no se ha observado en equinos (Segura, 2006; Gentry, 2008). La ausencia de este en las plaquetas equinas indica la existencia de rutas alternativas para llevar a cabo los procesos de secreción plaquetaria en caballos (Brunso, 2010).

#### **1.1.3.5. Sistema tubular denso**

Es un sistema de membranas que aparece en la vecindad de los microtúbulos y rodea los organelos, con apariencia y funciones similares a las del retículo endoplásmico liso de otras células. Regula la activación plaquetaria mediante el secuestro o liberación de calcio, de forma similar a los túbulos del músculo esquelético y por un mecanismo más rápido que el de las mitocondrias (García, 2000).

#### **1.1.3.6. Mitocondria**

Las mitocondrias juegan un papel importante en las plaquetas para proveer y mantener la energía metabólica requerida durante los eventos de agregación y secreción (White, 2007; Boudreaux, 2010).

#### **1.1.3.7. Los gránulos plaquetarios**

Las plaquetas de mamíferos contienen tres tipos de gránulos: densos, lisosomales y alfa. Estos gránulos son heterogéneos en cuanto a contenido y morfología (White, 2007; Boudreaux, 2010).

- **Gránulos o cuerpos densos:** son menos numerosos (Tablin, 2000) y más pequeños que los gránulos alfa, con un promedio de 4 a 8 por PLT (White, 2007). Representan el sitio de almacenamiento para nucleótidos de adenina (ADP y ATP), serotonina, calcio y fosfatos inorgánicos, pero no sirven como fuente de energía (White, 2007; Boudreaux, 2010). Los cuerpos densos de los caballos son similares en apariencia y en número al de los humanos (Segura, 2006).
- **Gránulos lisosomales:** estos gránulos pueden degradar material intracelular o pueden fundirse en la membrana del OCS para liberar su contenido en el espacio extracelular (Tablin, 2000). Contienen hidrolasas ácido dependientes incluidas las glicosidasas, las proteasas y las lipasas. La membrana lisosomal contiene proteínas que son exteriorizadas durante la liberación de las plaquetas (Boudreaux, 2010).
- **Gránulos alfa ( $\alpha$ ):** son los gránulos más grandes y numerosos de las PLTs, el número depende del tamaño de la plaqueta y el espacio que ocupen las otras estructuras. Usualmente se pueden encontrar de 40 a 80 gránulos alfa por PLT (White,

2007), de aproximadamente 0.2 a 0.4 mm de diámetro (Gader, 2008), lo que constituye un 15 % del volumen total de las células (García, 2000).

Los gránulos  $\alpha$  son únicos en términos de estructura y en su paquete de funciones. Estructuralmente estos gránulos están compuestos principalmente por dos compartimentos: una región central oscura o submembranosa donde se localiza la región del nucleótido que contiene proteoglicanos, la beta-tromboglobulina y el factor de las plaquetas (PF)-4 y una región gris (en la periferia), que sería la región de la matriz en la que se encuentra el factor von Willebrand (vWF), factor de la coagulación V, trombospondina (TSP) y P-selectina (White, 2007; Boudreaux, 2010). En equinos la secreción de la integrina P-selectina está relacionada con la activación de las PLTs (Segura, 2006). También contienen proteínas de adhesión (fibronectina, vitronectina), factores de coagulación (fibrinógeno, factor IV), factores de fibrinólisis, factores mitógenos de crecimiento, citoquinas, quimioquinas, factores de la regulación de angiogénesis y glicoproteínas de la membrana (Tablin, 2000).

Los gránulos  $\alpha$  están muy involucrados en el proceso de cicatrización de las heridas y en la regeneración de los tejidos por contener numerosos factores de crecimiento (FC), como son el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) (Tablin, 2000; Burnouf, 2013).

El citoplasma de los caballos está lleno de gránulos  $\alpha$ , que son dos veces más grandes que los de las plaquetas humanas (Gader, 2008; Brunso, 2010). La subestructura de los gránulos  $\alpha$  de las plaquetas equinas tienen una matriz mas organizada en comparación con la matriz de los gránulos en humanos (Segura, 2006; Gader, 2008; Brunso, 2010). El fibrinógeno aparece separado y se intercala entre las otras proteínas de la matriz de los gránulo  $\alpha$  (White, 2007).

#### **1.1.4. Activación plaquetaria**

Las plaquetas pueden ser activadas por diversos mecanismos: por contacto directo y adherencia a la capa subendotelial de una lesión endotelial o daño vascular; por la acción de los agonistas fisiológicos (trombina, ADP, colágeno, tromboxano A<sub>2</sub>, epinefrina, factores de activación plaquetaria) (Carmona, 2007; Jurk, 2005) que

interactúan con receptores específicos de la membrana asociada a la proteína G y por otros mecanismos que producen señales intracelulares (Jurk, 2005; Rozman, 2007).

Las plaquetas interactúan con proteínas de la matriz extracelular a través de adhesivos específicos a las glucoproteínas. La unión de agonistas bioquímicos a sus receptores ocasionan cambios en la membrana plasmática e inducen una compleja cascada de señales en la membrana intracitoplasmática, lo que resulta en la activación de las PLTs (Jurk, 2005), activación de la cascada de la coagulación y formación de trombina que a su vez contribuye a estimular la activación plaquetaria por retroalimentación positiva (Rozman, 2007). Después de su activación las PLTs cambian de forma, siendo ésta la primera manifestación física de activación (García, 2000), los gránulos (incluyendo ADP, serotonina y fibrinógeno) secretan su contenido, se agregan y a continuación el coágulo se retrae (Tablin, 2000; Jurk, 2005; Rozman, 2007).

#### **1.1.5. Modificación de la forma de las plaquetas**

Las plaquetas pasan rápidamente de su forma discoide de la fase inactiva a una figura esférica irregular, con pseudópodos. Esta nueva forma permite el contacto entre las plaquetas y a su vez se produce la redistribución de los microtúbulos, los cuales se trasladan hacia el centro de la célula y se desintegra el citoesqueleto. Este es un proceso independiente del calcio y dependiente de energía (García, 2000).

Cuando el estímulo de las plaquetas es eficaz, una serie de acciones siguen la modificación de la forma, como la liberación del contenido de los gránulos y la agregación. Desde el punto de vista funcional la forma cambiante tiene consecuencias de gran importancia ya que hace que el PF-3 esté disponible en la membrana de las PLTs. (Gentry, 2008).

#### **1.1.6. Agregación**

Está mediada por moléculas de fibrinógeno o el vWF, que conectan las plaquetas por reducción de los complejos de glicoproteínas (GP) IIb/IIIa a las plaquetas adyacentes, formando un agregado plaquetario. Para ser capaz de unirse a las glicoproteínas de fibrinógeno, inicialmente debe convertirse primero de un estado de baja afinidad a uno de alta afinidad: esto sucede a través de un proceso llamado “señalización de adentro hacia afuera”, que se inicia justo después del proceso de activación (Rozman, 2007).

En las plaquetas inactivas, el complejo glicoprotéico IIb/IIIa está presente en su forma inactiva como dos GP separadas (IIb y IIIa). El heterodímero GP IIb/IIIa es la forma activada del complejo, se forma solo después de la estimulación de las plaquetas y en la presencia de iones de calcio. Después de esto, las plaquetas exponen esta forma activa del complejo, el cual es capaz de unirse al fibrinógeno y a su vez unirse a los receptores glicoprotéicos de las PLTs circundantes (Gentry, 2008).

Dentro de los gránulos existen varias moléculas capaces de mantener y amplificar la agregación, el cual está limitado a pocas plaquetas al principio. El ADP, el calcio, la serotonina, el fibrinógeno, la TSP y la trombina generadas por la activación de la coagulación, son agonistas potentes de la agregación de plaquetas. Otros agonistas son las moléculas recién sintetizadas por las plaquetas activadas (el factor activador de plaquetas (PAF) y el tromboxano A<sub>2</sub>). Todos estos actúan conjuntamente para acelerar la formación de un agregado de plaquetas insoluble mediante la captación / adición de PLTs reclutadas del torrente sanguíneo (Gentry, 2008).

#### **1.1.7. Secreción**

El proceso de secreción de las plaquetas es un proceso activo y dependiente de adenosín trifosfato (ATP) que sigue después de la adhesión. La secreción del contenido de los gránulos de las PLTs se produce a través de un mecanismo de exocitosis y se relaciona con el aumento de la concentración de calcio en la PLT (Rozman, 2007). Mientras que el cambio de forma tiene lugar, los gránulos se llevan cerca del OCS (centralización de gránulos) y su membrana se fusiona con la membrana canicular que permite la secreción (Tablin, 2000); en caballos la centralización de gránulos no se observa (Brunso, 2010).

En las PLTs humanas, la secreción de los gránulos depende de la contracción interna y la fusión de las membranas, mientras que en las PLTs de equinos los mecanismos de fusión son predominantes. Por lo tanto, las diferencias estructurales y bioquímicas entre las plaquetas equinas y humanas ayudan a explicar las variaciones en sus respuestas fisiológicas (Brunso, 2010).

La secreción plaquetaria en caballos, requiere la fijación de los gránulos alfa a la membrana de superficie (Segura, 2006; Brunso, 2010), los cuales se fusionan entre sí para formar cadenas en la superficie de las membranas y descargar sus productos

almacenados en el exterior de la célula, dando lugar a una nueva membrana como vía secretora (Gader, 2008).

## 1.2. Leucocitos y quimioquinas

La familia de los leucocitos tienen un impacto directo antiinfeccioso y liberan cantidades importantes de anabolizantes y citoquinas catabólicas, siendo esta última su función primordial (Everts, 2008). Por lo que se puede decir que los leucocitos son la base del proceso de cicatrización y de la inflamación (Martin, 2005).

Entre los diferentes leucocitos se puede destacar principalmente a:

- **Los neutrófilos:** participan en las respuestas inflamatorias mediante la quimioatracción en los sitios tisulares de la inflamación y la fagocitosis de organismos y otros materiales extraños. Después de la fagocitosis, los gránulos lisosomales se fusionan con los fagosomas para matar algunos organismos específicos y luego degradar su material por digestión enzimática (Weiser, 2012).

Los neutrófilos llegan a la escena muy temprano después de cualquier daño a los tejidos. Su función principal es matar los microbios por medio de un bombardeo de neutrófilos alrededor de la lesión. Esto es particularmente evidente en situaciones de heridas crónicas y bien podría ser la base natural para destruir el tejido persistente de tales heridas. Nuevos estudios han demostrado que otra táctica de los neutrófilos para matar, es atrapar los microbios involucrados en mallas de extrusión de histonas y del ácido desoxirribonucleico (ADN) (Brinkmann, 2004).

- **Los monocitos:** también participan en la respuesta inflamatoria. En la sangre se consideran como células intermedias antes de la maduración. Estos migran hacia los tejidos, donde se continúan desarrollando a macrófagos con la ayuda del TGF- $\beta$  (Barrientos, 2008). Los fagocitos mononucleares pueden fagocitar bacterias, organismos complejos más grandes, las células dañadas, restos celulares y restos de partículas extrañas. Estas células desempeñan una función importante como inmunoreguladoras, al presentar los antígenos procesados a los linfocitos T. Estas células también son responsables de la destrucción normal y patológica de los eritrocitos, asociados al reciclaje metabólico del hierro (Weiser, 2012).

- **Los macrófagos:** que llegan un poco más tarde, operan como fagocitos voraces, limpiando la herida de los desechos de la matriz y las células, incluyendo fibrina y neutrófilos que llegaron primero a la lesión (Leibovich, 1975). Los macrófagos también producen numerosas citoquinas, factores angiogénicos y de crecimiento, que se cree que desempeñan un papel importante en la regulación de la fibro-proliferación y la



angiogénesis (Leibovich, 1976), además, inician el desarrollo del tejido de granulación y la liberan una variedad de citoquinas proinflamatorias (IL-1 e IL-6) (Barrientos, 2008).

Cada uno de estos tipos de células inflamatorias, libera cocteles de factores de crecimiento (FGF, TGF- $\beta$  y PDGF) (Barrientos, 2008) y citoquinas que funcionan como señales de reparación de los tejidos, direccionan los diversos comportamientos de las células huésped al trazar el sellado de la herida y actúan como amplificadores de la señal inflamatoria. De esta manera atraen aún más neutrófilos, macrófagos y mastocitos al sitio de la lesión y sólo hasta que la infección ha sido contrarrestada y completada la cicatrización, estas células inflamatorias se dispersan de la herida (Haase, 2003; Martin, 2005).

Los leucocitos son capaces de migrar a lo largo de un gradiente químico, fenómeno conocido como quimiotaxis. La acumulación de leucocitos fagocíticos en sitios de inflamación es de particular importancia para la defensa del huésped contra los microorganismos invasores y para la curación de heridas (Ye, 1997).

Una respuesta rápida y transitoria es característica de la activación de los leucocitos por quimioquinas, tales como el aumento de la concentración intracelular del calcio libre, la producción microbicida de radicales de oxígeno y los lípidos bioactivos, además, de la liberación del contenido almacenado de los gránulos citoplasmáticos, tales como, las proteasas de los neutrófilos y monocitos, la histamina proveniente de los basófilos y las proteínas citotóxicas de los eosinófilos (Baggiolini, 1998).

Durante la respuesta inflamatoria, los leucocitos se arrastran a través de las paredes de los vasos sanguíneos en respuesta a señales quimiotácticas difundidas en forma de concentración de gradientes locales quimioatrayentes. Los quimioatrayentes de los leucocitos inducen un reordenamiento intracelular del citoesqueleto, que proporcionan la fuerza propulsora para el movimiento; también inducen a la adhesión celular por medio del contacto extracelular con células endoteliales y proteínas de la matriz que proporcionan la tracción. La información direccional está codificada por la forma de concentración de los gradientes. Prácticamente todas las células, incluso los mismos leucocitos, pueden liberar una o más quimioatrayentes de leucocitos, si se les estimula apropiadamente (Murphy, 1996).

La mayoría de las quimiocinas se producen en condiciones patológicas por las células del tejido y la infiltración de los leucocitos. Algunas quimioquinas parecen cumplir funciones de mantenimiento, sin embargo, pueden estar involucradas en la

maduración de los leucocitos en la médula ósea y en el tráfico y retorno de los linfocitos, además de asegurar los mecanismos de regulación y renovación de los leucocitos circulantes (Baggiolini, 1998).

La comprensión detallada de las vías de señalización de las quimioquinas en los leucocitos podría conducir a nuevos tratamientos para la inflamación, si los inhibidores de los pasos clave pudieran ser identificados. En este sentido, se han logrado importantes avances en la definición de la naturaleza de la primera etapa de señalización y sobre la unión de los receptores de superficie celular de las quimioquinas. Al igual que las propias quimioquinas, el número de receptores de quimioquinas conocidos es grande y está creciendo a un ritmo rápido, impulsado por la tecnología de la clonación molecular (Murphy, 1996).

### **1.3. Factores de crecimiento (GF)**

Los GF representan uno de los grupos más importantes de las familias moleculares involucradas en la cicatrización (Molloy, 2003). Son polipéptidos solubles que regulan el crecimiento, la diferenciación y el fenotipo de numerosos tipos de células. Se unen a receptores específicos de membrana situados en la superficie de la célula en la que actúan (Cugat, 2010).

Los GF, son las proteínas biológicamente activas más importantes de las plaquetas, están contenidos en los gránulos  $\alpha$  y otros cuerpos granulares. Son liberados después de la activación de las células y tienen múltiples funciones tales como la generación, la regeneración y la remodelación de diversos tejidos y órganos (Zachos, 2005) así como la iniciación y la modulación de la cicatrización de heridas en tejidos blandos y duros (Rozman, 2007). Los GF son sintetizados por varios tipos de células que pertenecen al sistema inmunitario y musculo-esquelético y se unen a receptores celulares específicos para dar inicio a ciclos de señales de transducción intracelular que estimulan la producción de proteínas (Woo, 2000).

Cada GF tiene diferentes efectos sobre diferentes células en el entorno de la lesión. Algunos regulan la expresión y la concentración de otros GF a través de respuestas de retroalimentación, tanto de una forma autocrina como paracrina. Dicha regulación sucede principalmente por la facultad de modular la expresión de receptores de las células y su afinidad (Woo, 2000).

Por lo general los GF no actúan de forma endocrina y exhiben una difusión de corto alcance a través de la matriz extracelular, actuando localmente y con una lenta difusión. La capacidad de un GF para entregar un mensaje en particular a una subpoblación de células no está determinada exclusivamente por su identidad y su capacidad para difundirse a través de las matrices extracelulares (ECM), sino que también, se determina por el número de células diana, el tipo de receptores y la transducción de la señal intracelular subsiguiente al factor de unión. El mismo GF puede transmitir diferentes instrucciones dependiendo del tipo de receptor y célula a la que se une (Lee, 2011).

La importancia de los GF radica en la regulación del metabolismo celular, la división, la migración y la diferenciación de las células, la expresión de proteínas y la producción de enzimas (Makhdom, 2013). Potencialmente, tienen la capacidad de cicatrizar las heridas, ya que estimulan la angiogénesis y la proliferación celular, además, influyen en la producción, la degradación de la ECM y tienen acción quimiotáctica hacia células inflamatorias y fibroblastos (Komarcevic, 2000).

Existe una gran cantidad de factores de crecimiento. Sin embargo, los más estudiados y caracterizados, debido a su participación en los procesos de cicatrización de tendones (Molloy, 2003; Virchenko, 2006), ligamentos (Virchenko, 2006) y regeneración ósea (Makhdom, 2013) son los descritos en la tabla 1.

Los GF son notablemente regulados durante el proceso de reparación y pueden ser potencialmente producidos por células intrínsecas (ej. Eritendón) y por células extrínsecas (ej. Macrófagos). Usualmente tienen un efecto dosis dependiente, requieren receptores específicos para ser activados y actúan en sinergismo con moléculas de señalización (Molloy, 2003).

**Tabla 1.** Factores de crecimiento, tipos de células productoras y su función en heridas agudas y crónicas.

GF	Células	Herida aguda	Función	Herida crónica
IGF	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Condrocitos</li> <li>• Osteoblastos</li> <li>• Células osteoprogenitoras</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proliferación y diferenciación de células osteoprogenitoras</li> </ul>	

<b>TGF- <math>\beta</math></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Plaquetas</li> <li>• Queratinocitos</li> <li>• Macrófagos</li> <li>• Linfocitos</li> <li>• Fibroblastos</li> <li>• Matriz extracelular de cartílago y hueso</li> </ul>	A U M E N T A	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inflamación</li> <li>• La formación de tejido de granulación</li> <li>• Reepitelización</li> <li>• Formación y remodelación de la matriz</li> <li>• Regulación de síntesis de colágeno y proteoglicanos</li> <li>• Diferenciación de células mesenquimales pluripotenciales</li> </ul>	D I S M I N U Y E
<b>VEGF</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Plaquetas</li> <li>• Queratinocitos</li> <li>• Macrófagos</li> <li>• Células endoteliales</li> <li>• Fibroblastos</li> </ul>	A U M E N T A	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inflamación</li> <li>• La formación de tejido de granulación</li> <li>• Reepitelización</li> <li>• Formación y remodelación de la matriz</li> </ul>	D I S M I N U Y E
<b>PDGF</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Plaquetas</li> <li>• Neutrófilos</li> <li>• Monocitos</li> <li>• Macrófagos</li> <li>• Células endoteliales</li> <li>• Células del músculo liso</li> <li>• Fibroblastos</li> </ul>	A U M E N T A	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La formación de tejido de granulación</li> <li>• Estimula proliferación de osteoblastos y condrocitos</li> <li>• Quimiotáctico para macrófagos</li> <li>• Mitógeno para osteoblastos y células mesenquimales pluripotenciales</li> </ul>	D I S M I N U Y E
<b>FGF</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Queratinocitos</li> <li>• Mastocitos</li> <li>• Macrófagos</li> <li>• Células endoteliales</li> <li>• Células del músculo liso</li> <li>• Fibroblastos</li> <li>• Osteoblastos</li> <li>• Condrocitos</li> <li>• Macrófagos</li> <li>• Células mesenquimales</li> </ul>	A U M E N T A	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La formación de tejido de granulación</li> <li>• Reepitelización</li> <li>• Formación y remodelación de la matriz</li> <li>• Estimula proliferación de osteoblastos, condrocitos y células mesenquimales</li> <li>• Angiogénesis</li> <li>• Quimiotáctico para macrófagos</li> <li>• Mitógeno para osteoblastos y células mesenquimales pluripotenciales</li> </ul>	D I S M I N U Y E

Zachos, 2005; Barrientos, 2008.

### 1.3.1. Factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF)

El IGF es un polipéptido de cadena simple que muestra homología estructural con la proinsulina y se involucra tanto en el crecimiento normal del cuerpo como en la cicatrización. Es un mediador importante en cada fase del proceso de cicatrización de una herida, especialmente durante las fases inflamatorias y proliferativas (Molloy, 2003). Favorece la migración y la proliferación de fibroblastos en el sitio de la lesión y

aumenta la producción de colágeno (Molloy, 2003; Makhdom, 2013). Después de la secreción de IGF-1, este puede actuar sobre los tejidos locales en una forma autocrina/paracrina o puede entrar en la circulación y ejercer efectos endocrinos distantes (Hsu, 2004). Su acción proliferativa es amplificada con la presencia de otros GF (Molloy, 2003).

Una concentración alta de IGF-1 puede reducir la inflamación, aunque el mecanismo exacto de como modula la inflamación sea desconocido, se cree que una respuesta de retroalimentación se construye cuando las concentraciones altas de este factor, inhiben los genes celulares responsables de la cascada inflamatoria en el sitio de la lesión (Molloy, 2003).

Los estudios sobre los mecanismos de acción del IGF-1 en el cartílago articular han identificado que tiene un efecto anabólico y protector sobre el metabolismo de los condrocitos, que permite que la integridad de la matriz del cartílago se mantenga en la presencia de mediadores inflamatorios (Zachos, 2005).

### **1.3.2. Factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ )**

El TGF- $\beta$  es un péptido homodimérico de 25 kDa (Molloy, 2003; Makhdom, 2013). En mamíferos existen principalmente tres isoformas homodiméricas ( $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\beta$ 3) (Hsu, 2004; Makhdom, 2013) cada una de las cuales tiene su propio fenotipo (Molloy, 2003), pero el TGF- $\beta$ 1 es la más predominante en la cicatrización de heridas (Barrientos, 2008) y en la matriz ósea (Makhdom, 2013).

El TGF- $\beta$  es producido por los macrófagos, fibroblastos, queratinocitos y las PLTs (Barrientos, 2008). En los tejidos dañados, se cree que desempeña un papel fundamental en la respuesta inflamatoria al ser estimulado directamente por el lactato (Molloy et al, 2003). También se puede encontrar en los cartílagos y los huesos donde ejerce un papel importante en la formación, regeneración y la quimiotaxis (Burnouf, 2013), siendo el precursor de la mitogénesis y la estimulación de osteoblastos en la matriz de colágeno del hueso (Burnouf, 2013).

El TGF- $\beta$  se une a tres clases diferentes de receptores de membrana (RI, RII, RIII) (Molloy, 2003; Hsu, 2004; Barrientos, 2008), el vínculo con el receptor permite que este GF pueda llevar a cabo su propio trabajo. Aunque, la presencia de los receptores de TGF- $\beta$  en osteoblastos y condrocitos sugiere un papel en la curación de la fractura, el papel exacto de este GF no está claro (Zachos, 2005).

Una vez activado, el TGF- $\beta$  influye en los diversos aspectos de la reparación de tejidos: promueve la diferenciación y proliferación celular, además de la interacción para la unión con la fibronectina (Molloy et al, 2003)

El TGF- $\beta$  trabaja en sinergia con otros factores de crecimiento (Burnouf, 2013), aunque, su respuesta puede ser impredecible ya que depende de la dosis aplicada, la especie implicada y el entorno biológico (Zachos, 2005). Se puede regular por incremento de VEGF, lo que favorece la angiogénesis y el reclutamiento de células inflamatorias (Burnouf, 2013).

Al igual que el TGF- $\beta$ 1, el TGF- $\beta$ 2 está involucrado en todas las etapas de la cicatrización de heridas. Está implicado en el reclutamiento de células inflamatorias y fibroblastos a la zona de la herida. Se ha demostrado que estimula la formación de tejido de granulación mediante la inducción de la angiogénesis. También acelera la reepitelización en la formación de matriz durante la remodelación, aumenta la proteína de ADN y la producción de colágeno, al estimular el reclutamiento de fibroblastos a la zona de la herida, el resultado combinado incrementa la deposición de colágeno (particularmente de tipo I y III) y la formación de cicatriz (Barrientos, 2008).

El TGF- $\beta$ 3 promueve la cicatrización de la herida mediante el reclutamiento de células inflamatorias y fibroblastos a la zona de la herida, facilitando la migración de queratinocitos. Es un potente estimulante de la neovascularización y la reorganización vascular. A diferencia de las otras dos isoformas, el TGF- $\beta$ 3, inhibe la cicatrización y promueve una mejor organización de colágeno (Barrientos, 2008), siendo un antagonista natural de TGF  $\beta$ -1 y -2 (Komarcevic, 2000).

### **1.3.3. Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)**

El VEGF se relaciona con la familia del PDGF, e incluye 5 isoformas. Estos factores de crecimiento son homodímeros glicosilados de aproximadamente 46 kDa unidos por enlaces disulfuros (Burnouf, 2013). Los miembros de la familia VEGF incluyen: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, y el factor de crecimiento de placenta. Son producidos por las células endoteliales, queratinocitos, células musculares lisas, fibroblastos, neutrófilos, plaquetas y macrófagos (Barrientos, 2008).

Las diversas isoformas tienen la misma actividad biológica (Molloy, 2003), todos se unen a los tres receptores tirosina-quinasa estructuralmente relacionados llamado receptor de VEGF (VEGFR-1, -2, -3) (Molloy, 2003; Barrientos, 2008; Makhdom, 2013), localizado en la superficie endotelial de los vasos sanguíneos (Barrientos, 2008). Aunque, el VEGF tiene algún tipo de papel en la migración inicial y la proliferación de las células, alcanza la mayor concentración después de la fase inflamatoria, cuando se manifiesta su gran poder al estimular la angiogénesis. La expresión de VEGF aumenta en respuesta a estímulos biológicos y biomecánicos

como la hipoxia, otros factores de crecimiento, interleuquinas y la distracción ósea (Molloy, 2003).

#### **1.3.4. Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF)**

El PDGF se descubrió inicialmente como un mitógeno derivado de las plaquetas que era capaz de estimular la proliferación de fibroblastos y células de músculo liso. Desde entonces ha sido ampliamente estudiado, sobre todo por su papel en la cicatrización de heridas. Es uno de los primeros GF expresado después de la lesión del tejido (Hsu, 2004).

El PDGF es una familia de polipéptidos que incluye PDGF-A, B, C, y D, codificada por cuatro genes localizados en diferentes cromosomas. El PDGF tiene efectos estimulantes como un potente mitógeno y quimioatrayente para diversas células mesenquimales, incluyendo las células osteogénicas (Makhdom, 2013).

El PDGF comprende una familia de factores de crecimiento homo o heterodímeros separados pero muy relacionados, incluyendo al PDGF-AA, PDGF-AB, PDGFBB, PDGF-CC y PDGF-DD, los que son producidos por las PLTs, macrófagos, endotelio vascular, fibroblastos, queratinocitos (Barrientos, 2008), células gliales y neuronas (Deuel, 2007).

El PDGF es liberado por las PLTs durante las etapas iniciales de la regeneración de la fractura, el cual tiene un efecto mitogénico sobre los osteoblastos (Zachos, 2005).

Tras la lesión el PDGF es liberado en la degranulación de las PLTs y está presente en los fluidos de la herida. Esto estimula la mitogénesis y la quimiotaxis de neutrófilos, macrófagos, fibroblastos, y células de músculo liso a la zona de la herida. También estimula los macrófagos para producir y secretar factores de crecimiento tales como el TGF- $\beta$ . Al igual que el TGF- $\beta$ , PDGF también aumenta el desbridamiento del tejido, mediado por macrófagos y la formación de tejido de granulación. Los efectos del PDGF en la inducción de la angiogénesis es órgano dependiente. Además, de ser particularmente importante en la maduración de los vasos sanguíneos (Barrientos, 2008).

Durante la remodelación de tejidos, el PDGF ayuda a descomponer el colágeno viejo por medio de la regulación de la matriz de metaloproteinasas (Barrientos, 2008). Se observó que puede estimular tanto el colágeno como la producción de proteínas no colágenas, así como la síntesis de ADN de una manera dosis dependiente (Molloy et al., 2003, Deuel, 2007).

### **1.3.5. Factor de crecimiento derivado de fibroblastos (FGF)**

Es un polipéptido de cadena única compuesta de 146 aminoácidos y miembro de la familia del factor de crecimiento de unión a la heparina (Molloy, 2003, Hsu, 2004). La familia FGF se compone de 22 miembros (Hsu, 2004; Makhdom, 2013). De éstos, los tres miembros más importantes implicados en la curación de heridas cutáneas son el FGF-2, FGF-7, y FGF-10. El FGF es producido por los queratinocitos, fibroblastos, células endoteliales, células de músculo liso, condrocitos, y células cebadas (Hsu, 2004; Barrientos, 2008).

Se ha demostrado que el FGF es un potente estimulador de la angiogénesis, diferenciación, la migración y proliferación celular (Molloy, 2003; Makhdom, 2013). Estos se han utilizado para la regeneración de los tejidos dañados, incluyendo la piel, los vasos sanguíneos, músculo, tejido adiposo, tendón, ligamento, cartílago, hueso, diente y los nervios (Makhdom, 2013).

El FGF-2 o FGF básico es reconocido como un potente mitógeno para una variedad de células mesenquimales (Makhdom, 2013). Además juega un papel importante en la formación de tejido de granulación, reepitelización y remodelación tisular (Barrientos, 2008).

### **1.3.6. Interleuquina 4 (IL-4) y el receptor antagonista de la interleuquina 1 (IL-1ra)**

La IL-4 y la IL-1ra son dos citoquinas anti-inflamatorias que están involucradas en la cicatrización de las heridas y en los procesos inflamatorios.

La IL-4 es producida principalmente por células Th2, basófilos, mastocitos y eosinófilos. Estas citoquinas inducen el desarrollo de las células Th2I y la depresión de las células Th1 (Minciullo, 2016). En general la respuesta Th2 están asociadas con la cicatrización de los tejidos mediante la transformación M2 de los macrófagos (Gause, 2013) y la muerte de los parásitos (Bamias, 2015).

La IL-1ra es producida y liberada por células mononucleares como respuesta al mismo estímulo que induce la liberación de las IL-1. La IL-1ra neutraliza el efecto catabólico de la IL-1 (Eisenberg, 1990).

### **1.3.7. Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )**

El TNF- $\alpha$  tiene un gran poder catabólico y un efecto pro-inflamatorio sobre las células y particularmente sobre los tejidos de origen mesenquimal y ectodermal, como la piel (Tan, 2017) y los tejidos musculo-esqueléticos (Tan, 2017; Sedger, 2014).



El TNF- $\alpha$  ha demostrado que tiene un papel regulador sobre la inflamación cuando esta en presencia de los derivados de las plaquetas como los factores de crecimiento por ejemplo con el PDGF-B (Ríos, 2015).

#### **1.4. Concentrados plaquetarios (CP)**

El desarrollo de adyuvantes quirúrgicos bioactivos capaces de regular la inflamación y potenciar la cicatrización es uno de los grandes retos de la investigación clínica (Dohan, 2005).

Desde el punto de vista hematológico, los concentrados plaquetarios son productos de la sangre que actúan como medicamento en ciertas patologías. Se definen como el sobrenadante rico en plaquetas, obtenido después de la centrifugación de la sangre total, extraída con anticoagulante (Dohan, 2005). Este concentrado es conocido como plasma rico en plaquetas (PRP): el procedimiento para su obtención consiste en la adaptación del mismo compuesto de fibrina autóloga en la que se engloban el mayor número posible de plaquetas, pensando en el aporte de las proteínas que existen en su interior (Marx, 1998). Estas proteínas, como ya se ha comentado aportan señales importantes en el proceso de la cicatrización. Conociendo el comportamiento de los elementos formes y de los fluidos, como es la sangre, se pueden acotar unos parámetros en la centrifugación para decantar las células sanguíneas con mayor peso en el fondo y las de menor peso justo por encima. De esta forma, se consigue que los hematíes que son los de mayor peso molecular se depositen en el fondo del recipiente, en el medio la serie blanca y las PLTs y en la parte superior la fibrina y el sobrenadante “acelular” (Dohan, 2005).

El trabajo más conocido quizá sea el de Robert Marx en el que se describe el método de obtención de un concentrado de plaquetas mediante centrifugación. Este CP se obtiene de una manera más ambulatoria de lo que se hacía hasta el momento y la repercusión de su uso fue valorado por medio de histomorfometría, usando análisis radiológicos. Este trabajo describe la fisiología de la maduración ósea y la influencia de los factores de crecimiento derivados de las plaquetas, abriendo un nuevo y muy polémico campo de estudio (Marx, 1998).

En el intento de hacer llegar los métodos de obtención de CP al ámbito extrahospitalario, Eduardo Anitua en 1999, acuñó el término plasma rico en factores de crecimiento (PRGF), para la preparación de lechos óseos para la posterior colocación de implantes. El cual es un método ambulatorio que no necesita una gran cantidad de

sangre para obtener un coágulo rico en plaquetas y por tanto, rico en factores de crecimiento. El PRGF se puede preparar de forma ambulatoria y con una centrifuga de laboratorio convencional (Anitua, 1999).

El termino PRP ha sido utilizado de manera arbitraria para todos los concentrados plaquetarios, tanto en los compuestos originales utilizados en hematología para la detención de hemorragias, como para los nuevos concentrados ricos en factores de crecimiento. Estos últimos CP generalmente utilizan un doble centrifugado para aumentar la concentración de plaquetas (Dohan, 2006a); aunque se ha descrito un protocolo de simple centrifugado para la utilización en caballos (Arguelles, 2006). Estos protocolos se basan en una idea simple: la extracción de sangre con anticoagulante se realiza justo antes de la intervención y la muestra se transforma inmediatamente en un concentrado de plaquetas utilizando un separador celular. Al inicio se hacían específicamente en el laboratorio de hematología, posteriormente, se han desarrollado aparatos mas simples, específicos y automatizados (el ejemplo más claro es el Harvest SmartPrep). A continuación el CP se mezcla con trombina y/o cloruro de calcio con el fin de inducir una activación masiva de las plaquetas concentradas y su posterior gelificación (Dohan, 2006a). En esta etapa las citoquinas de las plaquetas se liberan normalmente.

Entre los muchos protocolos desarrollados, el uso de sellantes de fibrina ya está bien documentado. Pero su aplicación se mantuvo limitada durante mucho tiempo debido a la complejidad de su producción y el riesgo de contaminación de enfermedades infecciosas.

Los CP son la evolución natural de los sellantes de fibrina (FS), constituidos de fibrinógeno concentrado (polimerización inducida por la trombina y el calcio) (Dohan Ehrenfest, 2009a), cuando los médicos empezaron a manipular los diferentes agentes que intervenían en el proceso de coagulación con el fin de utilizarlos en situaciones clínicas (Del corso, 2012), para promover la hemostasia y la cicatrización (Zumstein, 2011). El desarrollo de nuevas tecnologías permitió la aplicación de métodos de producción simplificados y optimizados de los sellantes de fibrina. Uno de ellos incluso va tan lejos que imitan la matriz cicatrizal *ad integrum*: la fibrina rica en plaquetas y leucocitos (L-PRF) (Dohan, 2005).

Debido a las restricciones legales sobre el manejo de la sangre, una nueva familia de concentrados plaquetarios surgió en Francia en 2001. Es un protocolo nuevo, desarrollado por Choukroun y col., utilizado en cirugía oral y maxilofacial para mejorar la cicatrización ósea en implantología (Choukroun, 2001), denominado la segunda

generación del PRP, conocido como fibrina rica en plaquetas (PRF) (Sunitha, 2008; Dohan Ehrenfest, 2010a). El PRF no es un FS, ni un CP clásico; es un biomaterial sólido, que tiene características semejantes a una matriz cicatrizal autóloga (Dohan, 2006a) que acelera la cicatrización de tejidos blandos y duros (Gupta, 2011).

#### 1.4.1. Clasificación de los concentrados plaquetarios

El uso tópico de CP es reciente y su eficacia sigue siendo controvertida. Son varias las técnicas y protocolos disponibles para su producción; sin embargo, sus aplicaciones han sido confusas, porque cada método conduce a un producto diferente en cuanto a su biología y usos potenciales (Dohan Ehrenfest, 2012b).

Son tres los parámetros necesarios para la clasificación de los CP (Dohan Ehrenfest, 2009a):

- Equipo de preparación y centrífuga usada.
- Contenido del concentrado plaquetario.
- La red de fibrina.

A continuación, se presenta la clasificación más aceptada de los diferentes concentrados plaquetarios en 4 familias y dos grupos, en función al contenido de leucocitos y a la arquitectura de la fibrina (Tabla 2).

**Tabla 2.** Clasificación de los principales métodos de producción de concentrados plaquetarios disponibles en humanos.

<b>Concentrado plaquetario y terminología</b>	<b>Tipo de procedimiento</b>	<b>Método de Producción</b>
<b>P-PRP</b> (antes de ser activado)	Automático	Cell Separation PRP Vivostat PRF
<b>P-PRP gel</b> (después de ser activado)	Manual	Anitua's PRGF Nahita PRP
<b>L-PRP</b> (antes de ser activado)	Automático	PCCS PRP Smart PREeP PRP Magnellan PRP Angel PRP GPS PRP
<b>L-PRP gel</b> (después de ser activado)	Manual	Friadent PRP Curasan PRP Regen PRP Plateltex PRP Ace PRP

<b>P-PRF</b>	Manual	Fibrinet PRFM
<b>L-PRF</b>	Manual	Choukroun's PRF

Dohan Ehrenfest, 2012b.

El primer grupo corresponde a los PRP, que son concentrados plaquetarios líquidos antes de la activación (Dohan Ehrenfest, 2009a):

- Plasma rico en plaquetas puro sin leucocitos (P-PRP).
- Plasma rico en plaquetas y leucocitos (L-PRP).

Los anteriores concentrados plaquetarios después de ser activados conservan el nombre pero se denominan geles (Dohan Ehrenfest, 2012b):

- Gel de P-PRP.
- Gel de L-PRP.

El segundo grupo se encuentra en forma inactivada y corresponde al PRF (Dohan Ehrenfest, 2009a):

- Fibrina rica en plaquetas pura sin leucocitos (P-PRF).
- Fibrina rica en plaquetas y leucocitos (L-PRF).

#### **1.4.2. La fibrina rica en plaquetas y leucocitos (L-PRF)**

El L-PRF es el resultado de la búsqueda de un método simplificado para la preparación de CP de acuerdo con restricciones legislativas relativas a la utilización de productos de la sangre para fines terapéuticos porque para la preparación del L-PRF no se requiere la adición de ninguna sustancia anticoagulante (citrate de sodio, heparina) o agente gelificante (trombina bovina, cloruro de calcio) (Dohan, 2006a). Se ha demostrado que el uso de anticoagulantes pueden retrasar los procesos normales de cicatrización (Miron, 2017).

La peculiaridad del protocolo de preparación del L-PRF, es permitir una polimerización lenta y natural de la fibrina durante la centrifugación (Dohan, 2005; Dohan Ehrenfest, 2009b). Las concentraciones fisiológicas de la trombina en las muestras permiten una conversión lenta y suave del fibrinógeno en fibrina, lo que le da una estructura similar a la observada durante la formación de las redes de fibrina de los coágulos *in vivo* (Dohan, 2005). De su arquitectura natural de fibrina se produce una lenta liberación de factores de crecimiento y glicoproteínas de la matriz, durante 7 días (Dohan Ehrenfest, 2009b; Dohan Ehrenfest, 2010c; Su, 2009).

#### **1.4.2.1. Obtención de la fibrina rica en plaquetas y leucocitos**

El protocolo en humana para la obtención de L-PRF es mucho más simple que el necesario para la preparación de PRP; consiste en tomar sangre entera sin anticoagulante y centrifugarla posteriormente a baja velocidad por un corto periodo de tiempo (Choukroun, 2017; Kobayashi, 2016).

La ausencia de anticoagulante implica la activación en unos pocos minutos de la mayoría de las plaquetas de la muestra de sangre en contacto con las paredes del tubo y la liberación de la cascada de coagulación (Dohan, 2006a; Dohan, 2006b).

Durante la centrifugación, el fibrinógeno se concentra inicialmente en la parte alta del tubo, antes que la trombina circulante se transforme en fibrina. Al cabo de unos minutos, un coágulo firme y organizado de fibrina se obtiene en el centro del tubo, justo entre los glóbulos rojos de la parte inferior y el plasma “acelular” de la parte superior. Este coágulo de fibrina forma una estructura tridimensional que permite interceptar y atrapar la mayoría de las citoquinas, los leucocitos y las PLTs (Dohan, 2006a; Dohan, 2006b), lo que lo convierte en un verdadero biomaterial de fibrina rica en plaquetas y leucocitos (L-PRF) (Dohan, 2006b; Dohan, 2006c). El L-PRF puede ser utilizado directamente como un coágulo o como una fuerte membrana después de una leve compresión (Dohan Ehrenfest, 2010c; Kobayashi, 2012), con un gran potencial en la aplicación clínica y en la ingeniería de tejidos (Dohan Ehrenfest, 2009b).

Las membranas de L-PRF no tienen contraindicaciones, pueden ser utilizados en todo tipo de pacientes, porque siempre favorecen la cicatrización de los tejidos blandos. Pueden estimular la cicatrización y reducir los riesgos de necrosis de un colgajo después de una cirugía (Clark, 2001; van Hinsbergh, 2001). La membrana de L-PRF es una matriz altamente estimulante, atrayente de la migración y de la diferenciación celular (Charrier, 2008), además, se puede adaptar y ser suturada (Del Corso, 2012).

La observación histológica del coágulo de L-PRF revela que la arquitectura de las fibrillas de fibrina del L-PRF está estrechamente relacionada con las plaquetas circulantes y los glicosaminoglicanos. Esta observación es particularmente interesante debido a que los glicosaminoglicanos tienen una alta afinidad por los péptidos de bajo peso molecular (tales como las citoquinas de las PLTs), además tienen la capacidad de promover la migración celular y todos los fenómenos de la cicatrización (Dohan, 2006b). Por lo tanto, se puede decir que la particular estructura tridimensional del

L-PRF, no sólo permite la incorporación de las citoquinas y las PLTs extrínsecamente entre polímeros de fibrina, sino que también permite la incorporación de citoquinas inherentemente dentro de fibrillas de fibrina, que se suman a las cadenas de los glicosaminoglicanos (Dohan, 2006b).

Se ha considerado al L-PRF como una fibrina natural, basada en biomateriales favorables para el desarrollo de una microvascularización y capaz de guiar la migración de las células epiteliales a su superficie, todo esto encaminado a ayudar a la cicatrización (Choukroun, 2006a).

El método de producción de L-PRF permite obtener una alta cantidad de coágulos y/o membranas de L-PRF simultáneamente, con lo que es posible producir aún más L-PRF para cirugías mayores (Dohan Ehrenfest, 2009a).

#### **1.4.2.2. Aplicación y efectos de la fibrina rica en plaquetas y leucocitos en humanos**

Hasta el año 2004 no era permitido el uso de L-PRF por las leyes nacionales Francesas, a partir de esta fecha se han hechos diferentes evaluaciones *in vitro* y aplicaciones *in vivo*, principalmente en humanos y en animales de experimentación, en las que se ha demostrado los beneficios de la utilización del L-PRF en la regeneración de tejidos.

#### **1.4.2.3. Efecto antiinflamatorio e inmunológico**

Se ha descrito el poder antiinflamatorio que tiene el L-PRF al evaluar diferentes citoquinas que se producen durante el proceso de inflamación, en el cual se encontró que hubo un aumento de la secreción de todas las IL probadas (IL 1 $\beta$ , IL 4, IL 6, TNF  $\alpha$  y VEGF), lo que supone que debido a su activación lenta aumenta la degranulación de leucocitos; de igual manera se concluyó que estas citoquinas podrían ser atrapadas progresivamente en la red de fibrina durante la polimerización (Dohan, 2006c).

Por lo tanto, se consideró que el L-PRF tiene un efecto inmunológico, el cual puede estimular los mecanismos defensivos. Estos análisis revelaron que el L-PRF podría ser un nodo de la regulación inmune con habilidades de retrocontrol de la inflamación. Este concepto podría explicar la reducción de las infecciones postoperatorias cuando el L-PRF es utilizado como aditivo quirúrgico. El coágulo de L-PRF puede ser considerado como un nodo inmunológico de organización. Su capacidad de defensa contra las infecciones es bastante significativa, debido a las propiedades quimiotácticas de estas citoquinas, así como por la capacidad para facilitar su acceso

al sitio del tejido lesionado favoreciendo la neovascularización y la angiogénesis (Dohan, 2006c).

La importancia del contenido de leucocitos en los PRF se ha demostrado al observar que la presencia de estos en pocas cantidades es esencial en la cicatrización de heridas, ya que limpian el sitio de la herida y regulan la expresión de la inflamación y de las quimioquinas (Dohan Ehrenfest, 2009c).

Los macrófagos provenientes del linaje mieloide son considerados células claves en la secreción de factores de crecimiento (TGF  $\beta_1$ , PDGF, VEGF) durante el proceso de cicatrización. Estas células con ayuda de los neutrófilos y las PLTs son capaces de facilitar la regeneración de los tejidos (Miron, 2017). Además, tienen un impacto antibacteriano directo previniendo la infección de las heridas (Dohan Ehrenfest, 2009c; Miron, 2017).

#### **1.4.2.4. Efecto sobre la regeneración ósea**

Uno de los interrogantes más importante sin resolver en la literatura acerca de los CP es entender si estas preparaciones pueden mejorar o acelerar la cicatrización y la remodelación ósea. La respuesta sigue siendo muy compleja y el análisis de la literatura no da una respuesta clara (Simonpieri, 2012). Aunque, la literatura sobre L-PRF y la cicatrización del hueso es más reciente por ser una técnica nueva y homogénea debido a que la mayoría de los estudios de PRF se han realizado con L-PRF (Dohan Ehrenfest, 2009a).

La última técnica es utilizar el L-PRF como tejido propiamente dicho, al reunir volúmenes significativos de material de fibrina para rellenar directamente un sitio quirúrgico y promover la regeneración de los tejidos, como ya se demostró para la regeneración ósea (Mazor, 2009; Simonpieri, 2011) o después de la exéresis del tejido (Charrier, 2008).

Los fundamentos generales para el uso de L-PRF en el tratamiento de un defecto intraóseo son:

- En primer lugar, el L-PRF es un coágulo con una fuerte arquitectura de fibrina y con mejores propiedades mecánicas que un coágulo de sangre natural o un gel de PRP; el L-PRF por lo tanto, puede ser utilizado como un material de relleno en defectos intraóseos (Mazor, 2009; Simonpieri, 2011). Además, el L-PRF es un material sólido y fácil de manejar (Del Corso, 2012).
- En segundo lugar, las membranas de L-PRF se pueden utilizar como membranas de protección después del llenado del defecto intraóseo. El L-PRF se somete a una

remodelación más rápida *in situ* que una membrana de colágeno reabsorbible y promueve una fuerte inducción en el tejido debido a la lenta liberación de GF y otras proteínas de la matriz (Dohan Ehrenfest, 2009b; Dohan Ehrenfest, 2010c).

- En tercer lugar debido a que las membranas de L-PRF permiten que las células migren a través de ella, permiten la neo angiogénesis lo que es un punto clave en la cicatrización del hueso (Del Corso, 2012).

#### **1.4.2.5. Efecto en cirugía plástica**

Dentro de la a cirugía plástica facial, las propiedades hemostáticas, fibrogénicas y angiogénicas del L-PRF se han usado en procedimientos tales como ritidectomía, rinoplastia e implantes faciales, en el que se desean curación rápida, mínimo edema y la reducción de equimosis (Zhao, 2013).

El L-PRF también se ha utilizado con éxito en la lipoescultura facial, mejorando contundentemente su post-operatorio al no presentarse ningún caso de edema masivo, dolor severo y hematomas. De hecho, el depósito de una matriz de fibrina en las zonas injertadas permitió mejorar la angiogénesis, aumentó la vascularización y mejoró el drenaje linfático (Keyhan, 2013). De igual manera, se ha evaluado el efecto de los coágulos de L-PRF en el injerto de adipocitos de acuerdo con la técnica de lipoescultura facial descrito por Coleman (Coleman, 2006), donde el L-PRF tuvo un papel beneficioso en la cicatrización y la consolidación del injerto, al ofrecer un soporte matricial para la angiogénesis y estimular la proliferación de pre-adipocitos. Se observó claramente como la parte de la cara tratada con el L-PRF no presentó edema residual o equimosis durante las 3 semana post-operatorias (Braccini, 2007).

En relación al efecto sobre la cicatrización de heridas, se ha sugerido que el L-PRF podría ser beneficioso para la cicatrización de heridas recalcitrantes (Lundquist, 2013) y en heridas crónicas de las extremidades inferiores de diversas etiologías (Jorgensen, 2011). Se ha demostrado que una sola aplicación de L-PRF en heridas postoperatorias frescas muestra una mejoría media de 5 días en comparación con el tratamiento estándar (Chignon-Sicard , 2012).

#### **1.4.2.6. Efecto antimicrobiano**

Al igual que otros geles de CP y leucocitos (Bielecki, 2007; Moojen, 2008), el L-PRF presenta propiedades antibacterianas, además, de ser reguladores inflamatorios que pueden ser particularmente útil cuando los tejidos están dañados o no perfectamente sanos (Simonpieri, 2012).



A pesar, de que existen diversos estudios que muestran los efectos antimicrobianos de diferentes CP (Anitua, 2012; Burnouf, 2012; Álvarez, 2011; Drago, 2013; Wu, 2013) y de sellantes de fibrina (Tofuku, 2010, Burnouf, 2013), son muy escasas las publicaciones que reportan alguna contribución sobre los efectos antimicrobianos del L-PRF (Miron, 2017).

#### **1.4.2.7. El uso de la fibrina rica en plaquetas y leucocitos como andamio para la proliferación celular**

Las aplicaciones de ingeniería de tejidos comúnmente abarcan el uso de andamios tridimensionales (3D), para proporcionar un microambiente adecuado para la incorporación de células o factores de crecimiento para regenerar los tejidos u órganos dañados. Estos andamios sirven para imitar el microambiente real *in vivo* donde las células interactúan y se comportan de acuerdo con las señales mecánicas obtenidas desde el entorno 3D circundante. Por lo tanto, las propiedades del material de los andamios son de vital importancia en la determinación de la respuesta celular y el destino. Estos andamios 3D son altamente porosos con redes de poros interconectados para facilitar la difusión de nutrientes y oxígeno, así como para la eliminación de desechos (Loh, 2013).

La mayoría de los andamios utilizados en la ingeniería de tejidos son avasculares por naturaleza, por lo es muy importante que todas las estrategias se enfoque en el desarrollo de una red vascular para obtener resultados clínicos satisfactorios y regeneración de tejidos musculo-esqueléticos (Miron, 2017).

Una combinación de diferentes injertos de matriz celular ha sido utilizada en el tratamiento de terapia regenerativa en defectos de tejido con un tamaño crítico y/o con una pobre capacidad de cicatrización, los cuales han tenido unos resultados prometedores. La fibrina ha sido utilizada como andamio para tejidos cardiovasculares, (Flanagan, 2009), musculoesqueléticos (Hendrickson, 1994; Gerard, 2012), respiratorio (Cornelissen, 2012), neuronal (Man, 2011) y cutáneos (Falanga, 2007).

Las células normalmente son inyectadas en el sitio de la lesión en una solución de fibrinógeno, el cual a continuación es polimerizado por la trombina para crear un injerto que se adapta perfectamente a la lesión. La fibrina tiene ventajas sobre los hidrogeles sintéticos no biológicos, debido a que es una proteína natural de los vertebrados, autóloga y completamente degradable. La fibrina contiene una secuencia nativa de péptidos que se acoplan a las integrinas celulares (Gailit, 1997), que proporcionan sitios para la adhesión, soporte físico a las células injertadas e instrucciones para las señales mecánicas. Los geles de fibrina tienen propiedades de un material fiable que se pueden ajustar para crear características específicas del

injerto cambiando factores tales como la concentración de fibrinógeno, pH, y fuerza iónica (Carr, 1995; Davis, 2011). Estas características hacen que la fibrina sea un sustrato útil para los propósitos de bioingeniería y uno de los hidrogeles más populares en el campo de la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa.

Los andamios utilizados para la reparación de tejido óseo tienen que cumplir con varios requisitos como: biológicos, mecánicos, y arquitectónicos. Ellos deben ser biocompatibles, permitir la adherencia de las células, ser lentamente degradable y proporcionar un soporte físico. Además, deben mostrar poros altamente interconectadas para permitir un crecimiento homogéneo de células hacia el interior del tejido y una suficiente vascularización en el sitio del implante. Por lo tanto, las estrategias para abordar estos criterios deben incluir por una parte la búsqueda de un biomaterial ideal y en el otro lado para una tecnología de fabricación adecuada para controlar la porosidad y la resistencia biomecánica del implante (Uebersax, 2006).

Varios estudios *in vitro* han demostrado resultados positivos que puede ser adecuado para la aplicaciones en la ingeniería de tejido óseo, utilizando a el L-PRF como andamio en el cultivo celular, para la proliferación de diferentes células humanas, células de periostio (generación de capas) (Gassling, 2009), células de osteoblastos (Gassling, 2013).

### **1.5. Células troncales mesenquimales (MSC)**

Se define como célula troncal, aquella célula no diferenciada que posee las capacidades de autorrenovación por periodos indefinidos durante toda la vida del individuo y de tener la capacidad de diferenciación en otros tipos celulares bajo las condiciones apropiadas o señales correctas del microambiente celular (Rodríguez, 2005; Crovace, 2010).

Las células troncales mesenquimales son capaces de diferenciarse a células que conforman los tejidos derivados de esa misma capa, como son hueso, cartílago, músculo, estroma medular, tendones, ligamentos, grasa y otros tejidos conectivos (Lo, 2009). La capacidad de diferenciación de estas células no parece limitarse a estos tejidos, ya que también se ha demostrado capacidad de diferenciación a células de otras capas, como por ejemplo tejido neurogénico, células pancreáticas o células hepáticas (Deng, 2006; Karnieli, 2007).

A pesar de que haya más de 30 años de estudio de las células mesenquimales aún no existen ensayos especializados y marcadores concretos, lo que hace complicada la

selección positiva de estas células respecto a otros tipos celulares adherentes que pueden encontrarse en el tejido de origen del que se extraen.

Debido a esto, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) en 2006 determinó una serie de criterios para caracterizar y definir a las MSC humanas (Dominici, 2006):

1. Capacidad de adherencia al plástico del material de cultivo.
2. Expresión de diferentes marcadores de superficie (analizados por citometría de flujo): más de un 95% de CD105 (endoglina), CD73 (SH2 y SH3) y CD90 (Thy-1); y menos de un 2% de CD45 (antígeno común de leucocitos), CD34 (marcador de células precursoras de células hematopoyéticas), CD14 o CD11b y CD79 $\alpha$  o CD19 o HLA-DR.
3. Multipotencialidad de diferenciación a osteoblasto, adipocito y condrocito *in vitro*.

En general, para las MSC de todas las especies, estos criterios también deberían de ser válidos para poder afirmar que el tipo celular con el que se está trabajando corresponde con el de la célula mesenquimal. Pero el criterio de los antígenos de superficie que definen el fenotipo puede no ser del todo válido debido a la falta de especificidad de los anticuerpos utilizados en citometría, ya que la mayoría de ellos están desarrollados para la detección en la especie humana o murina y por tanto pueden dar un falso negativo por esta falta de reactividad (De Schauwer, 2011).

### **1.5.1. Parámetros para la clasificación de las células troncales mesenquimales**

Para clasificar las MSCs equinas se describen a continuación una serie de parámetros relacionados con sus diferentes capacidades.

#### **1.5.1.1. Proliferación**

Debido a la facilidad de establecer cultivos *in vitro* y su proliferación en los mismos, las MSC son un interesante modelo de estudio (Bianco, 2001). Estas células son capaces de expandirse en cultivo a un ritmo de 20 a 50 doblajes en 10 semanas (Lee, 2003). En el caso de la especie humana este ritmo es de un doblaje a los 4 días que se reducen a medida que van avanzando (Mitchell, 2006).

#### **1.5.1.2. Fenotipo**

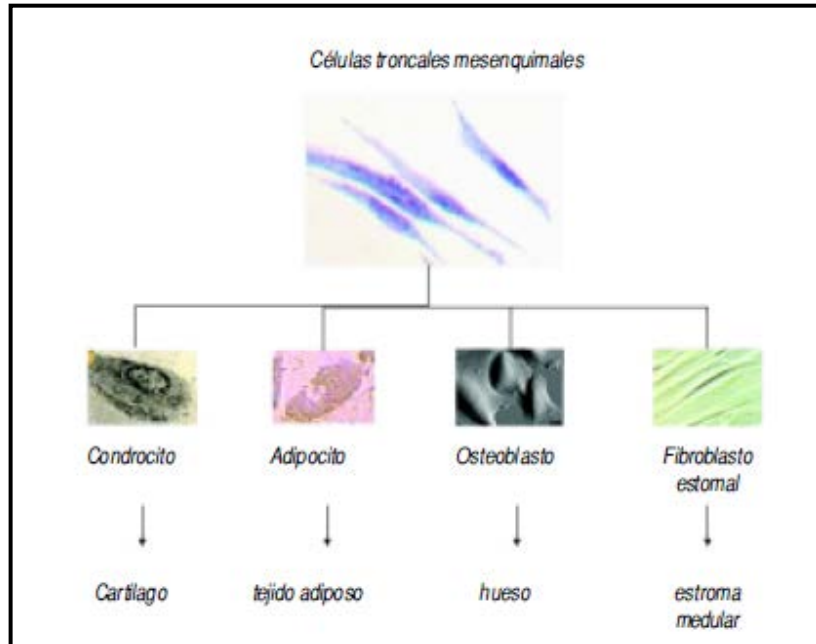
Para reconocer e identificar MSC es importante el conocimiento de su fenotipo específico para así poder aislarlas de otras células que las acompañan y que pueden

contaminar el cultivo. Aunque, las MSC fueron descritas como células similares a fibroblastos, la morfología puede variar según la fuente de obtención (Arévalo, 2007). En el caso de las MSC no existe un marcador que lleve a la identificación inequívoca de esta población celular en los diferentes tejidos donde la podemos encontrar, por ello la forma de caracterizarla es a través de la presencia o ausencia de determinados antígenos de superficie (Fortier, 2011).

### 1.5.1.3. Diferenciación celular

Las células troncales mesenquimales al derivar de la capa mesodérmica embrionaria poseen la capacidad de diferenciarse a osteoblastos, adipocitos, condrocitos, tenocitos y mioblastos (Figura 2) (Arévalo, 2007; Koch, 2008).

En el nicho natural de las MSCs, éstas permanecen en quiescencia en un estado G0/G1 a la espera de estímulos que indican que deben comenzar a multiplicarse, *in vitro* esto se puede lograr mediante la adicción de diferentes medios de cultivo específicos con inductores adecuados (Baksh, 2004).



**Figura 2.** Diferenciación de las MSC de medula ósea (Flores-Figueroa, 2006).

### 1.5.1.4. Relación con el sistema inmune y la inflamación

Una característica de las MSC que está siendo estudiada actualmente con gran interés es la relación de las MSC con el sistema inmune (Siegel, 2009). Este es el caso, por

ejemplo, de las lesiones en el ámbito deportivo, los procesos autoinmunes o la enfermedad injerto contra huésped.

Las MSC ejercen un efecto inhibitorio profundo tanto *in vivo* como *in vitro* sobre la proliferación de los linfocitos T y muestran efectos similares sobre las células B, las células dendríticas y las células asesinas naturales, pero en ninguno de los casos hay indicios de que las MSC induzcan apoptosis. Además, parece que la capacidad inmunomoduladora de las MSC es más efectiva cuando entran en contacto con las células inmunológicas que a su vez secretan factores solubles entre los que se encuentran la interleuquina (IL)-10, IL-6 e IL-2 o el interferón (IFN)- $\gamma$  y el factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$  (Ucelli, 2007).

Se considera que las MSC son “inmunoprivilegiadas” ya que no expresan en su superficie el complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC-II) (Carrade, 2011) que está implicado en el rechazo a los trasplantes. Gracias a la ausencia del MHC-II, el tratamiento *in vivo* con MSC no parece provocar respuestas inflamatorias ni rechazos, aunque, todavía se están llevando a cabo muchas investigaciones al respecto (Nauta, 2006).

La capacidad inmunomoduladora de las MCS sugiere para éstas un papel específico como reguladoras del mantenimiento de tolerancia periférica, la tolerancia a los trasplantes, la autoinmunidad, la evasión tumoral y la tolerancia materno-fetal (Patel, 2008).

También se ha descrito que las MSC tienen propiedades anti-inflamatorias, antifibróticas, antimicrobianas y regenerativas; lo que puede mejorar los resultados en los escenarios de los tejidos dañados e inflamados. Aunque, desde el punto de vista de la investigación, estas propiedades están en conflicto, ya que el impacto de las mismas MSC es todavía controversial. (Sutton, 2014).

### **1.5.2. Células troncales mesenquimales equinas**

Las MSCs equinas, de igual forma que las humanas, pueden obtenerse de diferentes tejidos; siendo la medula ósea (Vidal, 2006) y el tejido adiposo (Vidal, 2007) las fuentes tradicionales de obtención. Pero por cuestiones relativas a la facilidad de aislamiento, características de expansión y complicaciones del donante en la zona de extracción, se ha justificado la búsqueda de fuentes alternativas (Toupadakis, 2010), por lo que también han despertado interés las MSC procedentes de sangre periférica (Koerner, 2006; Bunnell, 2008), matriz del cordón umbilical (Hoynowski, 2007), sangre del cordón umbilical (Koch, 2007), de encías y ligamento periodontal (Mensing, 2011) en caballos.

Las MSC de la sangre del cordón umbilical y la matriz del cordón umbilical se pueden recoger con facilidad al momento del parto sin dañar a la yegua o al potro, ser sembradas y posteriormente criopreservadas, para tenerlas disponibles para cuando se requiera su aplicación (Monori, 2013). Por lo tanto, mediante el uso de estas fuentes no invasivas, el tiempo óptimo para el tratamiento puede ser determinada por el clínico cuando lo considere necesario, en contraste con el uso de las MSC de medula ósea o tejido adiposo que requieren un tiempo prolongado para su cultivo y expansión (Berg, 2009). Las MSC procedentes de la sangre del cordón umbilical se consideran más progenitoras (Carrade, 2011), menos inmunogénicas (Guest, 2008; Barberini, 2014) y con una capacidad migratoria superior, lo que indica que podrían ser mejor que las MSC derivadas de medula ósea (Burk, 2013).

Diferentes estudios han demostrado que las MSC procedentes de la matriz del cordón umbilical se pueden contaminar fácilmente con bacterias y hongos (Lovati, 2011), por lo que se considera la fuente menos atractiva para el uso en equinos (De Schauwer, 2014).

La sangre periférica también se considera una alternativa atractiva ya que la colección de una muestra de sangre venosa es un procedimiento mínimamente invasivo y fácil que puede realizarse en cualquier momento (Spaas, 2013).

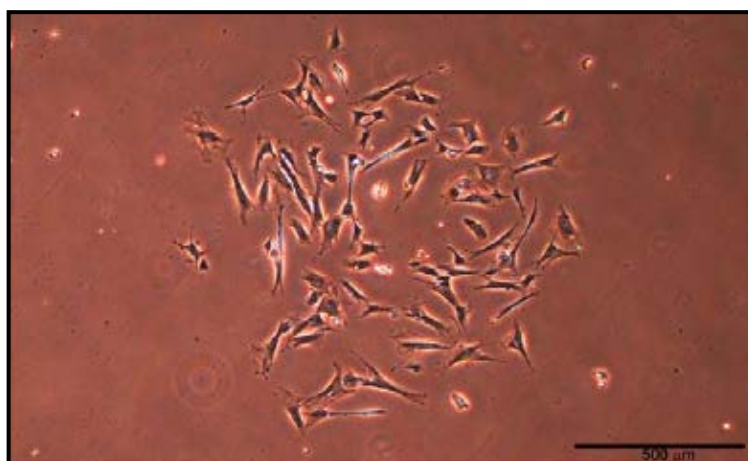
En todos los casos el criterio de aislamiento de las células se ha realizado por medio de la capacidad de adherencia al plástico que poseen. Una vez en cultivo, la morfología que adquieren las MSC equinas por lo general, son la típica forma de huso extendido (Figura 3) y de crecimiento en monocapa (Taylor, 2007). Además, las MSC equinas son capaces de formar colonias cuando se siembran a densidades bajas confirmando así su capacidad de autorrenovación.

A diferencia de las MSC humanas para las cuales la ISCT ha propuesto criterios mínimos en cuanto al fenotipo, hasta la fecha, no existe un consenso sobre un panel de marcadores para definir y caracterizar las MSC de otras especies diferente a los humanos, en especial para un modelo de grandes animales (Paebst, 2014). El principal problema que presenta la caracterización del fenotipo de las MSC equinas es la falta de anticuerpos comerciales que muestren reactividad con los epítomos de las moléculas de superficie de esta especie (Arnhold, 2007). Se ha demostrado que de 379 anticuerpos humanos de CD, sólo 14 (4%) mostraron reactividad cruzada con leucocitos equinos (Ibrahim, 2007).

Alternativamente, se ha sugerido el uso de un panel de marcadores de superficie celular para las MSC equinas: estas células deben ser positivas para CD29, CD44, CD90 y CD14 y negativas para CD79 y MHC-II (De Schauwer, 2011).

En cuanto al potencial de diferenciación, las MSCs equinas pueden ser inducidas hacia los linajes osteogénico, adipogénico y condrogénico, requisito de la ISCT para definir las MSCs humanas. El potencial de diferenciación de las MSCs equinas varía en función del origen del cual proceden las células (Ranera, 2012).

Las MSC se han venido utilizando experimentalmente en el campo de la ortopedia equina en un número limitado de casos clínicos, para el tratamiento quirúrgico de los quistes subcondrales del hueso, la reparación de fracturas y la reparación de cartílago. Sin embargo, el uso clínico más frecuente ha sido en el tratamiento de las lesiones de tendones (Richardson, 2007).



**Figura 3.** Colonia de MSC procedente de medula ósea de caballo después de ocho días de aislamiento (4x). Adaptado de Ranera, 2011.

Por último, la capacidad inmunomoduladora de las MSC equinas no ha sido muy estudiada, a pesar de que un mejor conocimiento de la misma podría suponer una mejora en el tratamiento de enfermedades frecuentes en el caballo, ya que las células inflamatorias juegan un papel crucial, porque en numerosas ocasiones dan inicio a enfermedades o problemas más graves (Ibrahim, 2007).

Recientemente se han evaluado y comparado varios factores utilizados en la inmunología de las MSC de humanos. Para este fin se ha evaluado cuantitativamente la expresión del mRNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa con

transcriptasa inversa (RT-PCR), lo que mostró una fuerte expresión de las moléculas coestimuladoras CD40 y CD80 y ninguna expresión para CD86 (De Schauwer, 2014).

En general, la mayoría de las terapias basadas en células, consisten en el uso de las MSC autólogas. No obstante, dada su capacidad inmunosupresora las MSC parecen perfectamente adecuadas para la terapia celular alogénica (Kode, 2009).

Una fuente alogénica de MSC proporcionaría una posibilidad de obtener una oferta de MSC más homogénea, de fácil disposición y con una capacidad probada para la diferenciación en varios linajes (Carrade, 2011), sin la necesidad de esperar más tiempo asociado con el aislamiento y la expansión de las MSC autólogas (Alves, 2011; Moroni, 2013). Para las MSC equinas no hay mucha información disponible con respecto a su perfil inmunogénico / inmunomodulador (De Schauwer, 2014), pero se ha demostrado que las MSC tienen una baja inmunogenicidad, lo que permite su uso clínico en aplicaciones alogénicas (Wang, 2008). Por otra parte, numerosos factores solubles juegan un papel esencial en la regulación de la inmunosupresión mediada por las MSC mediante la inhibición de la proliferación de células T (Yoo, 2009; Carrade, 2012).

A pesar de haber avanzado en lo concerniente al estudio de las MSC en los últimos años, aún no existe un acuerdo acerca de la mejor fuente de MSC equinas para un banco para la terapia de trasplante alogénicos (Barberini, 2014). Algunos estudios preliminares han sugerido que las MSC alogénicas de equinos se pueden utilizar sin provocar una respuesta inmune aparente mediada por células en los caballos. Estos hallazgos indican que las MSC alogénicas pueden ser una opción segura y práctica para el tratamiento de lesiones ortopédicas en equinos (De Schauwer, 2014).



## 2. Hipótesis

La fibrina rica en plaquetas y leucocitos (L-PRF) se comporta como un biomaterial que actúa como reservorio de diferentes factores de crecimiento, los cuales son liberados de forma gradual y sostenible por un periodo superior a dos semanas *in vitro*.

La fibrina rica en plaquetas y leucocitos (L-PRF) es un biomaterial que puede servir como andamio para el cultivo y proliferación de células troncales mesenquimales (MSC) *in vitro*.

La aplicación de fibrina rica en plaquetas y leucocitos (L-PRF) *in vivo* puede favorecer los procesos de regeneración músculo-esquelética en caballos.

### **3. Objetivos**

#### **3.1. Objetivo general**

Investigar la composición, distribución y comportamiento celular de la fibrina rica en plaquetas y leucocitos (L-PRF) durante un periodo mínimo de incubación de 2 semanas, utilizando diferentes métodos de producción para determinar índices de aplicabilidad en la terapia regenerativa equina.

#### **3.2. Objetivos específicos**

1. Describir la composición y arquitectura microscópica (distribución celular y configuración de fibrina) del coágulo de fibrina rica en plaquetas y leucocitos (L-PRF) del protocolo propuesto para caballos mediante histología (H & E), microscopía electrónica de barrido (SEM) y microscopía electrónica de transmisión (TEM).

2. Determinar las concentraciones de diferentes factores de crecimiento (TGF- $\beta$ 1, IGF-1, VEGF, PDGF-AB) que favorecen los procesos de regeneración músculo-esquelética, por cinética de elución de los coágulos de fibrina rica en plaquetas y leucocitos (L-PRF) equinos incubados durante 18 días, a intervalos de 48 horas.

3. Determinar cada 48 horas las concentraciones de TNF- $\alpha$  citoquina pro-inflamatoria, IL-4, IL-1ra citoquinas anti-inflamatorias, TGF- $\beta$ 1 y PDGF-BB factores de crecimiento anabólicos de los coágulos de fibrina rica en plaquetas y leucocitos (L-PRF) equinos, por medio de cinética de elución durante 21 días de incubación, en dos protocolos diferentes de producción (240 g x 8 min Vs 416 g x 10 min).

4. Establecer un nuevo protocolo para la obtención de fibrina rica en plaquetas y leucocitos (L-PRF) con una mayor área de superficie celular en forma de membrana y de cilindro y describir el comportamiento del TGF- $\beta$ 1 durante un periodo de incubación de 2 semanas.

5. Comparar 2 protocolos de producción (252 g x 8 min Vs 406 g x 10 min) del coágulo y la membrana de fibrina rica en plaquetas y leucocitos (L-PRF) durante 18 días de incubación, a través de la concentración de TGF- $\beta$ 1, para establecer cuál protocolo es

el más adecuado para la aplicación en los procesos de cicatrización de los tejidos músculo-esqueléticos en caballos.

6. Valorar si el coágulo de fibrina rica en plaquetas y leucocitos (L-PRF) sirve como andamio para la proliferación de células troncales mesenquimales autólogas y heterólogas derivadas de médula ósea equina.

7. Utilizar fibrina rica en plaquetas y leucocitos (L-PRF) en algún procedimiento quirúrgico, para determinar la aplicabilidad del producto en los procesos de regeneración músculo-esquelética en caballos.

## 4. Artículos

### 4.1. Microscopic characterization and the temporary release of 4 Growth factors from equine leukocyte and platelet rich fibrin clots

This manuscript was sent for publication on to the Willey-Blackwell for Veterinary Surgery and it was refused with the recommendation to send to more specific journal. It has now been resubmitted for publication to: Veterinary Medicine International.

#### **Running title: Characterization of equine leukocyte and platelet rich fibrin clots**

Roman F. Jiménez-Aristizabal, MVZ, MSc<sup>1</sup>, Jorge U. Carmona MVZ, MSc, PhD<sup>2</sup>, and Marta Prades, LV, PhD, Diplomate ACVS & ECVS<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Medicina y Cirugía Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès, Spain, <sup>2</sup>Grupo de Investigación Terapia Regenerativa, Departamento de Salud Animal, Universidad de Caldas, Manizales, Colombia

#### **Abstract**

**Objective:** The aims were 1) to describe the histological and ultra-structural appearance and cell distribution of leukocyte and platelet rich fibrin (L-PRF) clots from horses and; 2) to determine 4 growth factor concentrations of equine L-PRF clots incubated during 18 days, at 48 h intervals.

**Study design:** Experimental study.

**Animals:** Horses (n = 6).

**Methods:** Whole blood from horses was extracted into nine, 10 mL tubes with no additives and immediately centrifuged at 252g for 8 min. Clots were evaluated by conventional histology and electronic microscopy. Growth factor concentrations were measured by ELISA. A general linear modeling multivariate (GLM) and the Sidak were used as post hoc tests. A  $P \leq 0.05$  was set as significant.

**Results:** Histological and ultra-structural evaluation showed a clot composed by a fibrin layer and a cellular layer where blood cells, predominantly platelets were present. Fibrin fibers become to be more organized at day 13. At this time platelet integrity was lost. TGF- $\beta_1$  and IGF-1 concentration from the elution fluid present in the tubes where clots were incubated showed a progressive rise until day 13 and then decreased and stabilized between days 15 and 18 of incubation.

**Conclusion:** A 2 week long progressive and increasing TGF- $\beta_1$  and IGF-1 liberation from L-PRF clots, together with the fibrin mesh's histological and ultra-structural appearance make this procedure attractive for clinical application in horses.

**Key words:** horse, platelet concentrate, ultra-structural assessment, biomaterial, regenerative therapy

#### **4.1.1 Introduction**

Platelet concentrates (PC) have generated great interest both in the human (1) and veterinary (2) clinical fields due to their different contributions in augmenting the healing process and in potentiating regenerative properties in tissues that have suffered injury (3). These effects are mediated by the synergistic action of different cytokines and growth factors (GF), whose properties include increased chemotaxis, mitogenesis, cell proliferation and cell differentiation, as well as angiogenesis and extracellular matrix synthesis (1,2,4).

Transforming growth factor beta-1 (TGF- $\beta_1$ ) is considered as the most powerful collagen inducing synthesis of all cytokines (5) and the most massively produced isoform (6), which justifies its use as a sentinel to document the increased concentration of other growth factors (GF) released from platelet alpha granules (7,8). In some studies a significant association has been shown between platelet count and TGF- $\beta_1$  concentration in PC (9,10).

TGF- $\beta$  is a multifunctional regulator of cell activity and surface molecule production (11); once activated it modulates most aspects of tissue healing (7). It stimulates collagen type I, fibronectin, and glycosaminoglycan synthesis and monocyte chemotaxis (2). TGF  $\beta_1$  is considered a potent regulator of inflammation and the immune response, because it suppresses T and B cells proliferation and differentiation (11).

A plethora of different protocols for PC production have been described (1). Initially, platelet rich plasma (PRP) was described as a product obtained from centrifugation of anticoagulated blood in order to concentrate platelets and GF (9,10). Typically, platelet activating substances have been added to generate GF extrusion from platelet alpha granules (2).

In human medicine, PRP has been used in eye, plastic and maxillofacial surgery, sport medicine and orthopedics (4). In horses, it has been used primarily for the treatment of soft tissue diseases (12,13) and osteoarthritis (14). Regenerative benefits have been obtained in muscle-skeletal injury tissue without adverse reactions (2).

A second generation of PRP has been recently proposed as a biomaterial for human surgery. This substance is named leukocyte and platelet rich fibrin (L-PRF) and is obtained from venous blood collected in tubes without anticoagulant and immediately centrifuged at low acceleration (15). This is a production process in which platelet activation occurs gradually when platelets contact with the tube wall and fibrin polymerizes (7). Although, L-PRF is frequently used in human maxillofacial surgery (7,15) and for the treatment of recalcitrant chronic wounds (16), there is no basic or clinical information about this biomaterial in equine regenerative medicine.

The objectives of the present study were 1) to describe the microscopic appearance (cell distribution and fibrin configuration) of L-PRF clots from horses and; 2) to determine the TGF- $\beta$ 1 concentrations by elution kinetics of equine L-PRF clots incubated during 18 days, at 48 h intervals. Our hypothesis was that TGF- $\beta$ 1 concentrations from equine L-PRF clots will be released in a gradual manner, increasing in concentration during a period of time, anywhere from 1- 2 weeks.

#### **4.1.2. Materials and methods**

This study was approved by the Ethical Committee at the Universitat Autònoma de Barcelona.

##### **Horses**

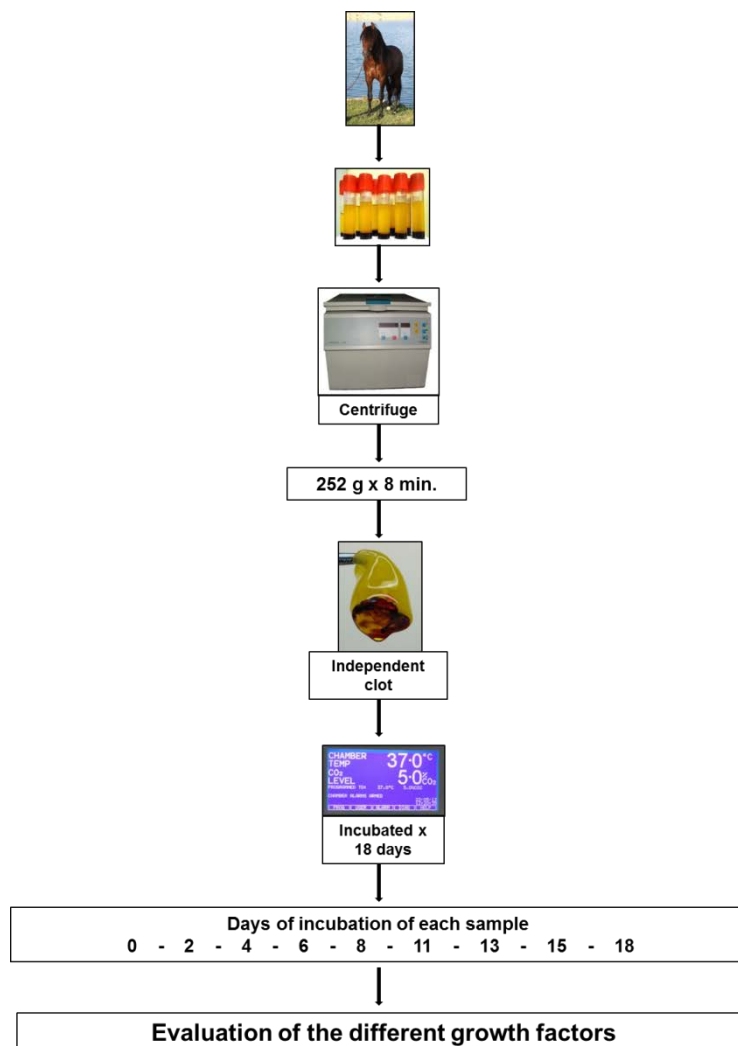
Six clinically normal mature horses were used: 2 stallions and 4 mares, with ages ranging from 5.5-8 years (mean 6.5 years) and an average body weight of 465 kg. All animals were stabled and were fed and managed under the same conditions. Horses included could not have received anticoagulants or other medications that could interfere with coagulation at least four weeks prior to blood extraction.

##### **Study design**

Nine 10 mL blood samples were taken in vacutainer plastic tubes (BD Vacutainer®, Becton Drive, Franklin Lakes, NJ, USA) with no additives from the jugular vein to prepare L-PRF clots (Figure 1) for histology, electron microscopy and, for measuring TGF- $\beta$ 1, IGF-I, VEGF and PDGF-AB concentrations. Additionally, two more blood samples were taken, one in a 3.8 % sodium citrate tube (BD Vacutainer®, Becton Drive, Franklin Lakes, NJ, USA) for basal determination of TGF- $\beta$ 1 concentration at day 0 and another blood sample was collected in EDTA tube for hemogram. The tubes with whole blood and the sodium citrate tubes were immediately centrifuged at 252g for

8 minutes at 22 °C. The supernatants were frozen for later determination of the different growth factor concentrations.

The L-PRF clots were maintained in the tubes at room temperature for 1h until solid clot formation occurred. Then, they were extracted from tubes and allowed to stand in a container for 10 minutes to remove residual erythrocytes. The samples were placed in a 10 mL vacutainer plastic tube without anticoagulant with 1 mL of MEM medium (MEM alfa medium, Gibco®, Life Technologies, Calrsbad, CA, USA), and then incubated at 37 °C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>, 95% air and, 100% humidity (Figure 1). Eluted liquid from individual clots were taken every 48h and frozen for later determination of the different growth factors concentration. This procedure was done with the 8 samples from each horse, with the last extraction taken on day 18. L-PRF clots used for scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) were taken at 0, 8 and 13 days of the study.



**Figure 1.** Processing scheme in different samples, for the evaluation of the growth factors.

#### 4.1.2.1. Histology

L-PRF clot samples from day 0 were fixed for 48 hours in 10% formalin. Then, 2 mm thick longitudinal sections were dehydrated in increasing gradients of alcohol (70%, 95% and 100%). The samples were placed in toluene blue before paraffin embedding and cut into 10 successive series of 4  $\mu\text{m}$ , for hematoxylin-eosin (H&E) staining.

#### 4.1.2.2. Scanning electron microscopy (SEM)

L-PRF clots were rinsed in PBS and fixed in a glutaraldehyde solution in 2.5% Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS) (DPBS, Gibco®, Life Technologies, Calrsbad, CA, USA) at 7.4 pH; during 24 hours. The cultures were dehydrated by incubating the samples in increasing gradients of ethanol for 5 minutes. Each sample was coated by sputtering 20 nm gold, for subsequent scanning electron microscope from 15 to 20 kV, using from 15 to 3500 magnifications. Examination was performed and analyzed under a scanning electron microscope (Hitachi S-570, Hitachi High-Technologies Europe, Germany) (Figure 2).



**Figure 2.** Computer scanning electron microscopy. (A) Samples after coating with gold, (B) Scanning Electron Microscope Hitachi S-70, used for the evaluation of the different samples.

#### 4.1.2.3. Transmission Electron Microscope (TEM)

Samples were fixed immediately after addition of the agonist, while aggregation was taking place. Washed platelet suspensions were mixed with 0.1% glutaraldehyde in 0.1M cacodylate buffer containing 1% glucose. After 15 min, cells were pelleted and the supernatant was removed. The L-PRF clots were then washed twice in cacodylate buffer and fixed for 90 min in a solution containing 2% glutaraldehyde and 2% tannic acid in 0.2M cacodylate buffer at a final pH of 7.35. The fixed solution was removed and the L-PRF clots were washed three times with 0.2% cacodylate. Finally, the L-PRF



clots were fixed again in 1% osmic acid for 90 min, dehydrated in a graded series of alcohol and embedded in resin. Contrast of thin sections was enhanced with uranyl acetate and lead citrate. Examination was performed in a electron microscope (JEOL-JEM 1400, JEOL Europe SAS, France) with an acceleration voltage of 40 to 120kV (Figure 3).



**Figure 3.** Transmission Electron Microscope JEOL JEM,-1400, used for the evaluation of the different samples.

#### **4.1.2.4. Different growth factor measurement by Elisa**

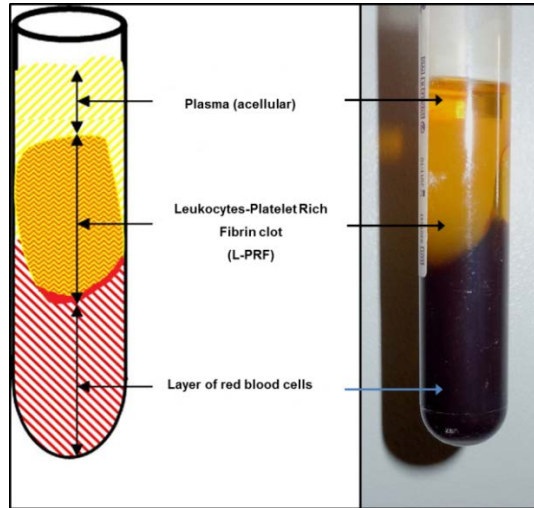
All the GF concentrations in plasma samples were determined in duplicate by a ELISA sandwich with antibodies against human TGF- $\beta$ 1 (DY240E), IGF-1 (DY291), VEGF (DY293B) and PDGF-AB (DY222) from R&D Systems Europe Ltd, UK, that had been previously standardized and validated for use in horses (17,18), due to 99% homology to this protein in human and equine species (19).

#### **4.1.2.5. Statistical analysis**

The data obtained from the different concentrations of the growth factors were analyzed for their normal and correlations. When submitting a normal distribution all data were analyzed by a general linear modeling multivariate (GLM), employing the time qualifying as a variable and the response variables TGF-  $\beta$ 1(pg/ml) and IGF-1 (pg/ml). The post hoc test used was the Sidak with a confidence level of 95% (p-value < 0.05). The results obtained from the different growth factors are expressed as mean. All data were analyzed by commercial software (SPSS 18.0 Inc., Illinois, USA).

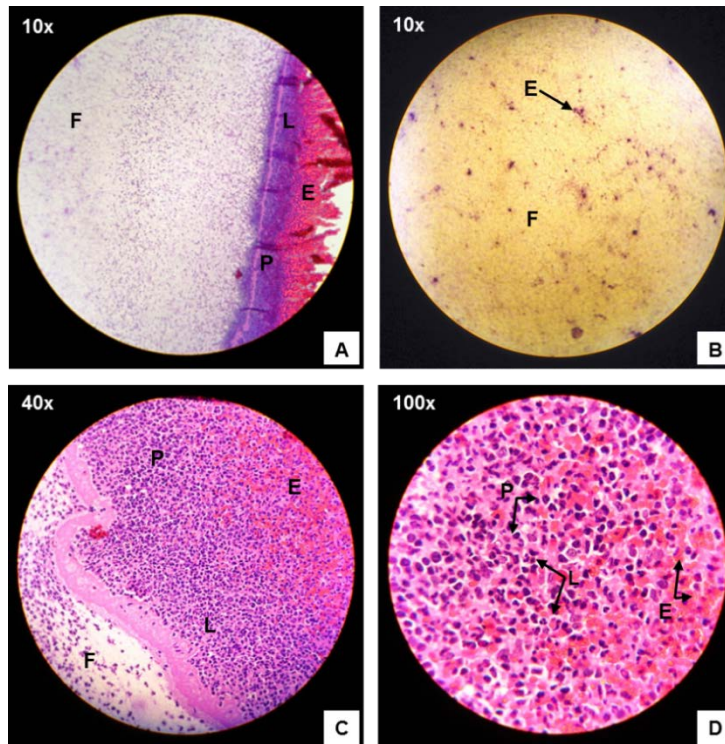
### 4.1.3. Results

Macroscopically, the equine L-PRF clot was composed of two parts: A fibrin portion (yellow) which formed the bulk of the clot or L-PRF and a second portion (red) located at the end of the clot where the majority of erythrocytes were contained (Figure 4).



**Figure 4.** Schematic representation and real leukocytes and platelet rich fibrin and its division within the tube of preparation.

#### 4.1.3.1. Histology



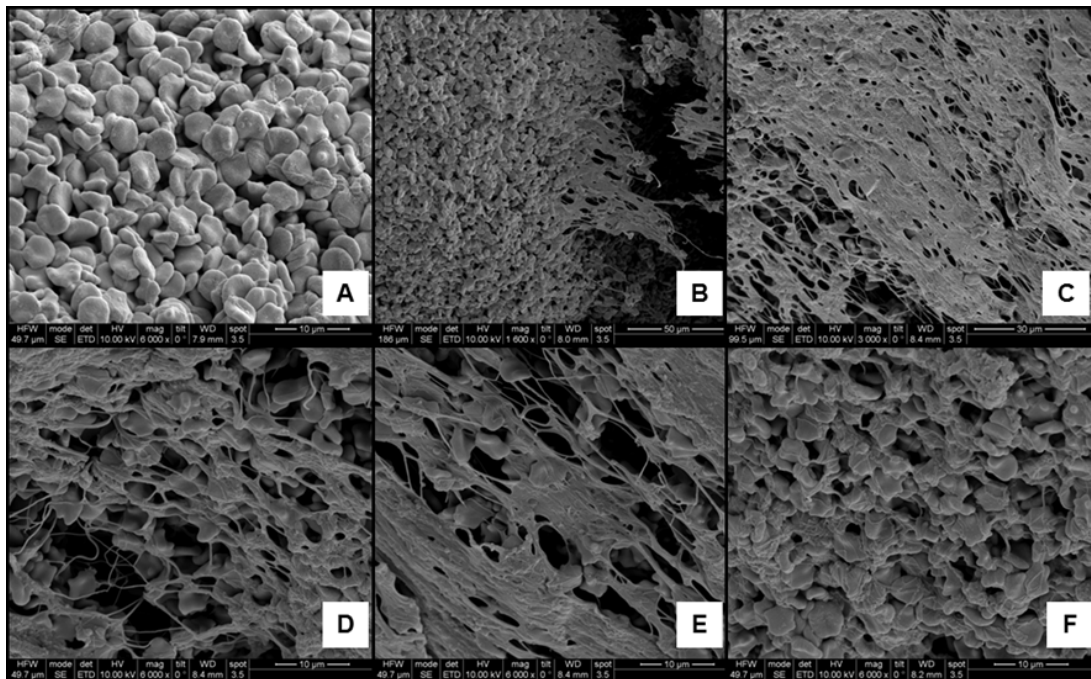
**Figure 5.** Histology of the L-PRF clot at day 0. (A) Division of the clot de L-PRF to x10, (B) part of fibrin clot L-PRF to x10, (C) clot of L-PRF to x40 and (D) cellular portion of

the L-PRF Clots and their different cells to X100. **P**: platelets; **E**: erythrocytes; **F**: fibrin; **L**: leukocytes.

Histologically, the L-PRF clot is composed of 5 zones. An area of erythrocytes, a transitional zone of leukocytes, erythrocytes and platelets, a layer of leukocytes, a layer of platelets and a layer of fibrin (Figure 5A, 5C). Erythrocytes were stained dark pink, platelets and aggregates of platelets were stained in purple with a few more dense granules in their interior and leukocytes were stained color purple and were easily differentiated by their particular form, although in some cases they can be confused with aggregates of platelets (Figure 5D). The fibrin network is clearly distinguished almost with absence of color and a low presence of cells (Figure 5B and 5C).

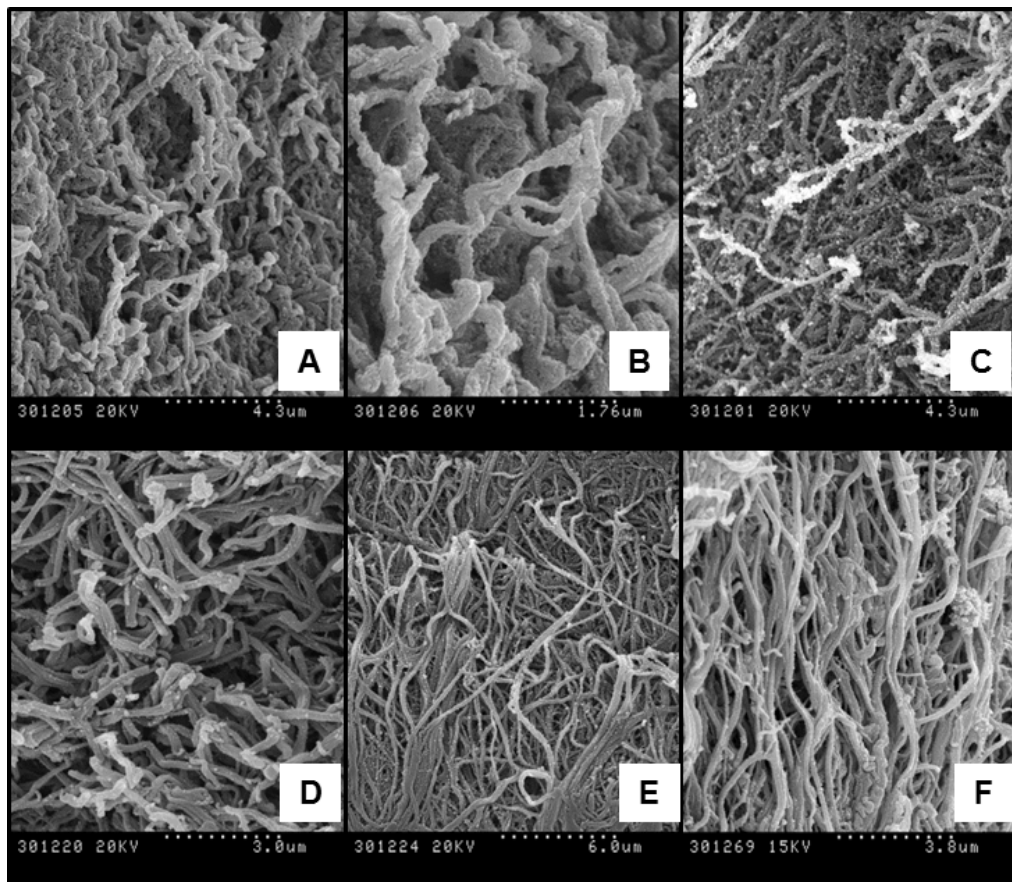
#### 4.1.3.2. SEM

The Electron microscopy allowed us to clearly observe as the different blood cells (PLTs, leukocytes and erythrocytes) became trapped within the networks of fibrin. In addition platelet aggregates were observed within the L-PRF clot (Figure 6).



**Figure 6.** Observation of the cellular basis of the L-PRF clot at day 0. **(A)** conglomerate of PLTs and leukocytes to 10µm, **(B and C)** fibrin network interlacing different cells that are in the Clot of L-PRF to 50µm and 30µm respectively, **D, E and F)** fibrin network interlacing the active and inactive PLTs that are found in the Clot of L-PRF to 10µm.

In Figure 11, the fibrin basis of L-PRF clot in different days of evaluation is observed. Day 0 was clearly a disorganized network of fibrin fibers without presence of cells (Figure 7A and 7B). A pattern of similar fibrin fibers was observed at the eighth day with some cellular infiltration (Figure 7C and 7D). However, a dense longitudinal organization of the fibrin fibers with narrow and long strands, interconnected with each other in the interior were seen at day 13, in addition to multiple cellular elements of the PLTs that formed a conglomerate of cells trapped between the fibrillary elements (Figure 7E and 7F)



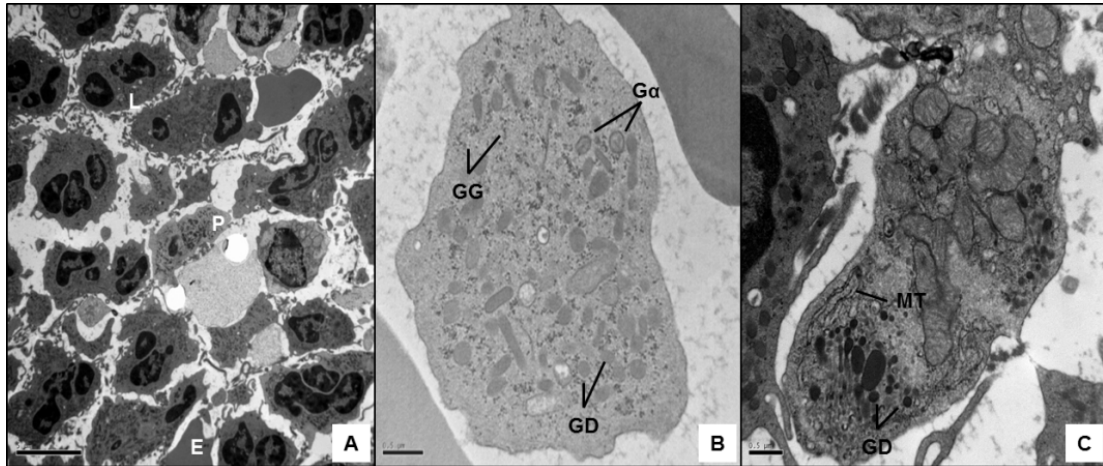
**Figure 7.** Observation of the fibrin basis of L-PRF clot in different days of evaluation. (A and B) Day 0 to 4.3µm and 1.76µm respectively, (C and D) Day 8 to 4.3µm and 3.0 µm respectively, E and F) day 13 to 6.0µm and 3.8µm respectively.

#### 4.1.3.3. TEM

The first way to detect that the platelets are in good condition is checking that they have not been fragmented or broken in the process of concentration in the of the L-PRF clot production.

In Figure 8, whole PLTs with its organelles intact inside can be seen which indicates that the integrity of the platelets is total and that the concentration process has not

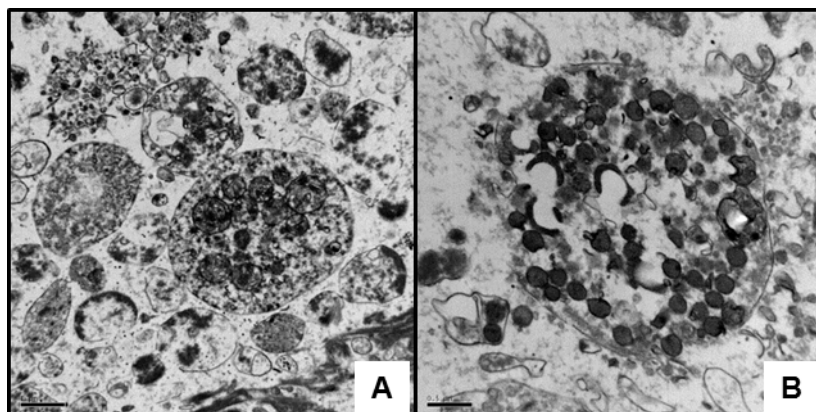
caused cell damage. However there was a change noted in the morphology of the PLTs (Figure 8B and 8C), losing the spherical shape and taking a more irregular shape, which indicated a certain degree of activation.



**Figure 8.** Platelets at day 0 of incubation. (A) Observation of the conglomerate of leukocytes, platelets and erythrocytes, (B and C) platelet structure.

**L:** leukocytes, **P:** platelets, **E:** erythrocytes, **GG:** Granules of glycogen, **Gα:** alpha granules, **GD:** dense granules, **MT:** microtubules.

In Figure 9, platelets were observed in different days of incubation. The eighth day of incubation, platelets showed a spherical shape with the preserved cytoplasm and alpha granules randomly scattered (Figure 9A). At day 13, the cytoplasm of platelets was interrupted with the migration of the organelles to the periphery. In addition, cellular debris was observed (Figure 9B).



**Figure 9.** Platelets in different times of incubation. (A) Day 8, (B) Day 13.

#### 4.1.3.4. Evaluation of 4 growth factors (TGF- $\beta$ 1, IGF-1, VEGF, PDGF-AB)

From the 4 growth factors analyzed in the exudate of the L-PRF clots (Figure 10), it was only possible to determine for TGF-  $\beta$ 1 and IGF-1 concentrations. The concentrations of the two other growth factors VEGF and PDGF-AB could not be determined because their values were not detectable for the standard curve of measurement.



**Figure 10.** L-PRF clots produced in vacutainer tubes<sup>®</sup>.

Growth factors, TGF-  $\beta$ 1 and IGF-1, concentrations (mean and standard deviation) are shown in table 1 for the different days of incubation.

**Table 1.** Values obtained when assessing the different growth factors (n=6).

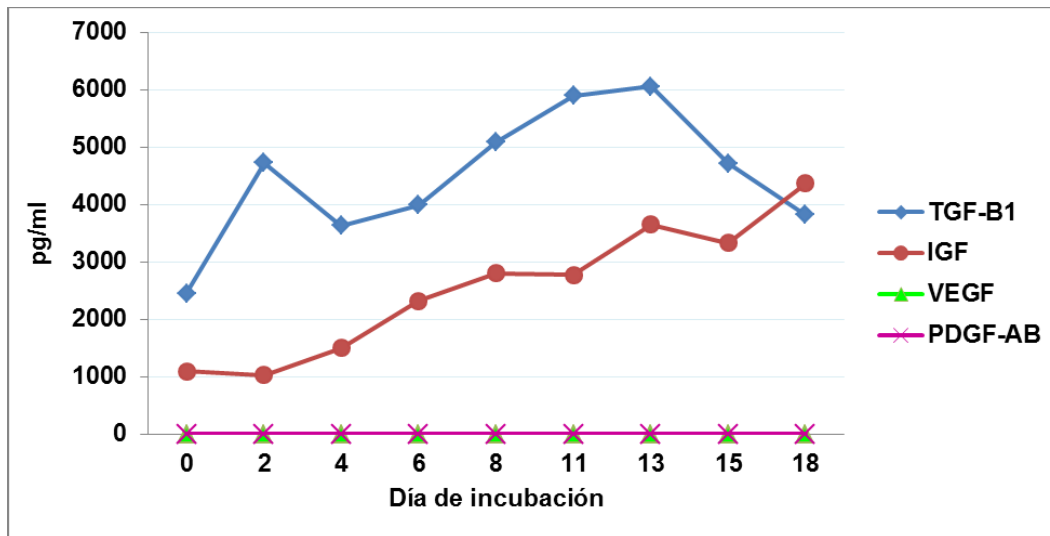
Day of Incubation	TGF- $\beta$ 1 (pg/ml)		IGF-1 (pg/ml)	
	X	SD	X	SD
0	2451.2	431.3	1093.6 <sup>A-l</sup>	496.5
2	4728.8 <sup>b</sup>	1595.6	1022.5 <sup>b-i</sup>	862.7
4	3631.5 <sup>c</sup>	684.2	1492.9 <sup>c-i</sup>	973.4
6	3987.4 <sup>d</sup>	824.1	2318.7 <sup>d-i</sup>	1360.7
8	5082.0 <sup>e</sup>	1600.2	2803.7 <sup>e</sup>	1754.5
11	5895.2 <sup>f-a</sup>	2398.6	2773.7 <sup>f</sup>	1429.4
13	6052.9 <sup>g-a</sup>	2343.6	3653.6 <sup>g</sup>	2529.1
15	4719.2 <sup>h</sup>	2607.4	3332.3 <sup>h</sup>	1592.6
18	3820.1 <sup>i</sup>	2370.7	4369.0 <sup>i</sup>	3040.9

Values with different superscripts in the same column, indicate significant differences (p < 0.05) between the various days of incubation. X: media, SD: standard deviation.

After the statistical analysis a significant difference was found for TGF-  $\beta$ 1 between the day 0 of incubation with an average value of 2451.2 pg/ml with respect to day 11 with

an average value of 5895.2 pg/ml, and day 13 of evaluation with a mean value of 6052 pg/ml.

Similarly significant differences were found for IGF-1 between day 0 of incubation with an average value of 1093.6 pg/ml, day 2 with an average value of 1022.5 pg/ml, day 4 with an average value of 1492.9 pg/ml and day 6 with an average value of 2318.7 pg/ml with respect to day 18 of evaluation with an average value 4369 pg/ml.



**Figure 11.** Graph of the concentrations of the different growth factors in picograms per milliliter, during the 18 days of incubation of the clot.

#### 4.1.4. Discussion

L-PRF production in humans is done without the addition of any xenobiological component (i.e: anticoagulant, thrombine, calcium salt) and through a single centrifugation of whole blood at 400 g for 10 minutes. However, in the present study, a soft spin 252 g for 8 minutes was more appropriate for horses since preliminary pilot studies using higher spins produced increased platelet activation and TGF- $\beta$ 1 release was less prolonged during the time.

The histological analysis from human L-PRF clots (20,21) was similar to our findings in terms of cell distribution. The H&E staining was useful for identifying the platelets and their aggregates as well as the erythrocytes. However, it was difficult to identify leucocytes, because they look like platelet aggregates. This problem can be solved using a Masson's trichrome staining technique, which permits to easily separate platelet aggregates and leukocytes (dark blue) from erythrocytes (red) (21). Unfortunately, this staining was not performed in our study.

L-PRF clots are formed by a slow and physiological polymerization that creates a strong and elastic matrix of fibrin in which the majority of platelets and leukocytes are concentrated and preserved with high efficiency (22). SEM studies from human L-PRF clots (20,21) demonstrated a homogeneous distribution of fibrin with an interconnection of fibrin fibers trapping different cells such as platelets, leukocytes and small amounts of red cells. However, our SEM findings only presented different types of fibers in a homogeneous distribution that became more organized at the end of the evaluation on day 13. To note, SEM revealed no cells in samples at 0 and 8 days and poor cellular migration at 13th day. Our findings could suggest that samples were taken from an acellular area (Fig 10B) and possibly also, that the cytokines trapped in the fibrin matrix could induce late cell migration (23). These findings support the idea that L-PRF could act as a complex three-dimensional scaffold (7,22) for tissue engineering, specially for wound repair and bone regeneration (20,24).

The TEM findings from the present study at 0 day were quite similar to another equine PRP study (25). In general, equine platelets present a discoid shape (two-thirds the size of human platelets) with their cytoplasm filled with  $\alpha$ -granule twice as large as those in human platelets in a highly organized matrix (25). However, our TEM results at 8 and 13 days demonstrated progressive damage of the platelets with external release of alpha ( $\alpha$ ) granules. These structural findings agreed with the progressive increase of TGF- $\beta$ 1 concentration from L-PRF elution concentration at the same times (table 3), which confirms that the platelet  $\alpha$ -granules are an important source of these protein.

All the GF coming from platelet alpha-granules are trapped inside the L-PRF dense and consistent fibrin network formed after centrifugation (23) that is why the TGF- $\beta$ 1 concentrations were obtained from the clot exudates, as it has been done in different studies in humans (8,21,23). The clots were incubated in order to mimic *in vivo* situations and to measure elution in optimal conditions (8).

In this study, TGF- $\beta$ 1 concentrations from clot exudates increased steadily from low baseline values and reached maximal concentrations on day 13, which was in accordance with previous studies conducted with human blood, where the maximum TGF- $\beta$ 1 value was obtained at day 14 (26). Even if the concentrations measured in L-PRF clot exudates in the present study are lower than those observed in human studies (26,27), TGF- $\beta$ 1 elution kinetic behavior of our study observed was similar.

TGF- $\beta$ 1 concentrations measured from the L-PRF clots were lower than those in previous equine platelet rich plasma (PRP) studies, where peak concentrations of 10.5 ng/mL (17 ) and,7.4 ng/mL (28) were obtained. This could mean that platelet activation and subsequent TGF- $\beta$ 1 and other GF release occurs in a slow and progressive manner during the natural process of polymerization generated after centrifugation as



there is no forced activation (26). Further, the dilutional effect of the culture medium should also be considered.

The values obtained for IGF-1 in the present study were in constant increase from the first day until the last evaluation in the different tests performed, and reached their maximum concentration on the last day of evaluation. In summary our results are contradictory to those obtained in other studies in humans (27), where this IGF-1 had an almost constant concentration during the time of study. Several PRP studies in horses have reported values below the ones obtained in the present study during the first 24 hours of evaluation. These results suggest that IGF-1 was contained within plasma (27) and that the contribution of the granules was minimal. In addition, it was not dependent on platelet activation. This leads to the thought that leukocytes and their activation during the process are an important source of IGF-1.

Finally, our study demonstrated that equine L-PRF present similar histological, ultrastructural and, biological characteristics than human L-PRF. In addition, our hypothesis was proven, since the TGF  $\beta$ 1 release from the equine L-PRF clots was done in a gradual and controlled way increasing its concentration for at least 2 weeks and these findings agreed with the TEM results. Clinical studies are necessary for evaluating this substance for the treatment of distal limb wounds and as a coadjuvant in orthopedic surgery in horses.

#### 4.1.5. References

1. Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T: Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte-and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol* 27:158-167, 2009.
2. Carmona J, López C, Giraldo C: Use of autologous platelet concentrates as regenerative therapy for chronic diseases of the equine musculoskeletal system. *Arch Med Vet* 43:1-10, 2011.
3. Du Toit DF, Kleintjes WG, Otto MJ, et al: Soft and hard-tissue augmentation with platelet-rich plasma: Tissue culture dynamics, regeneration and molecular biology perspective. *Int J Shoulder Surg* 1:64, 2007.
4. Everts PA, Overdevest EP, Jakimowicz JJ, et al: The use of autologous platelet-leukocyte gels to enhance the healing process in surgery, a review. *Surg Endosc* 21:2063-2068, 2007.
5. Khan R, Sheppard R: Fibrosis in heart disease: understanding the role of transforming growth factor- $\beta$ 1 in cardiomyopathy, valvular disease and arrhythmia. *Immunology* 118:10-24, 2006.
6. Wakefield LM, Letterio JJ, Chen T, et al: Transforming growth factor-beta1 circulates in normal human plasma and is unchanged in advanced metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res* 1:129-136, 1995.
7. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, et al: Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part II: platelet-related biologic features. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 101:45-50, 2006.
8. Visser LC, Arnoczky SP, Caballero O, et al: Platelet-Rich Fibrin Constructs Elute Higher Concentrations of Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 and Increase Tendon Cell Proliferation Over Time when Compared to Blood Clots: A Comparative In Vitro Analysis. *Vet Surg* 39:811-817, 2010.
9. Sutter WW, Kaneps AJ, Bertone AL: Comparison of hematologic values and transforming growth factor- $\beta$  and insulin-like growth factor concentrations in platelet concentrates obtained by use of buffy coat and apheresis methods from equine blood. *Am J Vet Res* 65:924-930, 2004.
10. Zimmermann R, Jakubietz R, Jakubietz M, et al: Different preparation methods to obtain platelet components as a source of growth factors for local application. *Transfusion* 41:1217-1224, 2001.
11. Lucas PJ, Kim S-J, Melby SJ, et al: Disruption of T Cell Homeostasis in Mice Expressing a T Cell-Specific Dominant Negative Transforming Growth Factor  $\beta$  II Receptor. *J Exp Med* 191:1187-1196, 2000.

12. Argüelles D, Carmona JU, Climent F, et al: Autologous platelet concentrates as a treatment for musculoskeletal lesions in five horses. *Vet Rec* 162:208-211, 2008.
13. Waselau M, Sutter WW, Genovese RL, et al: Intralesional injection of platelet-rich plasma followed by controlled exercise for treatment of midbody suspensory ligament desmitis in Standardbred racehorses. *J Am Vet Med Assoc* 232:1515-1520, 2008.
14. Carmona JU, Argüelles D, Climent F, et al: Autologous Platelet Concentrates as a Treatment of Horses with Osteoarthritis: A Preliminary Pilot Clinical Study. *J Equine Vet Sci* 27:167-170, 2007.
15. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, et al: Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 101:37-44, 2006.
16. Jørgensen B, Karlsmark T, Vogensen H, et al: A Pilot Study of Leucopatch, an Autologous, Additive-Free, Platelet-Rich Fibrin for the Treatment of Recalcitrant Chronic Wounds to Determine Safety. *Int J Low Extrem Wounds*, 2011.
17. Argüelles D, Carmona JU, Pastor J, et al: Evaluation of single and double centrifugation tube methods for concentrating equine platelets. *Res Vet Sci* 81:237-245, 2006.
18. Carmona JU, Argüelles D, Prades M: Niveles de factor de crecimiento transformante beta-3 y óxido nítrico en cuatro concentrados autólogos de plaquetas y plasma derivados de sangre equina. *Arch Med Vet* 40:155-160, 2008.
19. Penha-Goncalves M, Onions D, Nicolson L: Cloning and Sequencing of Equine Transforming Growth Factor-Beta 1 (TGF $\beta$ -1) cDNA. *DNA Seq* 7:375-378, 1997.
20. Kang YH, Jeon SH, Park JY, et al: Platelet-rich fibrin (PRF) is a bio-scaffold and reservoir of growth factors for tissue regeneration. *Tissue Eng Part A* 17:349-359, 2010.
21. Dohan Ehrenfest DM, Del Corso M, Diss A, et al: Three-dimensional architecture and cell composition of a Choukroun's Platelet-Rich Fibrin (PRF) clot and membrane. *J Periodontol*:1-5, 2009.
22. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, et al: Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part III: Leucocyte activation: A new feature for platelet concentrates? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 101:51-55, 2006.
23. Gaßling VLW, Açil Y, Springer IN, et al: Platelet-rich Plasma and Platelet-rich fibrin in human cell culture. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 108:48-55, 2009.
24. Gassling V, Douglas T, Warnke PH, et al: Platelet-rich fibrin membranes as scaffolds for periosteal tissue engineering. *Clin Oral Implants Res* 21:543-549, 2010.

25. Zandim BM, Souza MV, Magalhães PC, et al: Platelet activation: ultrastructure and morphometry in platelet-rich plasma of horses. *Pesq Vet Bras* 32:83-92, 2012.
26. He L, Lin Y, Hu X, et al: A comparative study of platelet-rich fibrin (PRF) and platelet-rich plasma (PRP) on the effect of proliferation and differentiation of rat osteoblasts in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 108:707-713, 2009.
27. Su CY, Kuo YP, Tseng YH, et al: In vitro release of growth factors from platelet-rich fibrin (PRF): a proposal to optimize the clinical applications of PRF. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 108:56-61, 2009.
28. Carter CA, Jolly DG, Worden CE, et al: Platelet-rich plasma gel promotes differentiation and regeneration during equine wound healing. *Exp Mol Pathol* 74:244-255, 2003.

## 4.2. Long term cytokine and growth factor release from equine platelet-rich fibrin clots obtained with two different centrifugation protocols

This manuscript has been received and accepted for publication on to the Elsevier Editorial System for Cytokine

Román F. Jiménez-Aristizabal,<sup>a,b</sup> Catalina López,<sup>a</sup> María E. Álvarez,<sup>a</sup> Carlos .E. Giraldo,<sup>a</sup> Marta Prades,<sup>b</sup> Jorge U. Carmona<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Grupo de Investigación Terapia Regenerativa, Departamento de Salud Animal, Universidad de Caldas, Manizales, Colombia

<sup>b</sup>Departament de Medicina i Cirurgia Animals. Facultat de Veterinària. Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès, Barcelona, Spain

### Abstract

**Objectives:** To compare the temporal release (over three weeks) of tumour necrosis factor alpha (TNF-  $\alpha$ ), interleukin 4 (IL-4) and IL-1 receptor antagonist (IL-1ra), platelet-derived growth factor BB (PDGF-BB) and transforming growth factor beta-1 (TGF-  $\alpha_1$ ) from two platelet-rich fibrin (PRF) preparations from equine blood obtained at either 240 g/8 min and 416 g/10 min.

**Methods:** Whole blood from 10 horses was used to obtain PRF clots by two different centrifugation protocols. After 1 h resting, PRF clots were deposited in wells with culture media, which were changed at 6 h, 24h and then each 48h till 21 days. Cytokines and GFs were measured by ELISA at 1h (serum supernatants from PRF clots) and all time points of culture media change. A negative control (plasma) and a positive control (blood lysate) were also included.

**Results:** There were not relevant differences between both protocols for the temporal release of the proteins evaluated. However, a significant ( $p \geq 0.05$ ) effect of time was noticed. All cytokines were detected after 6h of PRF clot culture till 21<sup>th</sup> day. GF were detected at 1h till 21<sup>th</sup> day. The concentrations for these proteins diminished gradually over time. A strong significant ( $p \geq 0.01$ ) correlation was noticed between all the proteins evaluated.

**Conclusions:** Leukocytes enmeshed in PRF clots were able to produce cytokines and TGF- $\alpha_1$  and PDGF-BB. These findings demonstrate a paramount role of leukocytes in wound healing induced or modified by PRF clots in mammals.

**Key words:** Platelet-rich fibrin, Cytokines, Horse, Wound healing, Platelet concentrate

#### 4.2.1. Introduction

Blood is a specialized mesenchymal tissue mostly composed by erythrocytes, leukocytes and platelets, which are suspended in a liquid extracellular matrix (ECM), plasma [1, 2]. Blood has several paramount physiologic actions, such as oxygen and CO<sub>2</sub> transportation, cell nutrition supply and distribution of leukocytes through body to act as immunologic guardians in cases of infection or severe injury [1, 2]. Furthermore, platelets act in cases of wounding or trauma by producing clot formation to avoid blood lose, releasing microbicidal chemokines [3] and activating wound healing through growth factor (GF) and cytokine release [4,5]. This last phenomenon is produced in a complex communication between leukocytes and stem cells, which are embedded in a provisional matrix scaffold of fibrin, which is necessary for triggering the process of wound healing and consequently produce tissue regeneration or scarring [6].

The use of activated platelets and leukocytes enmeshed in a fibrin scaffold, platelet-rich fibrin (PRF) [7], emerged as a simple and cost effective technology for the treatment of musculoskeletal [8] and oral surgical diseases in humans [9, 10] and animals like horses [11]. The PRF scaffold is biologically produced after tissue injury. That is why, it is valid to obtain PRF scaffolds from whole blood and to use this biomaterial to improve the healing process in different clinical conditions that require its usage [5].

Although PRF is commonly used in surgical settings or as a coadjuvant for improving tissue healing [12], there are several basic biologic mechanisms that should be studied to understand the reason why this bioscaffold is successfully used in clinical conditions [9, 10] and to establish the actual capacity of this biomaterial to retain, release and eventually produce pro and anti-inflammatory cytokines and anabolic GFs over time.

This study described and compared the temporal release (over three weeks) of selected pro-inflammatory (tumour necrosis factor alpha [TNF- $\alpha$ ]) and anti-inflammatory cytokines (interleukin 4 [IL-4] and IL-1 receptor antagonist [IL-1ra]) and anabolic platelet-related growth factors (platelet-derived GF isoform BB [PDGF-BB] and transforming growth factor beta-1 [TGF- $\beta_1$ ]) from two PRF preparations from horses blood obtained by two different centrifugation protocols (240 g/8 min and 416 g/10 min).

The hypotheses of this study was that PRF clots will produce a sustained release of cytokines and GFs over a long term period (three weeks) and that there is not significant differences between the cytokine and GF release profile from PRF clots obtained with any of the protocols of centrifugation evaluated.

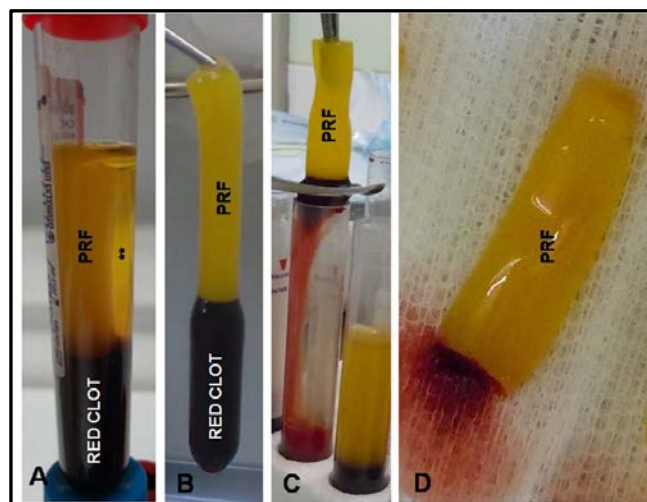
#### 4.1.2. Methods

This study was approved by the committee on animal experimentation of the Universidad de Caldas, Manizales, Colombia. A written owner informed consent authorization was provided for all horses.

##### 4.2.2.1. Horses and blood procurement and processing

Ten Argentinean Creole clinically healthy gelding horses, between 7-10 years were included. These animals were from the same owner. All the horses were stabled, fed and managed in a similar fashion. These horses were selected after performing an extensive physical examination together a complete blood cell count and a general clinical chemistry panel. Only were selected clinically healthy horses with platelet counts higher than  $100 \times 10^3/\mu\text{L}$ .

Whole blood from each horse was obtained by jugular puncture using a butterfly catheter 21G. Blood was deposited in two different types of tubes: one sodium citrate tube and seven 10-mL glass tubes without additives. Blood from sodium citrate tubes was used for platelet and leukocyte count and for plasma preparation (negative control), which was obtained by centrifugation at  $3500 \text{ g}$  per 5 min. From the seven 10-mL glass tubes, one tube was used for obtaining a blood lysate (positive control) by adding 1 mL of a solution containing 0.5% of a non-ionic detergent (Triton<sup>®</sup>X100, Sigma-Aldrich Co. LLC., MO, USA).



**Figure 1.** Photographs showing part of equine platelet-rich fibrin (PRF) procurement. **A)** A 10-mL glass tube without additives containing three blood components (blood clot, PRF clot and serum supernatant (\*\*)) 1 hour after be centrifuged. **B)** Entire equine whole blood clot after 1h of centrifugation. **C)** PRF clot is separated from red clot by scissor. **D)** An equine PRF clot ready to be deposited in a well with culture medium.

#### **4.2.2.2. Platelet-rich fibrin preparation**

Three tubes containing whole blood were centrifuged at 240 *g* over 8 min. The other three were spun at 416 *g* for 10 min, which is a common centrifugation protocol to produce human PRF [13]. Then, all the tubes remained in resting over 1 h. After this time, a solid phase (blood clot) and liquid phase (serum supernatant) from each tube was identified (Figure 16A). Blood clots composed by a red clot and a white clot (PRF) (Figure 16B) were separated with a sterile scissor (Figure 1C & D) and deposited in plastic wells for *in vitro* culture. On the other hand, serum supernatants were deposited in Eppendorf tubes and frozen at -80 °C for later quantification of TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-1ra, PDGF-BB and TGF- $\beta_1$ . These samples were considered as time 1 h of the experiment.

#### **4.2.2.3. Platelet-rich fibrin culture and study design**

Three PRF (white clots) preparations obtained from each horse with both protocols were deposited in 3 mL wells with Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (high glucose, 4500 mg/L) with L-glutamine and sodium bicarbonate and free of sodium pyruvate (DMEM, Lonza Group Ltd, Basel, Switzerland) and supplemented with streptomycin (100  $\mu$ g/mL) and penicillin (100  $\mu$ g /mL) without the addition of serum. Cultures were incubated in a 5% CO<sub>2</sub> and water saturated atmosphere. Culture media was completely changed at 6h, 24 h (1<sup>st</sup> day), and each 48h till 21<sup>th</sup> day. Each well containing a PRF clot was newly filled with fresh culture media (3 mL) after each sampling. Culture media from PRF obtained at each time point was aliquoted and deposited in Eppendorf tubes and frozen at -80 °C for later quantification of TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-1ra, PDGF-BB and TGF- $\beta_1$  by ELISA.

#### **4.2.2.4. ELISA analysis**

Plasma, blood lysates, serum supernatants and culture media from both PRF preparations from each horse obtained at different time points were used to determine the concentration of TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-1ra, PDGF-BB and TGF- $\beta_1$  by ELISA per duplicate. All proteins were assayed using commercial ELISA development kits from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). TNF- $\alpha$  (Equine TNF-alpha DuoSet, DY1814) IL-4 (Equine IL-4 DuoSet, DY1809) and IL-1ra (Equine IL-1ra/IL-1F3 DuoSet, DY1814) were assayed with equine-specific antibodies. PDGF-BB (Human PDGF-BB DuoSet, DY220) and TGF- $\beta_1$  (Human TGF- $\beta_1$  DuoSet, DY240E) were determined using human antibodies because there is a high homology between these proteins in humans and



horses [14, 15]. Furthermore, these kits have been used for the same purposes in other equine platelet-rich preparations studies [16-18]. The standards provided for each ELISA kit were used in preparing each standard curve according to the manufacturers' instructions. Readings were performed at 450 nm. The lower limit of detection for all the proteins assayed was 32.5 pg/mL. In general, the inter- and intra-assay coefficients of variation for the various ELISA kits were among 4-6%.

#### **4.2.2.5. Statistical and data analysis**

The Shapiro–Wilk test was used to assess the fit of the data set to a normal distribution (goodness of fit). All the parameters evaluated, but IL-4, presented a normal distribution ( $p > 0.05$ ). TNF- $\alpha$  IL-1ra, PDGF-BB and, TGF- $\beta_1$  concentrations from sera supernatants (1 hour) and culture media from PRF preparations obtained at different time points were compared by a generalized lineal model (GLM) of repeated measures evaluating the effect of the PRF protocol (treatment), time and the interaction between treatment and time. A Tukey test was used when necessary to establish significant differences. IL-4 concentrations were evaluated in a similar fashion than the aforementioned proteins after Log (Y) transformation.

Overall GF and cytokine concentrations from culture media and serum supernatants (time 1) from PRF clots obtained with both centrifugation protocols, as well as plasma (negative control), and blood lysates (positive control) were compared by one way ANOVA, followed when necessary by a Tukey test to establish significant differences. Correlation analyses were performed in order to determine the Pearson correlation product ( $r$ ) between the variables evaluated in the study over each point time or by considering the overall results. A  $p < 0.05$  was accepted as statistically significant for all tests.

### **4.2.3. Results**

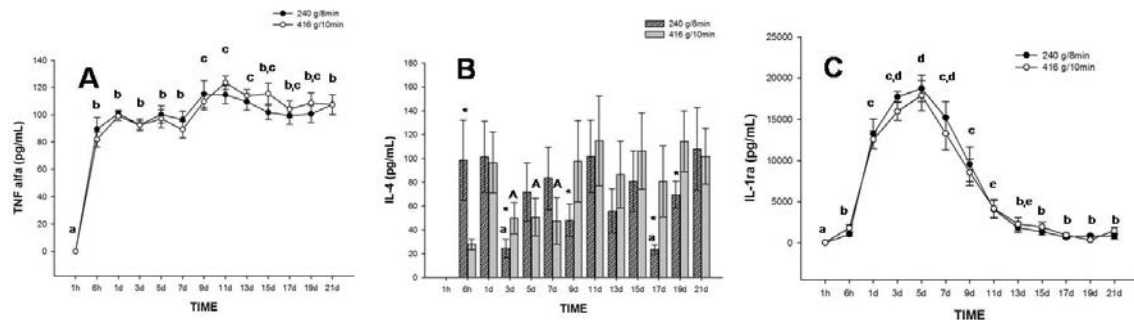
#### **4.2.3.1. Cell concentration in whole blood**

Blood from study's horses showed a mean white blood cell (WBC) concentration of  $7.32 \pm 0.92$  cells  $\times 10^3/\mu\text{L}$  and a mean platelet (PLT) concentration of  $110 \pm 9.3$  cytoplasmic fragments  $\times 10^3/\mu\text{L}$ .

#### 4.2.3.2. Temporal release of cytokines and growth factors in hemoderivatives and culture media from PRF preparations

TNF- $\alpha$ 1 was not detected in serum supernatant from PRF clots over 1h, its concentration increased dramatically at 6 h and remained stable (between 80-100 pg/mL) over each time point evaluated in the study; the effect of time influenced significantly ( $p = 0.001$ ) on TNF- $\alpha$  concentration (Figure 2A). The statistical model showed that the treatment (centrifugation protocol) did not influence the concentration of this catabolic cytokine.

IL-4 concentration was not detected at 1h in serum supernatants from PRF clots obtained with both centrifugation methods. However, the concentrations for this cytokine were detected in the rest of the time points evaluated. The results of the statistical model showed a significant ( $p = 0.003$ ) effect of time and treatment, but not significant interaction between both factor was observed. In figure 2B are presented the main significant differences for IL-4 concentration observed for time and treatment. In relation with this last factor, there were significant differences between both centrifugation protocols at 6h, 3<sup>rd</sup>, 9<sup>th</sup>, 17<sup>th</sup> and 19<sup>th</sup> days.

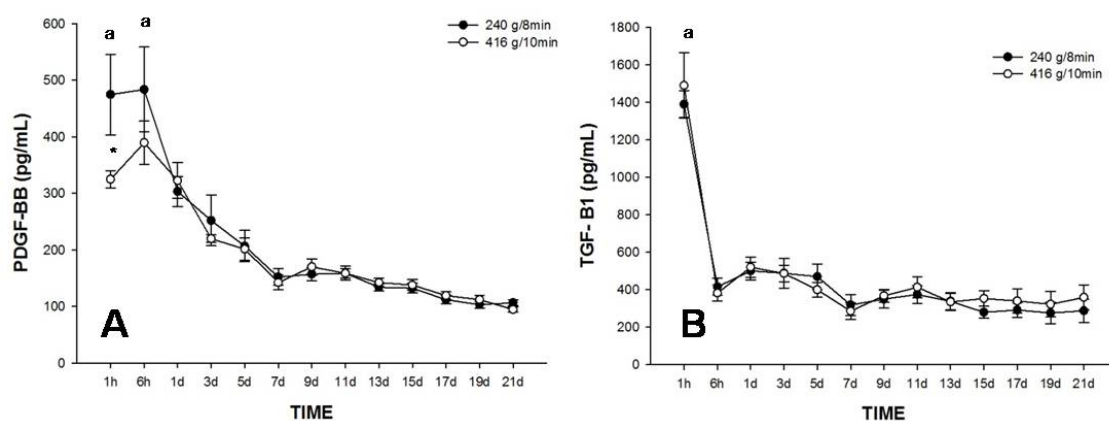


**Figure 2.** Mean (mean standard error [m.s.e.]) cytokine concentrations (pg/mL) in culture media over time released from PRF clots obtained with both centrifugation protocols. **A)** Temporal release of TNF- $\alpha$  from 1 h to 21 d. **B)** Temporal release of IL-4 from 1 h to 21 d. **C)** Temporal release of IL-1ra from 1 h to 21 d. <sup>a-b</sup> = Different lowercase letters denote significant differences ( $p < 0.01$ ) for TNF- $\alpha$  and IL-1ra concentrations over time by Tukey test. Furthermore, they denote significant ( $p < 0.01$ ) differences for IL-4 concentrations in culture media from PRF clots obtained at 240 g/ 8min. <sup>A</sup>= Capital letter denotes significant ( $p < 0.01$ ) differences for IL-4 concentrations in culture media from PRF clots obtained at 416 g/ 10min by Tukey test. <sup>\*</sup> = Denotes significant differences ( $p < 0.01$ ) between IL-4 concentrations at the same time points released from PRF clots obtained with different centrifugation protocols by Tukey test.

IL-1ra was not detected in PRF supernatants from both centrifugation protocols over the first hour of the study. However, it was appreciable concentrations from 6h till the end of the study (21<sup>th</sup> day). The statistical model showed only a significant ( $p = 0.0001$ ) effect of the time. The concentrations for this polypeptide in culture media from PRF clots obtained with both protocols exhibited a gradual increasing in its concentration from 6h to 5<sup>th</sup> day. After this IL-1ra concentrations diminished gradually till 13<sup>th</sup> day and remained stable over the rest of time points evaluated. In figure 2C are presented the main significant differences for IL-1ra concentration over time.

PDGF-BB concentrations were obtained through all study's time points. The results of the statistical model showed a significant ( $p = 0.001$ ) effect of time and treatment, but not significant interaction was observed between both factors. The only significant difference ( $p = 0.001$ ) observed between both treatments was detected at 1h, where the concentration for this GF was significantly higher in serum supernatants from PRF clots obtained at 240g/8 min. In general, this GF presented a higher initial concentration at 1 and 6 hours and then showed a gradual reduction of the concentration till 7<sup>th</sup> day and then, the concentrations for this polypeptide remained stable till 21<sup>th</sup> day (Figure 3A).

TGF-  $\alpha_1$  concentration was detected in all the time points evaluated. The statistical model showed only a significant ( $p = 0.001$ ) effect of the time. The highest significant ( $p = 0.001$ ) TGF-  $\alpha_1$  concentrations were obtained at 1 h in comparison with the rest of time points evaluated. In general the concentration for this GF remained in a 400-450 pg/mL range between 6h and 21 day (Figure 3B).



**Figure 3.** Mean (m.s.e.) growth factor concentrations (pg/mL) in culture media over time released from PRF clots obtained with both centrifugation protocols. **A)** Temporal release of PDGF-BB from 1 h to 21 d. **B)** Temporal release of TGF-b<sub>1</sub> from 1 h to 21 d. a-b= different lowercase letters denote significant differences ( $p < 0.01$ ) for PDGF-BB and TGF-b<sub>1</sub> concentrations over time by Tukey test. \* = Denotes significant differences

( $p < 0.01$ ) between PDGF-BB concentrations at the same time point released from PRF clots obtained with different centrifugation protocols by Tukey test.

#### 4.2.3.3 Overall release of cytokines and growth factors in hemoderivatives and culture media of PRF preparations

TNF- $\alpha$  1, IL-4 and IL-1ra concentrations were not detected in serum supernatants from PRF clots obtained with both protocols, plasma and blood lysates. However, these cytokines were released from PRF clots (obtained with both protocols) to the culture media from 6h till 21<sup>th</sup> day. These cytokines were apparently produced by cells embedded in the clots. Notably, there were not significant differences between the overall concentration of TNF- $\alpha$  1, IL-4 and IL-1ra in culture media from PRF clots from both protocols (Table 1).

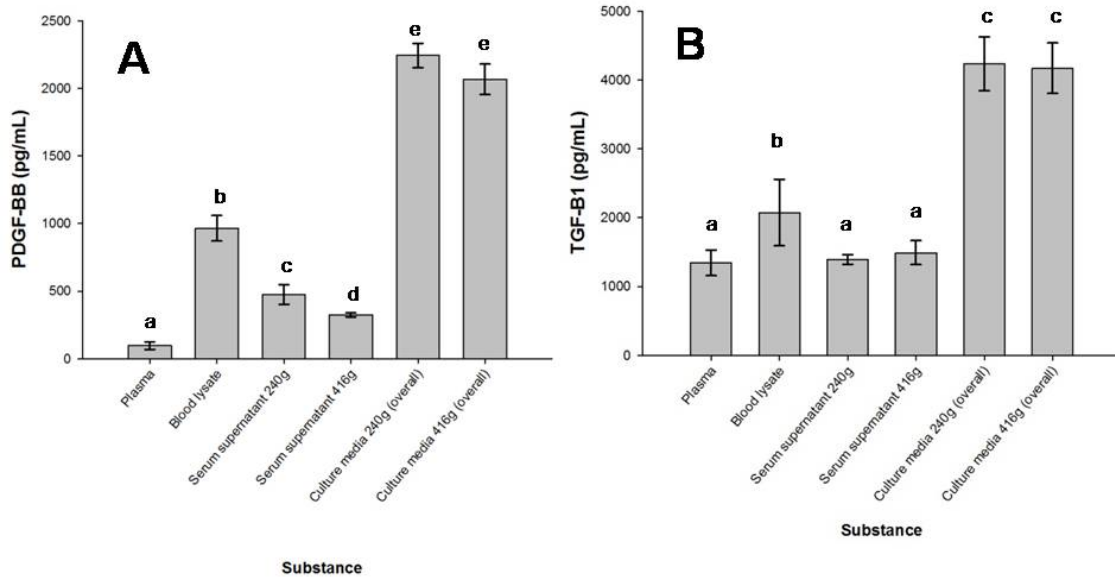
**Table 1.** Overall cytokine and growth factor concentration in blood lysates, plasma, and serum supernatants from PRF clots obtained with both centrifugation protocols.

Cytokine	Substance		Serum	Serum	Culture media	Culture media
	Plasma	Blood lysate	supernatant 240g/8 min	supernatant 416g/10 min	240g/8 min (Overall)	416g/10 min (Overall)
IL-1ra (ng/mL)	0.0	0.0	0.0	0.0	841.2 $\pm$ 87.5 <sup>a</sup>	715.2 $\pm$ 95.7 <sup>a</sup>
IL-4 (pg/mL)	0.0	0.0	0.0	0.0	883.8 $\pm$ 65.1 <sup>a</sup>	866.5 $\pm$ 91.9 <sup>a</sup>
TNF- $\alpha$ 1 (pg/mL)	0.0	0.0	0.0	0.0	1135.1 $\pm$ 22.9 <sup>a</sup>	1118.2 $\pm$ 22.7 <sup>a</sup>

IL-1ra, interleukin 1 receptor antagonist; IL-4, interleukin 4; TNF- $\alpha$ 1 tumour necrosis factor alpha. <sup>a</sup>= different lowercase letters represent significant ( $p = 0.0001$ ) differences between the same cytokines across the evaluated substances.

PDGF-BB and TGF- $\beta$ <sub>1</sub> concentrations were detected in all hemoderivatives evaluated and in culture media from 6h till 21<sup>th</sup> day. PDGF-BB concentrations were significantly ( $p = 0.001$ ) lower in plasma when compared to the other evaluated substances. The concentrations for this GF were significantly ( $p = 0.001$ ) lower in serum supernatants from both PRF clots obtained with both protocols when compared to blood lysates and

culture media from PRF clots obtained with both protocols. However, PDGF-BB concentrations from serum supernatants from PRF clots obtained at 240 g x 8 min were significantly higher ( $p = 0.04$ ) than the homologous hemoderivative obtained with the other protocol of centrifugation. Notably, the PDGF-BB overall concentrations in culture media from PRF clots obtained with both protocols were not different (Figure 4A).



**Figure 4.** Overall mean (m.s.e.) growth factor concentrations (pg/mL) in plasma, blood lysates, and released in serum supernatants and culture media from PRF clots obtained with both centrifugation protocols. **A)** Overall PDGF-BB concentrations. **B)** Overall TGF- $\beta_1$  concentrations. <sup>a-b</sup>= different lowercase letters denote significant differences ( $p < 0.01$ ) for PDGF-BB and TGF- $\beta_1$  overall concentrations in the substances evaluated by Tukey test.

TGF- $\beta_1$  concentrations were significantly ( $p = 0.001$ ) lower, but not different in plasma and serum supernatants from both clots obtained with both protocols when compared to the overall concentrations of this GF from culture media from clots obtained with both protocols. Notably, the concentrations for this GF were very similar between these last substances (Figure 4B).

#### 4.2.3.4. Correlations

Specific significant correlations were found between PDGF-BB and time ( $r = -0.71$ ,  $p = 0.0001$ ), PDGF-BB and TGF- $\beta_1$  ( $r = 0.62$ ,  $p = 0.0001$ ), TGF- $\beta_1$  and TNF- $\alpha$  ( $r = 0.60$ ,  $p = 0.0001$ ) and IL-4 and TNF- $\alpha$  ( $r = 0.60$ ,  $p = 0.0001$ ). Overall significantly strong correlations were observed between cytokines and GF evaluated (Table 2).

**Table 2.** Pearson correlation products between overall cytokine and growth factor concentrations.

<b>Polypeptide</b>	<b>IL-1ra</b>	<b>IL-4</b>	<b>PDGF-BB</b>	<b>TGF-<math>\beta_1</math></b>	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>
<b>IL-1ra</b>	1				
<b>IL-4</b>	0.934**	1			
<b>PDGF-BB</b>	0.857**	0.866**	1		
<b>TGF-<math>\beta_1</math></b>	0.932**	0.904**	0.838**	1	
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	0.947**	0.973**	0.885**	0.891**	1

PDGF-BB, platelet-derived growth factor isoform BB; TGF- $\beta_1$ , transforming growth factor beta-1. Other acronyms as in table 1. \*\* = ( $p = 000.1$ ).

#### 4.2.4. Discussion

The study presented here presents novel and complimentary information [19] about equine PRF biology, which could also have translational interest for human regenerative medicine. One of the most valuable points of this study stems in the fact that the kinetics release of cytokines and GF from PRF preparations were evaluated over three weeks with very short lapses of time (1h, 6h, 24 h and then each 48h till 21 days) when compared to human [20-25], equine [19] and rabbit studies [26, 27].

Cytokines and GFs evaluated in this study were selected considering the regulatory role of WBCs in inflammation and wound healing [24] and the potential anabolic effect of GFs mostly released from platelets [25]. However, it is important to consider that the molecules evaluated in this study are only a small representation of the plethora of cytokines and GFs potentially contained and released from PRF fibrin clots [23].

TNF- $\alpha_1$  was selected due its powerful catabolic and pro-inflammatory effect on cells and tissues particularly from mesenchymal and ectodermal origin, such as skin [28] and musculoskeletal tissues [28, 29]. On the other hand, TNF- $\alpha_1$  has also demonstrated a regulatory role over inflammation when is in presence of platelet-associated GFs, such as PDGF-B [30]. IL-4 and IL-1ra are two anti-inflammatory

cytokines which are implicated in wound healing and inflammation. IL-4 is mainly produced by Th2 cells, basophils, mast cells and eosinophils. This cytokine induces Th2-cell development and Th1-cell depression [31]. In general Th2 responses are associated with wound healing (through M2 macrophage transformation [32]) and parasite killing [33]. On the other hand, IL-1ra is produced and released from mononuclear cells as an answer to the same stimuli that induced IL-1 release. IL-1ra neutralizes the catabolic effects of IL-1 [34].

PDGF-BB is a sentinel polypeptide for GF release from activated platelets [18]. This GF is a powerful anabolic and anti-inflammatory molecule; it is one of the main responsible for stem cell chemotaxis, proliferation and differentiation [35]. On the other hand, TGF- $\beta_1$  is mostly released from activated platelets, but also (although in lesser degree) from leukocytes. This cytokine is anti-inflammatory and promotes collagen synthesis, extracellular matrix deposition [36] and stem cell differentiation [37]. Notably, PDGF-BB and TGF- $\beta_1$  induce up-regulation of nuclear factor kappa beta [38], which is implicated in the genesis and perpetuation of inflammation [39].

Several studies have included platelet-rich plasma preparations as positive controls for cytokine and GF release when compared to PRF preparations [19, 25, 27]. In this study, the positive control group for cytokine and GF release was a whole blood lysate, which was obtained mixing a solution of a non-ionic detergent [16-18]. The advantage of the inclusion of a whole blood lysate as a positive control stems in the fact that leukocytes and platelets actually contained in this hemoderivative are the primary source of cytokines and GFs released from a PRF preparation made with a similar sample. Thus the concentration released proteins from blood lysates could be hypothetically assumed as 100% of initial cytokine and GF concentration in a 10 mL glass tube containing whole blood for PRF procurement. This experimental approach also permits establishing if these proteins were fully released from PRF clots or were produced over time by resident cells in this biomaterial [24].

In the present study, two protocols for producing equine PRF clots were evaluated. Although some significant differences for time specific points were noticed for PDGF-BB and IL-4 concentrations in PRG supernatants at 1h (PDGF-BB) or in culture media PRF releasates (IL-4), in general there was not important technical differences between the both PRF protocols evaluated, particularly when overall results for both proteins were evaluated. However, it remains the necessity for determining if the ultrastructure of equine PRF clots obtained with the two different centrifugation protocols evaluated in this study could be different and if these possible structural differences have some effects on cell migration and cell anchorage and consequently on wound healing [13, 26].

Although cytokine and GF concentrations from plasma and PRF releasates are different between animal species [19, 23, 24] and even between studies of the same animal species [26, 27]; in general, the results from this study could be useful to clarify the release pattern of some key cytokines and GFs related with PRF biology in mammals. In this sense, TNF- $\alpha$ 1 showed a negligible release at 1h followed by a sudden production at 6h, which was maintained stable over the entire time of the experiment. IL-4 exhibited a complex release pattern, which in general terms was characterized by increasing alternating with decreasing its concentrations over time. This release pattern possibly implicated a feedback mechanism to maintaining the concentrations of this cytokine in a specific but wide range. On the other hand, IL-1ra exhibited a pattern of release characterized by gradual increasing in the release of this cytokine with a peak in the concentration at a 1week, and then a gradual decreasing of the same with a final stabilization between 11<sup>th</sup> and 21<sup>th</sup> days.

The overall PRF cytokine release to the culture media and the concentration of these polypeptides in plasma (negative control) and blood lysates (positive control) were useful to clarify that, at least in this animal model, TNF- $\alpha$ , IL-4 and IL-1ra were possibly produced only by activated leukocytes, which were embed into the PRF matrix. Interestingly, the production of these cytokines; particularly, TNF-  $\alpha$ 1, and IL-4 were sustained over time. This situation indicates an important metabolic activity of leukocytes, which was sustained over three weeks. This physiological phenomena lets consider PRF clots as immune nodes for inducing wound healing [24].

Both PDGF-BB and TGF- $\beta$ <sub>1</sub> kinetics release patterns indicated a platelet burst with massive release of both GF from time 1h and 6h for PDGF-BB and 1h for TGF- $\beta$ <sub>1</sub>. However, PDGF-BB concentrations were decreasing smoothly over time, whereas TGF- $\beta$ <sub>1</sub> concentrations decreased suddenly at 6h and then remained stable with slight (but not significant) increasing of its concentrations at 11<sup>th</sup> and 21<sup>th</sup> days. Notably, similar platelet-associated GF temporal release have described for equine PRF releasates over a five day *in vitro* study [19] and rabbit PRF releasates over a 28 day *in vitro* study [27].

The overall GF release from PRF clots to the culture media and the concentration of these molecules in plasma (negative control) and blood lysates (positive control) let to think that PDGF-BB is indeed produced by platelets [21], but possibly it also is released in significant quantities from activated leukocytes after 1 week of culture. Because, the entire temporal PDGF-BB production in culture media was at least the double than the concentration for this GF obtained in blood lysates (positive control). On the other hand, this study is useful to corroborate that although platelets are an important source of TGF- $\beta$ <sub>1</sub>; this GF is produced in lesser but sustained quantities by leukocytes possibly



6h after platelet degranulation. At this point it is necessary to consider that the initial serum supernatant from PRF clots is the most important source of PDGF-BB and TGF- $\beta_1$  and clinicians should aware for establishing some additional therapeutic procedure with this substance together with the use of PRF clot [21].

Several correlations were observed in the present study. Notably time point specific correlations indicated that PDGF-BB is negatively affected by time in 70% of the times. This correlation could be indicative that possibly the main source of this GF are platelets and that this is trapped and slowly released from PRF clots[21]. However, as mentioned a small quantity (30%) of this GF could be produced by leukocytes. On the other hand, the overall correlation analysis evidenced strong positive correlations between the evaluated molecules. This finding is useful to corroborate that in (simulated) physiologic conditions there is an adequate equilibrium between pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines and GFs. These results also suggest that TNF- $\alpha$  plays a crucial role for modulating inflammation a possibly driving it to its resolution by up-regulation of cytokines, as IL-4 and IL-1ra. This phenomenon has been previously noticed in an *in vitro* system of cartilage inflammation in co-culture with PRP, where TNF- $\alpha$  released to the culture media was positively correlated with anti-inflammatory cytokines [40].

#### **4.2.5. Conclusions**

This study contributes about PRF basic biology in horses and supports biologic translational information to humans and other mammals. TNF- $\alpha$ , IL-4 and IL-1ra were produced by resident leukocytes from PRF clots, whereas PDGF-BB and TGF- $\beta_1$  were mostly produced by platelet degranulation, although these findings were suggestive that both GF were also produced by leukocytes enmeshed in PRF clots. These findings demonstrate a paramount role of leukocytes in wound healing, either induced or modified by PRF clots in mammals. Furthermore, it is important to consider that TNF- $\alpha$  should be considered a regulatory and consequently beneficial cytokine in PRF clots, because it increases the release of anti-inflammatory cytokines from this biomaterial.

The hypotheses were corroborated, because PRF clots produced and released cytokines and GFs over a long term and no practical differences for protein release pattern were noticed between equine PRF clots obtained with the two centrifugation protocols evaluated. However, it is recommendable to incorporate the clinical use of serum supernatant which is a by-product obtained during PRF processing, because it is extremely rich in anabolic GF.

**Acknowledgments**

The authors thank Policía Nacional de Colombia.

**Role of the funding source**

This project was supported by the grant No. 0426415 of the Vicerrectoría de Investigaciones y Postgrados of the Universidad de Caldas, Manizales, Colombia.

**Conflict of interests**

All authors declare no conflict of interest.

**Author contributions**

MP and JUC had full access to all of the data in the study and take responsibility for the decision to submit this work for publication. MP and JUC designed the study and participated in data analysis and interpretation, manuscript drafting and critical revising. RFJ, CL, MEA and CEG performed laboratory work and contributed to data collection, data analysis and interpretation and critical revision of the manuscript. All the authors read and approved the final version of the manuscript to be published. This article represents part of the PhD thesis of RFJ supervised by MP and JUC and submitted to a Doctoral Program at the Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès, Barcelona, Spain.

#### 4.2.6. References

- [1] A. Clarkson, Chapter III - The simple tissues: the animal cell. Blood and lymph, A Text-Book of Histology, Butterworth-Heinemann 2013, pp. 59-84.
- [2] W.J. Krause, Krause's essential human histology for medical students, Universal-Publishers, Boca Ratón, FL, USA, 2005.
- [3] C. Lopez, J.U. Carmona, C.E. Giraldo, M.E. Alvarez, Bacteriostatic effect of equine pure platelet-rich plasma and other blood products against methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*. An in vitro study, *Vet Comp Orthop Traumatol* 27(5) (2014) 372-8.
- [4] C.E. Martinez, P.C. Smith, V.A. Palma Alvarado, The influence of platelet-derived products on angiogenesis and tissue repair: a concise update, *Front Physiol* 6(290) (2015).
- [5] K.R. Kumar, K. Genmorgan, S.M. Abdul Rahman, M.A. Rajan, T.A. Kumar, V.S. Prasad, Role of plasma-rich fibrin in oral surgery, *J Pharm Bioallied Sci* 8(Suppl 1) (2016) S36-S38.
- [6] S. Padilla, M. Sanchez, G. Orive, E. Anitua, Human-based biological and biomimetic autologous therapies for musculoskeletal tissue regeneration, *Trends Biotechnol* 19(16) (2016) 30160-3.
- [7] D.M. Dohan Ehrenfest, I. Andia, M.A. Zumstein, C.Q. Zhang, N.R. Pinto, T. Bielecki, Classification of platelet concentrates (Platelet-Rich Plasma-PRP, Platelet-Rich Fibrin-PRF) for topical and infiltrative use in orthopedic and sports medicine: current consensus, clinical implications and perspectives, *Muscles Ligaments Tendons J* 4(1) (2014) 3-9.
- [8] R. Papalia, L. Diaz Balzani, G. Torre, M.C. Tirindelli, C. Nobile, N. Maffulli, V. Denaro, Intraoperative application Platelet rich fibrin, postoperative injections of PRP or microfracture only for osteochondral lesions of the knee: a five-year retrospective evaluation, *J Biol Regul Homeost Agents* 30(4 Suppl 1) (2016) 41-49.
- [9] Z.R. Siddiqui, R. Jhingran, V.K. Bains, R. Srivastava, R. Madan, I. Rizvi, Comparative evaluation of platelet-rich fibrin versus beta-tri-calcium phosphate in the treatment of Grade II mandibular furcation defects using cone-beam computed tomography, *Eur J Dent* 10(4) (2016) 496-506.
- [10] A. Simonpieri, J. Choukroun, M. Del Corso, G. Sammartino, D.M. Dohan Ehrenfest, Simultaneous sinus-lift and implantation using microthreaded implants and leukocyte- and platelet-rich fibrin as sole grafting material: a six-year experience, *Implant Dent* 20(1) (2011) 2-12.
- [11] L.R. Goodrich, A.C. Chen, N.M. Werpy, A.A. Williams, J.D. Kisiday, A.W. Su, E. Cory, P.S. Morley, C.W. McIlwraith, R.L. Sah, C.R. Chu, Addition of Mesenchymal

Stem Cells to Autologous Platelet-Enhanced Fibrin Scaffolds in Chondral Defects: Does It Enhance Repair?, *J Bone Joint Surg Am* 98(1) (2016) 23-34.

[12] K. Hotwani, K. Sharma, Platelet rich fibrin - a novel acumen into regenerative endodontic therapy, *Restor Dent Endod* 39(1) (2014) 1-6.

[13] D.M. Dohan, J. Choukroun, A. Diss, S.L. Dohan, A.J. Dohan, J. Mouhyi, B. Gogly, Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 101(3) (2006) 19.

[14] B.P. Donnelly, A.J. Nixon, J.L. Haupt, L.A. Dahlgren, Nucleotide structure of equine platelet-derived growth factor-A and -B and expression in horses with induced acute tendinitis, *Am J Vet Res* 67(7) (2006) 1218-25.

[15] M.N. Penha-Goncalves, D.E. Onions, L. Nicolson, Cloning and sequencing of equine transforming growth factor-beta 1 (TGF beta-1) cDNA, *DNA Seq* 7(6) (1997) 375-8.

[16] C.E. Giraldo, M.E. Alvarez, J.U. Carmona, Effects of sodium citrate and acid citrate dextrose solutions on cell counts and growth factor release from equine pure-platelet rich plasma and pure-platelet rich gel, *BMC Vet Res* 11(60) (2015) 015-0370.

[17] C.E. Giraldo, M.E. Alvarez, J.U. Carmona, Influence of calcium salts and bovine thrombin on growth factor release from equine platelet-rich gel supernatants, *Vet Comp Orthop Traumatol* 30(1) (2017) 1-7.

[18] C.E. Giraldo, C. Lopez, M.E. Alvarez, I.J. Samudio, M. Prades, J.U. Carmona, Effects of the breed, sex and age on cellular content and growth factor release from equine pure-platelet rich plasma and pure-platelet rich gel, *BMC Vet Res* 9(29) (2013) 1746-6148.

[19] J. McLellan, S. Plevin, Temporal release of growth factors from platelet-rich fibrin (PRF) and platelet-rich plasma (PRP) in the horse: a comparative in vitro analysis, *Int J Appl Res Vet Med* 12(1) (2014) 44-48.

[20] R. Lundquist, M.H. Dziegiel, M.S. Agren, Bioactivity and stability of endogenous fibrogenic factors in platelet-rich fibrin, *Wound Repair Regen* 16(3) (2008) 356-63.

[21] C.Y. Su, Y.P. Kuo, Y.H. Tseng, C.H. Su, T. Burnouf, In vitro release of growth factors from platelet-rich fibrin (PRF): a proposal to optimize the clinical applications of PRF, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 108(1) (2009) 56-61.

[22] D.M. Dohan Ehrenfest, G.M. de Peppo, P. Doglioli, G. Sammartino, Slow release of growth factors and thrombospondin-1 in Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF): a gold standard to achieve for all surgical platelet concentrates technologies, *Growth Factors* 27(1) (2009) 63-9.

- [23] F. Passaretti, M. Tia, V. D'Esposito, M. De Pascale, M. Del Corso, R. Sepulveres, D. Liguoro, R. Valentino, F. Beguinot, P. Formisano, G. Sammartino, Growth-promoting action and growth factor release by different platelet derivatives, *Platelets* 25(4) (2014) 252-6.
- [24] D.M. Dohan, J. Choukroun, A. Diss, S.L. Dohan, A.J. Dohan, J. Mouhyi, B. Gogly, Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part III: leucocyte activation: a new feature for platelet concentrates?, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 101(3) (2006) e51-5.
- [25] D.M. Dohan, J. Choukroun, A. Diss, S.L. Dohan, A.J. Dohan, J. Mouhyi, B. Gogly, Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part II: platelet-related biologic features, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 101(3) (2006) 10.
- [26] M.Y. Bai, C.W. Wang, J.Y. Wang, M.F. Lin, W.P. Chan, Three-dimensional structure and cytokine distribution of platelet-rich fibrin, *Clinics* 72(2) (2017) 116-124.
- [27] M. Wang, J. Li, J. Liu, X. Lin, W. Xu, [The comparison of platelet-rich fibrin and platelet-rich plasma in releasing of growth factors and their effects on the proliferation and differentiation of adipose tissue-derived stem cells in vitro], *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 30(6) (2012) 641-4.
- [28] Y. Tan, Q. Qi, C. Lu, X. Niu, Y. Bai, C. Jiang, Y. Wang, Y. Zhou, A. Lu, C. Xiao, Cytokine Imbalance as a Common Mechanism in Both Psoriasis and Rheumatoid Arthritis, *Mediators Inflamm* 2405291(10) (2017) 25.
- [29] L.M. Sedger, M.F. McDermott, TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants - past, present and future, *Cytokine Growth Factor Rev* 25(4) (2014) 453-72.
- [30] D.L. Rios, C. Lopez, M.E. Alvarez, I.J. Samudio, J.U. Carmona, Effects over time of two platelet gel supernatants on growth factor, cytokine and hyaluronan concentrations in normal synovial membrane explants challenged with lipopolysaccharide, *BMC Musculoskelet Disord* 16(153) (2015) 015-0605.
- [31] P.L. Minciullo, A. Catalano, G. Mandraffino, M. Casciaro, A. Crucitti, G. Maltese, N. Morabito, A. Lasco, S. Gangemi, G. Basile, Inflammaging and Anti-Inflammaging: The Role of Cytokines in Extreme Longevity, *Arch Immunol Ther Exp* 64(2) (2016) 111-26.
- [32] W.C. Gause, T.A. Wynn, J.E. Allen, Type 2 immunity and wound healing: evolutionary refinement of adaptive immunity by helminths, *Nat Rev Immunol*. 2013 Aug;13(8):607-14. doi: 10.1038/nri3476. Epub 2013 Jul 5.
- [33] G. Bamias, F. Cominelli, Role of type 2 immunity in intestinal inflammation, *Curr Opin Gastroenterol* 31(6) (2015) 471-6.

- [34] S.P. Eisenberg, R.J. Evans, W.P. Arend, E. Verderber, M.T. Brewer, C.H. Hannum, R.C. Thompson, Primary structure and functional expression from complementary DNA of a human interleukin-1 receptor antagonist, *Nature* 343(6256) (1990) 341-6.
- [35] J. Donovan, D. Abraham, J. Norman, Platelet-derived growth factor signaling in mesenchymal cells, *Front Biosci* 18 (2013) 106-19.
- [36] L. Shi, N. Dong, X. Fang, X. Wang, Regulatory mechanisms of TGF-beta1-induced fibrogenesis of human alveolar epithelial cells, *J Cell Mol Med* 20(11) (2016) 2183-2193.
- [37] P. Han, Q. Cui, S. Yang, H. Wang, P. Gao, Z. Li, Tumor necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta1 facilitate differentiation and proliferation of tendon-derived stem cells in vitro, *Biotechnol Lett* 2(10) (2017) 017-2296.
- [38] J.U. Carmona, D.L. Rios, C. Lopez, M.E. Alvarez, J.E. Perez, M.E. Bohorquez, In vitro effects of platelet-rich gel supernatants on histology and chondrocyte apoptosis scores, hyaluronan release and gene expression of equine cartilage explants challenged with lipopolysaccharide, *BMC Vet Res* 12(1) (2016) 016-0759.
- [39] A. Panday, M.E. Inda, P. Bagam, M.K. Sahoo, D. Osorio, S. Batra, Transcription Factor NF-kappaB: An Update on Intervention Strategies, *Arch Immunol Ther Exp* 64(6) (2016) 463-483.
- [40] D.L. Rios, C. Lopez, J.U. Carmona, Evaluation of the anti-inflammatory effects of two platelet-rich gel supernatants in an in vitro system of cartilage inflammation, *Cytokine* 76(2) (2015) 505-13.

## **5. Evaluaciones anexas**

### **5.1. Evaluación de 4 factores de crecimiento del exudado del coágulo de L-PRF en tubo Proteal®**

#### **5.1.1. Introducción**

El L-PRF es una fuente rica en citoquinas, glicoproteínas y diferentes factores de crecimiento (Dohan, 2006c; Dohan Ehrenfest, 2009c) que promueven la cicatrización de tejidos óseos y blandos ..

El objetivo de esta evaluación era medir las concentraciones de TGF  $\beta$ 1, IGF-I, VEGF y PDGF de los exudados de los coágulos de L-PRF obtenidos en un Tubo Proteal®

#### **5.1.2. Metodología**

##### **5.1.2.1 Localización**

Las diferentes evaluaciones se llevaron a cabo en la fundación hospital clínico veterinario de la Universidad Autónoma de Barcelona. Todas las etapas de este estudio se llevaron a cabo de acuerdo a los principios éticos de la experimentación con animales y los procedimientos realizados fueron aprobados por el comité de ética correspondiente.

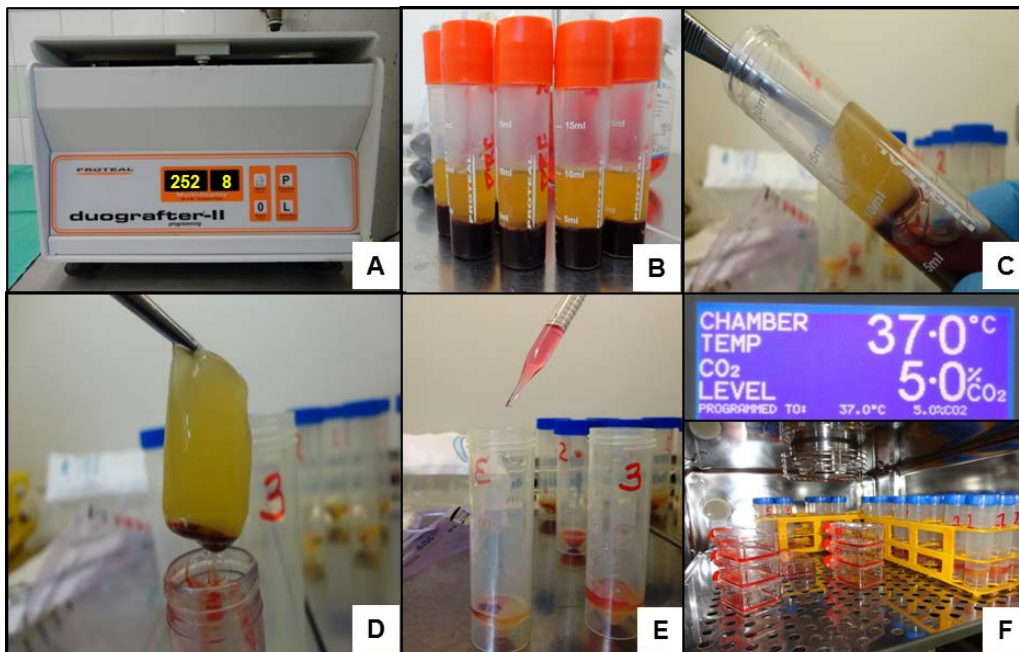
##### **5.1.2.2. Factores de inclusión de la muestra**

- 5 hembras de Pura Raza Española, entre 3 y 8 años de edad.
- Clínicamente sanas, determinado mediante examen físico y hemograma completo, utilizando un sistema de hematología de citometría de flujo (ADVIA 120 analyzer, Bayer Lab., NY, USA).
- Sin antecedentes de administración de anticoagulantes o algún otro medicamento que interfiera con la coagulación, por lo menos un mes antes de la toma de las muestras.
- Hembras no gestantes.

##### **5.1.2.3. Extracción y procesamiento de la sangre para la elaboración de los diferentes coágulos de L-PRF**

- Se preparó de un modo aséptico la piel del cuello del caballo.
- Se extrajeron 7 muestras de sangre de cada caballo de la vena yugular utilizando una jeringa de 20 ml y aguja de 18 G.
- Cada muestra de 10 ml de sangre se depositó en diferentes tubos Proteal® de 20 ml sin anticoagulante.

- Los tubos fueron centrifugados inmediatamente a 252 g durante 8 minutos a 22 °C (Figura 1A), y se dejaron reposar durante una hora a temperatura ambiente para favorecer la buena formación del coágulo (Figura 1B) (técnica modificada de Dohan, 2005).
- Trascurrida una hora se extrajeron los coágulos formados en la capa media de los tubos (Figura 1C y 1D).
- Después de extraer los coágulos de L-PRF de cada caballo, se depositaron en un tubo estéril libre de anticoagulante previamente identificado, al que se le adicionó 1 ml de medio DMEM (Gibco®, número de catalogo 41966-029) (Figura 1E), para ser incubados en una atmosfera con 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C (Figura 1F).
- Para determinar las concentraciones de los diferentes factores de crecimiento al día 0, los respectivos exudados de uno de los coágulos de L-PRF obtenidos de cada caballo, se depositaron en tubos eppendorf individuales, previamente identificados y se congelaron a -20 °C para su almacenamiento y posterior evaluación.
- En los diferentes días de incubación, se retiró uno de los recipientes que contenían los coágulos de L-PRF de la incubadora para extraer el volumen total del sobrenadante y se congelaron a -20 °C en tubos eppendorf para su almacenamiento y posterior evaluación. Este procedimiento se hizo aleatoriamente con todas las muestras de cada caballo, hasta retirar la última muestra de la incubadora el último día de incubación.





**Figura 1.** Elaboración del coágulo de L-PRF. (A) Centrifuga, (B) tubos en reposo, (C) extracción del coágulo de L-PRF, (D) coágulo de L-PRF, (E) adición de medio de cultivo, (F) incubación.

#### 5.1.2.4. Evaluación de los diferentes GF

Las concentraciones de los diferentes factores de crecimiento se evaluaron del exudado del coágulo del L-PRF y fueron determinadas por duplicado mediante un kit tipo sándwich colorimétrico de ELISA (R&D Systems) (Figura 2), específico para cada factor de crecimiento. Se siguieron todas las recomendaciones del fabricante:

- TGF- $\beta_1$  (Human TGF- $\beta_1$  DuoSet, DY240E / R&D Systems Europe Ltd, UK)
- IGF-1 (Human IGF-1 DuoSet, DY291 / R&D Systems Europe Ltd, UK)
- VEGF (Human VEGF DuoSet, DY293B / R&D Systems Europe Ltd, UK)
- PDGF-AB (Human PDGF-AB DuoSet, DY222 / R&D Systems Europe Ltd, UK)



**Figura 2.** Preparación y evaluación de los 4 factores de crecimiento (TGF- $\beta_1$ , IGF-1, VEGF y PDGF-AB).

Las pruebas para humanos fueron previamente validadas y estandarizadas para su uso en caballos en el servicio de producción de anticuerpos del instituto de biotecnología y biomedicina (IBB) de la UAB. Se ha demostrado que existe una gran homología entre estas proteínas en humanos y caballos (Carmona, 2007; Dohan, 2006a).

#### 5.1.2.5. Tiempo de incubación y retiro

Todas las muestras fueron incubadas por 15 días, retirando aleatoriamente 1 muestra por cada caballo en diferente día de incubación, para ser evaluada en el día: 0, 1, 2, 6, 9, 12 y 15.

### 5.1.3. Análisis Estadístico

Los datos obtenidos de las diferentes concentraciones de los factores de crecimiento fueron analizados para conocer su normalidad y correlaciones. Al presentar una distribución normal todos los datos fueron analizados mediante un modelado lineal general (GLM) multivariado empleando al tiempo como variable clasificatoria y las variables de respuesta TGF- $\beta$ 1 (pg/ml), IGF-1 (pg/ml) y VEGF (pg/ml). La prueba post hoc usada fue la de Sidak con un nivel del 95% de confianza ( $p$ -value < 0,05). Los resultados obtenidos de los diferentes factores de crecimiento se expresaron como media.

Todos los datos fueron analizados por un software comercial (SPSS Inc., Illinois, EE.UU.).

### 5.1.4. Resultados

De los 4 factores de crecimiento analizados solo se pudo determinar la concentración para TGF- $\beta$ 1, IGF-I y VEGF. La concentración para PDGF-AB, no se pudo determinar porque sus valores no fueron detectables para la curva estándar de medición.

El recuento para los factores de crecimiento TGF- $\beta$ 1, IGF-I y VEGF (media y desviación estándar) se muestran en la tabla 1, para los diferentes días de incubación. Después del análisis estadístico solo se encontró diferencia significativa para el IGF-I entre el día 2 de incubación con un valor medio de 268.9 pg/ml y el día 6 de incubación con un valor medio de 481.1 pg/ml con respecto al días 15 con un valor medio de 3876.4 pg/ml.

**Tabla 1.** Valores obtenidos al evaluar los diferentes factores de crecimiento elaborado en tubo Proteal® (n=5).

Día de incubación	TGF- $\beta$ 1 (pg/ml)		IGF-1 (pg/ml)		VEGF (pg/ml)	
	X	SD	X	SD	X	SD
0	1966	451.6	ND <sup>a</sup>	ND	99.1	65
1	1798.8	210.2	ND <sup>b</sup>	ND	ND	ND
2	1965.6	530.2	268.9 <sup>c-g</sup>	182.6	ND	ND
6	3712	1797	481.1 <sup>d-g</sup>	235.7	ND	ND
9	3444	821.2	1699.1 <sup>e</sup>	532.8	ND	ND
12	3474.4	895	2547.8 <sup>f</sup>	1544.4	ND	ND
15	3569.6	1035	3876.4 <sup>g</sup>	3481.1	ND	ND

Valores con diferentes superíndices en la misma columna, indican diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre los distintos días de incubación.

X: media, SD: desviación estándar, ND: no detectado.

#### **5.1.5. Conclusion**

Se encontró que el coágulo de L-PRF liberó concentraciones de TGF- $\beta$ 1 e IGF-1 de una manera gradual, controlada y constante hasta alcanzar las concentraciones máximas en la segunda semana de evaluación.

## **5.2. Evaluación de TGF- $\beta$ 1 del exudado del coágulo de L-PRF elaborado en tubo Falcón™ (cilindro de L-PRF)**

### **5.2.1. Introducción**

Análisis histológicos del coágulo de PRF han demostrado que las plaquetas y las células antiinflamatorias se acumulan en la parte proximal del coágulo (Choukround, 2017), por este motivo es que se busca crear un coágulo de L-PRF con una mayor área de superficie celular para la aplicación en la medicina equina.

### **5.2.2. Metodología**

#### **5.2.2.1 Localización**

Las diferentes evaluaciones se llevaron a cabo en la fundación hospitales clínico veterinario de la Universidad Autónoma de Barcelona. Todas las etapas de este estudio se llevaron a cabo de acuerdo a los principios éticos de la experimentación con animales y los procedimientos realizados fueron aprobados por el comité de ética correspondiente.

#### **5.2.2.2. Factores de inclusión de la muestra**

- 5 hembras de la raza Pretona, entre los 4 y 9 años de edad.
- Clínicamente sanas, determinado mediante examen físico y hemograma completo, utilizando un sistema de hematología de citometría de flujo (ADVIA 120 analyzer, Bayer Lab., NY, USA).
- Sin antecedentes de administración de anticoagulantes o algún otro medicamento que interfiera con la coagulación, por lo menos un mes antes de la toma de las muestras.
- Hembras no gestantes.

#### **5.2.2.3. Extracción y procesamiento de la sangre para la elaboración de los diferentes coágulos de L-PRF**

- Se preparó de un modo aséptico la piel del cuello del caballo.
- Se extrajeron 7 muestras de sangre de cada caballo de la vena yugular utilizando una jeringa de 20 ml y aguja de 18 G.
- Cada muestra de 10 ml de sangre se depositó en diferentes tubos Falcón™ de 50 ml sin anticoagulante.

- Los tubos fueron centrifugados inmediatamente a 252 g durante 8 minutos a 22 °C, y se dejaron reposar durante una hora a temperatura ambiente para favorecer la buena formación del coágulo (técnica modificada de Dohan, 2005).
- Trascurrida una hora se extrajeron los coágulos formados en la capa media de los tubos.
- Después de extraer los coágulos de L-PRF de cada caballo, se depositaron en un tubo estéril libre de anticoagulante previamente identificado, al que se le adicionó 1 ml de medio DMEM (Gibco®, número de catalogo 41966-029), para ser incubados en una atmosfera con 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C.
- Para determinar las concentraciones de TGF-β<sub>1</sub> al día 0, el respectivo exudado de uno de los coágulos de L-PRF obtenido de cada caballo, se depositaron en tubos eppendorf individuales, previamente identificados y se congelaron a -20 °C para su almacenamiento y posterior evaluación.
- Todas las muestras fueron incubadas por 18 días, retirando aleatoriamente uno de los recipientes el día 0, 1, 4, 8, 11, 14 y 18. Se les extrajo el volumen total del sobrenadante y se congelaron a -20 °C en tubos eppendorf para su almacenamiento y posterior evaluación. Este procedimiento se hizo aleatoriamente con todas las muestras de cada caballo.

#### **5.2.2.4. Evaluación del TGF-β<sub>1</sub>**

Las concentraciones del TGF-β<sub>1</sub> se evaluaron del exudado del coágulo del L-PRF y fueron determinadas por duplicado mediante un kit tipo sándwich colorimétrico de ELISA (R&D Systems), específico para esta factor de crecimiento. Se siguieron todas las recomendaciones del fabricante:

- TGF-β<sub>1</sub> (Human TGF-β1 DuoSet, DY240E / R&D Systems Europe Ltd, UK).

La prueba fue previamente validada y estandarizada para su uso en caballos en el servicio de producción de anticuerpos del instituto de biotecnología y biomedicina (IBB) de la UAB. Se ha demostrado que existe una gran homología entre estas proteínas en humanos y caballos (Carmona, 2007; Dohan, 2006a).

#### **5.2.3. Evaluación histológica**

Las muestras de los 5 cilindros de L-PRF obtenidas el día 0, se fijaron en formalina al 10% durante 48 horas. A continuación, se cortaron secciones longitudinales de 2 mm de espesor, las cuales se deshidrataron en gradientes crecientes de alcohol (70%, 95% y 100%). Luego las muestras se pusieron en azul tolueno antes de la inclusión en

parafina y se procedió a cortarlas en 10 series sucesivas de 4 micras, para ser teñidas con hematoxilina-eosina (H & E) y posterior observación bajo microscopio de luz.

#### 5.2.4. Análisis Estadístico

Las media de los datos obtenidos de las diferentes concentraciones de TGF- $\beta$ 1 (pg/ml) fueron analizados para conocer su normalidad. Al presentar una distribución normal todos los datos fueron analizados mediante ANOVA de una vía y la prueba post hoc de Tukey se utilizó para confirmar diferencias estadísticamente significativas entre los grupos con los valores de p-value < 0,05.

Todos los datos fueron analizados por un software comercial (SPSS Inc., Illinois, EE.UU.).

#### 5.2.5. Resultados

El recuento para TGF- $\beta$ 1 (media y desviación estándar) se muestran en la tabla 1, para los diferentes días de incubación.

Después del análisis estadístico se encontró diferencia significativa para el TGF- $\beta$ 1 entre el día 0 de incubación con un valor medio de 2832.1 pg/ml con respecto a los días 4, 8, 11, 14 y 18 de evaluación.

**Tabla 1.** Valores obtenidos al evaluar TGF- $\beta$ 1 elaborado en tubo Falcón™ (n=5).

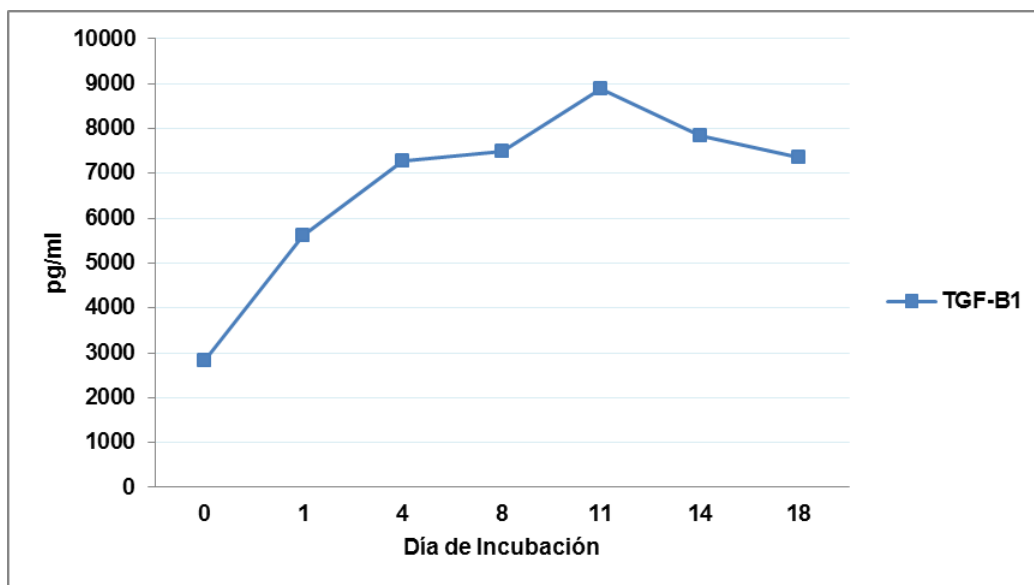
Día de Incubación	TGF- $\beta$ 1 (pg/ml)	
	X	SD
0	2832.1 <sup>a</sup>	1447.9
1	5602.6 <sup>b</sup>	1525.5
4	7285.2 <sup>c-a</sup>	1396.1
8	7485.8 <sup>d-a</sup>	1815.5
11	8895.6 <sup>e-a</sup>	2457.2
14	7841.9 <sup>f-a</sup>	2104.9
18	7359.2 <sup>g-a</sup>	1001.4

Valores con diferentes superíndices en la misma columna, indican diferencia significativa (p < 0,05) entre los distintos días de incubación.

X: media, SD: desviación estándar.

En la figura 1, se puede ver como la concentración de TGF- $\beta$ 1 mostró un incremento progresivo durante todo el tiempo de evaluación y a partir del día 4 supera el 157% de los valores obtenidos al día 0 hasta llegar a la máxima expresión al día 11 de

incubación con un valor de 214% superior al día inicial, para empezar a disminuir y estabilizarse entre los días 14 y 18 manteniendo una concentración superior al 159% de la basal.

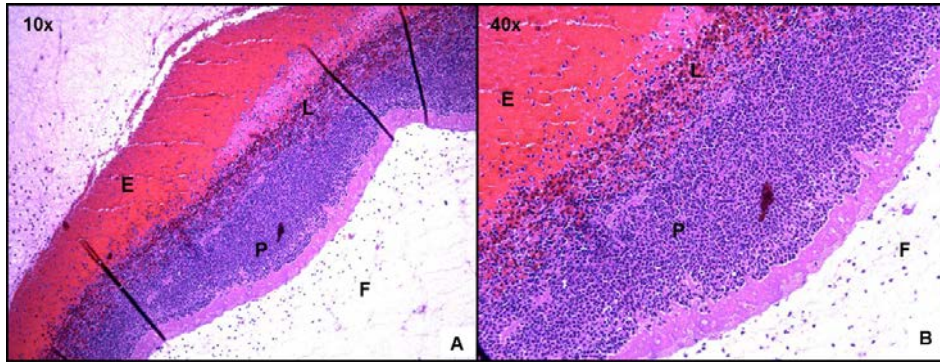


**Figura 1.** Grafica de la concentración de TGF-β1 en picogramos por mililitro, durante los 18 días de incubación.

En la elaboración de los diferentes cilindros de L-PRF, se encontró con el inconveniente que no todos los coágulos se formaban en el tiempo estipulado como máximo (1 hora) para permitir la buena formación del coágulo. Se debe destacar que los tubos Falcón™ utilizados para este propósito venían desprovistos de algún agente que favoreciera la coagulación, el caso contrario de los tubos Vacutainer®, tapa roja utilizados convencionalmente para las diferentes evaluaciones hematológicas.

#### **5.2.5.1. Evaluación histológica**

Los resultados encontrados en la histología del cPRF, se muestra una similitud de la distribución de las diferentes células que lo componen, con la evaluación previa del coágulo de L-PRF, en la que se observa claramente como está compuesto por una zona de eritrocitos, una zona de transición de los leucocitos, eritrocitos y plaquetas, una zona de leucocitos, una zona de plaquetas y una zona de fibrina (Figura 2A y 2B). Los eritrocitos se tiñeron de rosa oscuro, las plaquetas y agregados de plaquetas se tiñeron de púrpura con unos gránulos más densos en su interior y los leucocitos se tiñeron también de color púrpura, los cuales se pudieron diferenciar fácilmente por su forma particular. La red de fibrina se distingue claramente con ausencia de color y una escasa presencia de células.



**Figura 2.** Histología del cilindro de L-PRF. (A) División del cilindro de L-PRF a 10x, (B) cilindro de L-PRF a x40.

P: plaquetas; E: eritrocitos; F: fibrina; L: leucocitos

### 5.2.6. Conclusión

El cilindro de L-PRF presenta un comportamiento celular y una estructura histológica muy similar a los coágulos de L-PRF, al igual que las concentraciones de TGF- $\beta$ 1, pero con valores máximos en un periodo inferior a dos semanas.

## 5.3. Comparación del factor de crecimiento TGF- $\beta$ 1 obtenido del exudado del coágulo y la membrana de L-PRF de dos protocolos de producción diferentes

### 5.3.1. Introducción

Las membranas de L-PRF tienen fuertes efectos sobre la proliferación de la mayoría de las celulares (fibroblastos, queratinocitos, pre-adipocitos, osteoblastos, huesos y en la diferenciación de las células mesenquimales) (Dohan Ehrenfest, 2009c). Es importante recalcar que en la producción de la membrana de L-PRF es necesario comprimir el coágulo, sin embargo esta compresión puede dañar las plaquetas y liberar cantidades significativas de factores de crecimiento valiosos (Kobayashi, 2012). En apoyo de esta posibilidad, se ha demostrado que cantidades sustanciales de los factores de crecimiento, que se cree que están involucrados en la regeneración de los tejidos, son efectivamente eliminados por compresión (Su, 2009). Por lo tanto, el proceso de comprimir el coágulo podría influir en la calidad y la eficacia clínica de las preparaciones del PRF como material de injerto (Kobayashi, 2012).

En esta investigación sólo se evaluó el factor de crecimiento transformante beta-1 (TGF- $\beta$ 1), ya que es considerado el inductor más potente de la síntesis de colágeno de todas las citoquinas (Sutter, 2004) y la isoforma más producida masivamente



(Arévalo, 2007), lo que justifica su uso como centinela para documentar la concentración aumentada de otros GF (Sutter, 2004; Zimmermann, 2001).

Recientemente algunas investigaciones han formulado un nuevo protocolo para la producción de PRF en el que la velocidad de centrifugado se ha disminuido y se ha demostrado un aumento en el número de plaquetas (Kobayashi, 2016) y de leucocitos especialmente de neutrófilos (Choukround, 2017). Estos resultados sugieren que la masa, el tamaño y la densidad de los leucocitos y las plaquetas requieren una baja velocidad de centrifugado, lo suficiente para separarlos del resto de componentes sanguíneos, sin causar agregación al fondo del tubo (Choukround, 2017). Por lo que se hace necesario encontrar un protocolo adecuado para la aplicación de este producto en la medicina de caballos.

### **5.3.2. Metodología**

#### **5.3.2.1 Localización**

Las diferentes evaluaciones se llevaron a cabo en la fundación hospitales clínico veterinario de la Universidad Autónoma de Barcelona. Todas las etapas de este estudio se llevaron a cabo de acuerdo a los principios éticos de la experimentación con animales y los procedimientos realizados fueron aprobados por el comité de ética correspondiente.

#### **5.3.2.2. Factores de inclusión de la muestra**

- 4 hembras de la raza Pretona, entre los 4 y 9 años de edad.
- Clínicamente sanas, determinado mediante examen físico y hemograma completo, utilizando un sistema de hematología de citometría de flujo (ADVIA 120 analyzer, Bayer Lab., NY, USA).
- Sin antecedentes de administración de anticoagulantes o algún otro medicamento que interfiera con la coagulación, por lo menos un mes antes de la toma de las muestras.
- Hembras no gestantes.

#### **5.3.2.3. Extracción y procesamiento de la sangre para la elaboración de los diferentes coágulos y membranas de L-PRF**

- Se preparó de un modo aséptico la piel del cuello del caballo.

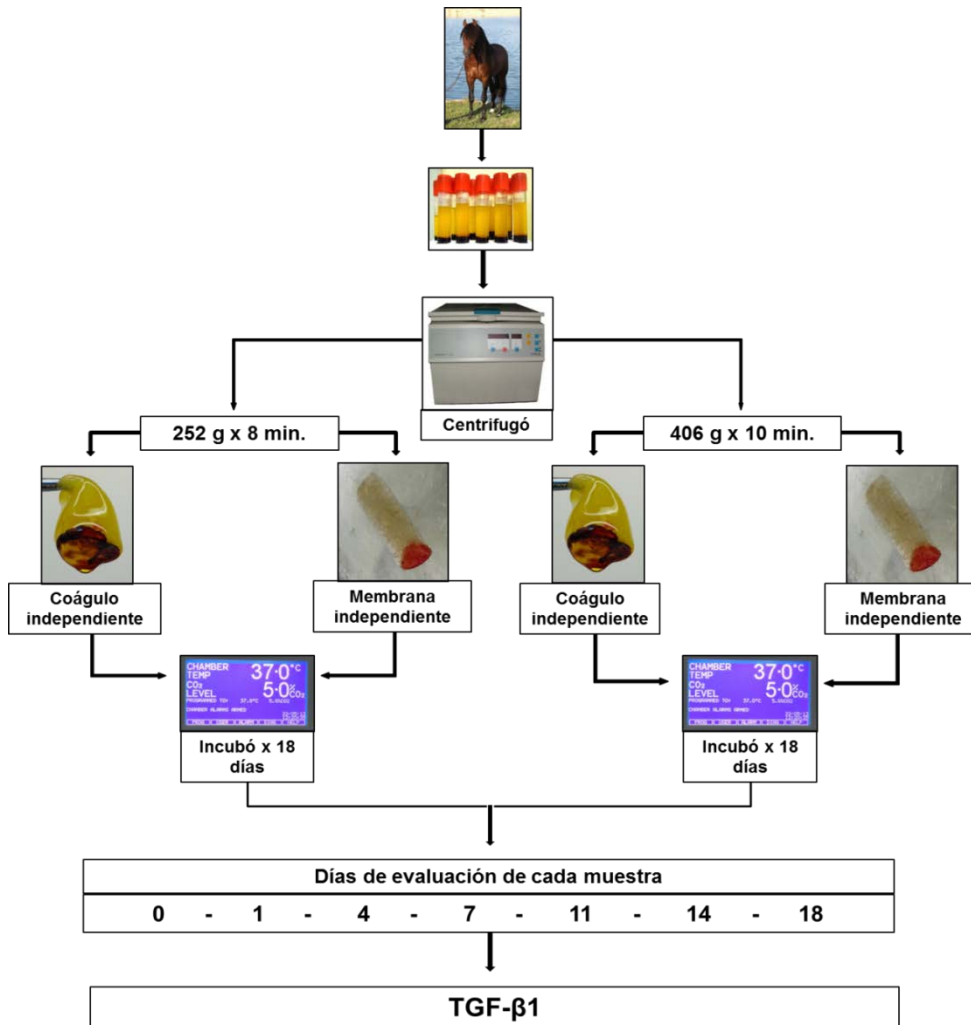
- Se extrajeron 28 muestras de sangre en cada caballo de la vena yugular utilizando una aguja Vacutainer® 21G.
- Cada muestra de 9 ml de sangre se depositó en diferentes tubos Vacutainer® de 10 ml sin anticoagulante.
- Las 28 muestras de cada caballo se dividieron por mitad para realizar 2 procedimientos diferentes como se observa en la Figura 23 (obteniendo 4 grupos):

**Procedimiento 1** (técnica modificada de Dohan, 2005):

- Grupo 1: 7 muestras para ser centrifugadas a 252g durante 8 minutos para evaluar el TGF-β1 del coágulo de cada caballo (7 muestras x 4 caballos = 28).
- Grupo 2: 7 muestras para ser centrifugadas a 252g durante 8 minutos para evaluar el TGF-β1 de la membrana de cada caballo (7 muestras x 4 caballos = 28).

**Procedimiento 2** (Dohan, 2005):

- Grupo 3: 7 muestras para ser centrifugadas a 406g durante 10 minutos para evaluar el TGF-β1 del coágulo de cada caballo (7 muestras x 4 caballos = 28).
- Grupo 4: 7 muestras para ser centrifugadas a 406g durante 10 minutos para evaluar el TGF-β1 de la membrana de cada caballo (7 muestras x 4 caballos = 28).



**Figura 1.** Esquema de procesamiento de los coágulos y membranas, para la evaluación del factor de crecimiento TGF-β1.

- Trascorrida una hora se extrajeron los coágulos formados en la capa media de los tubos.
- Para la elaboración de las membranas de L-PRF se siguieron los pasos anteriores hasta obtener el coágulo, luego se comprimió sutilmente durante 10 segundos para formar la membrana de L-PRF (Kobayashi, 2012).
- Después de extraer los coágulos y producir las membranas de L-PRF de cada caballo, se depositaron en un tubo estéril libre de anticoagulante previamente identificado, al que se le adicionó 1 ml de medio DMEM (Gibco®, número de catalogo 41966-029), para ser incubados en una atmosfera con 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C.
- Para determinar las concentraciones de TGF-β<sub>1</sub> al día 0, el respectivo exudado de uno de los coágulos y membranas de L-PRF de cada, se depositaron en tubos

ependorf individuales, previamente identificados y se congelaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  para su almacenamiento y posterior evaluación.

- Las 112 muestras fueron incubadas por 18 días, retirando aleatoriamente una muestra de cada caballo el día 0, 1, 4, 7, 11, 14 y 18 de incubación. Se les extrajo el volumen total del sobrenadante y se congelaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  en tubos eppendorf para su almacenamiento y posterior evaluación. Este procedimiento se hizo aleatoriamente con todas las muestras de cada caballo, hasta retirar la última muestra de la incubadora el último día de incubación.

Todo el proceso de preparación y extracción de los coágulos y membranas de L-PRF se realizó bajo una cámara de flujo laminar para evitar posible contaminación.

#### **5.3.2.4. Evaluación del TGF- $\beta_1$**

Las concentraciones del TGF- $\beta_1$  se evaluaron del exudado del coágulo del L-PRF y fueron determinadas por duplicado mediante un kit tipo sándwich colorimétrico de ELISA (R&D Systems), específico para esta factor de crecimiento. Se siguieron todas las recomendaciones del fabricante:

- TGF- $\beta_1$  (Human TGF- $\beta_1$  DuoSet, DY240E / R&D Systems Europe Ltd, UK).

La prueba fue previamente validada y estandarizada para su uso en caballos en el servicio de producción de anticuerpos del instituto de biotecnología y biomedicina (IBB) de la UAB. Se ha demostrado que existe una gran homología entre estas proteínas en humanos y caballos (Carmona, 2007; Dohan, 2006a).

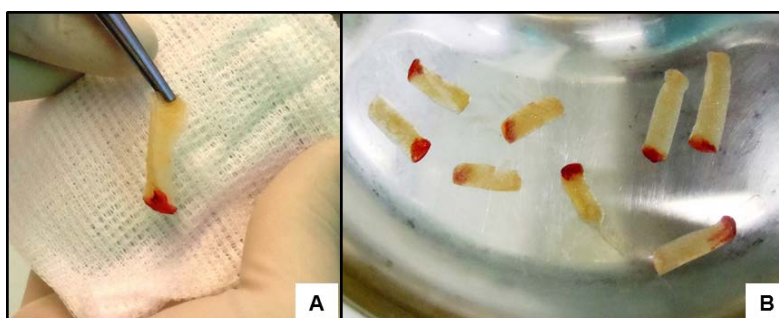
#### **5.3.3. Análisis Estadístico**

Los datos obtenidos de las diferentes concentraciones del TGF- $\beta_1$  expresado como media fueron analizados para conocer su normalidad mediante el test de Shapiro-Wilk. Al presentar una distribución normal todos los datos fueron analizados mediante un diseño completamente al azar en esquema factorial triple, para relacionar los 2 procedimientos (2 procedimientos x 2 grupos x 7 días). ANOVA de una vía y la prueba post hoc de Tukey se utilizó para confirmar diferencias estadísticamente significativas entre los grupos con los valores de p-value  $< 0,05$ .

Todos los datos fueron analizados utilizando un el software R (Development Core Team, 2011).

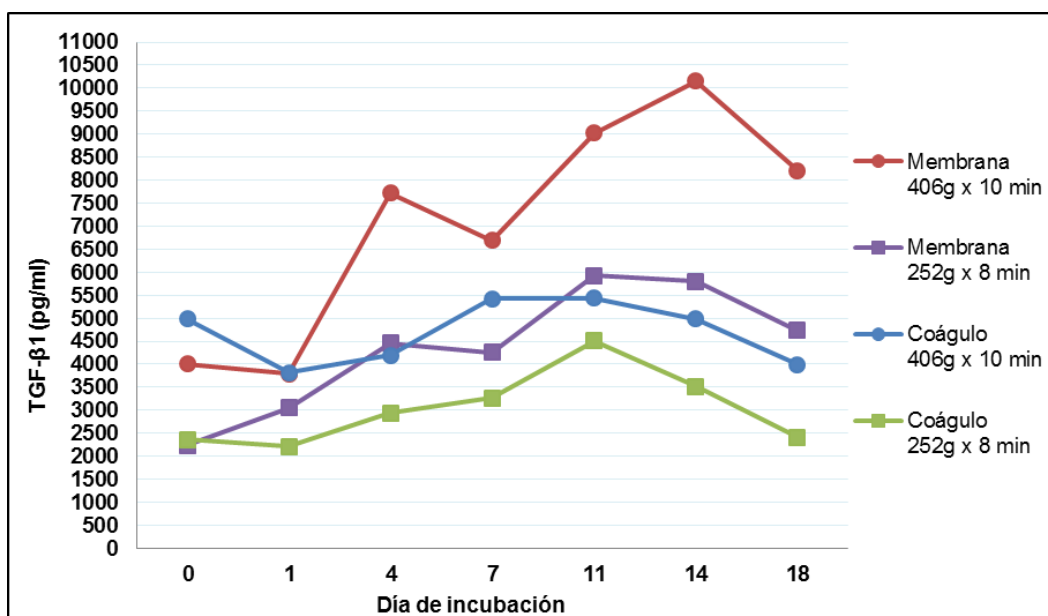
### 5.3.4. Resultados

En la figura 2, se puede observar el grupo de membranas utilizadas para la evaluación.



**Figura 2.** Membranas de L-PRF.

La figura 3, muestra el comportamiento de las diferentes concentraciones de TGF- $\beta$ 1 en pg/ml de los 4 grupos experimentales, durante los 18 días de incubación en sus diferentes días de evaluaciones.



**Figura 3.** Comparación de la concentración de TGF- $\beta$ 1 en picogramos por mililitro, durante 18 días de incubación en dos protocolos diferentes de preparación del coágulo y membrana de L-PRF (n=4).

Después de realizar el análisis estadístico se obtuvo que no había diferencia significativa entre la interacción del TGF- $\beta$ 1 en los diferentes días de incubación entre los factores de un mismo grupo e igual proceso de centrifugación. Aunque, al comparar los diferentes grupos, si se encontró diferencia significativa para el grupo 4 en el día 14 de incubación, con respecto a los otros 3 grupos de evaluación, con un

valor medio de 10154.4 pg/ml con respecto a la concentración de los otros grupos de evaluación al día 0 y 1 de incubación ( $p < 0,05$ ).

### **5.3.5. Conclusion**

Se encontró que la variación entre las dos aceleraciones y la duración de centrifugado evaluados, no influyeron de una manera significativa en la concentración y liberación controlada de TGF- $\beta$ 1 en el tiempo, aunque sí existe una diferencia significativa entre membrana y coágulo en los dos protocolos evaluados. De igual manera se comprobó que existe una alta variabilidad individual en la concentración de TGF- $\beta$ 1, inclusive, cuando se utiliza el mismo protocolo de producción de L-PRF.

## **5.4. Evaluación piloto del cilindro de L-PRF (cPRF) como andamio para la proliferación de células troncales mesenquimales**

### **5.4.1. Introducción**

Históricamente los concentrados plaquetarios (CP) y los compuestos de fibrina se han utilizado en la clínica humana y animal, en diferentes áreas como la cirugía plástica, ortopédica, reparación de lesiones de tendón y ligamentos, odontología, hemostasis y como fuente de factores de crecimiento (FC) y de fibrina (He, 2009; Dohan Ehrenfest, 2009a). La fibrina es un biopolímero responsable de la formación de coágulos de la sangre y ha demostrado ser adecuado para las aplicaciones de la ingeniería de tejidos (Gassling, 2013), ya que puede influenciar la biología celular y servir como receptáculo para los factores de crecimiento (Ho, 2006).

Varios autores que han realizado investigaciones *in vitro* en sangre de humanos han observado que el PRF es un producto que podría traer beneficios al tejido óseo al estimular su regeneración (Kang, 2011 Dohan Ehrenfest, 2010b), a diferencia de otros concentrados plaquetarios.

El PRF al ser biocompatible, poroso, reabsorbible (Yang, 2012) ha generado gran interés, como posible andamio para la proliferación y diferenciación de células mesenquimales (Kang, 2011). A diferencia de los geles y pegamentos de fibrina utilizados tradicionalmente, el PRF es un biomaterial que posee una arquitectura tridimensional formando una densa matriz de fibrina (Dohan Ehrenfest, 2010a) que en asociación con las células que la componen estimulan su entorno (Visser, 2010), aumentando la regeneración y reparación de lesiones músculo esqueléticas (Dohan, 2006b).

El material ideal para el soporte de las células tiene que imitar las condiciones fisiológicas para que las células puedan migrar, proliferar y diferenciarse; este material idóneo de soporte todavía no se ha encontrado (Fröhlich, 2008).

### **5.4.2. Localización**

Las diferentes evaluaciones se llevaron a cabo en las dependencias del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Zaragoza (HCV-UZ). Todas las etapas de este estudio se llevaron a cabo de acuerdo a la normativa sobre bienestar animal de la Universidad de Zaragoza y el permiso expreso del propietario.

Protocolo aprobado por el comité de ética de la U. de Zaragoza con el número PI 36/07.

### 5.4.3. Factores de inclusión de la muestra para la elaboración del cPRF

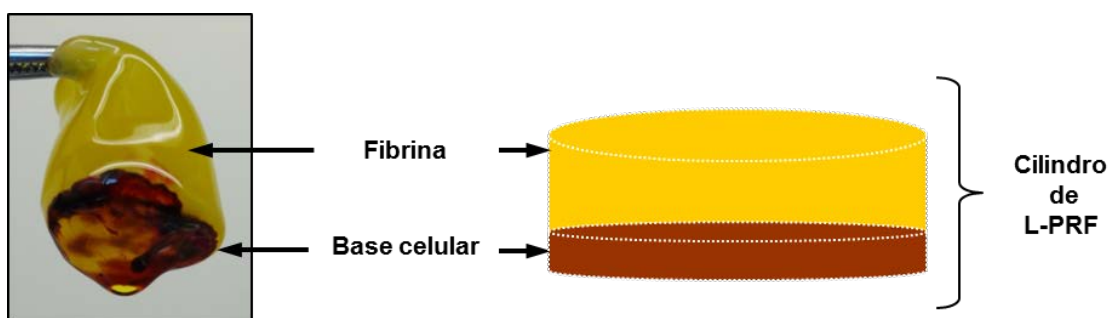
- 2 machos castrados y 1 hembra Pura Raza Española, entre los 5 y 8 años de edad.
- Clínicamente sanas, determinado mediante examen físico y hemograma completo, utilizando un sistema de hematología de citometría de flujo (ADVIA 120 analyzer, Bayer Lab., NY, USA).
- Sin antecedentes de administración de anticoagulantes o algún otro medicamento que interfiera con la coagulación, por lo menos un mes antes de la toma de las muestras.
- Hembra no gestante.

### 5.4.4. Metodología

#### 5.4.4.1. Extracción y procesamiento de la sangre para la elaboración de los diferentes cPRF

- Se preparó de un modo aséptico la piel del cuello del caballo.
- Se extrajeron 32 muestras de sangre de cada caballo de la vena yugular utilizando una jeringa de 20 ml y aguja de 18 G.
- Cada muestra de 10 ml de sangre se depositó en diferentes tubos Falcón™ de 50 ml sin anticoagulante.
- Los tubos fueron centrifugados inmediatamente a 252 g durante 8 minutos a 22 °C, y se dejaron reposar durante una hora a temperatura ambiente para favorecer la buena formación del coágulo (técnica modificada de Dohan, 2005).
- Trascorrida una hora se extrajeron los coágulos formados en la capa media de los tubos.

Los coágulos de L-PRF obtenidos se denominaron cilindros de L-PRF (cPRF) (Figura 1).



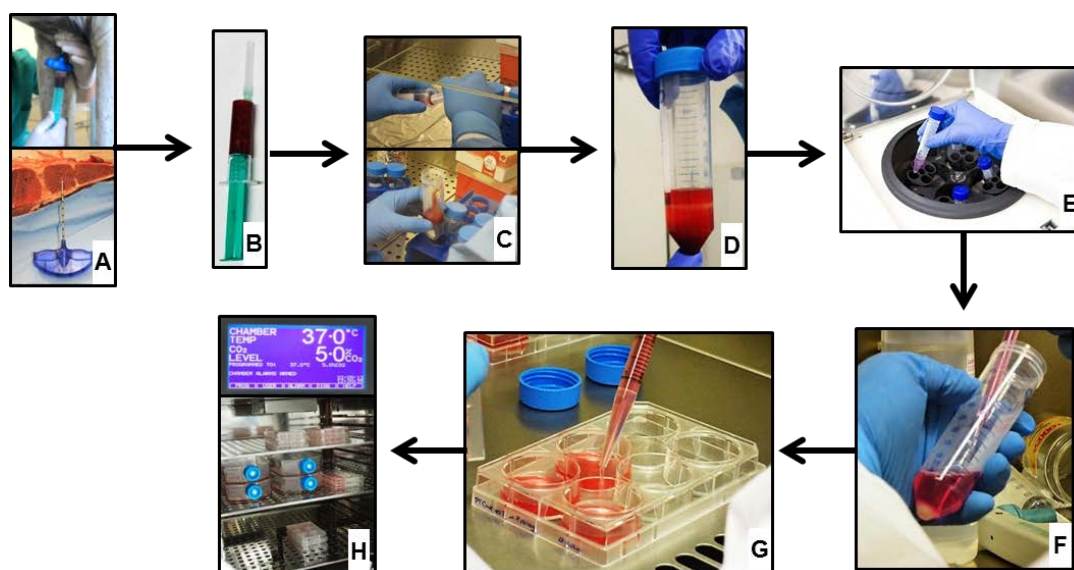
**Figura 1.** Cilindro de L-PRF (cPRF).



#### 6.4.4.2. Extracción y aislamiento de células troncales mesenquimales

Para la obtención de las MSC equinas se tomaron muestras de médula ósea del esternón de 1 hembra de las dependencias del HCV-UZ.

Previa preparación aséptica de la zona y sedación del caballo, se tomarán 20 ml de aspirado de médula ósea con aguja Jameshi® 11G de 4 pulgadas (No. Catálogo TJC4011) con heparina (Figura 2A y 2B) y se colocarán cuidadosamente en 40 ml de Ficoll (Figura 2C). A continuación el contenido se centrifugo a 400 g durante 30 minutos hasta conseguir separar una capa intermedia entre el plasma y los residuos eritrocitarios (Figura 2D). Se recogió dicha capa y el lavado de la misma mediante adición de PBS, posteriormente se centrifugo la muestra a 700 g durante 10 minutos para eliminar la heparina y el ficoll (Figura 2E), se elimino el sobrenadante y se resuspendió el pellet de células en DMEM bajo en glucosa (Sigma-Aldrich) suplementado con 1% de L-glutamina (Sigma-Aldrich), 1% de penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich) y 10% de suero fetal bovino (Gibco) (Figura 2F); luego se procedió a filtrar el cultivo, centrifugo nuevamente y se volvió a resuspender en un medio similar.



**Figura 2.** Extracción y aislamiento de células troncales mesenquimales a partir de médula ósea. (A) Extracción del esternón, (B) aspirado de medula ósea, (C) aspirado en Ficoll, (D) separación celular, (E) centrifugación para eliminación de heparina, (F) Pellet de células con adición de medio, (G) siembra células mononucleadas, (H) incubación.

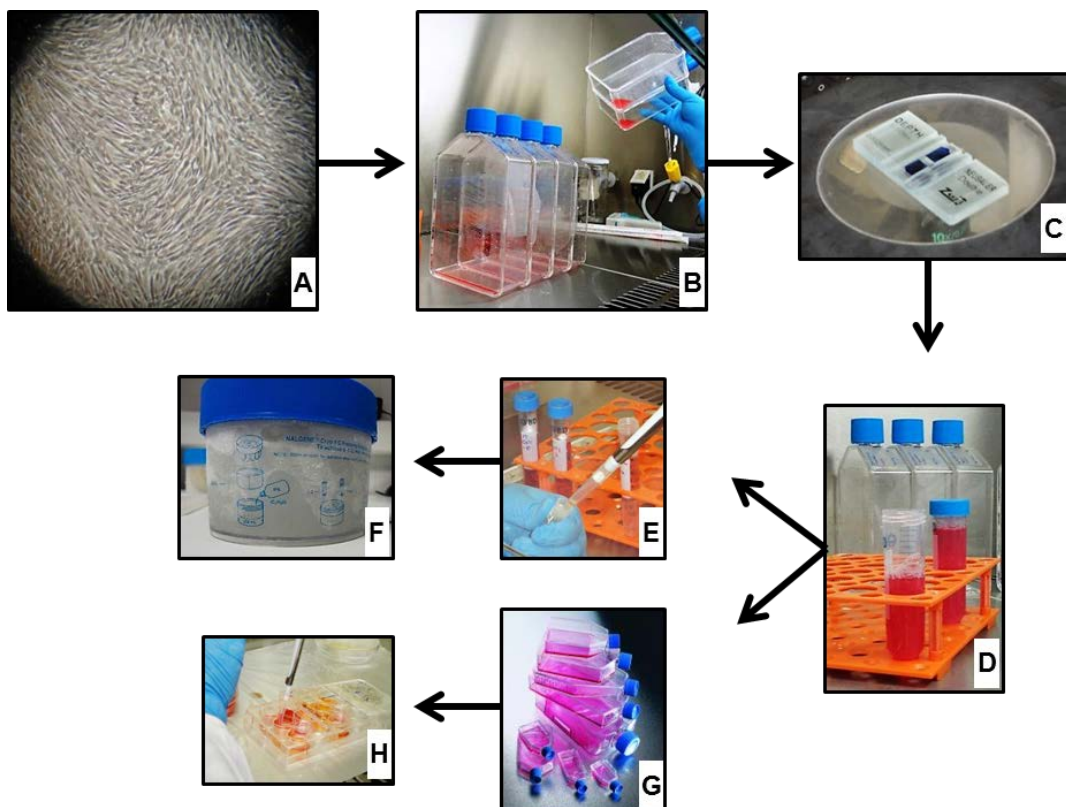
#### 5.4.4.3. Cultivo y expansión de células mesenquimales

Las células mononucleadas fueron lavadas con PBS y sembradas a una densidad de  $2 \times 10^6$  células/cm<sup>2</sup> (Figura 2G).

A las 24, 48 y 72 horas, las células se lavaron con PBS y el medio se cambió para eliminar las células no adherentes. Las MSC se mantuvieron en condiciones de 37 ° C y 5% de CO<sub>2</sub> (Figura 2H).

Las MSC cultivadas se les cambió el medio cada 3 días hasta alcanzar el 80% de confluencia (Figura 3A). Posteriormente, las células se separaron de la superficie de la placa de cultivo por tratamiento con 0,25% tripsina/EDTA (Sigma-Aldrich) (Figura 3B) y se contaron después de la tripsinización, usando una celda de Malassez según la técnica de azul de tripano (Figura 3C). En este punto, una fracción de células fue resembrada a una densidad de 5.000 MSC/cm<sup>2</sup> (Figura 3G y 3H), que constituyó un nuevo pase, y el resto de las células fueron criopreservadas en un criobox (Figura 3E y 3F) y se almacenaron en nitrógeno líquido, para posteriores evaluaciones. El medio de congelación en el que las células fueron resuspendidas estaba formado por un 90% de suero fetal bovino y 10% de dimetilsulfóxido (DMSO).

La metodología descrita anteriormente se repitió hasta alcanzar el 4 pase para cada uno de los animales empleados.

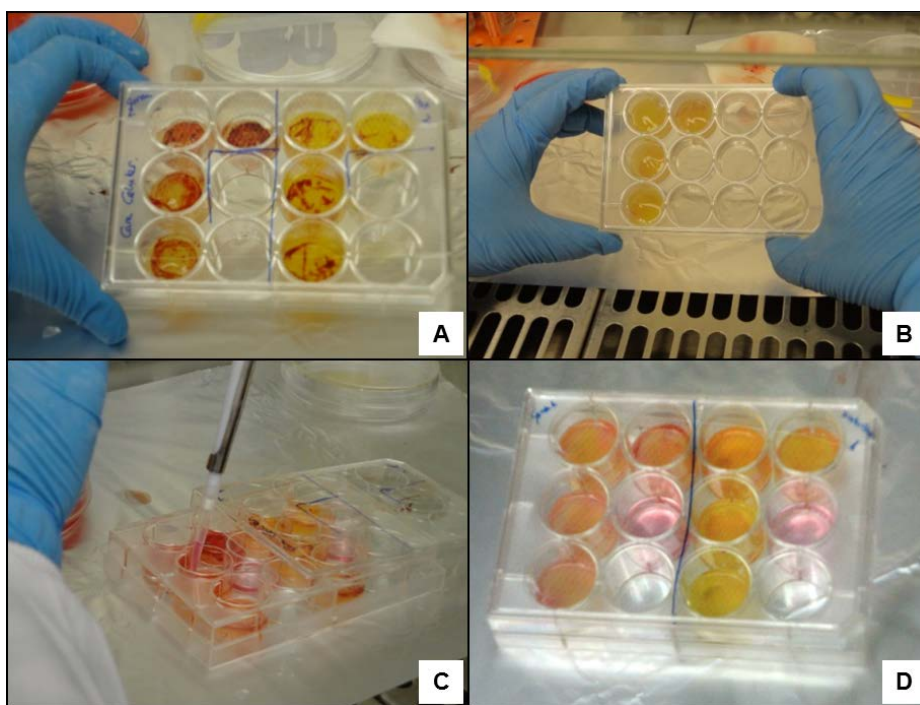


**Figura 3.** Cultivo y expansión de células mesenquimales. (A) Imagen 80% confluencia, (B) separación de las células de placa de cultivo, (C) celda de Malassez, (D) medio con contenido MSC, (E y F) congelación de células (G y H) siembra de células.

#### 5.4.4.4. Cultivos de las células troncales mesenquimales en los cilindros de L-PRF

Los cPRF obtenidos de los diferentes caballos fueron cultivados con las MSC en una placa de 12 pocillos de 3,8 mm. Las MSC fueron sembradas en una cantidad de 20.000 cel./cm<sup>2</sup>, para un total de 80.000 células por cada pocillo (Figura 4C).

Los cultivos se realizaron con células autólogas y alogénicas para cada caballo utilizado. Las MSC fueron sembradas independientemente sobre la base celular (Figura 3A) y sobre la base de fibrina (Figura 3B) del cilindro de L-PRF, para obtener un total de 4 grupos experimentales:



**Figura 4.** Cultivo de las MSC en el cilindro de L-PRF. (A) Cilindro de L-PRF por su base celular por duplicado, (B) cilindro de L-PRF por su base de fibrina, (C) siembra de las MSC, (D) placa con todas las muestras y grupos control.

#### Células autólogas:

- Cultivo de MSC en el cilindro de L-PRF por la base celular.
- Cultivo de MSC en el cilindro de L-PRF por la base de fibrina.

#### Células Alogénicas:

- Cultivo de MSC en el cilindro de L-PRF por la base celular.

- Cultivo de MSC en el cilindro de L-PRF por la base de fibrina.

Como control se sembraron las MSC solas en un pocillo de la placa de cultivo y de igual manera se depositó un cilindro de L-PRF en un pocillo sin ninguna adhesión de MSC por cada grupo experimental y por cada día de evaluación (Figura 4D).

Toda la evaluación se realizó por duplicado.

Todas las placas obtenidas de cada uno de los grupos fueron incubadas en una atmósfera con 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C, para ser evaluadas al día 4 y al día 8 de incubación.

#### **5.4.4.5. Evaluación de supervivencia y proliferación celular**

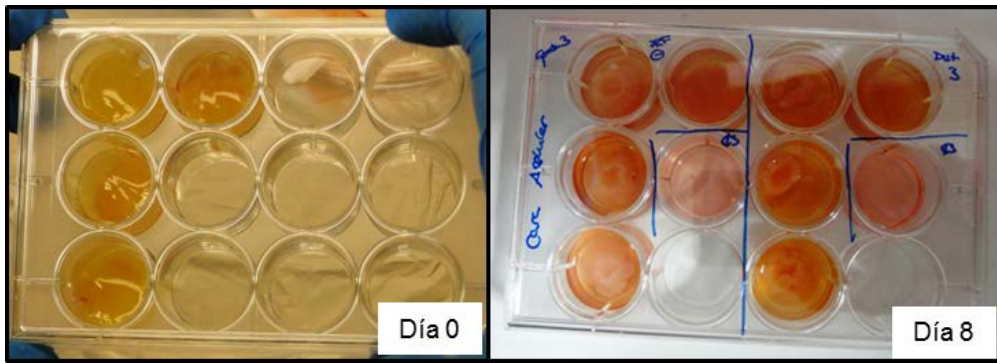
Para esta evaluación se realizó un ensayo de la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (MTT), a los 4 grupos experimentales al día 4 y día 8 de incubación.

Las muestras fueron lavadas 3 veces con PBS y se pasaron a una placa nueva, posteriormente se les añadió 1 ml de PBS al pocillo, 125 µl de la solución MTT 2 mg/ml (se pusieron tres pocillos sólo con medio de cultivo para utilizar como blanco) y se incubaron en una atmósfera con 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C durante 4 horas. Pasado este tiempo se extrajo el sobrenadante (el cual se guardó para posterior lectura), se le añadió 1 ml de DMSO y se incubó durante 30 minutos en agitación moderada. Finalmente se midió la absorbancia a 570 nm.

#### **5.4.5. Resultados**

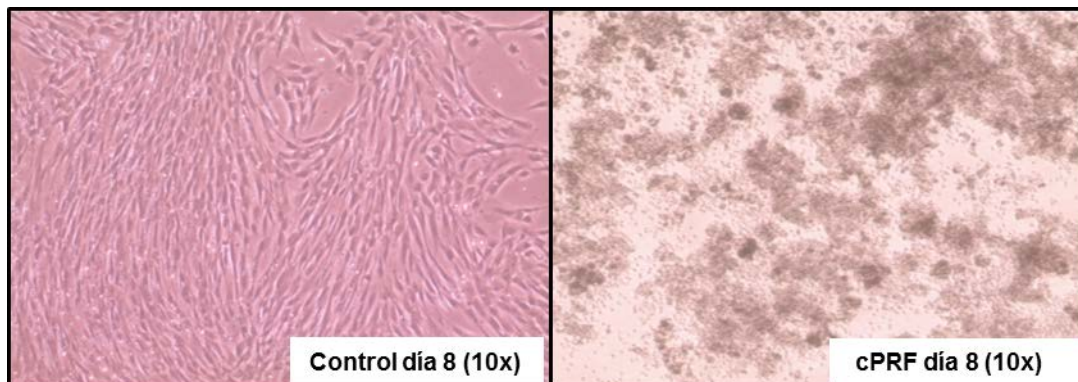
Las MSCs obtenidas a partir del tejido celular de medula ósea, mostraron un adecuado crecimiento celular, aproximadamente después de una semana de cultivo, la morfología propia de las MSCs mostró un aspecto celular estrellado, que al ir confluyendo cambió a una morfología alargada similar a las células fibroblásticas.

Los diferentes cultivos de las MSC en los cilindros de L-PRF se observaron macroscópicamente cada 4 días para ver si se desarrollaba algún cambio en los andamios. Se pudo determinar que los cilindros sembrados con las MSC a medida que transcurría el tiempo modificaban su estructura y se iban reduciendo de tamaño, lo que no sucedía con los cilindros de L-PRF control (Figura 5).



**Figura 5.** Visualización macroscópica del cultivo de las MSC en los cilindros de L-PRF.

De igual manera se observaron microscópicamente los cilindros de L-PRF con el cultivo de las MSC cada 4 días, para conocer el estado de las células mediante el grupo control (Figura 6A). Aunque, la característica densa de los cilindros de L-PRF, no permitieron visualizar de una manera clara las diferencias entre las células (Figura 6B).



**Figura 6.** Visualización microscópica del cultivo de las MSC en los cilindros de L-PRF al día 8 de incubación.

#### 5.4.5.1. Evaluación de supervivencia y proliferación celular

El ensayo MTT permitió determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas en los cuatro grupos experimentales, al final de cada periodo de incubación (días 4 y 8).

Se observó que al disolver los cristales de formazán, el DMSO también disuelve el constructor y da turbidez a la solución, ocasionando problemas a la lectura.

Al realizar el conteo celular se determinó que esta prueba era inespecífica, ya que el cPRF por si mismo daba lectura celular y esta prueba evalúa de manera indiferenciada la cantidad total de células vivas contenidas en la muestra.

#### **5.4.6. Conclusion**

Se requieren estudios adicionales y aumentar el número de animales evaluados, para determinar si el L-PRF es un biomaterial adecuado como andamio para la proliferación de células troncales mesenquimales.

## **6. Caso clínico**

### **6.1. Uso de una plastia muscular en combinación con fibrina rica en plaquetas y leucocitos para la reconstrucción de un defecto del seno maxilar**

#### **6.1.1. Reseña.**

1 caballo referido a las instalaciones de la fundación del hospital clínico veterinario de la Universidad Autónoma de Barcelona.

**Raza:** angloárabe.

**Sexo:** macho castrado.

**Edad:** 10 años.

**Actividad:** equitación de recreo.

**Peso aproximado:** 500 Kg.

#### **6.1.2. Anamnesis**

El caballo había presentado un sarcoide de grandes dimensiones en el canto medial del ojo derecho que fue tratado con crioterapia por parte de su veterinario referente. Como complicación del tratamiento se produjo un defecto iatrogénico en el seno maxilar derecho que dejaba expuesta la cavidad del seno maxilar.

#### **6.1.3. Examen físico/Observación**



**Figura 1.** Defecto en el seno maxilar derecho.

Se detectó un defecto iatrogénico, de aproximadamente 10 x 4 cm de diámetro en la región del seno maxilar adyacente al canto medial del ojo derecho con ausencia total de la piel, del tejido blando y del hueso. El defecto permitía visualizar el interior del seno maxilar derecho (Figura 1). Las estructuras internas parecían conservar su integridad y no se observaban signos de infección, ni inflamación.

#### **6.1.4. Exámenes complementarios iniciales**

- Se realizó un test de fluoresceína en ambos ojos y se observó una obstrucción total del conducto nasolacrimal del ojo derecho.
- Se realizó una radiografía de cráneo en la que se pudo apreciar un defecto en el seno maxilar derecho y ligera remodelación ósea no activa en el hueso frontal derecho (Figura 2).



**Figura 2.** Radiografía lateromedial de cráneo. Se observa un defecto óseo en el seno maxilar y ligera remodelación ósea en el hueso frontal.

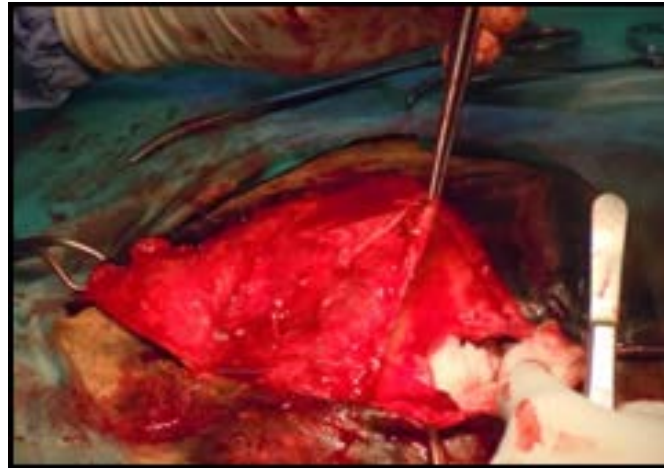
#### **6.1.5. Diagnóstico definitivo**

Se emitió un diagnóstico definitivo de fístula infraorbitaria maxilar derecha. Se realizó una plastia facial y se aplicaron varias membranas de fibrina rica en plaquetas y leucocitos (L-PRF) utilizando el protocolo descrito en el punto 4.3 para su producción. El objetivo fue promover la cicatrización de tejidos óseos y blandos a través de la estimulación de la producción de tejido de reparación, mejorando la resistencia de la herida y la iniciación de la formación de callo óseo.



### 6.1.6. Tratamiento quirúrgico

Se reavivaron los márgenes del defecto (360°) y se realizó una disección subcutánea de la piel ventral de la región circundante al defecto, comprendida desde el defecto hasta la cresta facial, y de la piel de la región frontal, con el fin de utilizarla para cubrir el defecto. Se prosiguió con la separación del periostio de la zona maxilar y frontal y se posicionó para cubrir el defecto. Se diseccionó el músculo elevador nasolabial derecho y se realizó una transposición del mismo para cubrir la lesión (Figura 3).



**Figura 3.** Transposición de periostio y del músculo elevador nasolabial para cubrir la lesión.

Se consiguió que el periostio y el músculo elevador nasolabial derecho cubriesen totalmente el defecto y se suturaron con puntos simples con material reabsorbible (PDS) del 0, 2/0 y 3/0 USP. A continuación, se colocaron 10 membranas de L-PRF (Figura 4).

Se realizó una aproximación proximal de la piel ventral al defecto. Se suturó la piel con un patrón de sutura simple y material no reabsorbible (Nylon) del 2/0 USP. Se colocó un drenaje en la zona más declive de la incisión quirúrgica, se limpió el campo quirúrgico y se realizó un vendaje con gasas estériles para proteger la zona y evitar su contaminación.



**Figura 4.** Cobertura defecto y aplicación de las membranas de L-PRF.

#### **6.1.7. Tratamiento postquirúrgico**

Se administró antibioterapia intravenosa de amplio espectro (penicilina sódica 22.000 UI/Kg cada 6h y gentamicina 6'6 mg/kg cada 24h) y antiinflamatorios no esteroideos (fenilbutazona 4'4 mg/kg cada 12h iv) durante los primeros 3 días de hospitalización. Se continuó con trimetoprim-sulfadiazina (30mg/kg cada 12h PO) y suxibuzona (3'3 mg/kg cada 12h PO) durante los siguientes 4 días. Se realizaron cambios de vendaje y aplicación de pomada antibiótica tópica cada dos días. El caballo estuvo en reposo en el box con paseos diarios de la mano hasta la retirada de los puntos de sutura.

#### **6.1.8. Evolución**

La evolución del animal fue muy favorable. No presentó signos de infección ni dehiscencia de las suturas (Figuras 5).

Actualmente el caballo no presenta ningún defecto estético, únicamente la salida esporádica de lágrima y la presencia de una nueva estructura compatible con un sarcoide en el canto medial del ojo derecho (Figura 6).



**Figura 5.** Fotografía realizada 25 días post-cirugía.



**Figura 6.** Aspecto del caballo 10 meses post-cirugía.

### **6.1.9. Conclusion**

La transposición de músculos faciales y periostio se considera una técnica quirúrgica efectiva para la reparación de defectos de tejidos blandos y óseos en el seno maxilar.

## 8. Discusión

Hasta la fecha son muy pocos los trabajos que han evaluado la metodología y aplicación de PRF en caballos. Cabe destacar, que existen otras publicaciones que han trabajado con concentrados plaquetarios equinos específicamente con PRP (Arguelles, 2006; Carmona, 2007), PRF (McLellan, 2014) y con geles de PRF (Textor, 2014). El presente estudio brinda información novedosa y complementaria sobre la biología de la fibrina rica en plaquetas y leucocitos (L-PRF) en equinos, también podría tener interés traslacional para la medicina regenerativa humana. Uno de los puntos más valiosos de este estudio se basa en el hecho de que la liberación cinética de citocinas y GF de PRF se evaluaron *in vitro* durante más de 2 semanas de incubación con lapsos de evaluación de 48 horas, en comparación con otros estudios realizados en humana (Su, 2009; Dohan Ehrenfest, 2009b; Dohan, 2006b), equinos (McLellan, 2014) y conejos (Bai, 2017; Wang, 2012) que evaluaron la concentración de los diferentes GF en un periodo de incubación más corto.

Este método permite la producción de una manera rápida una gran cantidad de coágulos o membranas de L-PRF simultáneamente, lo que favorece su uso en cirugías mayores. Otras ventajas de este método son su bajo coste, la gran facilidad del procedimiento y el uso de ningún producto químico o condiciones no naturales.

A diferencia de otros concentrados plaquetarios, el L-PRF no se disuelve rápidamente después de su aplicación. Debido a la polimerización lenta y fisiológica del coágulo, se forma una matriz de fibrina fuerte y elástica, la que se remodela lentamente de una manera similar a un coágulo natural de sangre. Dentro de esta matriz la mayoría de las plaquetas y más del 50% de los leucocitos se concentran y se conservan con alta eficiencia a lo largo del tiempo (Dohan, 2006b). Sin embargo, las plaquetas y los leucocitos se activan durante el proceso, lo que conduce a una incrustación sustancial de factores de crecimiento en la matriz de fibrina (Dohan, 2006c; Dohan Ehrenfest, 2009b). Este producto, por tanto, sólo existe en una forma inactivada y no se puede inyectar como una suspensión. Debido a su fuerte arquitectura de fibrina, este biomaterial sólido es particularmente útil en la cirugía (Dohan Ehnrefest, 2012a).

La producción de L-PRF en humana se realiza a través de una sola centrifugación de la sangre total a 400 g durante 10 minutos (Dohan, 2006c). Sin embargo, en el presente estudio, se redujo la velocidad de centrifugación y el tiempo, por considerarse mas apropiado para el uso en caballos, para evitar una excesiva activación de las plaquetas y como resultado obtener una liberación más prolongada de los factores de crecimiento en el tiempo. Este nuevo protocolo se ha basado en algunos estudios

realizados previamente con PRP (Arguelles, 2006; Carmona, 2007), donde se demostró que a una menor aceleración y tiempo de centrifugado se obtenía una cantidad apropiada de concentración plaquetaria y una adecuada liberación de los factores de crecimiento en caballos. Estudios piloto preliminares utilizando aceleraciones más altas produjeron una mayor activación plaquetaria y la liberación de TGF- $\beta$ 1 fue menos prolongada durante el tiempo. Recientemente se han realizado algunas evaluaciones en humana en la que se demuestra que una reducción de la aceleración incrementa significativamente la cantidad de plaquetas, leucocitos y la cantidad de factores de crecimiento derivados del PRF (Kobayashi, 2016; Choukroun, 2017).

En la elaboración de los coágulos de L-PRF en los diferentes tubos evaluados, se encontraron dificultades en la formación de algunos coágulos en el tiempo estipulado (1 hora) en los tubos de Falcón™ y Proteal®, sin embargo antes de las 2 horas después de haber centrifugado las muestras, todos los coágulos se formaron. Esta diferencia puede explicarse, debido a que no se utilizaron tubos de vidrio (Choukroun, 2001) o tubos Vacutainer® con el recubrimiento pulverizado de sílice que facilitan la polimerización y formación del coágulo a los pocos minutos después de la centrifugación (Dohan, 2005).

Varios trabajos han comenzado a usar la tecnología de imagen (Kang, 2011; Dohan Ehrenfest, 2010a), ya que ayuda a medir y conocer el estado de las células dentro de los diferentes CP. El análisis histológico del coágulo y el cilindro de L-PRF del presente estudio, mostraron una distribución celular por zonas, similar en ambos productos e igual contenido celular. La tinción H&E utilizada, fue útil para identificar las plaquetas y sus agregados, así como los leucocitos y los eritrocitos, además, de demostrar la misma distribución de estas células en los diferentes CP. Estos hallazgos son semejantes a los obtenidos en los coágulos de L-PRF (Kang, 2011; Dohan Ehrenfest, 2010a) y en el parche de fibrina rica en plaquetas (Lundquist, 2013) de humanos, en términos de distribución celular y contenido celular.

Las imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) de los coágulos de L-PRF, muestran claramente cómo el contenido celular está presente en la fracción celular del coágulo, con poca o nula presencia celular en la fracción de fibrina. Al día 0 de incubación de la base celular del coágulo de L-PRF se observó claramente que las redes de fibrina atrapaban las diferentes células, principalmente plaquetas, leucocitos y una pequeña cantidad de glóbulos rojos dentro de éstas. En la parte de fibrina al día 0 y 8 de evaluación, se observó que no había presencia celular como era de esperar y había un enmarañado irregular de pequeñas redes de fibrina, aunque, al día 13 de

evaluación unas pocas células estaban presentes y el enmarañado de fibrina se había hecho más homogéneo y organizado. Estos hallazgos se asemejan a los observados en humanos (Kang, 2011; Dohan Ehrenfest, 2010a) en los que se observó una distribución homogénea de la fibrina y una interconexión de las fibras que atrapaban las diferentes células. Los resultados obtenidos al día 13 de evaluación, se pueden explicar con los resultados obtenidos en el coágulo de L-PRF en humanos (Dohan Ehrenfest, 2010a), en los que los coágulos evaluados presentaron diferentes tipos de fibras, tendiendo a ser más densas a medida que pasaba el tiempo, lo que permitió suponer que había una alta concentración de plaquetas. Este fenómeno es bien explicado en un estudio realizado en caballos con un gel de PRF (Textor, 2014), donde describen que hay una mayor tensión de las fibras, cuando hay una mayor cantidad de plaquetas en el concentrado.

Estos hallazgos apoyan la idea de que el L-PRF podría actuar como un complejo andamiaje tridimensional (Dohan, 2006b; Dohan, 2006c), para la ingeniería de tejidos, especialmente para la reparación de heridas y la regeneración ósea (Kang, 2011; Gassling, 2010).

Los resultados de microscopía electrónica de transmisión al día 0 de evaluación fueron bastante similares a otro estudio realizado en PRP de caballos (Zandim, 2012). En general, las plaquetas de caballos presentan una forma discoidal (dos tercios del tamaño de las plaquetas humanas) con su citoplasma lleno de gránulos  $\alpha$ , dos veces más grandes que los presentes en las plaquetas de humanos en una matriz altamente organizada (Zandim, 2012). Sin embargo, los resultados a los días 8 y 13 de evaluación, demostraron el daño progresivo de las plaquetas con una liberación al exterior de los gránulos  $\alpha$ . Estos hallazgos estructurales concuerdan con el aumento progresivo de la concentración de TGF- $\beta$ 1 e IGF-1 liberados a partir del L-PRF durante los mismos días de evaluación, lo cual puede indicar que los gránulos  $\alpha$  de las plaquetas y los leucocitos son una fuente importante de estas proteínas.

Las citoquinas y GFs evaluados en este estudio fueron seleccionados teniendo en cuenta la regulación del papel de los glóbulos blancos en la inflamación y la cicatrización de heridas (Dohan, 2006c) y el potencial efecto anabólico de los GFs en su mayoría liberados por las plaquetas (Dohan, 2006b). Sin embargo, es importante considerar que las moléculas evaluadas en este estudio son sólo una pequeña representación de la plétora de citoquinas y GFs potencialmente contenidos y liberados de los coágulos o membranas de PRF (Passaretti, 2014).

Todos los factores de crecimiento procedentes de los gránulos  $\alpha$  de las plaquetas quedan atrapados dentro del L-PRF en la densa y consistente red de fibrina formada

después de la centrifugación (Gassling, 2009), por eso, las concentraciones de los diferentes factores de crecimiento se obtuvieron a partir de los exudados de los coágulos o membranas, como se ha hecho en diferentes estudios en humana (Dohan, 2006c; Visser, 2010; Zumstein, 2011; Choukroun, 2017). Los coágulos y las membranas se incubaron con el fin de imitar las situaciones *in vivo* y para medir la elución en condiciones óptimas (Visser, 2010).

Aunque las concentraciones de citocinas y GF liberados por el PRF son diferentes entre las especies animales (McLellan, 2014; Passaretti, 2014) e incluso entre los estudios de la misma especie animal (Bai, 2017; Wang, 2012); los resultados de este estudio podrían ser útiles para aclarar el patrón de liberación de algunas citoquinas claves y GFs relacionados con la biología del PRF en mamíferos.

En este estudio, se encontró que las concentraciones de los factores de crecimiento en las diferentes muestras (coágulo y membrana), tienen un comportamiento similar entre las diferentes evaluaciones realizadas (coágulos y membranas en tubo Vacutainer<sup>®</sup>, coágulo en tubo Proteal<sup>®</sup> y el cilindro de L-PRF en tubo falcón<sup>™</sup>)

Las concentraciones de TGF- $\beta$ 1 de los exudados de los coágulos de L-PRF aumentaron constantemente desde las concentraciones basales, hasta alcanzar las concentraciones máximas en la segunda semana de evaluación. El comportamiento cinético de elución del TGF- $\beta$ 1 coincide con estudios previos realizados con sangre humana, cuando el valor máximo de TGF- $\beta$ 1 se obtuvo en la segunda semana de evaluación (He, 2009; Su, 2009; Kobayashi, 2016).

Los valores medios de TGF- $\beta$ 1 obtenidos a partir de los exudados de los coágulos y membranas del L-PRF del presente estudio fueron más bajos que los reportados en estudios anteriores realizados en caballos en plasma rico en plaquetas, donde las concentraciones máximas que se obtuvieron en las primeras 24 horas de evaluación fueron de 10,5 ng/ml (Arguelles, 2006) y 7,4 ng/ml (Carter, 2003). De igual manera se obtuvieron concentraciones muy similares o superiores a las obtenidas en estudios más recientes en las primeras 24 horas de evaluación de diferentes concentrados plaquetarios, realizados en caballos con respecto al día 0 de evaluación con valores de 3055 pg/ml (Textor, 2011), 1362 pg/ml (Torricelli, 2011) y 3192 pg/ml (Giraldo, 2013). Esto podría significar que la activación plaquetaria y posterior liberación de TGF- $\beta$ 1 y otros GF se produce de una manera lenta y progresiva durante el proceso natural de polimerización generado después de la centrifugación, ya que no hay activación forzada (He, 2009).

Se puede pensar que aunque la concentración plaquetaria conseguida con esta técnica, no es la misma que con otros sistemas, en el presente trabajo se conservó la integridad plaquetaria en mayor medida, lo que favoreció que los depósitos de GF que

estaban en los gránulos alfa se mantuvieran íntegros hasta el final, sin perder su contenido, permitiendo su liberación en el tiempo.

Los valores obtenidos para el IGF-1 en el presente estudio, fueron en aumento constante desde el primer día hasta el último de evaluación en las diferentes pruebas realizadas, alcanzando su concentración máxima el último día de evaluación.

En comparación con los resultados obtenidos en otros estudios en humanos los cuales son bastante contradictorios (Su, 2009), se encontró que este GF tuvo una concentración casi constante durante el tiempo de estudio. Varios trabajos realizados en caballos con PRP (Torricelli, 2011; Textor, 2011) han reportado valores muy por debajo a los obtenidos en el presente estudio en las primeras 24 horas de evaluación. Estos resultados confirman que el IGF-1 estaba contenido dentro del plasma (Su, 2009) y que el aporte por parte de los gránulos  $\alpha$  era mínimo (Textor, 2011). Además, se ha descrito que este GF no es dependiente de la activación plaquetaria (Durante, 2013). Esto lleva a pensar que la concentración de leucocitos y su activación durante el proceso son una fuente importante de IGF-1.

Estos resultados son favorables para la posible utilización del L-PRF en técnicas de injerto de cartílago articular y tendón al tener una liberación prolongada y en aumento durante todo el periodo de evaluación. Como se ha descrito anteriormente, el IGF-1 desempeña un papel clave en la homeostasis y el crecimiento anabólico del cartílago. Estudios *in vitro* en humanos han demostrado cómo el IGF-1 estimula la producción de proteoglicanos en una forma dosis dependiente. De igual manera se ha demostrado que las concentraciones séricas de este GF y los niveles de respuesta de los condrocitos a IGF-1 disminuyen progresivamente con la edad, lo que quiere decir que una administración exógena de este factor ayudaría a mantener la integridad estructural y funcional del cartílago (Schmidt, 2006). Estos efectos han sido bien descritos en condrocitos equinos, en explantes de cartílago acondicionado con IL-1, un mediador conocido de la inflamación. En tratamientos con corticosteroides en combinación con IGF-1, se obtuvo un efecto protector que impedía la degradación de proteoglicanos detectados en los explantes tratados solo con corticosteroides, así como un efecto anabólico que resultó en un aumento en el contenido de colágeno (Zachos, 2005).

El VEGF, que es un potente promotor de crecimiento vascular y de la neovascularización, además, de jugar un papel directo en el control y regulación de los comportamientos de las células endoteliales (Zumstein, 2014), sólo fue detectable al día 0 de incubación, sin poderse detectar ningún aumento durante los otros día de



evaluación, estos valores encontrados, concuerdan con los obtenidos en un estudio realizado en caballos con PRP (Torricelli, 2011) en el cual sólo obtuvo concentraciones de este factor en las primeras 24 horas de evaluación. Estos resultados son contradictorios con los obtenidos en L-PRF de humanos (Dohan Ehnrefest, 2009b; Zumstein, 2011) donde se obtuvieron concentraciones casi constantes de este factor durante 7 días de evaluación. De igual manera, un estudio realizado en plasma rico en factores de crecimiento de humanos (Sánchez, 2012), obtuvo concentraciones durante 9 días de evaluación, aunque, su concentración después de la primer hora de evaluación fue mínima. Se ha demostrado que la liberación del VEGF se da en la etapa temprana de activación plaquetaria (Durante, 2013), mostrando una alta liberación durante las primeras 4 horas después de la preparación del L-PRF y se afirma que este resultado se debe a los leucocitos activados que se encuentran atrapados en la red de fibrina (Dohan Ehnrefest, 2009b). De igual manera otros autores han descrito que los leucocitos son una fuente abundante de VEGF (Werther, 2002, Zumstein, 2014).

El TNF- $\alpha$ 1 se seleccionó debido a su poderoso efecto catabólico y pro-inflamatorio en las células y tejidos, especialmente de origen mesenquimatoso y ectodérmico, como la piel (Tan, 2017) y los tejidos músculo-esqueléticos (Tan, 2017; Sedger, 2014). Por otra parte, TNF- $\alpha$ 1 también ha demostrado un papel regulador sobre la inflamación cuando está en presencia de plaquetas asociadas con GFs, como PDGF-B (Ríos, 2015). IL-4 e IL-1ra son dos citoquinas anti-inflamatorias que están implicadas en la cicatrización de heridas y la inflamación.

TNF- $\alpha$ 1 mostró una liberación insignificante en la primera hora de evaluación seguido de una producción repentina a las 6 h, que se mantuvo estable durante todo el tiempo del experimento. IL-4 exhibió un complejo patrón de liberación, que en términos generales se caracterizó por el aumento de la alternancia con la disminución de sus concentraciones en el tiempo. Este patrón de liberación implicó posiblemente un mecanismo de retroalimentación para mantener las concentraciones de esta citoquina en un intervalo específico pero amplio. Por otra parte, la IL-1ra exhibió un patrón de liberación caracterizado por un aumento gradual en la liberación de esta citoquina con un pico en la concentración en una semana, y luego una disminución gradual de la misma con una estabilización final entre el 11° y el 21° día.

La liberación total de citoquinas provenientes de PRF al medio de cultivo y la concentración de estos polipéptidos en plasma (control negativo) y lisados sanguíneos (control positivo) fueron útiles para aclarar que, al menos en este modelo animal, TNF- $\alpha$ , IL-4 e IL -1ra fueron posiblemente producidos sólo por leucocitos activados, que se

incrustan en la matriz PRF. Curiosamente, la producción de estas citocinas; particularmente, TNF- $\alpha$ 1 e IL-4 se mantuvieron en el tiempo. Esta situación indica una importante actividad metabólica de los leucocitos, que se mantuvo durante tres semanas. Este fenómeno fisiológico permite considerar a los coágulos de PRF como nodos inmunes que inducen la cicatrización de heridas (Dohan, 2006c).

El PDGF-BB es un polipéptido centinela para la liberación de GF de plaquetas activadas (Giraldo, 2013). Este GF es una poderosa molécula anabólica y anti-inflamatoria; es uno de los principales responsables de la quimiotaxis de las células troncales, la proliferación y la diferenciación (Donovan, 2013). En particular, PDGF-BB y TGF- $\beta$ 1 inducen la regulación del factor nuclear kappa beta (Carmona, 2016), que está implicado en la génesis y la perpetuación de la inflamación (Panday, 2016).

Los patrones de liberación cinética de PDGF-BB indicaron una ráfaga de plaquetas con liberación masiva de este GF desde el tiempo 1h y 6h. Sin embargo, las concentraciones de PDGF-BB disminuían sutilmente a lo largo del tiempo y luego se mantuvieron estables con un ligero (pero no significativo) aumento de su concentración a los 11<sup>o</sup> y 21<sup>o</sup> días. Cabe destacar que la liberación temporal de GF asociada con plaquetas ha sido descrita para liberaciones de PRF equinos durante un estudio in vitro de cinco días (McLellan, 2014) y liberaciones de PRF de conejo durante un estudio in vitro de 28 días (Wang, 2012).

La liberación global de GF a partir de coágulos de PRF a los medios de cultivo y la concentración de estas moléculas en el plasma (control negativo) y los lisados sanguíneos (control positivo) permiten pensar que el PDGF-BB es realmente producido por plaquetas (Su, 2009), pero posiblemente también se libera en cantidades significativas de leucocitos activados después de 1 semana de cultivo. Debido a que toda la producción temporal de PDGF-BB en el medio de cultivo fue al menos el doble que la concentración para este GF obtenido en lisados de sangre (control positivo). Por otra parte, este estudio es útil para corroborar que aunque las plaquetas son una fuente importante de TGF- $\beta$ 1; este GF se produce en cantidades menores pero sostenidas por los leucocitos posiblemente 6 h después de la desgranulación plaquetaria. En este punto es necesario considerar que el sobrenadante inicial del suero de los coágulos de PRF es una fuente importante de PDGF-BB y TGF- $\beta$ 1, por lo que los médicos deben ser conscientes de establecer algún procedimiento terapéutico adicional con esta sustancia junto con el uso del coágulo o membrana de PRF (Su, 2009).

Esto podría significar que la activación de plaquetas y su posterior liberación de los factores de crecimiento se produce de una manera lenta y progresiva durante el

proceso natural de polimerización, generado después de la centrifugación, ya que no hay una activación forzada (He, 2009). Además, los valores obtenidos en el presente estudio hacen pensar que en el caso de no haber diluido las muestras, el rendimiento habría sido mejor por lo que el efecto de dilución del medio de cultivo debe ser considerado. De igual manera, es importante destacar que las pruebas utilizadas para medir los diferentes GF a pesar de haber sido validadas para su uso en caballos, son pruebas específicas para humanos lo que condiciona en gran medida la obtención de buenos resultados. Al utilizar pruebas inespecíficas se obtienen resultados muy variables haciendo difícil la comparación de los diferentes GF con otros concentrados plaquetarios.

Las concentraciones medias de los GF de los exudados de los coágulos de L-PRF en el presente estudio, fueron inferiores a las observadas en estudios realizados en humanos (He, 2009; Su, 2009), sin embargo, el comportamiento de los GF evaluados en las diferentes evaluaciones de esta tesis fueron similares. Esto representa un beneficio potencial para la aplicación de este concentrado plaquetario en diferentes campos de la cirugía articular por medio de artroscopia, al mejorar la vascularización de estas lesiones y promoviendo la regeneración ósea y del cartílago. Además, por la diversidad del producto se podría utilizar como material de relleno en tendones o ligamentos, remplazando el tejido dañado o deteriorado, para mejorar la movilidad y la disminución del dolor. De igual manera se podría utilizar en el punto de unión de la ruptura de los tendones, al unirse los dos muñones, para acelerar el proceso de cicatrización.

Los resultados positivos en la reparación ósea de caballos basados en la terapia celular dependen del uso de las MSC equinas al mejorar la capacidad osteogénica y con un andamiaje apropiado, se debe crear un microambiente ideal para la supervivencia celular, la proliferación y la diferenciación (Hale, 2012). Se ha evaluado el pegamento de fibrina como un andamio apropiado para las MSC equinas (Mc Duffee, 2014) y han encontrado que el pegamento de fibrina ofrece un microambiente favorable para las MSC de equinos (Hale, 2012). La combinación de las MSC de equinos y el pegamento de fibrina es un método atractivo para su uso en terapia celular, para promover la cicatrización del hueso, además, las MSC equinas han demostrado una alta tasa de proliferación cuando se cultivan en superficies revestidas de fibrinógeno (Kisiday, 2011).

La porosidad óptima, la interconectividad de los poros y el control del diámetro de éstos son sólo algunas de las características importantes que pueden afectar a las

propiedades mecánicas, la respuesta de las células y el crecimiento de tejido nuevo. Para las aplicaciones *in vivo*, el mínimo tamaño de poro recomendado puede variar entre 100 y 500  $\mu\text{m}$ ; ya que al tener una porosidad mayor, únicamente se favorece la formación de tejido fibroblástico. Otras consideraciones para tales diseños giran en torno a las propiedades mecánicas y la biocompatibilidad (Uebersax, 2006). A pesar de que en el presente trabajo no se evaluó la porosidad del coágulo de L-PRF; por microscopía de barrido se observó la densidad de la red de fibrina, encontrando una red muy densa, lo que hace suponer que por este motivo no permitió la expansión de las MSC, como se ha descrito en un estudio realizado en un gel de “fibrina rica en plaquetas” en caballos, los poros grandes favorecen el crecimiento celular y la proliferación, mientras que los poros más pequeños favorecen la unión celular, debido a la mayor área de superficie global que provee (Textor, 2014); además, describe que estos concentrados plaquetarios tienen una porosidad intermedia y un áreas de poros extremadamente pequeñas.

A pesar de no haber comprobado el crecimiento de MSC en el cilindro de L-PRF; se puede seguir considerando al coágulo de L-PRF como un andamiaje sólido para el suministro a largo plazo de GF, lo cual es un nuevo enfoque en la ingeniería de tejidos (Zumstein, 2014).

La evaluación de MTT en el presente estudio nos permitió comprobar que hubo un incremento celular en el cultivo de MSC con los cilindros de L-PRF, pero no se pudo diferenciar qué células eran las que componían, ya que de igual manera se observó que el cilindro de L-PRF por sí mismo generaba una liberación celular. Un estudio realizado en humanos para determinar la proliferación de osteoblastos en la membrana de L-PRF (Gassling, 2011), demostró que el L-PRF apoya la proliferación celular de osteoblastos, pero al realizar la prueba de MTT comprobaron que había un crecimiento celular dentro de la membrana, aunque no se pudo diferenciar con claridad qué células la componían. De igual manera otro estudio por el mismo autor (Gassling, 2010), demostró que las membranas de L-PRF de humanos son adecuadas para el cultivo *in vitro* de células de periostio, a diferencia del presente estudio los cultivos fueron realizados sobre los cilindros de L-PRF.

Al observar los coágulos de L-PRF con las MSCs a los 8 días de incubación se mostró una retracción del coágulo, este fenómeno no se puede explicar con claridad, porque en observaciones previas del coágulo y la membrana de L-PRF sin MSC, estos conservaron su estructura durante semanas. La retracción del cilindro de L-PRF contradice lo descrito en un estudio realizado en humanos (Zumstein, 2011), en el cual la membrana de L-PRF parecía intacta después de 7 días de cultivo. Para poder esclarecer dicho fenómeno, se debería hacer una evaluación del contenido de

trombina y fibrinógeno, para determinar con exactitud la densidad del cilindro de L-PRF y con esto conocer su estructura y poder dar una mejor explicación.

Una serie de estudios sobre el L-PRF en humana describen cómo los coágulos y las membranas tienen una liberación de diferentes proteínas y una arquitectura constante de la matriz durante más de 7 días *in vitro* (Dohan Ehrenfest, 2009b; Choukroun, 2001; Su, 2009; He, 2009), mientras que la matriz del gel de PRP se disuelve rápidamente y libera todos los factores de crecimiento en una descarga muy rápida, por lo que el gel de PRP es considerado como coadyuvante farmacéutico transitorio, mientras que el L-PRF es un biomaterial sólido (Del Corso, 2012). Estas características claves tienen que ser tomados en cuenta durante el desarrollo de metodologías clínicas como se muestra en la presente tesis al utilizar los coágulos o membranas de L-PRF en la aplicación *in vivo*.

La cuestión del contenido de leucocitos en los concentrados de plaquetas para uso quirúrgico es en realidad un viejo debate, aunque, la mayor parte de los concentrados plaquetarios usados en medicina contienen leucocitos (Weibrich, 2003). Para algunos autores, los leucocitos deben desecharse de la preparación, con el fin de evitar los procesos inflamatorios (Anitua, 2007), sin embargo, no hay ninguna prueba de que los leucocitos dentro de estas preparaciones quirúrgicas puedan tener efectos secundarios indeseables (Martin, 2005). Por el contrario, varios estudios mostraron que la L-PRP tiene efectos antimicrobianos (Moojen, 2008; Cieslick-Bielecki, 2009), incluso se ha utilizado en aplicaciones inmunes sensibles, sin presentar reacciones inflamatorias indeseables hasta la fecha (Bielecki, 2008; Cieslick-Bielecki, 2009). La influencia de los leucocitos en los concentrados plaquetarios en cirugía es en realidad una forma relevante de la investigación (Dohan Ehrenfest, 2009b) y ningún autor puede afirmar que su influencia es negativa. Todas las declaraciones sobre esta cuestión deben ser discutidas cuidadosamente y probadas científicamente (Dohan Ehrenfest, 2010b). Ahora es importante demostrar la influencia de los leucocitos en la biología de cada producto y sus beneficios potenciales, ya que podría explicar muchos de los datos controvertidos de la literatura (Zhao, 2013). Algunos autores señalan el papel clave anti-infeccioso de los leucocitos en los concentrados plaquetarios en cirugía, tanto por la acción directa de estos sobre los tejidos (Moojen, 2008), como por su capacidad de la regulación inmune (Dohan, 2006c; El-Sharkawy, 2007).

Con respecto al caso clínico se puede decir que es la primera vez que se describe el uso de membranas del L-PRF en cirugía de caballos.

La relevancia de las membranas de L-PRF en cirugía es particularmente importante debido a que este material tiene una forma y un volumen que encaja firmemente con muchas aplicaciones quirúrgicas, lo que se ha demostrado ampliamente en la cirugía periodontal y maxilofacial en humanos (Simonpieri, 2012).

Hasta la fecha no se ha documentado el tratamiento de una fístula en los senos paranasales como consecuencia de un tratamiento con criocirugía y tratada con PRF. Dadas las dimensiones del defecto y puesto que el injerto de periostio no era suficiente para cubrirlo, se decidió realizar una transposición del músculo elevador nasolabial del lado afectado (Brink, 2006). Como tratamiento innovador se aplicaron las membranas de L-PRF, ya que estas se podían adaptar y ser suturadas en el lugar de la lesión (Del Corso, 2012). Varios estudios histológicos realizados en humanos ratifican el éxito obtenido en esta cirugía al demostrar que el uso del L-PRF como biomaterial en cirugía en combinación con materiales de injerto, ayuda a acelerar el periodo de cicatrización de 8 a 4 meses, además de reducir la cantidad de material de injerto utilizado, sin afectar la densidad del ósea (Choukroun, 2006b; Toffler, 2009).

El uso de L-PRF promueve nuevas estrategias terapéuticas, pero la combinación de este material autólogo con otras herramientas biotecnológicas, por lo que pueden aumentar la calidad y la seguridad de estos tratamientos ya que una superficie de implante al ser mejorada puede ser de gran ayuda para promover mejores resultados clínicos y ampliar el potencial terapéutico (Simonpieri, 2009a; Simonpieri, 2009b).

Los concentrados plaquetarios son productos que liberan factores de crecimiento que pueden ser utilizados como un suplemento para expandir células troncales, bajo condiciones donde estas células mantengan su capacidad de diferenciación (Burnouf, 2013).

## 9. Conclusiones

El coágulo y los cilindros de L-PRF equino presentan características histológicas, ultraestructurales y biológicas similares a los de L-PRF humano.

Las concentraciones de factores de crecimiento TGF- $\beta$ 1, IGF-1 y de citoquinas de los coágulos de L-PRF analizados tuvieron una liberación incremental en cultivo de 2 a 3 semanas.

En relación a los dos protocolos de centrifugación de L-PRF evaluados no se vieron cambios significativos en la arquitectura del L-PRF, ni en la cantidad de los factores de crecimiento detectados aunque sí se observó una alta variabilidad individual.

El comportamiento de la liberación de citoquinas TNF- $\alpha$  -i, IL-4, IL-1ra y del factor de crecimiento IGF-1 del coágulo de PRF indican una actividad metabólica muy importante de los leucocitos hasta las 3 semanas en cultivo con las consecuencias inmunitarias beneficiosas para la cicatrización y regeneración que esto puede implicar.

Las concentraciones de los factores de crecimiento en las diferentes muestras (coágulo, membrana y cilindros) tienen un comportamiento similar entre las diferentes metodologías realizadas aún variando los tubos de obtención.

A pesar que los resultados iniciales obtenidos en las pruebas realizadas con los coágulos de L-PRF como andamio para la proliferación de MSC no fueron positivos, se requieren estudios adicionales para determinar si diferentes densidades de fibrina del L-PRF podrían favorecer la proliferación de células troncales mesenquimales.

El L-PRF es una técnica de bajo costo y sencilla de emplear con resultados alentadores debido a la liberación prolongada de diferentes GF y con potencial para usarse para mejorar la cicatrización de tejidos en caballos, aunque muchos estudios son todavía necesarios para validar metodologías, aplicaciones clínicas y combinaciones de L-PRF con otros materiales, lo cual representa una emocionante perspectiva para los próximos años.

## 10. Referencias

- Álvarez M.E., López C., Giraldo C.E., Samudio I., Carmona J.U. In vitro bactericidal activity of equine platelet concentrates, platelet poor plasma, and plasma against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Arch Med Vet.*, 2011; 43: 155-161.
- Alves H., Dechering K., Van Blitterswijk C., De Boer J. High-throughput assay for the identification of compounds regulating osteogenic differentiation of human mesenchymal stromal cells. *PLoS One.*, 2011; 6:e26678.
- Anitua E. Plasma rich in growth factors: Preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants.*, 1999; 07; 14(4): 529-35.
- Anitua E., Sanchez M., Orive G., Andia I. The potential impact of the preparation rich in growth factors (PRGF) in different medical fields. *Biomaterials.*, 2007; 28(31): 4551–4560.
- Anitua E., Alonso R., Girbau C., Aguirre J.J., Muruzabal F., Orive, G. Antibacterial effect of plasma rich in growth factors (PRGF®-Endoret®) against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* strains. *Clinical and experimental dermatology.*, 2012; 37(6): 652-657.
- Arevalo J., Páez D.M., Rodriguez V.M. Células Madre Mesenquimales: características biológicas y aplicaciones clínicas. *NOVA publ. Cient.*, 2007; 5(8): 177-184.
- Argüelles D, Carmona J.U., Pastor J., Iborra A., Viñals L., Martínez P., Bach E., Prades M. Evaluation of single and double centrifugation tube methods for concentrating equine platelets. *Res Vet Scien.*, 2006; 81: 237-245.
- Arnhold S.J., Goletz I., Klein H., Stumpf G., Beluche L.A., Rohde C., Addicks K., Litzke L.F. Isolation and characterization of bone marrow-derived equine mesenchymal stem cells. *Am J Vet Res.*, 2007; 68(10): 1095-1105.
- Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature.*, 1998; 392 (6676): 565-568.
- Bai M.Y., Wang C.W., Wang J.Y., Lin M.F., Chan W.P. Three-dimensional structure and cytokine distribution of platelet-rich fibrin. *Clinics.* 2017; 72(2): 116-124.
- Baksh D., Song L., Tuan R.S. Adult Mesenchymal stem cells: Characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *Journal of cellular and molecular medicine.*, 2004; 8(3): 301-316.
- Bamias G., Cominelli F. Role of type 2 immunity in intestinal inflammation. *Curr Opin Gastroenterol.*, 2015; 31(6): 471-6.
- Barberini D.J., Freitas N.P.P., Magnoni M.S., Maia L., Listoni A.J., Heckler M.C., Sudano M.J., Golim M.A., Landim-Alvarenga F.C., Amorim, R.M. Equine mesenchymal



stem cells from bone marrow, adipose tissue and umbilical cord: immunophenotypic characterization and differentiation potential. *Stem cell research & therapy.*, 2014; 5(1): 25.

- Barrientos S., Stojadinovic O., Golinko M.S., Brem H., Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair and Regeneration.*, 2008; 16(5): 585-601.
- Berg L., Koch T., Heerkens T., Bessonov K., Thomsen P., Betts D. Chondrogenic potential of mesenchymal stromal cells derived from equine bone marrow and umbilical cord blood. *Vet Comp Orthop Traumatol.*, 2009; 22:363–370.
- Bianco P., Riminucci M., Gronthos S., Robey P.G. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells.*, 2001; 19(3): 180-192.
- Bielecki T.M., Gazdzik T.S., Arendt J., Szczepanski T., Krol W., Wielkoszynski T. Antibacterial effect of autologous platelet gel enriched with growth factors and other active substances AN IN VITRO STUDY. *Journal of Bone & Joint Surgery, British Volume.*, 2007; 89 (3): 417-420.
- Bielecki T., Gazdzik T.S., Szczepanski T. Benefit of percutaneous injection of autologous platelet-leukocyte-rich gel in patients with delayed union and nonunion. *Eur Surg Res.*, 2008; 40(3): 289–96.
- Braccini, F.; Dohan, D.M. The relevance of Choukroun's platelet rich fibrin (PRF) during facial aesthetic liposuction (Coleman's technique): preliminary results. *Rev. Laryngol. Otol. Rhinol. (Bord.)*, 2007; 128(4): 255-260.
- Boudreaux M.K. Platelet Structure. *Schalm's veterinary hematology. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell.*, 2010; 561-568.
- Brinkmann, V., Reichard u., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D.S., Weinrauch Y., Zychilinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.*, 2004; 303: 1532–1535.
- Brink, P. Levator labii superioris muscle transposition to treat oromaxillary sinus fistula in three horses. *Veterinary Surgery.*, 2006; 35 (7): 596-600.
- Brunso L., Segura D., Monreal L., Escolar G., White J.G., Diaz-Ricart M. The secretory mechanisms in equine platelets are independent of cytoskeletal polymerization and occur through membrane fusion. *Platelets.*, 2010; 21(8): 658-666.
- Bunnell, B.A., Estes B.T., Guilak F., Gimble J.M. Differentiation of adipose stem cells. *Methods Mol Biol.*, 2008; 456: 155-71.
- Burk J., Ribitsch I., Gittel C., Juelke H., Kasper C., Staszyc C., and Brehm W. Growth and differentiation characteristics of equine mesenchymal stromal cells derived from different sources. *The Veterinary Journal.*, 2013; 195(1): 98-106.

- Burnouf T., Chou M.L., Wu Y.W., Su C.Y., Lee L.W. Antimicrobial activity of platelet (PLT)-poor plasma, PLT-rich plasma, PLT gel, and solvent/detergent-treated PLT lysate biomaterials against wound bacteria. *Transfusion.*, 2013; 53: 138-146.
- Carmona J.U., Argüelles D., Climent F., Prades M. Autologous platelet concentrates as a treatment of horses with osteoarthritis: a preliminary pilot clinical study. *Journal of Equine Veterinary Science.*, 2007; 27(4): 167-170.
- Carmona J.U., Rios D.L., Lopez C., Alvarez M.E., Perez J.E., Bohorquez M.E. In vitro effects of platelet-rich gel supernatants on histology and chondrocyte apoptosis scores, hyaluronan release and gene expression of equine cartilage explants challenged with lipopolysaccharide, *BMC Vet Res.*, 2016;12(1): 016-0759.
- Carr M.E. Jr., Carr S.L. Fibrin structure and concentration alter clot elastic modulus but do not alter platelet mediated force development. *Blood Coagul Fibrinolysis.*, 1995; 6: 79–86.
- Carrade D.D., Lame M.W., Kent M.S., Clark K.C., Walker N.J., Borjesson D.L. Comparative analysis of the immunomodulatory properties of equine adult-derived mesenchymal stem cells. *Cell Med.*, 2012; 4: 1–11.
- Carrade D.D., Owens S.D., Galuppo L.D., Vidal M.A., Ferraro G.L., Librach F., Buerchler S., Friedman M.S., Walker N.J., Borjesson D.L. Clinicopathologic findings following intra-articular injection of autologous and allogeneic placentally derived equine mesenchymal stem cells in horses. *Cytotherapy.*, 2011; 13: 419–430.
- Carter, C.A., Jolly, D.G., Worden, C.E., Hendren, D.G. and Kane, C.J.M. Platelet-rich plasma gel promotes differentiation and regeneration during equine wound healing. *Experimental and molecular pathology.*, 2003; 74: 244-255.
- Chang, I. Platelet-rich fibrin modulates the expression of extracellular signal-regulated protein kinase and osteoprotegerin in human osteoblasts. *Journal of Biomedical Materials Research Part A.* 2010; 95: 327-332.
- Charrier J.B., Monteil J.P., Albert S., Collon S., Bobin S., Dohan Ehrenfest D.M. Relevance of Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF) and SMAS flap in primary reconstruction after superficial or subtotal parotidectomy in patients with focal pleiomorphic adenoma: a new technique. *Rev. Laryngol. Otol. Rhinol.* (Bord.), 2008; 129(4-5): 313-318.
- Chignon-Sicard B., Georgiou C.A., Fontas E., David S., Dumas P., Ihrai T. Efficacy of leukocyte- and platelet-rich fibrin in wound healing: a randomized controlled clinical trial. *Plast Reconstr Surg.*, 2012; 130(6): 819e–29e.
- Choukroun J., Adda F., Schoeffler C., Vervelle A. Une opportunité en parodontologie: le PRF. *Implantodontie.*, 2001; 42: 55–62.

- Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, Giard MO, Schoeffler C, Dohn SL, Dohn AJJ, Mouhyi J, Dohn DM. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part IV: Clinical effects on tissue healing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*, 2006a; 101:E56-60.
- Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, Girard M.O, Schoeffler C, Dohan S.L, Dohan A.J, Mouhyi J, Dohan D.M. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part V: histologic evaluations of PRF effects on bone allograft maturation in sinus lift. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*, 2006b; 101: 299-303.
- Choukroun, J., and S. Ghanaati. Reduction of relative centrifugation force within injectable platelet-rich-fibrin (PRF) concentrates advances patients' own inflammatory cells, platelets and growth factors: the first introduction to the low speed centrifugation concept. *European Journal of Trauma and Emergency Surgery.* 2017: 1-9.
- Cieslik-Bielecka A., Bielecki T., Gazdzik T.S., Arendt J., Król W., Szczepanski T. Autologous platelets and leukocytes can improve healing of infected high-energy soft tissue injury. *Transfus Apher Sci.*, 2009; 41(1): 9–12.
- Clark R.A., Fibrin and wound healing. *Ann N Y Acad Sci.*, 2001; 936: 355–67.
- Coleman S.R., Facial augmentation with structural fat grafting. *Clin Plast Surg.*, 2006; 33(4): 567–77.
- Cornelissen C.G., Dietrich M., Kruger S., Spillner J., Schmitz-Rode T., Jockenhoevel S.L. Fibrin gel as alternative scaffold for respiratory tissue engineering. *Ann Biomed Eng.*, 2012; 40:679–687.
- Crovace A., Staffeieri F., Rossi G. Implantation of autologous bone marrow mononuclear cells as a minimal invasive therapy of Legg-Calve-Perthes disease in the dog. *15th Annual European ESVOT Congress.*, 2010.
- Cugat R., Garcia-Balletbo M. Growth factors-A brief review. *European Musculoskeletal Review.*, 2005; 5(2): 32-35.
- Davis H.E., Miller S.L., Case E.M., Leach J.K. Supplementation of fibrin gels with sodium chloride enhances physical properties and ensuing osteogenic response. *Acta Biomater.*, 2011; 7: 691–699.
- De Schauwer C., Meyer E., Van de Walle G.R., Van Soom A. Markers of stemness in equine mesenchymal stem cells: a plea for uniformity. *Theriogenology.*, 2011; 75(8): 1431-1443.
- De Schauwer C., Goossens K., Piepers S., Hoogewijs M.K., Govaere J.L., Smits K., Meyer E., Van Somm A., Van de Walle G.R. Characterization and profiling of immunomodulatory genes of equine mesenchymal stromal cells from non-invasive sources. *Stem Cell Research & Therapy.*, 2014; 5:6.

- Del Corso M., Vervelle A., Simonpieri A., Jimbo R., Inchingolo F., Sammartino G., Dohan Ehrenfest, D.M. Current knowledge and perspectives for the use of platelet-rich plasma (PRP) and platelet-rich fibrin (PRF) in oral and maxillofacial surgery part 1: Periodontal and dentoalveolar surgery. *Current pharmaceutical biotechnology.*, 2012; 13(7): 1207-1230.
- Deng Y.B., Liu X.G., Liu Z.G., Liu X.L., Liu Y., Zhou G.Q. Implantation of BM mesenchymal stem cells into injured spinal cord elicits de novo neurogenesis and functional recovery: Evidence from a study in rhesus monkeys. *Cytotherapy.*, 2006; 8(3): 210-214.
- Deuel T.F., Chang Y. Growth factors in: Principles of Tissue Engineering., 2007; (3): 193-206.
- Dohan S., Dohan A., Choukroun J., Diss A., Simonpieri A., Girard M.O., Dohan D. "De l'usage des concentrés plaquettaires en utilisation topique." *EMC-Odontologie.*, 2005; 1: 141-180.
- Dohan D.M., Choukroun J., Diss A., Dohan S.L., Dohan A.J., Mouhyi J., Gogly B. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*, 2006a; 101: e37-44.
- Dohan D.M., Choukroun J., Diss A., Dohan S.L., Dohan A.J., Mouhyi J., Gogly B. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part II: platelet-related biologic features. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*, 2006b; 101: e45-50.
- Dohan D.M., Choukroun J., Diss A., Dohan S.L., Dohan A.J., Mouhyi J., Gogly B. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part III: leucocyte activation: a new feature for platelet concentrates? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*, 2006c; 101: e51-5.
- Dohan Ehrenfest D.M., Rasmusson L., Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (PPRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol.*, 2009a; 27(3): 158-167.
- Dohan Ehrenfest, D.M.; de Peppo, G.M.; Doglioli, P.; Sammartino, G. Slow release of growth factors and thrombospondin-1 in Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF): a gold standard to achieve for all surgical platelet concentrates technologies. *Growth Factors.*, 2009b; 27(1): 63-69.
- Dohn Ehrenfest D,M,, Diss A,, Odin G,, Doglioli P,, Hippolyte M,P,, Charrier J. In vitro seeffects of Choukroun's PRF (platelet-rich fibrin) on human gingival fibroblasts,

dermal prekeratinocytes, preadipocytes, and maxillofacial osteoblasts in primary cultures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*, 2009c; 108: 341-352.

- Dohan Ehrenfest D.M., Del Corso M., Diss A., Mouhyi J., Charrier J.B. Three-dimensional architecture and cell composition of a Choukroun's platelet-rich fibrin clot and membrane. *J. Periodontol.*, 2010a; 81(4): 546-555.
- Dohan Ehrenfest D.M., Doglioli P., de Peppo G.M., Del Corso M., Charrier, J.B. Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF) stimulates *in vitro* proliferation and differentiation of human oral bone mesenchymal stem cell in a dose-dependent way. *Arch. Oral Biol.*, 2010b; 55(3), 185-194.
- Dohan Ehrenfest D.M. How to optimize the preparation of Leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF, Choukroun's technique) clots and membranes: introducing the PRF Box. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, 2010c; 110(3): 275-278.
- Dohan Ehrenfest D.M., Bielecki T., Jimbo R., Barbe G., Del Corso M., Inchingolo F., Sammartino G. Do the fibrin architecture and leukocyte content influence the growth factor release of platelet concentrates? An evidence-based answer comparing a pure platelet-rich plasma (PPRP) gel and a leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Curr Pharm Biotechnol.*, 2012a; 13: 1145–1152.
- Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D., Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.*, 2006; 8(4): 315-317.
- Donovan J., Abraham D., Norman J. Platelet-derived growth factor signaling in mesenchymal cells. *Front Biosci*, 2013; 18: 106-19.
- Drago L., Bortolin M., Vassena C., Taschieri S., Del Fabbro M. Antimicrobial activity of pure platelet-rich plasma against microorganisms isolated from oral cavity. *BMC microbiology.*, 2013; 13 (1): 47.
- Durante C., Agostini F., Abbruzzese L.T., Toffola R., Zanolin S., Suine C., and Mazzucato M. Growth factor release from platelet concentrates: analytic quantification and characterization for clinical applications. *Vox sanguinis.*, 2013; 105(2): 129-136.
- Eisenberg S.P., Evans R.J., Arend W.P, Verderber E., Brewer M.T., Hannum C.H., Thompson R.C. Primary structure and functional expression from complementary DNA of a human interleukin-1 receptor antagonist. *Nature*, 1990; 343(6256): 341-6.
- El-Sharkawy H., Kantarci A., Deady J., Hasturk H., Liu H., Alshahat M., Van Dyke T.E. Platelet-rich plasma: Growth factors and pro- and anti-inflammatory properties. *J Periodontol.*, 2007; 78(4): 661–669.

- Everts P.A., van Zundert A., Schonberger J.P., Devilee R.J., Knape J.T.,. What do we use: Platelet-rich plasma or platelet–leukocyte gel? *J Biomed Mater Res A.*, 2008; 85(4): 1135–1136.
- Falanga V., Iwamoto S., Chartier M., Yufit T., Butmarc J., Kouttab N., Shraye D., Carson P. Autologous bone marrow-derived cultured mesenchymal stem cells delivered in a fibrin spray accelerate healing in murine and human cutaneous wounds. *Tissue Eng.*, 2007; 13: 1299–1312.
- Flanagan T.C., Sachweh J.S., Frese J., Schnöring, H., Gronloh, N., Koch, S., & Jockenhoevel, S. In vivo remodeling and structural characterization of fibrin-based tissue-engineered heart valves in the adult sheep model. *Tissue Eng Part A.*, 2009; 15: 2965–2976.
- Flores-Figueroa E., Montesinos J.J., Mayani H. Células troncales mesenquimales. *Rev Invest Clin.*, 2006; 58 (5): 498-511.
- Fortier L.A., Travis A.J. Stem cells in veterinary medicine. *Stem Cell Res Ther.*, 2011; 2(1): 9.
- Fröhlich M., Grayson W.L., Wan L.Q., Marolt D., Drobic M., Vunjak-Novakovic G. Tissue engineered bone grafts: biological requirements, tissue culture and clinical relevance. *Current stem cell research & therapy* 2008; 3(4):254.
- Gader A.G.M., Al Ghumlas A.K., Hussain M.F., Al Haidari A., White J.G. The ultrastructure of camel blood platelets: A comparative study with human, bovine, and equine cells. *Platelets.*, 2008; 19(1): 51-58.
- Gailit J., Clarke C., Newman D., Tonnesen M.G., Mosesson M.W., Clark R.A. Human fibroblasts bind directly to fibrinogen at RGD sites through integrin alpha (v) beta3. *Exp Cell Res.*, 1997; 232: 118–126.
- García M.M., Alfonso, C.C. Características estructurales y funcionales de las plaquetas. *Rev Cubana Angiol y Cir Vasc.*, 2000; 1(2): 132-41.
- Gassling, V.L.W., Açil, Y., Springer, I.N., Hubert, N. and Wiltfang, J. Platelet-rich Plasma and Platelet-rich fibrin in human cell culture. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology.*, 2009; 108: 48-55.
- Gassling V., Douglas T., Warnke P.H., Acil Y., Wiltfang J., Becker, S.T. Platelet-rich fibrin membranes as scaffolds for periosteal tissue engineering. *Clinical Oral Implants Research.*, 2010; 21: 543–549.
- Gassling V., Hedderich J., Açil Y., Purcz N., Wiltfang J., Douglas T. Comparison of platelet rich fibrin and collagen as osteoblast-seeded scaffolds for bone tissue engineering applications. *Clinical oral implants research.*, 2013; 24(3): 320-328.

- Gause W.C., Wynn T.A., Allen J.E. Type 2 immunity and wound healing: evolutionary refinement of adaptive immunity by helminthes. *Nat Rev Immunol.*, 2013; 13(8): 607-14.
- Gentry P., Burgess H., Wood D. Hemostasis in: Kaneko J.J., Harvey J.W., Bruss M.L. (Eds.). *Clinical biochemistry of domestic animals*. Academic press. 10 edit., 2008; 287-330.
- Gerard C., Forest M.A., Beauregard G., Skuk D., Tremblay, J.P. Fibrin gel improves the survival of transplanted myoblasts. *Cell Transplant.*, 2012; 21: 127–137.
- Giraldo C.E., López C., Álvarez M.E., Samudio I.J., Prades M. and Carmona J.U. Effects of the breed, sex and age on cellular content and growth factor release from equine pure-platelet rich plasma and pure-platelet rich gel. *BMC veterinary research.*, 2013; 9(1): 29.
- Guest D.J., Ousey J.C., Smith M.R. Defining the expression of marker genes in equine mesenchymal stromal cells. *Stem Cells Cloning.*, 2008; 1:1–9.
- Gupta V., Bains V.K., Singh G.P., Mathur A., Bains, R. Regenerative potential of platelet rich fibrin in dentistry: Literature review. *Asian Journal of Oral Health & Allied Sciences.*, 2011; 1: 23-8.
- Haase, R., Kirschning C.J., Sing A., Scrottner P., Fukase K., Kusumoto S., Wagner H., Heesemann J., Ruckdeschei K. A dominant role of Toll-like receptor 4 in the signaling of apoptosis in bacteria-faced macrophages. *J. Immunol.*, 2003; 171: 4294–4303.
- Hale B.W., Goodrich L.R., Frisbie D.D., McIlwraith C.W., and Kisiday J.D. Effect of scaffold dilution on migration of mesenchymal stem cells from fibrin hydrogels. *American journal of veterinary research.*, 2012; 73 (2): 313-318.
- Han. P, Cui Q., Yang S., Wang H., Gao P., Li Z. Tumor necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta1 facilitate differentiation and proliferation of tendon-derived stem cells in vitro. *Biotechnol Lett*; 2017; 2(10): 017-2296.
- Hartwig J., Italiano J. The birth of the platelet. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.*, 2003; 1(7): 1580-1586.
- He, L., Lin, Y., Hu, X., Zhang, Y. and Wu, H. A comparative study of platelet-rich fibrin (PRF) and platelet-rich plasma (PRP) on the effect of proliferation and differentiation of rat osteoblasts in vitro. - *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*, 2009; 108 (5): 707-13.
- Hendrickson D.A., Nixon A.J., Grande D.A., Todhunter R.J., Minor R.M., Erb, H., Lust G. Chondrocyte fibrin matrix transplants for resurfacing extensive articular cartilage defects. *J Orthop Res.*, 1994; 12: 485–497.

- Ho W, Tawil B, Dunn JCY, Wu BM. The behavior of human mesenchymal stem cells in 3D fibrin clots: dependence on fibrinogen concentration and clot structure. *Tissue Eng.*, 2006;12(6):1587-1595.
- Hoynowski, S.M., Fry M.M., Gardner B.M., Leming M.T., Tucker J.R., Black L., Theodore L.B., Mitchell K.E. Characterization and differentiation of equine umbilical cord-derived matrix cells. *Biochem Biophys Res Commun.*, 2007; 362(2): 347-53.
- Hsu C., Chang J. Clinical implications of growth factors in flexor tendon wound healing. *The Journal of hand surgery.*, 2004; 29(4): 551-563.
- Ibrahim S., Saunders K., Kydd J.H., Lunn D.P., Steinbach F. Screening of anti-human leukocyte monoclonal antibodies for reactivity with equine leukocytes. *Vet Immunol Immunopathol.*, 2007; 119:(1): 63-80.
- Italiano J.E., Hartwig J. Megakaryocyte development and platelet formation. *Platelets.*, 2007; 2: 23-44.
- Jorgensen B, Karlsmark T, Vogensen H, Haase L, Lundquist R. A pilot study to evaluate the safety and clinical performance of Leucopatch, an autologous, additive-free, platelet-rich fibrin for the treatment of recalcitrant chronic wounds. *Int J Low Extrem Wounds.*, 2011; 10(4): 218–23.
- Jurk K., Kehrel B.E. Platelets: physiology and biochemistry. In *Seminars in thrombosis and hemostasis.*, 2005; 31( 04): 381-392.
- Kang Y.H., Jeon S.H., Park J.Y., Chung J.H., Chung Y.H., Chung H.W., Kim E.S. Chung, P.H. Platelet-rich fibrin (PRF) is a bio-scaffold and reservoir of growth factors for tissue regeneration. *Tissue engineering.*, 2011; 7: 349-359.
- Karnieli O., Izhar-Prato Y., Bulvik S., Efrat S. Generation of insulinproducing cells from human bone marrow mesenchymal stem cells by genetic manipulation. *Stem Cells.*, 2007; 25 (11): 2837-2844.
- Keyhan S.O., Hemmat S., Badri A.A., Abdesahzadeh A., Khiabani K. Use of platelet-rich fibrin and platelet-rich plasma in combination with fat graft: which is more effective during facial liposuction? *J Oral Maxillofac Surg.*, 2013; 71(3): 610–21.
- Kisiday J.D., Hale B.W., Almodovar J.L., Lee C.M., Kipper M.J., Wayne M.C., Frisbie D.D. Expansion of mesenchymal stem cells on fibrinogen-rich protein surfaces derived from blood plasma. *J Tissue Eng Regen Med.*, 2011; 5: 600–611.
- Kobayashi M., Kawase T., Horimizu M., Okuda K., Wolff L.F., Yoshie, H. A proposed protocol for the standardized preparation of PRF membranes for clinical use. *Biologicals*, 2012; 40(5): 323-329.
- Kobayashi E., Flückiger L., Fujioka-Kobayashi M., Sawada K., Sculean, A., Schaller B., and Miron R.J. Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF. *Clinical oral investigations*, 2016; 20(9): 2353-2360.



- Koch T.G., Heerkens T., Thomsen P.D., Betts D.H. Isolation of mesenchymal stem cells from equine umbilical cord blood. *BMC Biotechnol.*, 2007; 7: 26.
- Koch T.G., Berg L.C., Betts D.H. Concepts for the clinical use of stem cells in equine medicine. *Can Vet J.*, 2008; 49(10): 1009-1017.
- Kode J.A., Mukherjee S., Joglekar M.V., Hardikar A.A. Mesenchymal stem cells: immunobiology and role in immunomodulation and tissue regeneration. *Cytotherapy.*, 2009; 11:377–391.
- Koerner, J., Nestic D., Romero J.D., Brehm W., Mainil-Varlet P., Grogan S.P. Equine peripheral blood-derived progenitors in comparison to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells.*, 2006; 24(6): 1613-9.
- Komarcević A. [The modern approach to wound treatment]. *Medicinski pregled.*, 1999; 53(7-8): 363-368.
- Körbling M., Estrov Z. Adult Stem Cells for Tissue Repair A New Therapeutic Concept? *N Engl J Med.*, 2003; 349: 570-582.
- Lee H.S., Huang G.T., Chiang H., Chiou L.L., Chen M.H., Hsieh C.H., Jiang C.C. Multipotential mesenchymal stem cells from femoral bone marrow near the site of osteonecrosis. *Stem Cells.*, 2003; 21(2): 190-199.
- Lee E.H., Kim J.Y., Kweon H.Y., Jo Y.Y., Min S.K.,; Park Y.W., Choi J.Y., Kim S.G. A combination graft of low molecular-weight silk fibro in with Choukroun platelet-rich fibrin for rabbit calvarial defect. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, 2010; 109(5): e33-38.
- Leibovich, S.J., Ross, R. The role of the macrophage in wound repair: A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *Am. J. Pathol.*, 1975; 78: 71–100.
- Leibovich, S.J., Ross, R. A macrophage-dependent factor that stimulates the proliferation of fibroblasts in vitro. *Am. J. Pathol.*, 1976; 84: 501–514.
- Levin J. The evolution of mammalian platelets. *Platelets.*, 2007; 1: 3-45.
- Lo, B., Parham L. Ethical issues in stem cell research. *Endocr Rev.*, 2009; 30(3): 204-13.
- Loh Q.L., Choong C. Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: Role of porosity and pore size. *Tissue Engineering Part B: Reviews.*, 2013; 19(6), 485-502.
- Lovati A.B., Corradetti B., Lange-Consiglio A., Recordati C., Bonacina E., Bizzaro D., Cremonesi F. Comparison of equine bone marrow-, umbilical cord matrix and amniotic fluid-derived progenitor cells. *Vet Res Commun.*, 2011; 35:103–121.
- Lundquist R., Dziegiel M.H., Agren M.S. Bioactivity and stability of endogenous fibrogenic factors in platelet-rich fibrin. *Wound Repair Regen.*, 2008; 16(3): 356-63.

- Lundquist R., Holmstrøm K., Clausen C., Jørgensen B., Karlsmark T. Characteristics of an autologous leukocyte and platelet-rich fibrin patch intended for the treatment of recalcitrant wounds. *Wound Repair Rege.*, 2013; 21(1): 66–76.
- Makhdom A.M., Hamdy R.C. The role of growth factors on acceleration of bone regeneration during distraction osteogenesis. *Tissue Engineering Part B: Reviews.*, 2013; 19(5): 442-453.
- Man A.J., Davis H.E., Itoh A., Leach J.K., Bannerman P. Neurite outgrowth in fibrin gels is regulated by substrate stiffness. *Tissue Eng Part A.*, 2011; 17: 2931–2942.
- Martin P., Leibovich S.J. Inflammatory cells during wound repair: The good, the bad and the ugly. *Trends Cell Biol.*, 2005; 15(11): 599–607.
- Marx R.E., Carlson E.R., Eichstaedt R.M., Schimmele S.R., Strauss J.E., Georgeff K.R. Platelet rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*, 1998; 85(6): 638-46.
- Mazor Z., Horowitz R.A., Del Corso M., Prasad H.S., Rohrer, M.D., Dohan Ehrenfest D M. Sinus floor augmentation with simultaneous implant placement using Choukroun's platelet-rich fibrin as the sole grafting material: a radiologic and histologic study at 6 months. *Journal of periodontology.*, 2009; 80(12): 2056-2064.
- McDuffee L.A., Gonzalez B.P.E., Nino-Fong R., Aburto E. Evaluation of an in vivo heterotopic model of osteogenic differentiation of equine bone marrow and muscle mesenchymal stem cells in fibrin glue scaffold. *Cell and tissue research.*, 2014; 355 (2): 327-335.
- Mensing N., Gasse H., Hambruch N., Haeger J.D., Pfarrer C., Staszyc C. Isolation and characterization of multipotent mesenchymal stromal cells from the gingiva and the periodontal ligament of the horse. *BMC veterinary research.*, 2011; 7(1), 42.
- Minciullo P.L, Catalano A., Mandraffino G., Casciaro M., Crucitti A., Maltese G., Morabito N., Lasco A., Gangemi S., Basile G. Inflammaging and Anti-Inflammaging: The Role of Cytokines in Extreme Longevity. *Arch Immunol Ther Exp.*, 2016; 64(2): 111-26.
- Miron R.J., Fujioka-Kobayashi M., Bishara M., Zhang Y., Hernandez M., and Choukroun J. Platelet-rich fibrin and soft tissue wound healing: a systematic review. *Tissue Engineering Part B.*, 2017; 23(1): 83-99.
- Mitchell J.B., McIntosh K., Zvonic S., Garrett S., Floyd Z.E., Kloster A., Di Halvorsen Y., Storms R.W., Goh B., Kilroy G. Wu X., Gimble J.M. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells.*, 2006; 24(2): 376-385.

- Molloy T., Wang Y., Murrell G.A. The roles of growth factors in tendon and ligament healing. *Sports Medicine.*, 2003; 33 (5): 381-394.
- Moojen D.J., Everts P.A., Schure R.M., Overdevest E.P., van Zundert A., Knappe J.T., Castelein R.M., Creemers L.B., Dhert W.J. Antimicrobial activity of platelet-leukocyte gel against *Staphylococcus aureus*. *J. Orthop. Res.*, 2008; 26(3): 404-410.
- Moroni L., Fornasari P.M. Human mesenchymal stem cells: a bank perspective on the isolation, characterization, and potential of alternative sources for the regeneration of musculoskeletal tissues. *J Cell Phys.*, 2013; 228:680–687.
- Murphy P.M. Chemokine receptors: structure, function and role in microbial pathogenesis. *Cytokine & growth factor review.*, 1996; 7(1), 47-64.
- Nauta A.J., Westerhuis G., Kruisselbrink A.B., Lurvink E.G.A., Willemze R., Fibbe W.E. Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting. *Blood*, 2006; 108(6): 2114-2120.
- Paebst F., Piehler D., Brehm W., Heller S., Schroeck C., Tárnok A., Burk J. Comparative immunophenotyping of equine multipotent mesenchymal stromal cells: An approach toward a standardized definition. *Cytometry Part A.*, 2014; 1-10.
- Paes Leme F.O., Wurzinger L.J., Vasconcelos A.C., Alves G.E. Ativação de plaquetas de equinos com laminite induzida e tratados com ketoprofeno, fenilbutazona e flunixin meglumina. *Arq. bras. med. vet. Zootec.*, 2006; 58(2): 149-157.
- Panday A, Inda M.E., Bagam P., Sahoo M.K, Osorio D., Batra S. Transcription Factor NF-kappaB: An Update on Intervention Strategies. *Arch Immunol Ther Exp.* 2016; 64(6): 463-483.
- Patel S.A., Sherman L., Munoz J., Rameshwar P. Immunological properties of mesenchymal stem cells and clinical implications. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis.*, 2008; 56(1): 1-8.
- Ranera B., Lyahyai J., Romero A., Vázquez F.J., Remacha A.R., Bernal M.L., Zaragoza P., Rodellar C., Martín-Burriel I. Immunophenotype and gene expression profiles of cell surface markers of mesenchymal stem cells derived from equine bone marrow and adipose tissue. *Veterinary immunology and immunopathology.*, 2011; 144(1), 147-154.
- Ranera B., Ordovas L., Lyahyai J., Bernal L.M., Fernandes F., Remacha A.R., Romero A., Vazquez F.J., Osta R., Cons C., Varona L., Zaragoza P., Martín-Burriel I., Rodellar C. Comparative study of equine bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. *Equine Vet J.*, 2012; 44(1): 33-42.

- Richardson L.E., Dudhia J., Clegg P.D., Smith R. Stem cells in veterinary medicine— attempts at regenerating equine tendon after injury. *Trends in biotechnology.*, 2007; 25(9): 409-416.
- Ríos D.L., Lopez C., Alvarez M.E., Samudio I.J., Carmona J.U. Effects over time of two platelet gel supernatants on growth factor, cytokine and hyaluronan concentrations in normal synovial membrane explants challenged with lipopolysaccharide. *BMC Musculoskelet Disord*, 2015; 16(1): 153.
- Rodríguez Pardo V.M. Células Madre: Conceptos generales y perspectivas de investigacion. *Universitas Scientiarum.*, 2005; 10(1): 5-14.
- Rozman P., Bolta Z. Use of platelet growth factors in treating wounds and soft-tissue injuries. *Acta demartolovenerologica Alpina panamericana et Adriatica*, 2007; 16(4): 156.
- Sánchez M., Albillos J., Angulo F., Santisteban J., Andia I. Platelet-rich plasma in muscle and tendon healing. *Operative Techniques in Orthopaedics.*,2012; 22(1): 16-24.
- Segura D., Monreal L., Pérez-Pujol S., Pino M., Ordinas A., Brugués R., White J.G., Escolar G. Assessment of platelet puncture in horses: Ultrastructure, flow cytometry, and perfusion techniques. *J Vet Intern Med.*, 2006; 20: 581–588.
- Schär M.O., Diaz-Romero J., Kohl S., Zumstein M.A., and Nesic D. Platelet-rich concentrates differentially release growth factors and induce cell migration in vitro. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 2015; 473(5): 1635-1643.
- Schmidt M.B., Chen E.H., Lynch S.E. A review of the effects of insulin-like growth factor and platelet derived growth factor on in vivo cartilage healing and repair. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2006; 14: 403-12.
- Sedger L.M., McDermott M.F. TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants - past, present and future. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2014; 25(4): 453-72.
- Shi L., Dong N., Fang X., Wang X. Regulatory mechanisms of TGF-beta1-induced fibrogenesis of human alveolar epithelial cells. *J Cell Mol Med*, 2016; 20(11): 2183-2193
- Siegel G., Schäfer R., Dazzi F. The immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells. *Transplantation.*, 2009; 87(9S): S45-S49.
- Silva A., and Sampaio R. Anatomic ACL reconstruction: does the platelet-rich plasma accelerate tendon healing? *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, 2009; 17:676-682.
- Simonpieri A, Del Corso M, Sammartino G, Dohan Ehrenfest DM. The Relevance of Choukroun's Platelet-Rich Fibrin and Metronidazole during Complex Maxillary

Rehabilitations Using Bone Allograft. Part I: A New Grafting Protocol. *Implant Dent.*, 2009b; 18: 102-11.

- Simonpieri A, Del Corso M, Sammartino G, Dohan Ehrenfest D.M. The Relevance of Choukroun's Platelet-Rich Fibrin and Metronidazole during Complex Maxillary Rehabilitations Using Bone Allograft. Part II: Implant Surgery, Prosthodontics, and Survival. *Implant Dent.*, 2009a; 18 : 220-9.
- Simonpieri, A., Choukroun J., Del Corso M., Sammartino G., Dohan Ehrenfest D.M. Simultaneous sinus-lift and implantation using microthreaded implants and leukocyte- and platelet-rich fibrin as sole grafting material: a six-year experience. *Implant Dent.*, 2011; 20(1): 2-12.
- Simonpieri A., Del Corso M., Vervelle A., Jimbo R., Inchingolo F., Sammartino G.M., Dohan Ehrenfest D. Current knowledge and perspectives for the use of platelet-rich plasma (PRP) and platelet-rich fibrin (PRF) in oral and maxillofacial surgery part 2: Bone graft, implant and reconstructive surgery. *Current pharmaceutical biotechnology.*, 2012; 13 (7): 1231-1256.
- Spaas J.H., De Schauwer C., Cornillie P., Meyer E., Van Soom A., Van de Walle G.R. Culture and characterization of equine peripheral blood mesenchymal stromal cells. *Vet J.*, 2013; 195:107–113.
- Su C.Y., Kuo, Y.P., Tseng Y.H., Su C.H., Burnouf T. *In vitro* release of growth factors from platelet-rich fibrin (PRF): a proposal to optimize the clinical applications of PRF. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, 2009; 108(1): 56-61.
- Sunitha Raja V., Munirathnam Naidu E. Platelet-rich fibrin: evolution of a second-generation platelet concentrate. *Indian J Dent Res.*, 2008; 19: 42-6.
- Sutton M.T., Bonfield T.L. Stem Cells: Innovations in Clinical Applications. *Stem Cells International.*, 2014; 2014.
- Tablin, F. Platelet structure and function. *Schalm's Veterinary Hematology. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Company.*, 2000; 448-452.
- Tan Y., Qi Q., Lu C., Niu X., Bai Y., Jiang C., Wang Y., Zhou Y., Lu A., Xiao C. Cytokine imbalance as a common mechanism in both psoriasis and rheumatoid arthritis. *Mediators Inflamm.*, 2017; 2405291(10): 25.
- Taylor S.E., Smith R.K.W., Clegg P.D. Mesenchymal stem cell therapy in equine musculoskeletal disease: scientific fact or clinical fiction? *Equine Vet J.*, 2007; 39(2): 172-180.
- Textor J.A., Norris J.W., Tablin, F. Effects of preparation method, shear force, and exposure to collagen on release of growth factors from equine platelet-rich plasma. *American journal of veterinary research.*, 2011; 72(2): 271-278.

- Textor J.A., Murphy K.C., Leach J.K., Tablin F. Ultrastructure and growth factor content of equine platelet-rich fibrin gels. *American journal of veterinary research.*, 2014; 75(4): 392-401.
- Timeus F., Crescenzo N., Basso G., Ramenghi U., Saracco P., Gabutti V. Cell Adhesion Molecule Expression in Cord Blood CD34+ Cells. *Stem Cells.*, 1998; 16: 120-126.
- Toffler M., Toscano N., Holtzclaw D., Corso M. D., Ehrenfest D.D. Introducing Choukroun's platelet rich fibrin (PRF) to the reconstructive surgery milieu. *J Implant Adv Clin Dent.*, 2009; 1(6), 21-32.
- Tofuku K., Koga H., Yanase M., Komiya, S. The use of antibiotic-impregnated fibrin sealant for the prevention of surgical site infection associated with spinal instrumentation. *European Spine Journal.*, 2012; 21(10): 2027-2033.
- Torricelli P., Fini M., Filardo G., Tschon M., Pischedda M., Pacorini A., Kon E., and Giardino R. Regenerative medicine for the treatment of musculoskeletal overuse injuries in competition horses. *International orthopaedics.*, 2011; 35 (10): 1569-1576.
- Toupadakis C.A., Wong A., Genetos D.C., Cheung W.K., Borjesson D.L., Ferraro G.L., Galuppo L.D., Leach J.K., Owens S.D., Yellowley C.E. Comparison of the osteogenic potential of equine mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, umbilical cord blood, and umbilical cord tissue. *Am J Vet Res.*, 2010; 71:1237–1245.
- Uccelli A., Pistoia V., Moretta L. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression? *Trends Immunol.*, 2007; 28(5): 219-226.
- Uebersax L., Hagenmüller H., Hofmann S., Gruenblatt E., Müller, R., Vunjak-novakovic G., Kaplan D.I., Merkle H.P., and Meinel, L. Effect of scaffold design on bone morphology in vitro. *Tissue engineering.*, 2006; 12 (12): 3417-3429.
- van Hinsbergh, V.W.; Collen, A.; Koolwijk, P. Role of fibrin matrix in angiogenesis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2001; 936: 426-437.
- Vidal M.A., Kilroy G.E., Johnson J.R., Lopez M.J., Moore R.M., Gimble J.M. Cell growth characteristics and differentiation frequency of adherent equine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity. *Vet Surg.*, 2006; 35(7): 601-10.
- Vidal, M.A., Kilroy G.E., Lopez M.J., Johnson J.R., Moore R.M., Gimble J.M. Characterization of equine adipose tissue-derived stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity and comparison with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Vet Surg.*, 2007; 36(7): 613-22.

- Virchenko O., Grenegård M., Aspenberg P. Independent and additive stimulation of tendon repair by thrombin and platelets. *Acta orthopaedica.*, 2006; 77(6): 960-966.
- Visser, L.C., Arnoczky, S.P., Caballero, O. and Egerbacher, M. Platelet-Rich Fibrin Constructs Elute Higher Concentrations of Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 and Increase Tendon Cell Proliferation Over Time when Compared to Blood Clots: A Comparative In Vitro Analysis. *Veterinary Surgery.*, 2010; 39: 811-817.
- Wang M., Yang Y., Yang D., Luo F., Liang W., Guo S., Xu J. The immunomodulatory activity of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in vitro. *Immunology.*, 2008; 126:220–232.
- Wang M., Li J., Liu J., Lin X., Xu W. The comparison of platelet-rich fibrin and platelet-rich plasma in releasing of growth factors and their effects on the proliferation and differentiation of adipose tissue-derived stem cells in vitro], *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. West China journal of stomatology*, 2012; 30(6): 641-4.
- Weibrich G., Kleis W.K., Buch R., Hitzler W.E., Hafner G. The Harvest Smart PRePTM system versus the Friadent-Schutze platelet-rich plasma kit. *Clin Oral Implants Res.*, 2003; 14(2): 233–239.
- Werther K., Christensen I.J., Nielsen H.J. Determination of vascular endothelial growth factor (VEGF) in circulating blood: Significance of VEGF in various leucocytes and platelets. *Scand J Clin Lab Invest.*, 2002; 62(5): 343–350.
- White J.G. Platelet structure. *Platelets.*, 2007; 2: 45-73.
- Woo S.L.Y., Debski R.E., Zeminski J., Abramowitch S.D., Chan Saw S.S., Fenwick, J.A. Injury and repair of ligaments and tendons. *Annual review of biomedical engineering.*, 2000; 2(1): 83-118.
- Yang K.C., Wang C.H., Chang H.H., Chan W.P., Chi C.H., Kuo T.F. Fibrin glue mixed with platelet - rich fibrin as a scaffold seeded with dental bud cells for tooth regeneration. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 2012; 6 (10): 777-785.
- Ye, R. D., Boulay, F. Structure and function of leukocyte chemoattractant receptors. *Advances in pharmacology.*, 1997; 39: 221-289.
- Yoo K.H., Jang I.K., Lee M.W., Kim H.E., Yang M.S., Eom Y., Lee J.E., Kim Y.J., Jung H.L., Sung K.W., Kim C.W., Koo H.K. Comparison of immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from adult human tissues. *Cell Immunol.*, 2009; 259:150–156.
- Zachos T.A., Bertone A.L. Growth factors and their potential therapeutic applications for healing of musculoskeletal and other connective tissues. *American journal of veterinary research.*, 2005; 66(4): 727-738.

- Zandim, B.M., Souza, M.V., Magalhães, P.C., Benjamin, L.A., Maia, L., Oliveira, A.C., Pinto, J.O. and Ribeiro Júnior, J.I. (Platelet activation: ultrastructure and morphometry in platelet-rich plasma of horses. *Pesquisa Veterinária Brasileira.*, 2012; 32: 83-92.
- Zhao Q.M., Ding Y.J., Si T. Platelet rich fibrin in plastic surgery. *OA Evidence-Based Medicine.*, 2013; 1(1): 3.
- Zumstein M.A., Bielecki T., Dohan Ehrenfest D.M. The future of platelet concentrates in sports medicine: platelet-rich plasma, platelet-rich fibrin, and the impact of scaffolds and cells on the long-term delivery of growth factors. *Operative Techniques in Sports Medicine.*, 2011; 19(3): 190-197.
- Zumstein M.A., Rumian A., Lesbats V., Schaer M., Boileau, P. Increased vascularization during early healing after biologic augmentation in repair of chronic rotator cuff tears using autologous leukocyte-and platelet-rich fibrin (L-PRF): a prospective randomized controlled pilot trial. *Journal of Shoulder and Elbow Surgery.*, 2014; 23(1): 3-12.