

MEDICINA REGENERATIVA: APLICACIÓN EN LA CLÍNICA EQUINA

Vázquez FJ¹, Romero A¹, Rodellar C²

1.- Dpto. de Patología Animal. Servicio de Cirugía y Medicina Equina. Hospital Veterinario. Universidad de Zaragoza

2.- Laboratorio de Genética Bioquímica. Universidad de Zaragoza

1.1.- ¿QUÉ ES LA MEDICINA REGENERATIVA?

Medicina regenerativa es el proceso de reemplazar o regenerar las células, tejidos u órganos para conseguir restaurar o restablecer una función normal.

Por lo tanto este campo de la medicina se encarga de regenerar tejidos/órganos que hasta hace poco se consideraban irreparables, bien sea:

- estimulando los propios mecanismos del cuerpo para reparar esos tejidos dañados mediante:
 - células progenitoras o “células madre” (terapia celular)
 - moléculas activas:
 - administradas solas (factores de crecimiento)
 - secretadas por células (terapia de inmunomodulación)
- reemplazando la matriz extracelular dañada, permitiendo a la lesión a curar por sí misma o mejorando la acción de alguno de los mecanismos anteriores (mallas biológicas, scaffolds)
- reemplazándolos completamente por tejidos/órganos creados *in vitro* (ingeniería de tejidos)

El objetivo final de estas terapias es llegar a alcanzar una curación funcional total y pasar de la simple cicatrización a la completa regeneración.

La Medicina Regenerativa comenzó en 1957 con los trabajos de Ed. Thomas con trasplante de médula ósea (Células madre hematopoyéticas) que le valieron el Premio Nobel de Medicina en 1990.

En los años 70: Friedstein describió por primera vez la presencia de células adherentes en la médula ósea (UFCF) capaces de originar hueso y cartílago. A lo largo de los 80 se fueron caracterizando estas células y el propio Friedstein en 1987 demuestra *in vitro* sus propiedades (proliferación, autorrenovación y multipotencialidad) y las denomina por primera vez como “célula troncal estromal” (*mesenchymal stem cell*) = célula madre mesenquimal

Fortier y cols en 1998 aíslan, cultivan y expanden células madre mesenquimales equinas.

1.2.- ¿QUÉ “PRODUCTOS” EMPLEAMOS EN MEDICINA REGENERATIVA EQUINA?

1.2.1.- CELULAS MADRE (MSCs)

1.2.1.1.- ¿QUÉ SON LAS CÉLULAS MADRE?

Las Células Madre son células indiferenciadas con elevado potencial proliferativo y con la doble capacidad de:

- Autorrenovarse, es decir, formar células idénticas a las células originarias
- Diferenciarse, es decir, ser capaces de generar uno o más tipos celulares especializados

Su función biológica es:

- La creación de estructuras orgánicas durante el desarrollo del individuo
- La regeneración de tejidos dañados, enfermos o envejecidos

La correcta nomenclatura de las “células madre” debería ser células troncales o células progenitoras; el adjetivo de “madre” es una denominación “emocional” que se le ha dado en España desde los años 90. En otros idiomas no se usa esta “terminología”: *Stem cells, Cellules souches, Celule staminali...*

Según su origen, pueden ser:

- Células madre embrionarias
- Células madre adultas

Entre ambos extremos encontramos las células madres de origen fetal, amnióticas y provenientes del cordón umbilical.

Las células madre embrionarias son totipotentes, es decir, pueden dar lugar a todas y cada una de las posibles poblaciones celulares que existen en el organismo adulto.

Las células madre adultas (o somáticas) pueden ser de dos tipos: hematopoyéticas y mesenquimales.

Las células madre hematopoyéticas sólo se consideran multipotentes, ya que pueden dar lugar a varias poblaciones celulares, pero todas de la misma línea, de la serie hematopoyética.

Las células madre mesenquimales, en cambio, se consideran pluripotentes, ya que aunque no pueden dar lugar a todas las líneas celulares (totipotencia), sí que pueden originar células de al menos 2 linajes embrionarios distintos (mesodermo, ectodermo)

Estas MSCs, por lo tanto, son células pluripotentes, adultas, con morfología fibroblastoide, con capacidad de autorrenovarse y formar colonias celulares y con la propiedad de diferenciarse hacia diversos linajes celulares (mínimo 3). Esta capacidad se denomina plasticidad.

En el año 2006 la ISCT (*International Society for Cellular Therapy*) propone 3 criterios para definir las MSCs humanas:

- Adherentes en placa de cultivo
- Capaces de diferenciarse in vitro a al menos 3 linajes celulares: osteoblastos, adipocitos y condrocitos
- Expresar determinados antígenos de superficie y no expresar los antígenos hematopoyéticos

1.2.1.2.- ¿CÓMO Y DE DÓNDE SE OBTIENEN LAS MSCs EQUINAS?

Las MSCs equinas pueden obtenerse de médula ósea (Fortier et al, 1998), grasa subcutánea (Vidal et al, 2007), sangre del cordón umbilical (Koch et al, 2007) y sangre periférica (Koerner et al, 2006), aunque las fuentes más habituales en la clínica son las dos primeras:

Para obtener MSCs de la médula ósea esternal, con el caballo bajo sedación y anestesia local de la zona, se localiza el espacio interesternal mediante ecografía. A través de ese espacio y tras la preparación aséptica de la región, se introduce hasta la médula de la esternebra una aguja de Jameshdi y se aspira la médula ósea en jeringuillas precargadas con heparina. En el laboratorio las células son aisladas mediante centrifugación en gradiente de Ficoll

La obtención de MSCs de grasa subcutánea de la base de la cola se realiza con el animal sedado e infiltración de anestésico local, se incide la piel junto al maslo y, tras disecar el subcutáneo se obtienen unos 30 grs de tejido adiposo que se depositan en un recipiente estéril con PBS. En el laboratorio las células son aisladas tras un proceso de digestión controlada de la grasa con colagenasa.

Las células se expanden (cultivan) bajo condiciones específicas y de total asepsia. Una vez que las células han llegado a confluencia (Pase 0) se utiliza su capacidad para adherirse al plástico de las placas de cultivo para aislarlas, lavando la placa y resemebrando las células adheridas.

Generalmente son necesarias unas 3 semanas y al menos 3 pases para alcanzar una cantidad de 20 o 30 millones de MSCs.

1.2.1.3.- ¿CÓMO SE CREE QUE FUNCIONAN LAS CÉLULAS MADRE?

Todavía falta mucho para conocer como ayudan a regenerar los tejidos las MSCs...

Parece ser que sus efectos derivarían de la doble acción de:

a) Integrarse en el tejido dañado. En este procesos se solapan diferentes fenómenos:

- *“Homing”* (migración): capacidad de las MSCs de dirigirse hacia los tejidos diana desde el torrente circulatorio
- *“Engraftment”* (injerto): capacidad de incorporarse a un tejido u órgano; no implica necesariamente funcionalidad celular
- *“Niche”* (nidación): ambiente que permite que las células se diferencien (factores tanto paracrinos como autocrinos) => repercusión funcional

b) Efectos secretores de moléculas activas. Parece ser, no obstante, que la actividad regenerativa de las MSCs es, sobre todo, por sus efectos paracrinos y de señalización celular (Caplan, 2009) y no tanto por su capacidad de diferenciación/proliferación en su “nicho”. Los principales efectos de la actividad terapéutica y regenerativa de las MSCs son:

- Antiapoptosis
- Angiogénesis

- Quimioatracción
- Efecto anti-fibrosis (*anti-scarring*)
- Permitir el crecimiento y diferenciación de las células progenitoras
- Inmunomodulación: este es uno de los efectos en los que más se está trabajando debido a sus posibles implicaciones clínicas:
 - alto poder antiinflamatorio en fases agudas
 - posibilidad de usar MSCs alogénicas (bancos de células criopreservadas)
 - enfermedades inmunomediadas

1.2.1.4.- ¿CÓMO SE ESTÁN UTILIZANDO LAS CÉLULAS MADRE EN CLINICA EQUINA?

Los tejidos poco vascularizados del aparato locomotor del caballo (tendones/ligamentos, cartílago) con escasa capacidad de regeneración, son las principales dianas de la medicina regenerativa equina.

Las fuentes habituales de MSCs para uso clínico en caballos son la médula ósea y la grasa aunque los resultados de algunos trabajos (Frisbie et al, 2009) podrían inclinar la balanza a favor de la médula.

Los trabajos de R. Smith del RVCS y la comercialización de MSCs autólogas equinas por la empresa *Vet-Cell* han impulsado y permitido el tratamiento en toda Europa de centenares de casos clínicos de tendinitis del TFSD y desmitis del LSM con esta terapia regenerativa.

En los últimos años hemos asistido a la publicación de numerosos estudios *in vitro* e *in vivo*, con lesiones naturales e inducidas que demuestran la eficacia de estos tratamientos a nivel ecográfico, clínico, funcional, biomecánico, histológico bioquímico y en lo referente a la tasa de recaída.

Tal vez una de las muchas cuestiones que quedan por resolver es cuándo se debe aplicar este tratamiento tras la lesión aguda. Una de las posibles desventajas de este enfoque terapéutico es que se necesitan al menos 3 semanas de cultivo celular. Los recientes trabajos sobre el uso de MSCs equinas de origen alogénico, permitirían superar este obstáculo.

El tratamiento de la osteoartritis es, probablemente, uno de los campos en el que más esperanzas se han depositado en el uso de las MSCs, no sólo por el propio interés para la especie equina y la industria del caballo, sino también por la idoneidad de este modelo animal para la especie humana, que fue reconocida en hace unos años por la FDA norteamericana.

El uso intrarticular de las células madre en caballos se plantea con dos posibilidades: o bien inyección directa de las MSCs en suspensión en la articulación, o bien el depósito de las células directamente en el defecto cartilaginoso, utilizando *scaffolds* y/o “pegamentos” biológicos.

Hasta el momento los trabajos publicados muestran más evidencias de efecto antiinflamatorio e inmunomodulador que de regeneración cartilaginosa propiamente dicha, aunque numerosos casos muestran una mejoría clínica empírica.

En definitiva, desde hace unos años el uso de las MSCs ha irrumpido con fuerza en la ortopedia equina, tanto a nivel investigador como clínico, pese a que algunos autores muestran su escepticismo ante la “sobrevaloración” que se ha podido depositar en sus beneficios: “*Is ‘Stem Cell Therapy’ Becoming 21st Century Snake Oil?*” (Jeffery y Granger, 2012)

1.2.1.5.- CUESTIONES POR RESOLVER. LINEAS FUTURAS DE TRABAJO

- ¿Cuál es la cantidad adecuada de MSCs?
- ¿Cuál es el mejor origen de MSCs para las distintas lesiones?
- ¿Cuántos tratamientos?, ¿qué periodicidad?
- ¿En qué momento de la lesión (agudas, subagudas, crónicas)?
- ¿Posibilidad de utilizar MSCs alogénicas (bancos de MSCs)?
- ¿Posibilidad de obtener MSCs suficientes de sangre periférica?
- Clarificar si predomina la integración celular vs señalización
- Inmunomodulación...

1.2.2.- NO TODOS LOS TRATAMIENTOS REGENERATIVOS SON MSCs

Entre el público en general, y entre nuestros clientes en particular, existe una gran confusión en lo referente a los “materiales” que podemos usar en medicina regenerativa. Debido a su uso en algunos afamados deportistas de elite y la divulgación científica, es habitual encontrar propietarios que confunden, por ejemplo, MSCs con PRPs; este fenómeno se ve aumentado si incluimos algunos enfoques terapéuticos más recientes, a los cuales denominamos casi siempre con complicados acrónimos desde el inglés: IRAP, PRF, AD-SVF...

Tratando de aclarar este confuso conjunto de siglas, podemos tratar de diferenciar en función de si el producto utilizado contiene o no células progenitoras:

- “Productos” que SI que contienen células progenitoras. Este grupo, a su vez puede subdividirse en:
 - o Células progenitoras aisladas y expandidas (cultivadas) = son las **MSCs** que ya hemos conocido, inoculamos altas cantidades de células progenitoras. La literatura científica comienza a reservar el término de *expanded regenerative medicine* para estas terapias, reservando el de *non-expanded regenerative medicine* para el resto:
 - o **Fracciones celulares no expandidas** (sin cultivo tras su obtención): se inoculan células progenitoras pero en cantidades muy reducidas
- “Productos” que sólo contienen moléculas activas (SIN células progenitoras) = generalmente los denominamos **factores de crecimiento**

1.2.2.1.- FRACCIONES CELULARES NO EXPANDIDAS

Se trata de materiales autólogos, obtenidos directamente del propio caballo, en los que sabemos que si que existe una cierta cantidad de células progenitoras, pero que no han sido cultivadas y expandidas. Su disponibilidad es prácticamente inmediata, sin necesidad de esperar al menos 3 semanas para obtener millones de células, lo cual significa un coste de obtención muchísimo menor y se evitan estrictas regulaciones sanitarias (humana). En contrapartida, con estas terapias, la cantidad de células troncales que inoculamos es muy escasa, tal vez sub-terapéutica (Frisbie and Smith, 2010).

1.2.2.1.1.- *Aspirado de médula ósea sin cultivar*

Uno de los trabajos que más contribuyó a impulsar el interés por la medicina regenerativa en clínica equina fue una comunicación de Herthel y colaboradores presentada en la convención anual de la AAEP en 2001 en el que, precisamente, utilizaba este material para tratar caballos con desmitis del LSM, obteniendo mejores resultados que los descritos en la bibliografía.

La médula esternebral se obtiene de manera sencilla, en condiciones de campo, con una aguja de Jameshdi. Como ya se ha comentado, en este producto tenemos una cantidad muy reducida de células progenitoras, pero además parece ser que hay una alta cantidad de moléculas activas y factores de crecimiento, aunque, desgraciadamente, no se suelen cuantificar ni caracterizar, por lo que los resultados son difícilmente extrapolables. No obstante la sencillez de su obtención y bajo coste hace que algunos cirujanos lo utilicen como coadyuvante en osteosíntesis, artrodesis, maxilofacial... y que los clínicos equinos lo estén utilizando en algunas lesiones tendinológicas, a pesar de que en alguna ocasión se ha sugerido la posibilidad de que las espículas óseas presenten favorezcan la diferenciación de islotes óseos en las zonas tratadas.

1.2.2.1.2.- *Fracción vascular estromal derivada de grasa (AD-SVF)*

En 2001 el equipo de Zuk y colaboradores publicó los resultados de sus trabajos en los que había conseguido aislar del tejido adiposo humano unas células de aspecto similar a las células madre mesenquimales y que habían podido diferenciarse a diferentes linajes celulares.

La empresa norteamericana *Vet-stem* comenzó a comercializar un preparado autólogo, obtenido de tejido adiposo de caballo, al que se denominó Fracción Vascular Estromal (SVF en inglés) el cual contiene, entre otras células mononucleadas, MSCs sin expandir. Se trata por lo tanto, de nuevo, de un preparado relativamente rápido de obtener (no necesita cultivo), pero con un escaso número de células progenitoras.

La empresa comercializadora y diferentes trabajos (Harman et al., 2006) reportan el uso de este preparado en numerosas lesiones tanto naturales como inducidas (Nixon et al., 2008) de tendones y ligamentos del caballo, sin ningún efecto adverso. Desde entonces las sensaciones clínicas de numerosos veterinarios parecen corroborar estos resultados.

En 2009 Frisbie y su equipo trataron carpos de caballos con un modelo de osteoartritis inducida, comparando placebo, AD-SVF y MSCs obtenidas de médula ósea. No se encontraron efectos adversos, pero no hubo diferencias significativas entre los

animales control y los tratados con células no cultivadas provenientes de grasa; sin embargo, el nivel de PGE2 fue menor en las articulaciones tratadas con MSCs provenientes de médula.

1.2.2.2.- FACTORES DE CRECIMIENTO

Los factores de crecimiento (*growth factors*) son sustancias naturales producidas por el organismo, capaces de estimular el crecimiento celular, la proliferación y la diferenciación celular. Normalmente son proteínas u hormonas. Estos factores de crecimiento son unas moléculas activas sumamente importantes para la regulación de una gran variedad de procesos celulares. Los factores de crecimiento normalmente actúan como moléculas de señalización entre células uniéndose a receptores específicos en la superficie de sus células diana. Los efectos sobre la diferenciación y la maduración celular, varían entre los diferentes tipos de factores de crecimiento, por ejemplo: las proteínas morfogénicas óseas estimulan la diferenciación celular de hueso, mientras que los factores de crecimiento de fibroblastos y factores de crecimiento endoteliales vasculares estimulan la diferenciación y neoformación de vasos sanguíneos (angiogénesis).

La cantidad de factores de crecimiento conocidos es muy grande y su número se amplía constantemente con las nuevas investigaciones. Algunos ejemplos son: *Angiopoietin (Ang)*, *Bone morphogenetic proteins (BMPs)*, *Epidermal growth factor (EGF)*, *Erythropoietin (EPO)*, *Fibroblast growth factor (FGF)*, *Growth differentiation factor-9 (GDF9)*, *Insulin-like growth factor (IGF)*, *Interleukines (IL)*, *Migration-stimulating factor*, *Myostatin (GDF-8)*, *Nerve growth factor (NGF) and other neurotrophins*, *Placental growth factor (PlGF)*, *Platelet-derived growth factor (PDGF)*, *Transforming growth factor alpha (TGF- α)*, *Transforming growth factor beta (TGF- β)*, *Tumor-necrosis-factor-alpha (TNF- α)*, *Vascular endothelial growth factor (VEGF)*...

El uso de estos factores en medicina regenerativa equina se ha visto incrementado en los últimos años gracias a nuevos métodos de obtención y concentración de estas moléculas a partir de la propia sangre de los caballos, abaratando enormemente su uso con respecto a algunos factores comerciales exógenos (como el IGF-1).

1.2.2.2.1.- Sobrenadante de médula ósea esternal

Tras el trabajo de Herthel en 2001, muchos clínicos consideraron que el principal efecto beneficioso de la médula ósea esternal era debido, no a sus escasas células progenitoras de la fracción celular, sino a la gran concentración de factores de crecimiento de la fracción acelular que se obtiene tras la centrifugación de la médula. Existen numerosas experiencias clínicas que sugieren que el uso de este sobrenadante es beneficioso aplicado intralesionalmente o de manera periligamentaria o peritendinosa, pero, desgraciadamente, no existen demasiados ensayos clínicos controlados que demuestren estos efectos y que caractericen el verdadero contenido en factores de crecimiento de este sobrenadante.

No obstante la sencillez y el bajo coste de su obtención, hace que sigan siendo muchos los veterinarios de caballos que lo utilizan sobre todo en lesiones de ligamentos, sobre todo después de conocer los resultados del trabajo de Schnabel y colaboradores en 2008, en el que se obtenían mejores resultados *in vitro* sobre explantes de LSM con la fracción acelular de médula ósea que con los PRPs.

1.2.2.2.2.- Fracción de Plasma Rico en Plaquetas (PRP)

Los trabajos del odontólogo vasco E. Anitua de finales de los 90 y principios de los 2000 fueron algunos de los que más contribuyeron al enorme interés de la medicina regenerativa por este tipo de factores de crecimiento derivados del sistema de coagulación y obtenidos de la propia sangre del paciente. Muchos de estos factores son liberados por las plaquetas. Esta metodología se basa, por lo tanto, en aumentar la concentración en plaquetas del plasma (mediante centrifugación), incrementando así su concentración en diversas moléculas activas derivadas de estas células sanguíneas.

Las plaquetas son una fuente vital de factores de crecimiento, quimioquinas y citoquinas, que son liberados durante los procesos reparativos que ocurren en las primeras fases de la reparación de la lesión. Se cree que la liberación de factores de crecimiento desde los concentrados de plaquetas imita (e incluso mejora) los procesos fisiológicos de la coagulación y reparación de la herida, estimulando así la regeneración intrínseca de los tejidos en la que plaquetas endógenas son esenciales. Estos factores plaquetarios también pueden estimular la quimiotaxis de macrófagos, la angiogénesis, la proliferación y la migración de fibroblastos y la síntesis de colágeno. Tras la activación de las plaquetas, los gránulos alfa contenidos en su citoplasma inician un proceso de degranulación y liberan una serie de factores de crecimiento. Algunos de estos son conocidos por participar en la curación de tejidos blandos e incluyen PDGF, IGF-I y IGF-II, TGF- β 1, VEGF, FGF y PDEGF. Otros factores de crecimiento presentes en las plaquetas parece que son más importantes para la reparación del hueso y el cartílago: Oc, On), Fn, y TSP-1.

Existen diferentes métodos de obtener Plasma rico en Plaquetas o Fracción de Plasma Rico en Plaquetas (PRP). Todos ellos se basan en la centrifugación de sangre obtenida de la yugular del caballo en tubos citratados. Algunos métodos pueden realizarse con equipamiento "básico" de laboratorio (centrífuga, cámara de flujo laminar), como el "método de la doble centrifugación" desarrollado por el equipo de M. Prades (Argüelles et al, 2006). Otros, en cambio utilizan sistemas comerciales para separar la fracción rica en plaquetas (inmediatamente por encima de la capa de glóbulos blancos tras la centrifugación).

Existe una enorme variabilidad entre la concentración de plaquetas (y por tanto de factores de crecimiento) obtenidos entre los diferentes métodos. Esta es una de las causas por la que es complicado estandarizar los métodos y hacer estudios comparativos de los resultados. Además muchos de los sistemas comerciales existentes no sólo no garantizan una concentración adecuada de plaquetas (de 4 a 5 veces) sino que incluso permiten que en el concentrado resultante se incluyan leucocitos, responsables de marcados efectos adversos en algunos usos de los PRPs.

En función del uso que vaya a darse al PRP, puede utilizarse como líquido o como gel (añadiendo Ca o trombina).

En medicina humana los PRPs se están utilizando en implantología dental y en lesiones de ligamentos y tendones de deportistas. Precisamente este último es el uso más habitual en clínica equina, existiendo multitud de trabajos tanto *in vitro* como *in vivo* (lesiones naturales e inducidas mediante cirugía o colagenasa) que evidencian su utilidad en el tratamiento de lesiones en el TFSD, LSM y otros tendones y ligamentos. Estos trabajos demuestran no sólo una recuperación ecográfica más rápida, sino

también una mejor reparación funcional con una menor tasa de recidiva de las lesiones.

Los PRPs se inyectan intralesionalmente (si es preciso guiándose por ecografía) una o varias veces, aunque trabajos recientes (Bosch y colaboradores, 2010 y 2011) demuestran un marcado efecto de angiogénesis y reparación de lesiones tendinosas creadas de manera quirúrgica. En estos estudios el efecto tiene una duración prolongada pese a administrarse un único tratamiento con PRPs, lo cual parece sugerir que podría ser suficiente con una única administración.

Pese a que está mucho menos extendido su uso, los PRPs también se están utilizando en el tratamiento de la enfermedad degenerativa articular equina. Diferentes trabajos en medicina humana muestran un marcado efecto beneficioso de los PRP en articulaciones con osteoartritis. Parece ser que los beneficios de este tratamiento se deben a una marcada actividad antiinflamatoria. Uno de los pocos trabajos existentes en clínica equina fue publicado por el grupo de M. Prades (Carmona et al, 2008) que trataron 5 caballos con DJD con inyecciones intraarticulares seriadas, obteniendo mejoría clínica hasta 8 meses tras el tratamiento.

Por último, la utilización de geles de PRP en el tratamiento de heridas cutáneas es otro uso menos llamativo pero también muy eficaz de esta fuente de factores de crecimiento.

1.2.2.2.3.- Suero autólogo condicionado (IRAP)

La erosión del cartílago y los efectos catabólicos de la enfermedad degenerativa articular son iniciados y activados por citoquinas proinflamatorias, entre las que juega un papel destacado la Interleuquina 1 (IL-1). Este mediador es especialmente activo en la especie equina; en los caballos con osteoartritis los receptores de IL-1 aumentan significativamente. Existe una proteína denominada IL-1ra o IRAP (*Interleukine Receptor Antagonist Protein*) que ejerce como antagonista de la IL-1, ocupando sus receptores.

Algunos componentes sanguíneos, como los monocitos, son capaces de producir esta IRAP. El suero sanguíneo enriquecido con la producción endógena de esta proteína se denomina Suero Autólogo Condicionado (ACS) y puede obtenerse en laboratorio por medios bioquímicos (inmunoglobulinas, LPS, IL-1, TNF- α ...) o de manera mucho más sencilla por fenómenos físico-químicos.

Este método consiste en incubar sangre completa con diminutas esferas de vidrio recubiertas de sulfato de cromo. La sencillez del método posibilita que existan kits comerciales con los que los clínicos equinos pueden preparar ACS con un equipamiento laboratorio mínimo (*Orthokine*[®]). Estos preparados no sólo contienen elevados niveles de IRAP, sino que también presentan otros factores de crecimiento y citoquinas.

Esta metodología se desarrolló para su uso en medicina humana, en pacientes con artritis, reuma y problemas de columna y existen diferentes publicaciones *in vitro* e *in vivo* que justifican su uso.

Pese a los relativamente escasos trabajos que han testado esta terapia en caballos, en los últimos años su uso se está extendiendo ampliamente en clínica equina, fundamentalmente para caballos con sinovitis, artritis aguda y en fases iniciales de

osteoartritis, aunque también hay veterinarios que lo están usando en lesiones de tejidos blandos.

1.2.2.2.4.- *Fibrina Rica en Plaquetas (PRF)*

Uno de los “puntos débiles” de la biología del PRP es que la liberación de factores de crecimiento es sumamente rápida. En efecto, la secreción de moléculas activas comienza pocos minutos después de la introducción de PRP en la lesión, cuando se inicia la activación de las plaquetas y más del 95% de los factores de crecimiento son degranulados en menos de 1 hora.

En 2006 el equipo de Choukroun y colaboradores (Dohan DM et al, 2006), describen lo que denominan “segunda generación de los concentrados plaquetarios” y a la que nombran como Fibrina Rica en Plaquetas (PRF).

Con esta metodología, las plaquetas autólogas son atrapadas en la red de fibrina que se forma de manera natural al coagular la sangre y la liberación de los factores de crecimiento es mucho más lenta y sostenida.

Hasta el momento existen muy pocas comunicaciones de su uso en clínica equina (García L et al., 2011), aunque ya hay grupos de investigación trabajando con el posible uso de estas “mallas biológicas activas” en situaciones clínicas de pérdida de sustancia, ósea, cutánea...