

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Cirugía



**“ESTUDIO EXPERIMENTAL DE LA APLICACIÓN DE PLASMA RICO
EN FACTORES DE CRECIMIENTO SOBRE LA CICATRIZACIÓN DE
ANASTOMOSIS CÓLICA”**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR
Alejandro Ortega Carrasco

BAJO LA DIRECCIÓN DE LOS DOCTORES
D. Fernando de la Portilla de Juan
Dña. Ana María García Cabrera

SEVILLA, 2019

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE MEDICINA

TESIS DOCTORAL
SEVILLA 2019

ESTUDIO EXPERIMENTAL DE LA APLICACIÓN DE PLASMA RICO EN FACTORES DE CRECIMIENTO SOBRE LA CICATRIZACIÓN DE ANASTOMOSIS CÓLICA

Doctorando: Alejandro Ortega Carrasco
Directores: Fernando de la Portilla de Juan
Ana María García Cabrera

Son muchas las personas que de alguna manera han ayudado y contribuido a que este trabajo siguiera adelante a lo largo de estos años, gracias a ellas esta tesis es una realidad.

Quiero empezar dando mi más sincero agradecimiento al Dr. Fernando de la Portilla por ofrecerme la oportunidad de realizar este trabajo. Persona que contagia su entusiasmo y su dedicación, incansable y siempre en el vértice de la innovación.

A la Dra. Ana María García, sin la que hubiera sido imposible finalizar exitosamente esta tesis. Gracias por volcar toda tu experiencia y conocimientos, por tus consejos, orientación y valiosos comentarios, y por supuesto tu infinita paciencia.

Al Dr. Padillo, por contribuir con su experiencia y presencia en este camino de la investigación.

Indispensables han sido las aportaciones de:

Sheila Pereira, que me ha introducido en el campo de la experimentación de laboratorio y me ha transmitido los conocimientos necesarios para desarrollar esta fase esencial. Gracias por tu profesionalidad, dedicación y constancia.

Juan Manuel Praena, que me ha facilitado enormemente el estudio y análisis de los datos estadísticos. Gracias por esta aportación fundamental.

Maite, que ha sufrido día a día las largas tardes de experimentación animal. Gracias por tu exquisito trato a los animales, por tu entrega y la acomodación a los difíciles horarios laborales.

Sebastián, que ha puesto desinteresadamente toda su sabiduría y experiencia en este trabajo, abordando el análisis anatomopatológico de cada muestra. Siempre te estaré agradecido.

A mis compañeros de trabajo con los que he tenido la suerte de compartir el día a día. Que me han enseñado a fortalecerme en las situaciones difíciles y a valorar cada pequeño momento, que me han mostrado el significado de ser cirujano y me han ofrecido todo su buen hacer. A mis compañeros del Hospital de la Línea, a mis compañeros del Hospital de la Serranía de Ronda y a mis compañeros del Hospital Virgen de Valme de Sevilla.

A María, que representa el apoyo fundamental en todos los ámbitos de mi vida, que comparte alegrías y tristezas, que entiende y sufre el trabajo diario de un cirujano y un doctorando. Razón para empezar cada día y afrontar cada objetivo.

Agradecimiento infinito para mi familia. A mis padres, que son ejemplo de tesón y superación, que me han inculcado tantos valores que son innumerables y han hecho de mí la persona que soy, siempre los llevo en el pensamiento. Gracias mamá por contagiarme tu capacidad de lucha, gracias papá por tu apoyo incondicional. A mis hermanos, que brillan con luz propia y me alegran cada momento de la vida. A ellos les dedico este trabajo.

*“Es sabiduría reconocer la necesidad,
cuando todos los otros cursos ya han
sido considerados, aunque pueda
parecer locura a aquellos que se atan a
falsas esperanzas”*

“La Comunidad del Anillo”

John Ronald Reuel Tolkien

INDICE

ABREVIATURAS	13
1) RESUMEN	15
2) INTRODUCCION	19
1.1 Antecedentes y evolución histórica	21
Aplicación experimental y terapéutica de los factores de crecimiento	22
- Traumatología, ortopedia y rehabilitación	22
- Dermatología	24
- Cirugía digestiva	26
1.2 Histología del tubo digestivo	30
1.3 Cicatrización	34
Fase de inflamación y hemostasia	35
- Papel de las plaquetas	36
- Polimorfonucleares	38
- Macrófagos	39
Fase de proliferación	41
- Fibroplasia y formación tejido de granulación	41
- Angiogénesis	44
- Epitelización	45
- Contracción	48
Fase de remodelación	49
1.4 Anastomosis intestinal	50
Evolución histórica	50
Técnicas actuales: sutura manual y mecánica	55
- Sutura manual	56
Materiales de sutura	57
Confección de la sutura	57
- Sutura Mecanica	58

1.5 Modelo experimental en el estudio de anastomosis intestinales	60
Modelos animales	60
Parámetros de medición	62
1.6 Dehiscencia de anastomosis intestinal	64
Definición e incidencia	64
Factores asociados	66
- Factores preoperatorios	67
Estado nutricional: desnutrición, obesidad	68
Condición patológica	68
Hábitos tóxicos	69
Medicación habitual	70
Radioterapia y quimioterapia neoadyuvante	71
Sexo	72
Edad	72
- Factores intraoperatorios	73
Tiempo operatorio	73
Técnica quirúrgica e influencia del cirujano	73
Cirugía de urgencias	75
Uso de drenajes intraabdominales	75
Pérdida de sangre y necesidad de transfusión	76
Nivel de anastomosis y características de la lesión colónica	77
Presentación clínica y diagnóstico. Complicaciones	78
1.7 Factores de crecimiento	84
Papel de las plaquetas	84
- Definición, morfología y estructura	84
- Activación y función plaquetaria	86
Plasma rico en plaquetas	88
Definición y tipos de factores de crecimiento. Implicación en el proceso de cicatrización	90
- Factor de crecimiento transformador (TGF)	92
- Factor derivado de las plaquetas (PDGF)	96
- Otros factores de crecimiento	97
Rutas de aplicación de los factores de crecimiento y plasma rico en plaquetas	105

2) HIPÓTESIS DE TRABAJO	109
2.1 Justificación	111
2.2 Objetivos	111
General	111
Específicos	111
3) MATERIAL Y METODOS	113
3.1 Experimentos previos al ensayo	115
Comparación tiempos de inmersión	115
Determinación factores de crecimiento tras descongelación	116
3.2 Experimentos del ensayo	117
Población de estudio	117
Diseño del estudio	119
Instalaciones y material quirúrgico	120
Período preoperatorio	122
Técnica anestésica y analgésica	124
Técnica quirúrgica	124
Período postoperatorio y estabulación	127
Sacrificio y obtención pieza quirúrgica	127
Estudio histológico y morfológico anastomótico	128
3.3 Variables del estudio	131
Variables independientes	131
Variables dependientes	131
Definición de variables	131
3.4 Modelo estadístico	133
3.5 Consideraciones legales y éticas	134
4) RESULTADOS	137
4.1 Mortalidad	139
4.2 Evaluación macroscópica	139
- Absceso	139
- Peritonitis	139

- Dehiscencia	140
- Estenosis	142
- Adherencia	144
4.3 Evaluación microscópica	145
Análisis según el día postoperatorio	145
4.4 Evolución temporal del proceso de cicatrización	150
4.5 Análisis de la cicatrización mediante la determinación de hidroxiprolina en los tejidos	157
5) DISCUSION	159
Evaluación del proceso de cicatrización	162
Evaluación anastomótica	164
Plasma rico en factores de crecimiento utilizado, vía de administración y tiempos de contacto	166
Limitaciones del ensayo	170
6) CONCLUSIONES	172
ANEXOS	175
BIBLIOGRAFÍA	183

ABREVIATURAS

AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos
ASA	American Society of Anesthesiologists
aFGF, bFGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
CCI	Charlson Comorbidity Index
CTGF	Factor de crecimiento tejido conectivo
ECH	Enema con contraste hidrosoluble
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
GFs	Factores de crecimiento
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos
HGF/SF	Factor de crecimiento de hepatocitos/Factor de dispersión
HIV	Virus de la inmunodeficiencia humana
HRP	Peroxidasa de rábano
HTA	Hipertensión arterial
IA	Índice anastomótico
IAPs	Proteínas inhibidoras de la apoptosis
IECs	Células epiteliales intestinales
IFN-γ	Interferón γ
IGF	Factor de crecimiento semejante a la insulina
IL	Interleuquina
LAP	Péptido asociado a la latencia
L-PRF	Fibrina rica en plaquetas y leucocitos
LP-PRP	Plasma rico en plaquetas y pobre en leucocitos
LR-PRP	Plasma rico en plaquetas y leucocitos
LTBP	Proteínas de fijación al TGF- β latente o Latent TGF- β -Binding Protein
MCP-1	Proteína quimiotáctica de monocitos 1
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloproteinasa de la matriz
NGF	Factor de crecimiento del nervio
NK	Células Natural killer
NO	Óxido nítrico
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Proteína C reactiva
PCT	Procalcitonina sérica
PDGF	Factor de crecimiento derivado de las plaquetas
PDS	Polidioxanona
PF4	Factor plaquetario 4
PIGF	Factor de crecimiento placentario
PLGA	Polímeros de ácido láctico y ácido glicólico
PMN	Polimorfonucleares
PPP	Plasma pobre en plaquetas
P-PRF	Fibrina rica en plaquetas puro

PRF	Fibrina rica en plaquetas
PRGF	Preparado rico en GFs
PRP	Plasma rico en plaquetas
PRPGF	Plasma rico en plaquetas y GFs
RSA	Radiografía simple de abdomen
SNC	Sistema nervioso central
TC	Tomografía computerizada
TGF-α	Factor de crecimiento transformante alfa
TGF-β	Factor de crecimiento transformador beta
TIMPs	Inhibidor tisular de metaloproteinasas
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
TNF-β	Factor de necrosis tumoral β
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial

1. RESUMEN

INTRODUCCION

La dehiscencia de sutura anastomótica intestinal continúa siendo un tema de actualidad debido a las consecuencias que conllevan para el paciente en forma de mayor estancia hospitalaria, numerosas intervenciones, morbilidad importante y en última instancia incremento de la mortalidad. Y por el hecho de que no se ha podido disminuir su incidencia a pesar de los numerosos avances tanto técnicos, quirúrgicos como médicos. Muchos grupos de trabajo han estudiado infinidad de metodologías, procedimientos, administración de medicamentos, aplicación de diferentes materiales... sin encontrar el camino para evitar su aparición.

Existe un creciente interés en unas proteínas que intervienen durante todo el proceso de cicatrización de los tejidos. Los factores de crecimiento tienen un papel fundamental en todas las etapas, modulando diferentes acciones necesarias: quimiotaxis, mitosis, angiogénesis, regulación de la síntesis y degradación de componentes de la membrana extracelular. Intervienen muchos de ellos y la mayoría son sintetizados, almacenados y secretados por las plaquetas. Múltiples estudios se han dirigido a la obtención de preparados de concentrados de plaquetas o bien aisladamente algún factor concreto, para su aplicación clínica o experimental con el objetivo de potenciar el proceso de cicatrización. Aunque se desprenden unos resultados prometedores, todavía persisten unos interrogantes en función de los tejidos y/o pacientes involucrados relacionados con la vía de administración más adecuada, concentración más efectiva de plaquetas o qué factor/es de crecimiento utilizar, dosis, número de repeticiones adecuadas, tiempo de exposición...

MATERIAL Y MÉTODO

Se trata de un ensayo aleatorizado y controlado donde se utilizan 80 ratas wistar albina, distribuidas en 2 grupos: 40 animales son intervenidos realizándoseles colotomía y anastomosis frente a otro grupo de 40 animales se les realiza colotomía y anastomosis, pero con inmersión la misma en plasma rico en factores de crecimiento alogénico. Cada uno de estos grupos se sacrifican en dos días postoperatorios distintos, de forma que 20 animales de cada grupo se sacrifican al 4º día postoperatorio y 20 animales de cada grupo se sacrifican al 10º día postoperatorio. Se estudian los cambios histológicos y la concentración de hidroxiprolina como marcador indirecto de depósito de colágeno en la anastomosis.

RESULTADOS

78 animales de experimentación completan el protocolo de estudio. La dehiscencia anastomótica se presenta en 11 de 78 animales intervenidos (14,1%), todos ellos pertenecientes al grupo sacrificado al 4º día postoperatorio. No se describen abscesos, 2 casos de peritonitis, 2 casos de estenosis de la anastomosis, no existen diferencias significativas en cuanto a la descripción de adherencias. En el grupo sacrificado al 4º día postoperatorio existe un mayor grado de reepitelización y deposición de colágeno en los animales en donde no se aplica PRGF de forma significativa. La infiltración de células PMN presenta una mayor presencia en fases iniciales del grupo tratado con PRGF con respecto al grupo control, aunque no significativo. El análisis de los resultados histológicos en el grupo sacrificado el 10º día postoperatorio no encuentra diferencias estadísticamente significativas en la comparación de grupos control y aplicación de PRGF. Existe una tendencia al alza de la neovascularización y la deposición de colágeno no significativa en el grupo tratado con PRGF en los animales sacrificados más tardíamente con respecto a los animales sacrificados al 4º día postoperatorio. En cada uno de los grupos analizados se observa una mayor expresión de hidroxiprolina/proteínas en etapas más avanzadas de la cicatrización con respecto a etapas iniciales. Esta tendencia ascendente es más pronunciada en el grupo de anastomosis donde se aplicó PRGF, aunque no son estadísticamente significativos.

CONCLUSIONES

La aplicación local de PRGF por inmersión de la anastomosis produce un incremento de la infiltración inflamatoria de los tejidos en fases iniciales de la cicatrización y un aumento de la neovascularización, reepitelización, deposición de colágeno y expresión de hidroxiprolina en fases más tardías de la misma, aunque sin significación estadística.

2. INTRODUCCION

1.1 Antecedentes y evolución histórica

Los trabajos experimentales de Cohen y Levi-Montalcini sobre las proteínas promotoras del sistema nervioso glandular en la década de los años 50 (1) y la descripción por primera vez del factor de crecimiento epidérmico aislado en animal de experimentación por Cohen en 1962 (2), sientan las bases del conocimiento de los factores de crecimiento. Posteriormente, la descripción de cada uno de los GFs derivados de plaquetas y su obtención permitieron la aplicación experimental y clínica.

En la última década, se han reconocido las propiedades de los GFs y se han realizado muchos estudios experimentales dirigidos a la mejora y aceleración de la cicatrización de heridas agudas y crónicas de diferentes tejidos y órganos en una amplia variedad de campos: cirugía digestiva, traumatología, otorrinolaringología, oftalmología... (3). Partiendo de los primeros resultados publicados tras la aplicación en humanos, donde la administración local de GF autólogo en úlceras crónicas cutáneas presentado en 1987 en el encuentro de la asociación americana de cirugía por el grupo de knighton y colaboradores (4), arrojó unos resultados alentadores que animó a continuar con los cuantiosos estudios realizados hasta la actualidad y la aplicación clínica en diferentes ámbitos: odontología y cirugía maxilofacial, traumatología y medicina deportiva, reumatología, cirugía plástica y medicina estética, oftalmología, cirugía vascular, neurocirugía, otorrinolaringología, urología, quemados, dermatología o cirugía torácica. A partir de medios de administración muy variada, desde de su inyección o inoculación directa local o a nivel sistémico, hasta la utilización de transportes como esponjas de colágeno, suturas, geles que actúan a modo de vehículos biocompatibles (5).

Sin embargo, es difícil extraer conclusiones definitivas de los estudios realizados hasta la actualidad, ya que, la mayoría de ellos comparten unas características que impiden la comparación de los datos y resultados (6) (7):

- No son uniformes en cuanto a estandarización de la preparación de PRP y administración (dosis y concentraciones, medios de administración...).
- La significación estadística es limitada debido al pequeño tamaño de las muestras y a la escasez de ensayos clínicos controlados y aleatorizados en humanos. Suele tratarse de series de casos limitadas o casos y controles.

A esto se adiciona un déficit de terminología aceptable común a todos los autores y muchos datos contradictorios encontrados en la literatura que dan lugar a que el metaanálisis de los datos sea muy difícil de realizar (8). Actualmente no existe una eficacia clínica contrastada que se pueda asociar a la utilización clínica de las terapias ricas en plaquetas (9) (10).

Aplicación experimental y terapéutica de los factores de crecimiento

La tendencia actual en la investigación quirúrgica se centra en la estimulación de la cicatrización para potenciar la curación de heridas, incluso en condiciones desfavorables.

TRAUMATOLOGÍA, ORTOPEDIA Y REHABILITACIÓN

En el campo de la traumatología y ortopedia las aplicaciones de PRP se han centrado en situaciones patológicas severas que afectan fundamentalmente a tendones, ligamentos, cartílagos y huesos (11). A nivel experimental existen multitud de estudios en donde la aplicación de PRP parece que incrementa la velocidad de la curación de lesiones con respecto al grupo control, para ello se toman lesiones o defectos en diferentes tejidos. Un ejemplo es la aplicación de PRP en fracturas de huesos largos, con resultados estadísticamente significativos, en distintos modelos animales (11) (ratones (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22), ratas (23) (24), perros (25), ovejas (26) y cerdos (27) (28)). La forma de administrar el PRP es diversa, desde la utilización directa en la zona de lesión (25) (18) (26) o conjuntamente a autoinjertos de tejido óseo esponjoso (28) (29), implantes de hueso (14) (16) (20) o incluso junto a hidrogeles (13). Este mismo vehículo se utiliza en un ensayo experimental en lesiones horizontales meniscales de rata, aumentando significativamente la proliferación e inhibición de la muerte de las células implicadas en el grupo donde se administra FGF junto a gelatina acuosa de glutaraldehído (30). La sutura de tendones en ovejas previamente recubiertos por PDGF mediante inmersión no sólo obtiene resultados prometedores de calidad y velocidad de cicatrización de la sutura del tendón dañado al tejido óseo sino que se confirma la completa adhesión de los GF al tejido (31). Del mismo modo, la inmersión de suturas en soluciones de PDGF utilizadas para reparar lesiones agudas del tendón aquileo también han constatado resultados positivos aunque sin evidenciar un aumento significativo de la cicatrización de un grupo con respecto a otro (32). La administración en seres humanos está más extendida en medicina deportiva referente a dolencias tendinosas,

cartilagosas, meniscales y musculares. Sobretudo mediante la inyección directa del PRP en la zona afecta, de hecho estudios en pacientes con afección tendinosa crónica han mostrado una mejoría significativa de los síntomas del codo de tenista más rápidamente (33) incluso comparándola con grupos de pacientes en los que se realiza infiltración con corticoides. Sánchez y colaboradores realizó un estudio comparativo en atletas, obteniéndose unos resultados positivos y significativos en cuanto a rapidez de recuperación en el grupo en que el que además de realización de cirugía reconstructiva del tendón de Aquiles se aplicaba PRGF (34). Otros estudios centrados en el tratamiento de fibrocartílogo encuentran una cicatrización óptima hasta en el 80% de los casos si se aplica PRGF además de la realización de la reconstrucción del menisco. Sin embargo, no toda la bibliografía hasta la actualidad apoya estos datos y en muchos de ellos no se evidencia una diferencia significativa, mayormente porque estos tratamientos no están completamente estandarizados (35). También se han introducido estos tratamientos en la reparación de defectos de cartílogo en combinación con la artroscopia observando una cicatrización acelerada del cartílogo, y en la osteoartritis de rodilla mediante inyección directa en la zona dañada mejorando los resultados del tratamiento frente al ácido hialurónico (36).

Ha aumentado la frecuencia en la que se desarrollan estudios encaminados a mejorar los resultados quirúrgicos, para acortar el período de cicatrización y acelerar la rehabilitación del miembro afecto, así como disminuir los fracasos postquirúrgicos. Esto queda patente en la utilización de PRP en reconstrucciones tendinosas con aloinjertos, donde se describen menos complicaciones, existe menos inflamación y una mejor cicatrización (37).

En España, autores como Sánchez (38) y Cugat (39) también han aplicado PRGF a la reconstrucción articular mediante autoinjertos de isquiotibiales con resultados positivos. En cuanto a complicaciones, se describe una disminución de hematomas postoperatorios; a nivel funcional un aumento de los movimientos de la articulación intervenida y una mayor estabilidad articular, radiológicamente los hallazgos son positivos en el primer mes postoperatorio.

Una reciente revisión sistemática (40) evalúa, desde una perspectiva clínica, la efectividad y los posibles efectos adversos derivados de la aplicación de terapias ricas en plaquetas en lesiones musculoesqueléticas, abarcando una amplia variedad de patologías (desgarro del manguito de los rotadores, cirugía del síndrome del pinzamiento del hombro, reconstrucción del ligamento cruzado anterior, epicondilitis del codo, tendinopatía patelar, tendinopatía del tendón de Aquiles). De forma general en el

análisis por patologías la evidencia disponible es insuficiente para establecer una diferencia clínica y estadísticamente significativa en la aplicación de estas terapias frente a los tratamientos normalizados habituales.

DERMATOLOGÍA

Pero es en la dermatología donde se puede encontrar mayor cantidad de estudios desarrollados en humanos, lo más frecuente es que se traten heridas crónicas de origen diabético o vascular en donde los tratamientos habituales no han tenido éxito. Sin embargo, la baja calidad de los estudios, el número no representativo de pacientes y la falta de unión de criterios otorga una baja calidad de la evidencia científica y por tanto no pueden recomendarse de forma generalizada (41). En la mayoría de los casos se utiliza PRP o PRGF (42) autólogos aplicado directamente en las heridas crónicas en diferentes grupos de pacientes, en estudios retrospectivos (43) o prospectivos (42). La administración en heridas crónicas de estos preparados parece que modifica la evolución de cronicidad invirtiendo la tendencia (44). La seguridad y la eficacia de su aplicación se somete a prueba con un ensayo clínico fase III, mediante el cual se muestra que este procedimiento es seguro, simple y eficaz junto con una reducción de los costes frente a los tratamientos tradicionales (45).

En 2006 se integran los resultados de cuatro ensayos multicéntricos, aleatorizados, prospectivos y cegados (46) (47) (48), donde se incluyen 922 pacientes portadores de úlceras crónicas diabéticas profundas en extremidades inferiores. Por un lado, se estudia la eficacia y la seguridad (46) de la aplicación local de geles de PDGF-BB en diferentes concentraciones (30 $\mu\text{g/g}$ y 100 $\mu\text{g/g}$) y por otro, las características de la curación de las heridas mediante la aplicación de GF local frente a un protocolo de curación/aplicación de gel placebo. La probabilidad de completar la cicatrización de las úlceras fue significativamente mayor en los pacientes donde se administró gel en dosis de 100 $\mu\text{g/g}$ de PDGF-BB, también se evidenció una aceleración significativa en alcanzar esta curación (99 días en los pacientes con PDGF-BB frente a 141 días en los pacientes con gel placebo). Además, al no detectarse efectos secundarios se describe como un procedimiento seguro (48). Según estos estudios realizados, el PDGF-BB humano recombinante es el primer factor de crecimiento que muestra efectos estadísticamente significativos en ensayos clínicos fase II, III (46) y IV. Siguiendo este camino, otros autores como Buchberger, han aglutinado diferentes estudios para evaluar la seguridad, la eficacia y la efectividad de la aplicación local de factores de

crecimiento, que según el estudio en el que nos detengamos varía (PDGF, EGF, FGF). Con unos resultados positivos muy similares a los ya descritos en ensayos anteriores: incrementan la cicatrización de forma más acelerada y segura (49). Este incremento del cierre de úlceras en pacientes diabéticos también ha inclinado la balanza hacia un menor riesgo de amputación de miembros inferiores, disminuyendo la morbimortalidad de los mismos y los costes económicos globales (50). Vilella en una revisión sistemática, que incluye varios ensayos clínicos aleatorizados, demuestra que existe una evidencia científica que apoya el uso de PRP en el tratamiento de úlceras diabéticas con mejoría de la curación de estas heridas (51). También, la administración en sinus pilonidales intervenidos, con cierre secundario de la herida quirúrgica, permite una cicatrización más rápida que en los casos intervenidos con tratamiento habitual (52), aunque los resultados del estudio no pueden ser considerados como significativos, sí que hace comprender la potencialidad de aplicabilidad de estos nuevos compuestos de PRP o PRGF.

Pero no todos los estudios concluyen la efectividad reconocida de estas terapias en todos los tipos de úlceras. Metaanálisis, como el realizado por Martínez-Zapata, que abarca 10 ensayos clínicos aleatorizados (ECA) pone sobre la mesa que aunque existen resultados aislados positivos, no puede recomendarse para el tratamiento de todos los tipos de heridas crónicas (41). Así, muchos estudios centrados en la aplicación de PRP en otras circunstancias como heridas quirúrgicas tras cirugía cardíaca en pacientes de alto riesgo (53), incisiones tras cirugía vascular (54), heridas agudas traumáticas de partes blandas (55) ... no han mostrado resultados significativos para su uso generalizado en estos campos.

Actualmente, algunas sociedades científicas recomiendan el uso de estas nuevas terapias en cierto tipo de lesiones como las úlceras por presión, cuando no responden a las terapias convencionales (56), y de forma más tajante en las úlceras crónicas neuropáticas de pacientes diabéticos (57). Sin embargo, en úlceras de origen venoso esta práctica no tiene argumentos suficientes para recomendarse (58). En contraposición, otras asociaciones científicas de excelencia como el National Institute for Health and Clinical Excellence (NICE) no recomiendan el uso sistemático de los preparados de PRP en pacientes con úlceras crónicas.

CIRUGÍA DIGESTIVA

En el campo que compete a este estudio, la administración de GFs se ha realizado a través de múltiples medios, con diversidad de tipología de GFs, siempre en modelo experimental, pero en distintos segmentos del tubo digestivo. Con la finalidad de estudiar el comportamiento de la cicatrización, la variación en la velocidad de la misma y si estos cambios en la cicatrización influyen de alguna manera en la disminución de las complicaciones subsiguientes (Tabla 1). Egger y colaboradores demostraron por vez primera la promoción de la cicatrización de una anastomosis colónica izquierda, a partir de la inyección intraperitoneal de GF, en este caso keratinocítico (59). Precedido por estudios en roedores donde se habían detectado aumento significativo de proliferación epitelial colónica tras administración exógena de KGF, caracterizado por incremento de los pliegues de la mucosa colónica, mayor profundidad de las criptas y proliferación de células caliciformes en el segmento de colon tratado (60). En otros casos se han administrado combinaciones de varios GFs comparándolos con la administración de cada de uno de ellos por separado o el vehículo. De esta manera, tras la división del colon izquierdo y realización de anastomosis se procede a la inyección intraperitoneal postoperatoria de KGF y/o IGF, los resultados fueron satisfactorios con aceleración de la cicatrización de la anastomosis colónica, sin embargo, la administración conjunta no obtuvo mejores resultados (61).

Se ha documentado que las dosis altas de corticosteroides influyen en el metabolismo y el peso corporal animal, disminuyendo el peso corporal medio y por tanto contribuyendo negativamente en la cicatrización anastomótica. Algunos autores describen alteraciones de la proliferación mucosa cuando esta se encuentra bajo la influencia de inmunosupresores como esteroides y metotrexato (62). Bajo estas circunstancias adversas también se ha procedido a dividir el colon animal, tratado con corticosteroides, para posteriormente realizar anastomosis e inyección de IGF-I, describiéndose un efecto protector en las anastomosis de los animales tratados con IGF-I intraperitoneal (63). En esta línea, también se han simulado modelos experimentales inmunosuprimidos mediante la administración de micofenolato mofetilo, estudiándose el comportamiento de la cicatrización anastomótica de colon en ratas junto con la administración de IGF-I con resultados positivos (62). Por tanto, la administración exógena de IGF-I en animales inmunodeprimidos puede revertir la alteración en la proliferación mucosa, determinado sobre todo por el aumento de la profundidad de las criptas y de las células proliferantes de la mucosa que neutraliza el deterioro de la

mucosa por agentes inmunosupresores (64). Análisis de hidroxiprolina en el tejido anastomosado de colon de ratas muestran aumento significativo en los animales tratados con IGF-I, característica indirecta del aumento de la síntesis de colágeno en el tejido cicatricial (65). La función protectora de los GFs se ha demostrado en algunos trabajos utilizando modelos experimentales de inflamación e infección peritoneal, donde ratones con incapacidad inducida de la producción endógena de HB-EGF y peritonitis secundaria presentan una peor respuesta a la inflamación causada por la invasión bacteriana que aquellos ratones con inoculación exógena intraperitoneal de HB-EGF, igualmente mejora la función de la barrera intestinal, disminuye la apoptosis celular con incrementos de la proliferación de las células epiteliales intestinales, y disminución de la translocación bacteriana (66). Bajo los efectos contraproducentes de peritonitis inducida se han llevado a cabo anastomosis ileales en modelos de conejo con aplicación de cola de fibrina junto con VEGF. Los resultados fueron positivos, con un aumento detectable de la formación de nuevos capilares perianastomóticos que se traduce en un aumento de la presión de estallido de forma estadísticamente significativa del grupo en el que se aplica el GF (67).

La incorporación de los GFs en las suturas que se utilizan para acometer las anastomosis colónicas convierten a éstas en vehículos de los propios GFs. La administración por este medio ha demostrado en algunos estudios incremento de la neoangiogénesis, de hidroxiprolina y depósito de colágeno en fases más posteriores de la cicatrización (68). La utilización de revestimientos portadores de medicamentos, tales como el poly (D,L-lactide) (PDLLA), incorpora GFs en la propia sutura que va a ser utilizada para la realización de la anastomosis con resultados prometedores. Como demuestra la aplicación de IGF-I sobre suturas en anastomosis de colon transversal de ratas, donde no solo se evidencia que se mantiene intacta la bioactividad del GF sino que, se establece un aumento significativo de la estabilidad biomecánica de la anastomosis al tercer día en el grupo en donde se aplican GFs frente al otro grupo. La reepitelización se hace evidente con mejores resultados y más prematuramente que en los grupos no tratados con IGF-I de forma significativa (5).

Se han desarrollado sistemas que tratan de liberar de una forma controlada, continua y bioactiva GFs determinados sobre anastomosis intestinales. Hirai y colaboradores (69) administraron FGFb en diferentes concentraciones utilizando láminas de hidrogel, que tras estudios preliminares parece que engloban toda estas características. Los resultados son positivos en cuanto al incremento de neoangiogénesis perianastomótica,

infiltración de fibroblastos y de la red de colágeno en los tejidos anastomosados, lo que podría aumentar la fuerza anastomótica durante el período postoperatorio.

Resultados muy similares se han obtenido en modelos de colon isquémico anastomosados, donde se recurre a la administración de genes de VGF y FGF en el tejido circundante a la anastomosis mediante la inyección de plásmidos no virales (70). El aumento de producción de VEGF local, gracias a la inoculación de ARN mensajero, da lugar a unos cambios histológicos que llevan a un incremento de la cicatrización (71). Aumenta el flujo sanguíneo tisular así como la neoangiogénesis, además se detecta un aumento de la activación de fibroblastos y deposición de colágeno, con lo que mejora la presión de ruptura de la anastomosis (71) (70).

La administración de HB-EGF por sonda enteral en ratones con división y reanastomosis de ileon terminal demuestra un aumento de la presión de estallido de anastomosis de forma significativa con respecto a los ratones a los que no se le administra el GF (72). Además, aunque no existen diferencias estadísticamente significativas, se detectan una mayor tasa de complicaciones locales y mortalidad en el grupo no tratado con GF. El grupo de Radulescu demuestra que la administración exógena de HB-EGF no sólo actúa como protector intestinal en condiciones experimentales, sino que juega un importante papel en la curación de las anastomosis intestinales (72).

Un modelo que se acerca más al descrito en el estudio de la tesis que nos ocupa, con buenos resultados experimentales, valora varios parámetros relacionados con la cicatrización (presión de estallido anastomótico, concentración de hidroxiprolina, proliferación neoangiogénica, análisis histológico...) en tejido colónico de conejo anastomosado. El procedimiento experimental introduce la aplicación de VEGF mediante inyección en el estrato muscular perianastomótico para compararlo con un grupo control en el que la inyección sólo está formada por cloruro sódico (73). Los resultados son estadísticamente significativos a favor del grupo experimental con el uso de GF, con aumento de las presiones de estallido y concentración de hidroxiprolina sólo en el 4º día postoperatorio (73).

Autor	Animal	n	Intervención	GF	Tipo de estudio	Parámetros	Resultados
Ishii, M	Conejos	32	Inyección muscular propia	VEGF	Ensayo controlado no aleatorizado	Histología, Presión estallido, Hidroxiprolina	↑ Presión estallido ↑ hidroxiprolina (4º día) P<0,05

Li, Z	Conejos	128	Aplicación superficial anastomosis en infección inducida	VEGF Cola fibrina	Ensayo controlado randomizado	Histología, Presión estallido, Hidroxiprolina	↑ Presión estallido (día 7,14) ↑ hidroxiprolina (día 5,7,14) ↓ dehiscencia P<0,05
Fuchs, TF	Ratas	48	Suturas + PDLLA cargadas con GF	IGF-I	Ensayo controlado no aleatorizado	Clínica, Biomecánica, Histología, Inmunohistoquímica	↑ Presión estallido (día 3) P<0,05
Radulescu, A	Ratones	149	Inactivación gen Sobreexpres. Gen Adminis. SNG	EGF-HB	Ensayo controlado no aleatorizado	Presión de estallido, Histología, Complicaciones	↑ Presión estallido (día 6) ↑ curación histológica ↑ angiogénesis ↑ colágeno (día 6) P<0,05
Egger, B	Ratas	68	Inyección peritoneal repetida	KGF	Ensayo controlado no aleatorizado	Presión de estallido, Criptas y moco, Histología, Hidroxiprolina	↑ Presión estallido (día 2,4,7) P<0,05
Mantzoros, I	Ratas	80	Inyección peritoneal	IGF-I Cortisona	Ensayo controlado randomizado	Presión de estallido, Histología, Angiogénesis, Hidroxiprolina	↑ Presión estallido ↑ angiogénesis ↑ colágeno (día 7) P<0,05
Zacharakis, E	Ratas	40	Inyección peritoneal	IGF-I	Ensayo controlado no aleatorizado	Presión de estallido, Histología, Angiogénesis, Hidroxiprolina	↑ Presión estallido ↑ hidroxiprolina ↑ colágeno (día 7) P<0,05
Egger, B	Ratas	80	Inyección peritoneal	IGF-I tKGF	Ensayo controlado no aleatorizado	Presión estallido, Histología, Colágeno, Inmunohistoquímica	↑ Presión estallido (día 2,4,6) P<0,05
Adas, G	Ratas	40	Terapia génica (DNA)	VEGF-A FGF-2 Humanos	Ensayo controlado no aleatorizado	Presión de estallido, Histología, Hidroxiprolina	↑ Presión estallido ↑ hidroxiprolina (día 4) P<0,05
Enestvedt, CK	Zarigëya	29	Inyección local plásmido no viral	VEGF Humano	Ensayo controlado no aleatorizado	Presión estallido, Angiogénesis, ARNm VEGF	↑ Angiogénesis ↑ ARNm VEGF (día 10) P<0,05
Rijcken, E	Ratas	120	Suturas recubiertas ¹	IGF-I	Ensayo controlado no aleatorizado	Presión de estallido, Histología, Hidroxiprolina	↑ Presión estallido (día 1) ↑ histología (día 7) ↑ hidroxiprolina (día 7) P<0,005
Inglin, RA	Ratas	63	Inyección peritoneal	IGF-I Mico-fenolato Mofetil	Ensayo controlado no aleatorizado	Presión de estallido, Morfometría Proliferación mucosa	↑ Proliferación mucosa (día 2,6) P<0,005
Giusto, G	Cerdos	8	Inmersión segmentos seccionados	PRP PRGF	Ensayo controlado randomizado	Presión de estallido, Dehiscencia, Histología	↑ Epitelización mucosa (día 8) P<0,005
Hirai, K	Ratas	18	Láminas gelatina hidrogel	FGFb	Ensayo controlado no aleatorizado	Histología, Colágeno, Presión estallido	↑ Presión estallido P<0,05 ↑ Angiogénesis (día 3,7 y 14) P<0,05 ↑ Fibroblastos (7 y 14) P<0,05 ↑ Colágeno (día 3,7 y 14) P<0,05

Tabla 1 Revisión de estudios en los que se utiliza GFs en tracto digestivo

1.2 Histología del tubo digestivo

El tracto digestivo es un tubo continuo formado por varias secciones que se prolonga desde la boca hasta el ano. De estas secciones el esófago, estómago, intestino delgado e intestino grueso presentan unas características histológicas uniformes, ya que, la pared de todos ellos es laminar compuesta por **cuatro capas constantes** que, de una posición interna a más externa, son: túnica mucosa, túnica submucosa, túnica muscular y túnica adventicia o serosa. La mucosa marca las diferencias más significativas entre las distintas partes del tracto digestivo (74).

❖ Mucosa

Está presente a lo largo de todo el tracto digestivo. Desde el espacio luminal, se compone de un revestimiento epitelial interno o lámina epitelial, a continuación de un tejido laxo conectivo subyacente de sostén rico en células llamado lámina propia, y por último de un tejido formado por células musculares lisas llamado, por tanto, lámina muscular de la mucosa (74).

Según en qué tramo nos encontremos, la mucosa aporta una serie de características especiales. Aunque el objetivo principal es **aumentar la superficie interna del intestino** y con ello también la capacidad de absorción, también cumple con otras funciones importantes como la protección o secreción de diversas sustancias (75). La capa más interna de la mucosa está compuesta por una hoja celular continua, estas células epiteliales se encuentran unidas entre sí por uniones intercelulares, aportando homogeneidad y un sellado mecánico del espacio luminal. Su función y estructura difiere enormemente en las diferentes partes del tracto (76). Sin embargo, será una membrana delgada de material amorfo situada entre el epitelio y la lámina propia la que establezca las verdaderas propiedades mecánicas a la mucosa, llamada lámina basal (76).

En el **intestino delgado**, donde prima la función absorbente del alimento, existen unos rasgos estructurales dirigidos a potenciarla. Para ello se necesita aumentar la superficie luminal mediante las **válvulas de Kerckring** o pliegues circulares, formados por espesor completo de la mucosa y núcleo de submucosa que aumentan la superficie intestinal hasta 3 veces, y las **vellosidades intestinales** (77). Gracias a su forma de dedo de guante y a su longitud (oscila entre los 0.5 mm. y los 1,5-2 mm.) permiten aumentar enormemente la superficie mucosa hasta 5 – 10 veces más y, por ende, la cantidad de células epiteliales disponibles para la absorción. El núcleo de la vellosidad está

constituido por tejido conectivo laxo que proviene de la lámina propia de la mucosa, numerosas células del sistema inmune y algunas células musculares lisas, además de fibroblastos. Una red importante de capilares sanguíneos con endotelio fenestrado se distribuye por el interior de cada vellosidad, al igual que vasos linfáticos. Este entramado de capilares permite retirar con gran eficiencia las sustancias que han sido incorporadas por las células epiteliales (77). Su superficie está recubierta por epitelio cilíndrico simple formado por enterocitos maduros que dan lugar a un denso borde en cepillo. Si se observa al microscopio electrónico se pueden apreciar otras estructuras en dedo de guante, alargadas, paralelas y muy juntas unas de otras denominadas **microvellosidades**, que aumentan la superficie intestinal hasta 20 veces (74). En la base de las vellosidades se encuentran las aberturas de secreción de las glándulas intestinales o **criptas de Lieberkühn**. Están revestidas por epitelio, al igual que las vellosidades, y quedan separadas unas de otras por tejido conectivo de la lámina propia. Las funciones generadoras y secretoras quedan reflejadas por sus diversos tipos celulares: células absortivas, células madre pluripotenciales, células de la cripta indiferenciadas, células caliciformes, células de Paneth, células enteroendocrinas y células M (77).

Existe una población bien definida de células madre en las criptas del epitelio intestinal, que tiene la capacidad de repoblar todo el epitelio además de mantener la homeostasis. El contacto con las células de Paneth ha sido descrito como un factor determinante para definir el destino de estas células madre intestinales (78).

Se ha demostrado que las células epiteliales intestinales, no sólo producen una amplia gama de citocinas y quimioquinas, sino que también expresan receptores para estas y otros productos péptidos antimicrobianos (79). Están sometidas a **autorenovación**, de forma que las interrupciones que ocurren en la mucosa son reparadas por la migración e hiperplasia de células epiteliales, con lo que se sella el defecto y se crea una barrera para bacterias lumbinales. Dan lugar a una amplia población de células durante su migración en el recorrido desde la cripta hacia la superficie, proliferando y diferenciándose en cada uno de los tipos celulares epiteliales de la pared de la cripta.

En el intestino, las células epiteliales que llevan a cabo estas tareas de renovación están compartimentadas anatómicamente y derivan de una población de células madre que proliferan rápidamente, situadas sobre varias posiciones celulares por encima de la base de las criptas. En el transcurso de unos 4 a 6 días de vida útil, las células de las criptas no diferenciadas migran fuera de la zona de la cripta proliferativa a lo largo del

eje denominado cripta-vellosidad, donde adquieren características fenotípicas de enterocitos maduros absorptivos antes de someterse a la muerte celular apoptótica y extrusión en la punta de las vellosidades (80).

La lámina propia se compone de **tejido conectivo reticular laxo** que destaca por su excepcional contenido celular, tanto células libres como fijas, apareciendo en gran número linfocitos y células plasmáticas. Se extiende formando el núcleo de tejido conectivo de las vellosidades, así como también ocupa el espacio entre las criptas de Lieberkühn. Los abundantes linfocitos de la lámina propia suelen dar lugar a folículos solitarios o a agregaciones foliculares llamados **placas de peyer**, presentes sobre todo a nivel del íleon (74).

En el **intestino grueso** por el contrario, la membrana mucosa de la superficie luminal es bastante lisa dado que no posee vellosidades empero se siguen observando glándulas tubulares, bajo la forma de criptas de lieberkühn, que son más largas y rectas que el intestino delgado (74). Existen aproximadamente 20 millones de estas criptas en el colon humano, poseen su porción secretora en la capa muscular de la mucosa y sus conductos secretores corren por la lámina propia hasta fusionarse con el epitelio intestinal. El epitelio es cilíndrico alto, aquí son mucho más abundantes las células caliciformes y siguen distinguiéndose células madres pluripotenciales y células enteroendocrinas. La lámina propia, compuesta como ya dijimos por tejido reticular rico en células, es escasa debido a la gran cercanía de unas glándulas con otras. Se observan folículos linfáticos con más frecuencia y se pueden extender hasta la profundidad de la submucosa. La lámina muscular de la mucosa tanto de intestino delgado como grueso contiene dos capas de fibras, una interna circular y otra más externa cuyas células se orientan longitudinalmente. Se repara por migración e hiperplasia de las células epiteliales (81).

❖ **Submucosa**

Ubicada entre la muscular de la mucosa y la muscular propia, es una capa de **tejido conjuntivo** que contiene fibroblastos, mastocitos, vasos sanguíneos, vasos linfáticos y fibras nerviosas del **plexo de Meissner**. Varía en densidad pero por lo general es laxa, fundamentalmente fija la mucosa a las capas subyacentes (74) (75). En el intestino grueso, puede contener cantidades considerables de tejido adiposo (74).

Está formada principalmente por una red de **fibras de colágeno y fibras elásticas** entrelazadas, disponiéndose en ángulo de 50 grados con respecto al eje longitudinal del

intestino cuando este permanece en reposo. Esta angulación cambia según exista mayor o menor diámetro intestinal, se trata por tanto de una red flexible que dota de resistencia a la pared intestinal. El análisis bioquímico de esta capa muestra un predominio de **colágeno tipo I**, hasta un 68%, un 20% de **colágeno tipo II** y un 12% de **colágeno tipo V** (82). La molécula de colágeno está compuesta por tres cadenas polipeptídicas helicoidales entrelazadas entre sí, formando una estructura rígida llamada triple hélice. Cada una de las cadenas contiene 1000 aminoácidos, de los cuales cada tercer aminoácido es glicina mientras que aproximadamente 100 posiciones son prolina y alrededor de 100 posiciones son **hidroxiprolina**. Esto se debe a que, tanto la prolina como la hidroxiprolina, son aminoácidos cíclicos rígidos que limitan la rotación de la estructura de las cadenas polipeptídicas contribuyendo a la estabilidad de la triple hélice. Por ello, la submucosa proporciona al tracto digestivo la mayor parte de la **resistencia a la tracción**, siendo responsable del anclaje de las suturas que mantienen los extremos del intestino que han sido anastomosados (83).

❖ Muscular propia

Es la principal responsable de la **contractilidad**, se compone de dos capas de tejido muscular liso: una interna con células orientadas circularmente y otra externa que lo hacen de forma longitudinal, entre ellas se encuentra el plexo de terminales nerviosos o **plexo mioentérico de Auerbach**. Cada capa realiza un tipo de contracción con funciones diferentes: a) la más interna provoca desplazamientos del material que se está digiriendo hacia adelante y hacia atrás, de manera que se mezcle bien con las sustancias digestivas y también para que se renueve el líquido en contacto con las células epiteliales b) la externa produce contracciones en forma de onda que provocan el avance del material en digestión a lo largo del intestino (77).

Además del plexo mioentérico, entre las capas circular y longitudinal del intestino delgado y colon, se encuentra un reticulado de células ramificadas denominadas **células intersticiales de Cajal**, que también se han descrito en la muscular propia y la submucosa. Son células mesenquimales en forma de huso o estrella con procesos ramificados largos a las que se les atribuye el papel de marcapasos del intestino, regulando la motilidad intestinal.

❖ Adventicia y serosa

Es una membrana serosa compuesta por **epitelio plano simple** o mesotelio junto con tejido conectivo submesotelial subyacente, denominada **subserosa**. Compuesta

por una delgada capa de tejido conectivo recubierta por epitelio plano simple o células mesoteliales del peritoneo (77). Existen segmentos del tracto digestivo que no poseen serosa y pierden la protección que esta capa confiere, se denominan por tanto extraperitoneales (esófago y tercio inferior del recto).

1.3 Cicatrización

Frecuentemente se ha tomado el proceso de cicatrización de la piel como modelo representativo y esencial para explicar la cicatrización en otros tejidos del cuerpo, sin embargo, actualmente se advierten diferencias significativas entre el proceso que ocurre en la piel y el que ocurre en el tracto digestivo.

El proceso de cicatrización tiene muchos elementos comunes entre los distintos tejidos corporales, pero a su vez, también existen diferencias tisulares que determinan variaciones sustanciales en la misma. En el tejido del sistema digestivo ciertas características fisiológicas apoyan una mayor rapidez del proceso de cicatrización llegándose de forma más temprana a dotar de resistencia a las heridas intestinales. Algunas de éstas características incluyen su estructuración en **capas múltiples**, la **fuerza tensil** que aporta la serosa en el sellado de la línea de sutura, el contenido de **microorganismos intraluminales**, la **síntesis de colágeno** por los fibroblastos y que característicamente también lo producen las células del músculo liso en el tracto digestivo, los **efectos reguladores** de diversas sustancias implicadas y el peculiar **suministro vascular** del tracto digestivo (83) (84).

Todas las capas intestinales juegan un papel importante en el proceso de cicatrización de la anastomosis. Entre ellas, la submucosa es de gran importancia porque es fuente de fibroblastos, que se activan después de la cirugía gastrointestinal con el posterior depósito de colágeno, proporcionando la mayor resistencia a la tracción de las cuatro capas intestinales. A nivel de la serosa, el inicio de la primera fase y con ella de la hemostasia da lugar a un tapón de fibrina, que sirve como andamio para la infiltración celular. La importancia de la mucosa ha pasado inadvertida, sin embargo, representa la mayor reserva de macrófagos de los tejidos intestinales, cuya ausencia prolongada o disfunción perjudica la cicatrización de anastomosis. Por otro lado, la interacción entre bacterias y mucosidad luminal y la mucosa también son importantes para mantener la homeostasis necesaria para que se pueda producir la cicatrización. Todo este proceso de curación implica un precio importante en el metabolismo

energético, especialmente en la mucosa y las capas musculares (85).

Se sucede una progresión ordenada y equilibrada de eventos (Fig.1) (coagulación, inflamación, síntesis y deposición de matriz, angiogénesis, fibroplasia, epitelización, contracción y remodelación) en donde plaquetas, fibroblastos y células epiteliales, endoteliales e inflamatorias actúan de forma conjunta para **restaurar la barrera epitelial y reestablecer la homeostasis de la mucosa**. Además, también se produce concomitantemente una activación coordinada de mediadores que facilitan y colaboran en la regulación de estos eventos. Se incluyen lípidos y proteínas tales como lipoxinas, resolvinas, protectinas, maresinas, prostaglandinas, citoquinas y anexinas. De forma general se acepta incluir todos estos eventos en tres fases bien diferenciadas: **fase inflamatoria, fase proliferativa y fase de remodelación** (86) (87).

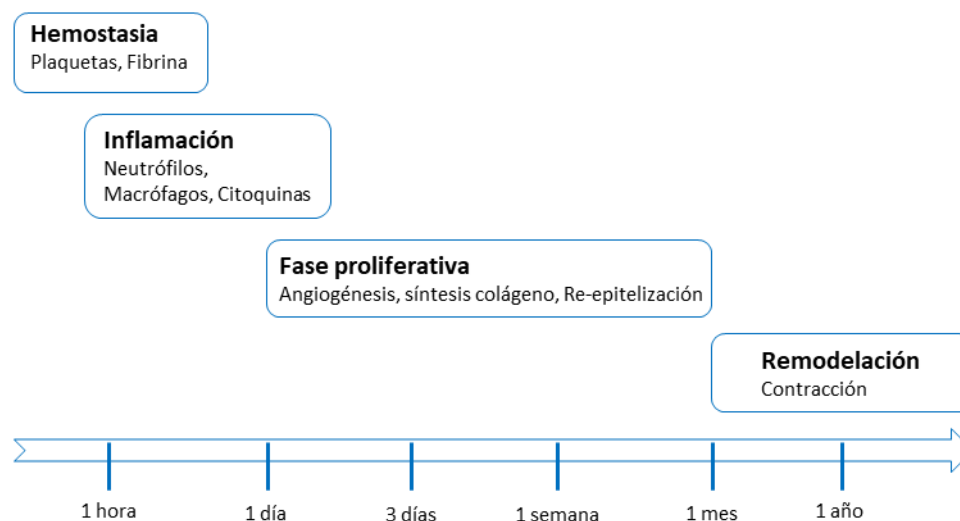


Fig.1 Evolución temporal fases de la cicatrización

Fase de inflamación y hemostasia

Una vez que se produce el daño en la pared intestinal, la principal consecuencia es la pérdida de la función como barrera de la misma, quedando expuestas células subepiteliales inmunocompetentes de la lámina propia a las bacterias y antígenos luminales, escenificado en la exposición de polisacáridos endotóxicos producidos por *Escherichia Coli* a macrófagos de la lámina propia intestinal. Se inicia una **respuesta celular y vascular** con la finalidad de reclutar localmente células inflamatorias y generar los mediadores involucrados. Estos acontecimientos se prolongan durante los **dos o tres primeros días** tras del inicio del daño (88).

En primer término, la respuesta vascular da lugar a **vasoconstricción inicial** y **posteriormente vasodilatación** que aumenta la permeabilidad capilar tratando de facilitar la llegada de componentes celulares inflamatorios como neutrófilos y macrófagos. Paso fundamental en la curación de las heridas, ya que, producen y liberan factores quimiotáxicos específicos. Provocando, en segundo término, una infiltración linfocitaria que se encarga de fagocitar y eliminar detritus y bacterias. Por último, los numerosos factores liberados causan la migración y división de las células que están implicadas en la fase proliferativa subsiguiente (89). De forma concomitante, se activa la coagulación para detener la hemorragia y se liberan factores para atraer las células que fagocitan los detritus, las bacterias y el tejido dañado y que además liberan factores que inician la fase proliferativa (Fig.2). Son claves la liberación del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) y los factores de crecimiento transformadores (TGF- α 1 y TGF- α 2) que atraen células inflamatorias (leucocitos, neutrófilos y macrófagos) (90).

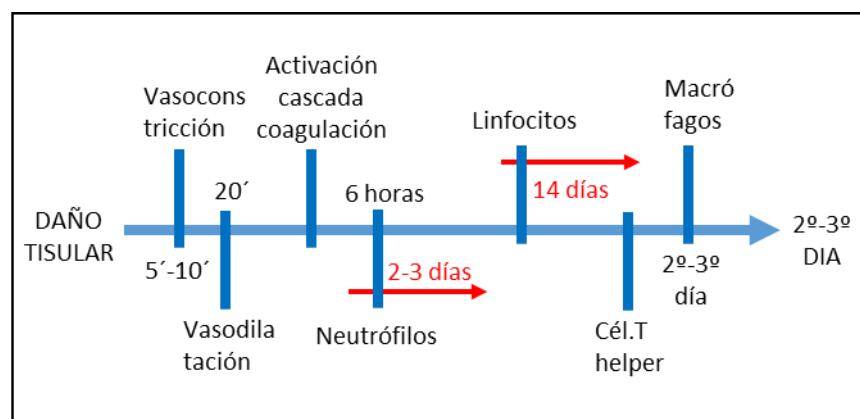


Fig.2 Evolución temporal fase inflamatoria de la cicatrización

- Papel de las plaquetas (1º y 2º horas)

La inflamación está inducida y mantenida por la infiltración de células inmunes como células T, macrófagos y neutrófilos en la mucosa intestinal, y otras células no inmunes como plaquetas.

Lo primero que sucede es la adhesión de las plaquetas al tejido intersticial. La exposición del colágeno fibrilar desde el epitelio dañado y la liberación de mediadores inflamatorios como la trombina por células endoteliales inducen la activación plaquetaria y su degranulación, iniciando la **activación de la cascada de la coagulación** que conduce a la formación del trombo de fibrina y de una matriz extracelular provisional (91).

La **trombina** interviene en dos eventos importantes, por un lado es un potente inductor de la degranulación de plaquetas, a través de la cual una gran variedad de mediadores bioactivos son secretados, y por otro lado, tiene la capacidad de atraer más plaquetas a la zona lesionada (92). Se liberan péptidos que intervienen en la agregación plaquetaria como **fibrinógeno**, **fibronectina** y **trombospondina**, otros factores intervienen en la adhesión plaquetaria como el **factor de Von Willebrand**. Todos estos mediadores permiten adherirse unas a otras y agregarse formando una masa. La fibrina y fibronectina se enlazan y forman un coágulo que atrapa proteínas y partículas. Inicialmente este coágulo previene futuras pérdidas sanguíneas, pero más tarde también es el principal soporte estructural para la herida hasta que se deposite el colágeno. Las células migratorias usan este coágulo como una matriz para avanzar a través de ella, las plaquetas se adhieren a esta y secretan factores como **citoquinas** y **factores de crecimiento** que estimulan a las células acelerando su tasa de división celular. Este proceso queda limitado por la prostaciclina, que producida de forma simultánea por las células endoteliales inhiben la agregación. Eventualmente, el coágulo sufre lisis y es reemplazado por tejido de granulación y posteriormente por colágeno.

También liberan sustancias vasoactivas como **serotonina**, **bradiquinina**, **prostaglandinas**, **tromboxanos** e **histamina**. Son potentes quimiotáxicos y citoquinas promotoras del crecimiento, mejoran la respuesta inflamatoria por el reclutamiento de células inmunes, la activación de células inmunes y/o células no inmunes y la liberación de radicales de oxígeno, capesinas y enzimas que degradan la matriz extracelular (92). La liberación de tromboxanos y prostaglandinas hacen que el vaso sanguíneo entre en espasmo para prevenir la pérdida sanguínea y concentrar células inflamatorias y factores en el área dañada (86). Esta vasoconstricción dura de 5 a 10 minutos y es seguida por vasodilatación que es máxima alrededor de 20 minutos tras la producción de la herida.

La degranulación plaquetaria también inicia la cascada del complemento con la formación de **complejos C3a y C5a**, son potentes anafilotoxinas que promueven la liberación de histaminas, basófilos y mastocitos (86). Es importante porque la histamina está involucrada en la vasodilatación que ocurre a continuación de la vasoconstricción. De manera que los vasos sanguíneos se vuelven porosos y hacen que el tejido se torne edematoso a causa de la fuga proteica desde el torrente sanguíneo al espacio extracelular, incrementando la carga osmótica que atrae agua dentro del área. Dicha

porosidad también facilita el ingreso de células inflamatorias como los leucocitos en la herida a partir del torrente circulatorio.

Las plaquetas producen además importantes **factores de crecimiento** (GFs) en la zona dañada como el factor de crecimiento plaquetario (PDGF), factor de crecimiento transformador beta (TGF- β), factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α), factor de crecimiento fibroblástico (FGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor plaquetario 4 (PF4), factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) (93).

- **Polimorfonucleares** (1º y 2º días)

Durante esta fase inicial de migración de leucocitos, los neutrófilos y macrófagos activados eliminan restos de tejidos, células muertas y otros microorganismos invasores. También producen **citoquinas** y **quimioquinas** que amplifican la respuesta de curación de la herida, tienen función mitogénica y quimiotáctica dirigidas a las células endoteliales, las cuales rodean la lesión y forman nuevos vasos sanguíneos y migran hacia el centro de la ulceración (92).

Los **neutrófilos** son el primer tipo celular reclutado, acuden a la zona dañada aproximadamente a las 6 horas de producirse la lesión tisular. Representan la célula inflamatoria más abundante en la etapa inicial de la curación de la herida, concretamente durante los dos o tres primeros días. Se acumulan formando una primera línea de defensa contra infecciones locales e inician el desbridamiento sintetizando y secretando hidrolasas y proteasas. Por un lado, tienen acción bactericida liberando radicales libres de oxígeno y por otro lado son capaces de limpiar la herida fagocitando detritus y bacterias, también mediante la secreción de proteasas que rompen el tejido dañado. Una vez finalizada su función sufren apoptosis para seguidamente ser fagocitados y degradados por los macrófagos.

La migración de neutrófilos guarda correlación con estímulos quimiotácticos específicos, tales como el **factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos** (GM-CSF), **interleuquinas** (IL) (como la IL-8: atrae y activa), la **calicreína** y los **fibrinopéptidos**, que aumentan la expresión del complejo dimérico CD11/CD18. La activación de la degranulación de neutrófilos libera citoquinas inflamatorias y profibrogénicas, posteriormente mueren y se continúa con el reclutamiento de macrófagos, que también pueden producir IL-8 ellos mismos contribuyendo a su

autoreclutamiento. La rápida acumulación de neutrófilos puede ser acelerada por otras sustancias quimiotácticas como algunos péptidos, un ejemplo de ello es el **péptido N-formilmetionil** derivado de proteínas bacterianas, y productos del complemento (89).

Una vez que los neutrófilos salen al intersticio, suceden las interacciones “célula-célula” y “célula-matriz” favorecidas por las **integrinas** o **receptores de superficie** de los neutrófilos. Así se inicia la función de fagocitosis de bacterias y proteínas de la matriz por medio de la liberación **hidrolasas**, **proteasas** y **lisozimas**, y la producción de radicales libres de oxígeno. Finalmente, los neutrófilos agotados quedan atrapados en el coágulo y se disecan con él, y los que permanecen en tejido viable mueren por apoptosis y son removidos por los macrófagos o fibroblastos.

Los linfocitos, además de la interpretación como células efectoras inmunológicas que producen una respuesta específica contra antígenos, son capaces de producir GFs particulares como el FGF-b y EFG. Están presentes en número elevado durante todo el proceso de curación, hasta la constitución de una subpoblación principal de leucocitos después del día 14, es el que más activamente va a influir en los procesos de la reparación del tejido y remodelación (89).

Otros leucocitos que entran al área dañada son las **células T ayudadoras**, secretan citoquinas para incrementar la inflamación, la vasodilatación y la permeabilidad capilar y la actividad de los macrófagos.

- **Macrófagos**

Los monocitos de la sangre periférica se infiltran en el lugar del daño intestinal en respuesta a agentes quimiotácticos como el PDGF, por ejemplo. La liberación de factores procedentes de las plaquetas, así como la fagocitosis de los componentes de la célula, tales como la fibronectina o colágeno, contribuyen a la activación de los monocitos transformándolos en los macrófagos que son la célula principal implicada en el control del proceso de reparación (93).

La migración y activación de macrófagos guarda relación con la expresión de la **proteína quimiotáctica de monocitos 1** (MCP-1), también son atraídos a la herida por GFs liberados por las plaquetas y otras células. Reemplazan a los polimorfonucleares (PMN) en la herida dos o tres días después del inicio de la respuesta inflamatoria, se estimula y promueve su crecimiento por medio de citoquinas (89) pasando a adquirir un papel esencial en el proceso de cicatrización. En base a su comportamiento, esta

respuesta puede ser pro-inflamatoria (M1), que no favorece la cicatrización de heridas e incluso las perjudica, o anti-inflamatoria (M2), contribuyendo a la cicatrización de heridas. Una variación en el índice de M2 / M1 puede influir en el resultado de la curación anastomótica (85).

Además de tener un papel en la fagocitosis de los fragmentos de células, los macrófagos secretan factores quimiotácticos que atraen otras células inflamatorias al sitio de la herida y producen prostaglandinas que funcionan como vasodilatadores potentes que afectan a la permeabilidad de los microvasos (93). Cuando es activado pasa a ser la principal célula efectora en el proceso de reparación de tejidos al degradar y eliminar bacterias y los componentes del tejido conectivo dañado, tales como colágeno, elastina y proteoglicanos, gracias a la liberación de **proteasas**. En el momento que están unidos a la matriz extracelular sufren un cambio fenotípico y se transforman en células reparadoras adquiriendo un papel fundamentalmente secretor de un número importante de GFs y otras citoquinas, especialmente durante el tercer y cuarto día tras el inicio del trauma. El bajo contenido de oxígeno de la herida les induce a producir factores como el PDGF, TGF- α y β , el FGF, VEGF y IGF-1, que atraen las células involucradas en la etapa de proliferación, estimulan la síntesis de componentes de la matriz extracelular producidos por fibroblastos, promueve el crecimiento de vasos sanguíneos del tejido circundante y estimulan las células que reepitelizan la herida (93).

La expresión de citoquinas tales como **interleuquina 6 (IL-6)**, **interleuquina 1 (IL-1)**, **factor de necrosis tumoral α (TNF- α)** e **interferón γ (IFN- γ)** se han observado en fases tempranas de la reparación de las heridas intestinales, por tanto, desempeñan un papel importante en este proceso. Comparando su evolución temporal en la cicatrización de diferentes tejidos se sospecha que la curación de heridas intestinales es más rápida que en otros lugares como por ejemplo la piel, lo que se atribuye a la diferencia en la expresión de citoquinas y GFs entre las diferentes localizaciones (94) (95). El TNF- α es liberado principalmente por los macrófagos, es esencial en la iniciación de la cascada inmune durante la respuesta a la herida, mientras que el IFN- γ es liberado por células natural killer (células NK), linfocitos T y macrófagos, dirigido a aumentar la población de macrófagos localmente y la activación de neutrófilos con el fin de implementar la citotoxicidad e intensificar la respuesta inflamatoria local mediante la liberación de IL-1 β , óxido nítrico (NO) y la producción de TNF- α en macrófagos (94).

Fase de proliferación

La fase comienza en el 2º día desde que se produce el daño en la pared intestinal y puede extenderse hasta el día 14. Se caracteriza por una **proliferación y migración** de diferentes tipos celulares que conduce a la formación de la **MEC, angiogénesis, reepitelización y contracción** de la herida (Fig.3) (96).

El omento mayor juega un papel crítico en la anastomosis intraperitoneal envolviendo la línea de sutura, sumándose a la producción de tejido de granulación (83).

A diferencia de lo que ocurre en la piel, tanto los fibroblastos como las células del músculo liso de la pared intestinal fabrican colágeno. La mayor parte del que se produce normalmente en el tracto gastrointestinal se deposita en mayor concentración en la submucosa ya que son las células del músculo liso de la lámina propia las que lo producen y mantienen. Por ello, la mayor fuerza de las capas de la pared del intestino se encuentra en la submucosa, siendo la responsable del anclaje de las suturas que mantienen unidos los bordes del defecto.

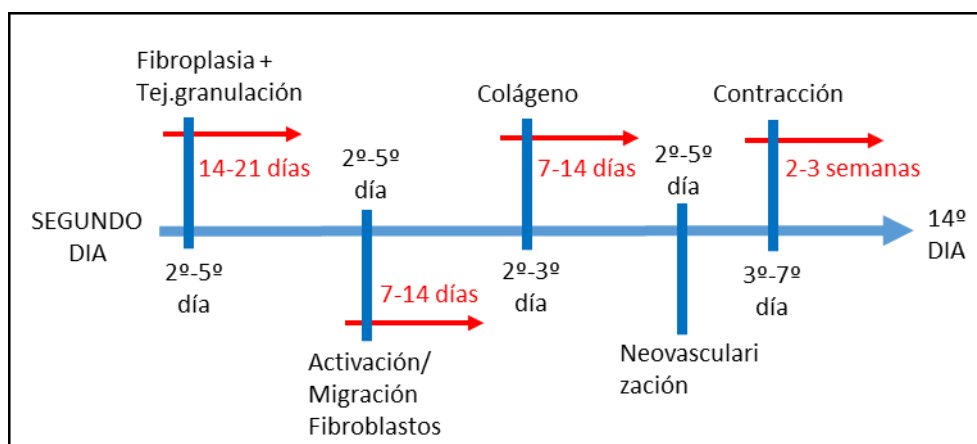


Fig.3 Evolución temporal fase proliferativa de la cicatrización

- **Fibroplasia y formación del tejido de granulación** (2º-3º día)

La fibroplasia es el proceso por el cual el tejido parenquimatoso normal es remplazado por depósito de nuevos componentes de la MEC. Así, se acumulan células inflamatorias, células endoteliales, fibroblastos y miofibroblastos, y se forman nuevos vasos sanguíneos y nueva MEC. Su composición es diferente con respecto a la del tejido normal formada por fibronectina, colágeno, glicosaminoglicanos y proteoglicanos. Los principales componentes son **fibronectina** y **ácido hialurónico**, que hidrata

sobremanera la MEC y facilita la migración celular. Esta matriz es provisional y luego es reemplazada por otra que se parece más a la del tejido normal.

Simultáneamente con la formación de este tejido de granulación tiene lugar la **activación, migración y acumulación de fibroblastos en la herida**. Ocurre desde los 2 a los 5 días después de producirse el daño, cuando la fase inflamatoria está finalizando, y alcanza su mayor población 1 a 2 semanas después de la lesión. Al final de la primera semana, los fibroblastos son las células más comunes en la herida (86), la fibroplasia termina de 2 a 4 semanas después de iniciado el proceso.

Los fibroblastos de la lámina propia de la pared intestinal proliferan y migran desde el tejido normal de los márgenes de la herida para luego depositarse en la matriz de colágeno y diferenciarse a **miofibroblastos**. Depositán moléculas en la MEC como glicoproteínas, glicosaminoglicanos (GAGs), proteoglicanos, elastina, y fibronectina que usan luego para migrar a través de la herida.

La hipoxia de la zona de la herida y la liberación de citoquinas por las plaquetas y macrófagos contribuyen a la estimulación de la secreción de GFs como PDGF, TGF- β 1, IGF-I, EGF, FGF) y VEGF (97) que estimulan la proliferación, la migración al lecho de la herida y la producción de moléculas extracelulares por los fibroblastos (98). El **PDGF** estimula la liberación de **proteasas séricas** (plasmina y plasminógeno del suero y activador del plasminógeno) y **colagenasas** (MMP-1 o metaloproteinasa de la matriz; MMP-2 o gelatinasa y MMP-3 o estromalisina) generando un sistema proteolítico que degrada la matriz facilitando el desplazamiento celular, mientras el **TGF- β 1** induce la secreción de **inhibidores de las proteinasas**, actuando como controladores del proceso de degradación de la matriz. La **fibronectina**, que puede ser sintetizada en gran cantidad por los miofibroblastos, es esencial y el principal responsable para la inducción de la migración autocrina de miofibroblastos intestinales de forma dosis-dependiente, es decir, a mayor concentración de fibronectina mayor será la migración de miofibroblastos (97).

Los **fibroblastos** presentan una heterogeneidad fenotípica, que se acentúa más en aquellos localizados en la pared intestinal, ya que algunos poseen características de células diferenciadas de músculo liso llamadas entonces **miofibroblastos**. Se definen morfológicamente e inmunológicamente por la expresión de proteínas del citoesqueleto (99). Algunas de estas características específicas radican en los microfilamentos de actina que protruyen en el citoplasma y la capacidad de formación de conexiones intercelulares mediante uniones adherentes y tipo gap. Juegan un papel importante en

el crecimiento del tejido y en la contracción de la herida (91). Existen dos tipos de miofibroblastos: por un lado, los miofibroblastos **subepiteliales** localizados principalmente en la lámina propia de la base de las criptas intestinales, por otro lado, las **células de cajal**, que tienen un fenotipo miofibroblástico, localizadas en la submucosa y en la muscular propia. Forman una red tridimensional mediante la comunicación de unas con otras con uniones adherentes y gap, pero también mantienen conexiones con células epiteliales a través de fenestraciones en la membrana basal. Por último, también interactúan con macrófagos intestinales (91).

Una de las más importantes tareas de los fibroblastos es la producción de **colágeno** (colágeno I, III y VI), este es el que incrementa la fuerza de la herida porque antes de su depósito lo que sostiene la herida cerrada es el coágulo de fibrina-fibronectina que no ofrece mucha resistencia. En la piel, la producción de colágeno se restringe a los fibroblastos, mientras que en el tracto gastrointestinal también las **células del músculo liso** contribuyen a su formación (96). Además, parece que existen condiciones y estímulos externos distintos que condicionan mayor o menor producción de colágeno por los fibroblastos intestinales comparados con los que se encuentran en la piel (100). Normalmente la mayor parte del colágeno que se produce en el tracto gastrointestinal se deposita en mayor concentración en la submucosa debido a que las células del músculo liso de la lámina propia son uno de los tipos celulares que lo producen y mantienen. Por ello, la mayor fuerza de las capas de la pared del intestino se encuentra en la **submucosa**, siendo la responsable del anclaje de las suturas que mantienen unidos los bordes del defecto.

La producción es más notable a partir del segundo y tercer día tras el daño epitelial y es máxima desde la primera hasta la tercera semana. La producción de colágeno continua durante dos a cuatro semanas, a partir de aquí se frena al incrementarse su destrucción, las **colagenasas** y otros factores están implicados su degradación y destrucción. Inicialmente la síntesis excede a la degradación llegando gradualmente a un equilibrio, comienza así la fase de maduración. La granulación se detiene, los fibroblastos disminuyen y empiezan a sufrir apoptosis, convirtiendo el tejido de granulación de uno rico en células a uno que contiene principalmente colágeno. Esto marca el fin de la fase de granulación.

Numerosos estudios han demostrado una reducción de la fuerza de los márgenes de la herida intestinal durante los primeros 3-4 días (101) (96). Esto está relacionado principalmente al aumento de la actividad de colagenasa en el sitio de la herida (102), pero también influyen otros factores como la reorganización de fibras de colágeno

inducida enzimáticamente. Así, la inhibición de la unión de las fibras de colágeno disminuye la fuerza de la anastomosis intestinal, aunque la cantidad de total colágeno permanezca sin alterar (96). Además, la reducción de la resistencia se correlaciona con la infiltración de neutrófilos, ya que las proteasas derivadas de neutrófilos y los radicales libres de oxígeno realizan cambios en la MEC y contribuyen a cambios en la fuerza de la herida. Después de 3 a 4 días, la producción de colágeno y la acumulación son evidentes dentro de la zona de la herida intestinal. Este aumento de colágeno está asociada con un rápido aumento de la fuerza neta de los márgenes de la herida (88).

También se han estudiado otros elementos de la matriz extracelular, cuya alteración pueden estar en relación con la debilidad de la anastomosis en el período de curación temprano. Los efectos de la fibronectina sobre las glucoproteínas, que tienen un papel potencial en la reparación del tejido, sobre el ácido hialurónico así como sobre los glucosaminoglicanos, que varían en contenido y composición, parecen estar vinculados a inestabilidad de la anastomosis (103) (87).

- **Angiogénesis** (2-5º día)

La angiogénesis o neovascularización es un proceso dinámico y bien regulado que consiste en la **formación de nuevos vasos sanguíneos** a partir de la vasculatura preexistente (104). El tejido vascular representa hasta el **60% del total** del nuevo tejido formado para la reparación (93). Desempeña un papel central en el proceso de cicatrización de la anastomosis, ya que aporta el oxígeno y los nutrientes necesarios para el metabolismo celular local, así como péptidos y células necesarios para continuar con el proceso de curación. Tras la lesión, las células endoteliales de la microvasculatura se activan por hipoxia y factores proangiogénicos, los más importantes reguladores de angiogénesis son el VEGF) y el TGF- β 1 producidos principalmente por células endoteliales y macrófagos. El **VEGF** estimula la proliferación de células endoteliales y media la actividad del enzima óxido nítrico sintasa de las células endoteliales. Aunque su función principal sea el estímulo de angiogénesis, VEGF también ejerce efectos no angiogénicos, como el estímulo y migración de fibroblastos (96).

La formación de los nuevos vasos sanguíneos requiere degradar la MEC circundante en un primer momento, luego una fase de migración y división celular o proliferación y finalmente se deben reestablecer los contactos célula-célula. Para hacerlo, necesitan colagenasas y activador del plasminógeno que degraden el coágulo y parte de la MEC (104). Las metaloproteinasas dependientes del zinc digieren la

membrana basal y la MEC para permitir la proliferación celular. Los componentes de la matriz como la **proteína ácida**, rica en cisteína de la matriz celular (SPARC) liberado por fibroblastos y macrófagos, junto a la **trombospondina** y la **tenascina** son considerados proteínas antiadhesivas porque desestabilizan las interacciones célula-matriz. Las células endoteliales también son atraídas por la fibronectina encontrada en la fibrina y por los GFs liberados por otras células (105). La vasculogénesis está íntimamente ligada a la capacidad de movilización del progenitor de células endoteliales de la médula ósea a las zonas dañadas (104). Gracias al desarrollo de **pseudópodos** (prolongaciones o falsos pies) las células endoteliales avanzan a través de la matriz extracelular a la herida.

La hipoxia estimula el crecimiento endotelial, así como la presencia de ácido láctico en la herida. En un ambiente bajo en oxígeno, los macrófagos y las plaquetas producen factores angiogénicos que atraen las células endoteliales quimiotácticamente. Cuando el ambiente hipóxico cede, estas células paran de producir factores angiogénicos. Así, cuando el tejido es adecuadamente perfundido, la migración y proliferación de las células endoteliales se reduce. Los capilares sufren una regresión por tumefacción mitocondrial en las células endoteliales de los extremos distales de los capilares, luego adherencia plaquetaria a las células endoteliales y finalmente ingestión de los capilares necrosados por los macrófagos.

- **Epitelización**

Paralelamente a la angiogénesis, dentro de las 24-48 horas después del daño de la pared intestinal, se inicia la epitelización de la herida. Es un complejo conjunto de eventos que ocurren de forma coordinada dirigidos a **restaurar la barrera epitelial** que protege el tejido subyacente de bacterias y antígenos intraluminales (96). Estos eventos se van solapando, aun así, se pueden clasificar en restitución epitelial, proliferación epitelial y diferenciación celular.

La **restitución epitelial** se produce transcurridos minutos a horas tras el daño, pero las células epiteliales requieren tejido viable para migrar a través de él, entonces si la herida es profunda, primero debe ser llenada con tejido de granulación. Atendiendo a este hecho, el inicio de la migración de las células epiteliales es variable (81). Se produce normalmente por debajo de una capa suprayacente de mucosidad protectora compuesta de mucina, otras proteínas y lípidos en un fluido rico en bicarbonato superficiales al defecto epitelial (80).

Como paso inicial, las células epiteliales localizadas en la zona de la lesión de la pared intestinal comienzan a **desdiferenciarse y a cambiar fenotípicamente** (80). De tal manera que se desprenden del aparato de adhesión para separarse de las células circundantes y de la membrana basal, pierden la polaridad columnar para tomar una forma aplanada y comienza una remodelación del citoesqueleto de actina-miosina con desarrollo de proyecciones llamadas lamelopodios. Todos estos acontecimientos son necesarios para migrar rápidamente y cubrir el área dañada (80).

El movimiento dentro de una MEC es un proceso de múltiples etapas que requiere cambios en la estructura del citoesqueleto, adherencias y depende de los constituyentes de la MEC (106). Por eso para que las células epiteliales puedan desplazarse requieren en primer lugar de la extensión de unas protrusiones celulares llamadas **pseudopodia**, cuyas superficies recubiertas por integrinas van a interactuar con ligandos transitorios de la MEC subyacente para crear adhesiones temporales matriz-célula, y en segundo lugar de una tracción celular mediada por el **citoesqueleto de actina-miosina** de las proyecciones, de forma que van avanzando hacia la dirección correcta a través de la MEC por tracción, mientras que en la zona trasera celular se van desprendiendo las adherencias transitorias matriz-célula (107) (81). Las células epiteliales trepan una sobre otra para migrar, las primeras células que se fijan a la membrana basal forman el **estrato basal**. Estas células basales continúan migrando a través del lecho de la herida y las células epiteliales también se deslizan sobre ella. La fase de reepitelización sigue al tejido de granulación, a medida que las células epiteliales migran a través del nuevo tejido, forman una barrera entre la herida y el medio luminal.

Las células solamente migran sobre tejido vivo, deben secretar colagenasas y proteasas como las MMPs para disolver partes dañadas de MEC en su camino. A medida que las células epiteliales intestinales (IECs) migran, nuevas células epiteliales se forman en los bordes de la herida para reemplazarlas, estimuladas por las integrinas y las MMPs, en una tasa 17 veces mayor de lo habitual. Las células epiteliales también tienen la habilidad de disolver el coágulo y fagocitar el tejido muerto y bacterias que de otra manera obstruirían su paso.

Las **integrinas** son receptores de superficie celular que interactúan con la MEC y median diversas señalizaciones intracelulares. Definen forma, movilidad y regulan el ciclo celular, normalmente anclan la célula a la membrana basal reorganizando su citoesqueleto y son liberadas desde los filamentos intermedios de la célula y reubicadas en los filamentos de actina para servir como fijación a la MEC de forma transitoria para la migración durante la pseudopodia, algunas de ellas (Integrina 11 e Integrina 21) se

unen a los dos tipos de colágeno más importantes, colágeno tipo I y tipo IV (107); (108). Además, tienen un importante papel en la regulación de la formación y degradación de la MEC.

Las IECs migran hasta que se encuentran con las células epiteliales del otro lado de la herida en la parte media de la misma, este mecanismo de inhibición de contacto es el que detiene la migración. Entonces, se generan las proteínas que forman la nueva membrana basal y se produce la unión estrecha entre las células gracias a una red compleja y organizada de múltiples proteínas que incluyen **occludinas** (ZO-1, ZO-2). Este fenómeno es clave para volver a recuperar la función barrera de la mucosa. Tras la restauración de las interacciones de unión intercelulares, la repolarización epitelial y en última instancia la rediferenciación comienza la estimulación de la proliferación epitelial para restaurar la capacidad funcional de la mucosa (80).

Todo este conjunto dinámico está regulado por proteínas de la familia **Rho GPTasas** tales como RHO, RAC y Cdc42 (109). Son reguladores claves de la migración a través de sus efectos directos e indirectos en la reorganización de la actina del citoesqueleto en células que emigran, donde las proteínas RAC y Cdc42 son importantes para la formación de pseudopodia y RhoA es crucial para la formación de fibras de tracción para la contractilidad de actina y miosina (106). Por otro lado, las **proteínas inhibidoras de la apoptosis** (IAPs) inducen citoprotección, migración celular y proliferación celular de sistemas formados por células no epiteliales, sin embargo, se han identificado proteínas inhibidoras de la apoptosis, en concreto la llamada **tipo 2** (IAPs2), expresadas en colonocitos humanos. Adquiriendo el papel de promotor de la restitución de las IECs, de importancia para la cicatrización de heridas en el colon humano normal (110).

La **proliferación** ocurre en forma superpuesta a la migración con el objetivo de aumentar significativamente el número de enterocitos y colonocitos disponibles, seguido por la etapa de diferenciación celular. Están implicados múltiples GFs, citoquinas inmunorreguladoras y péptidos que controlan la cicatrización de heridas intestinales actuando sobre la restitución o proliferación epiteliales. Muchos de estos factores promueven la reparación del tejido por un aumento de la producción del TGF- β , sin embargo otros factores tales como los péptidos de la familia trébol (TFF) y proteínas de la familia de las galectinas promueven la curación de heridas por un mecanismo independiente de la acción del TGF- β (111).

- **Contracción**

Alrededor de **una semana tras el daño epitelial** la herida comienza un proceso a través del cual se hace más estrecha, esta puede disminuir de un 40% a un 80% pero no es simétrica, generalmente tiene un eje de contracción que permite una mayor organización y alineamiento de las células con el colágeno. Los fibroblastos se diferencian en miofibroblastos y la herida comienza a contraerse gracias a ellos, estos establecen una fijación desde los bordes de la herida y los contraen usando un mecanismo similar al de las células musculares lisas. Es clave en el proceso de cicatrización porque **limita el área de epitelio dañado que tiene que ser restituido** finalmente (91).

Un cierre rápido de la herida es importante para reducir el tiempo en el que se interrumpe la barrera natural de la pared intestinal, disminuyendo la translocación bacteriana dentro de la mucosa intestinal (91). El pico máximo de contracción se presenta de los 5 a 15 días de la lesión y puede durar varias semanas, e incluso continúa aun cuando la herida ya está reepitelizada completamente.

Inicialmente la contracción ocurre con los fibroblastos, más tarde estimulados por los GFs, se diferencian en **miofibroblastos**, los cuales son semejantes a las células del músculo liso e incluso contiene el mismo tipo de actina que el músculo liso, y son totalmente responsables de la contracción. Los miofibroblastos situados en las inmediaciones de las criptas intestinales forman un nicho de células madres epiteliales y regulan la diferenciación de células epiteliales. Además, orquestan muy diversas funciones en el intestino, están involucrados en el crecimiento y reparación, tumorigénesis, inflamación y fibrosis. Cuando ocurre la lesión, los miofibroblastos adultos se reponen a partir de varias fuentes: mediante diferenciación o activación de los fibroblastos residentes, mediante desdiferenciación de células de músculo liso y adipocitos perivasculares, mediante transición de células epiteliales y endoteliales a células mesenquimales y, por último, mediante células madre derivadas de la médula ósea (112).

Los miofibroblastos son atraídos por la fibronectina y los GFs, se mueven a lo largo de la herida enlazados a la fibrina y a la fibronectina en la provisional MEC para alcanzar los bordes. También la **endotelina 1** estimula la contracción y la migración de los miofibroblastos subepiteliales del colon a través del receptor de la endotelina mediado por la fosforilación de la miosina (113). La contracción de la herida se consigue cuando forman múltiples conexiones con la matriz, con los bordes de la herida y entre ellos, lo

que les permite traccionar la matriz reduciendo el tamaño de la herida, así agilizan el cierre de la herida.

Finalmente, los miofibroblastos paran de contraerse y sufren apoptosis. La ruptura de la matriz provisional lleva a la disminución del ácido hialurónico y al incremento del **condroitín sulfato**, que gradualmente hace que los miofibroblastos dejen de migrar y proliferar. La reepitelización y la contracción de la herida no explican completamente el cierre de todo el defecto producido, circunstancia que ha dado un papel a la secreción y depósito de condroitín sulfato (114). Estos eventos señalan el inicio del estadio de maduración de la cicatrización de la herida.

Fase de remodelación

Comienza al **mismo tiempo que la fibroplasia y continúa durante meses y años** (115), durante esta el colágeno es remodelado y realineado a lo largo de las líneas de tensión, las células que no se requieren más son eliminadas por apoptosis. Depende de una equilibrada producción y degradación de los componentes de la MEC. Los miofibroblastos son las células predominantes de la mucosa que sintetizan **fibronectina, ácido hialurónico, proteoglicanos y colágeno** de la MEC, mientras que la degradación es mediada por enzimas proteolíticas derivadas de distintos tipos celulares, de las cuales la familia de las **MMPs** representan los más importantes (91). Con el tiempo la fibronectina y el ácido hialurónico van desapareciendo por acción de las enzimas proteasas y hialuronidasas respectivamente.

Durante la maduración, el colágeno tipo III, que se depositó durante la proliferación, se degrada gradualmente y a cambio se deposita **colágeno tipo I**, que es más fuerte. La fuerza tensil de la herida se incrementa a un 50% del tejido normal a los tres meses del inicio del proceso, al final alcanza una fuerza tensil hasta un 80% del tejido normal debido a que los colágenos fibrilares forman haces fibrosos que aumentan mucho la fuerza tensil del nuevo tejido.

Las **MMPs, endopeptidasas** dependientes del zinc, son las encargadas de degradar el colágeno inicialmente depositado. Se secretan como proformas inactivas, luego cada enzima madura tiene preferencia por diferentes proteínas de la MEC. Algunos MMPs, como la **colagenasa** (MMP-1), las **gelatinasas** (MMP-2 y MMP-9) y la **estromalisina** (MMP-3) están hiperactivas en las zonas cercanas a la anastomosis intestinal cuando estas no se han realizado en condiciones cuidadosamente asépticas. Este aumento de

función de las MMPs provoca la degradación de proteínas de la MEC del tejido submucoso donde se anclan las suturas de la anastomosis, pudiendo favorecer la debilidad de la misma (116).

Al final, la actividad celular disminuye y el tejido conjuntivo cicatricial se torna rico en colágeno, pobre en células y vasos sanguíneos. La regresión de tubos capilares excesivos en la herida refleja la diferenciación del tejido de granulación y el tejido cicatricial final (96).

1.4 Anastomosis intestinal

Evolución histórica

Desde la antigüedad, la unión de los segmentos del tubo digestivo para la restitución del tránsito intestinal ha sido uno de los pilares fundamentales de la cirugía digestiva. Su objetivo es dar continuidad al paso del contenido intraluminal de una forma estanca, evitando la filtración y la obstrucción de su contenido. Desde los inicios, hace más de 200 años, se ha pasado de un procedimiento que implicaba una alta mortalidad y morbilidad a ser un procedimiento rutinario y seguro. Para ello ha sido necesaria una evolución no solo de la cirugía experimental sino de otras disciplinas médicas (117).

Las anastomosis intestinales conocidas más tempranas fueron en realidad fístulas intestinales internas que partían de una base patológica, ya que, se producían a partir de complicaciones de enfermedades intestinales o de traumas penetrantes que dieron lugar a las mismas (118). Esta forma de tratamiento fue introducida por Philipp von Hohenheim Bombast Teofrasto hace 5 siglos (117).

Los antecedentes a la realización de la primera sutura intestinal retroceden a 1717 cuando **Johannes Palfijn** se da cuenta que las heridas intestinales son propensas a curar con la adhesión firme entre capas serosas de los extremos, aunque no llegó a esta conclusión mediante la sutura de los mismos. Esto dio pie a la primera anastomosis intestinal documentada realizada por **Philipp F. Ramdohr** en 1727. Casi 70 años más tarde un anatomista francés, **Marie-François-Xavier Bichat**, continúa esta línea de estudio y demuestra la importancia de la adhesión de las capas serosas intestinales frente a otras (117). Más tarde se introducen varias ideas que comenzaron a sentar las bases de una correcta técnica anastomótica de la mano de **Antoine Lembert**, que

introdujo en 1826 la aposición serosa o el concepto de asepsia propuesto por **Lord Joseph Lister** en 1867. Otro hito que impulsó el aumento de la realización de anastomosis de una forma determinante y más generalizada fue la introducción de la anestesia por **William Morton** en 1846 (117).

En la reunión de la Société Royale de Médecine en Marsella en 1826, **Felix-Nicholas Denans** introdujo un procedimiento nuevo para la realización de anastomosis en modelo animal mediante la realización de una anastomosis término-terminal utilizando un anillo metálico de plata o zinc, llamado anastomosis por compresión. Su principio se basa en la colocación de dos anillos contrapuestos que presionan el tejido a anastomosar entre sí, de forma subsiguiente se produce una isquemia y el desprendimiento de los extremos grapados liberando al lumen intestinal los anillos colocados inicialmente (119). En el mismo año, **Lembert** desarrolla un método de unión de segmentos intestinales mediante suturas invertidas que procuraba el enfrentamiento de una serosa contra la otra (118).

Desde entonces este nuevo concepto de anastomosis por compresión sigue su evolución de la mano de cirujanos como **Bonnier**, con la creación de nuevos dispositivos en 1885, y **Murphy** que desarrolla en 1892 el “botón de Murphy” (Fig.4). Se trataba de producir una necrosis limitada en los extremos que se iban a abocar mediante la colocación de dos anillos circulares sujetos mediante sendas bolsas de tabaco enfrentados uno al otro. Se utilizaron ampliamente desde su presentación, sin embargo, rápidamente se evidenciaron sus limitaciones que radicaban principalmente en la estenosis anastomótica y en la presencia de cuerpo extraño metálico que permanecía intraluminalmente hasta que se desprendía con el tejido necrótico, además se describieron casos de necrosis en la zona anastomosada (120). En este contexto a finales del siglo XIX, surge el cirujano germano **Billroth** que realiza exitosamente la primera anastomosis intestinal manual (121).

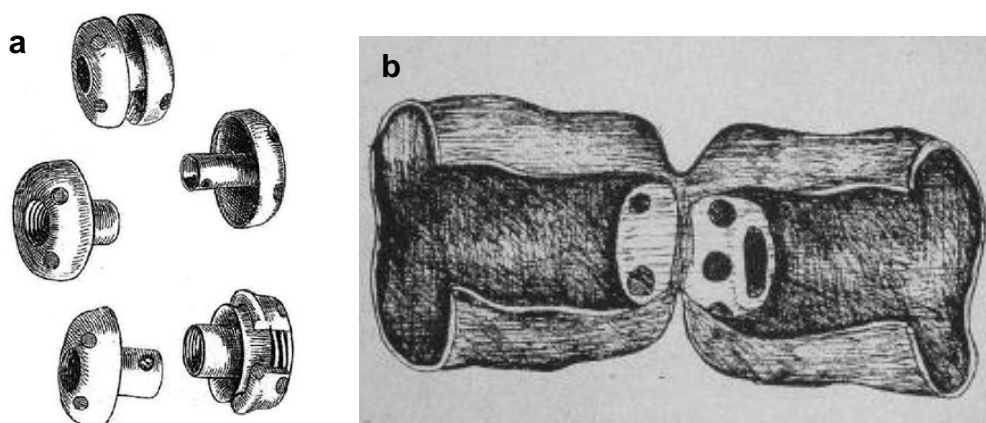


Fig.4 a) Botón de Murphy b) Disposición en la anastomosis

Muchos de los principios usados actualmente en la realización de anastomosis intestinales se deben a **Halsted** dados a conocer en 1887. Algunos de gran importancia como el reconocimiento del papel de la submucosa de la pared intestinal como responsable destacable del aporte de la fuerza donde se anclan los puntos de suturas al realizar las anastomosis.

No es hasta la primera década del siglo XX cuando comienzan a desarrollarse instrumentos quirúrgicos capaces de grapar tejidos, que han ido evolucionando hasta las máquinas modernas que encontramos en la actualidad. Los investigadores se han empleado a fondo para diseñar un método de anastomosis que excluya la posibilidad de fugas anastomóticas después de realizar una anastomosis intestinal.

Los dispositivos de grapado quirúrgicos se introdujeron por el húngaro **Humer Hütl** con la ayuda del ingeniero alemán **Víctor Fischer**, en 1908 presentan el primer dispositivo con grapas de acero inoxidable ideado para realizar anastomosis enterogástricas (121). En 1921 el Dr. **Aladar Von Petz**, discípulo de Hütl, modifica el instrumento anterior haciéndolo menos pesado y más fácil de manejar incorporándole un artilugio similar a una ruleta, al girarla secuencialmente desplazaba una pieza sobre un riel provocando el grapado doble del tejido situado entre sus dos extremos contrapuestos (122) (Fig.5). Este instrumento va adquiriendo modificaciones posteriores, desarrolladas por cirujanos como el Dr. **Friederich** que ingenia un sistema de cartuchos que cargan de grapas el instrumento, a otros doctores como **Sandor** en 1936, **Tomada** en 1937 y **Nakayama** en 1954 (122).

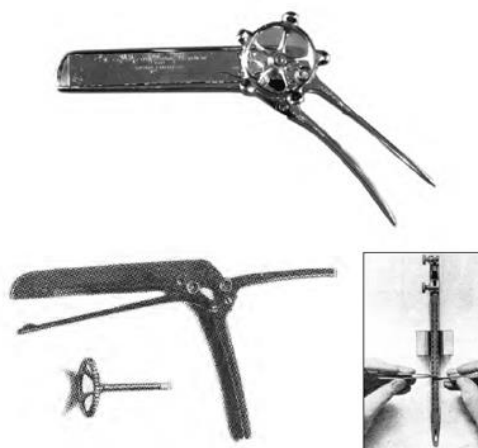


Fig.5 Dispositivo de Von Petz

En la década de los años 50 estos instrumentos experimentan un importante revulsivo de la mano de algunos cirujanos rusos. **Gudov** crea una máquina para suturas vasculares en 1950, que es posteriormente adaptado por el **Androsov** para su

utilización en cirugía digestiva (122). Se trata de máquinas de autosutura con cartuchos de grapas muy similares a los que existen actualmente. Tanto es así que, en 1960 el cirujano ruso **Kalinina** presenta la primera máquina de autosutura circular, con la cual era posible realizar anastomosis término-terminales en zonas quirúrgicamente complejas por su situación o características como anastomosis esófago-yeyunales, esófago-gástricas o rectales. Sin embargo, este dispositivo presentaba algunos inconvenientes importantes como la dificultad de mantener la limpieza y esterilización del instrumento, la eficacia de corte de la cuchilla y su desgaste, y principalmente porque sólo aplicaba una hilera de grapas con inversión de la anastomosis termino-terminal. A pesar de todo era un instrumento muy ingenioso que dio pie a los actuales instrumentos circulares de sección y grapado. Más tarde fue modificado en la ciudad de Lille por el Dr. **Vankemmel** (123). Sin embargo, a pesar de los resultados comparables en cuanto a mortalidad, dehiscencia de anastomosis e infección con las suturas manuales, la tasa de estenosis se situaba en niveles sensiblemente aumentados.

Mark Ravitch, estadounidense de la Universidad de Pennsylvania, realiza en 1958 un viaje a Rusia y descubre los instrumentos de grapado que se estaban comenzando a desarrollar, sobre todo en cirugía pulmonar (122). Tomando como modelo estos nuevos instrumentos, introduce mejoras globales en cuanto a materiales más adecuados basados en aleaciones de metales, las recargas de grapas para su reutilización es más fácil y ágil sin tener que desmontar el instrumento, mejor diseño articular y rotatorio de diferentes secciones que lo hacen adaptarse a zonas de mayor complejidad, se incrementa también la seguridad (124).

En 1963 y 1964 se produce un impulso definitivo cuando **Ratvich** comienza a trabajar con **Félix Steichen** y fundan una compañía dedicada a fabricar y desarrollar estos instrumentos: en este contexto se informa en 1977 del uso exitoso de una grapadora circular entre segmentos terminales del tracto digestivo con una doble línea de grapas y en 1978 se presenta un instrumento modificado para mayor comodidad similar a una pistola totalmente desechable (122) (Fig.6). Todo esto permitió que a partir de 1983 estos instrumentos fueran difundidos ampliamente (125).

El concepto de anastomosis por compresión ha continuado en el pensamiento de los investigadores. Por ello, en 1980 **Knight y Griffen** realizaron la primera anastomosis rectal por doble engrapado, lo cual resultó en un significativo impacto, sobre todo en la cirugía colorrectal que dio paso a que otros investigadores evolucionaran el dispositivo.

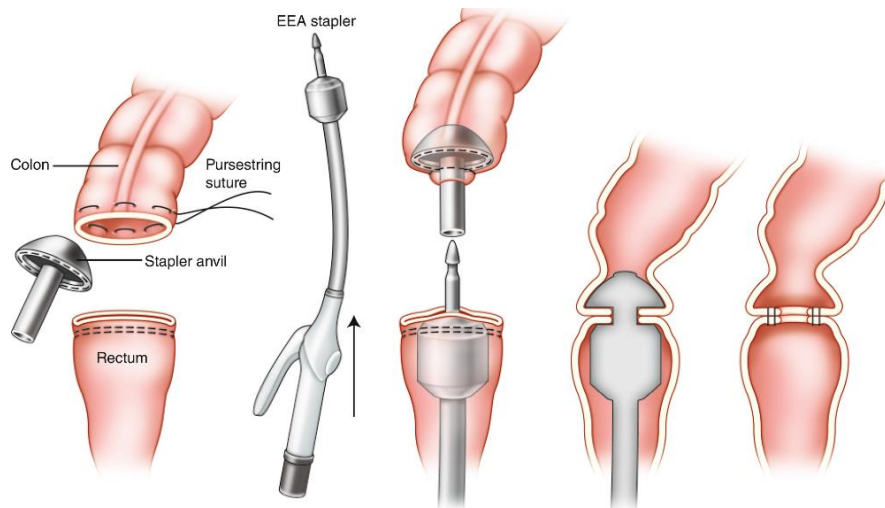


Fig.6 Instrumento mecánico grapador circular

En 1984 **Kanshin** et al. desarrollan el dispositivo AKA-2 para anastomosis transanales, que funciona de forma similar a los dispositivos de grapado endoanales pero incluyendo dos anillos de plástico que sujetan el tejido y presionan los extremos uno contra el otro mientras que un eje cortante secciona el tejido sobrante (119). **Hardy** y colaboradores presentan en 1985 el primer estudio experimental en el que se utiliza un anillo biodegradable para la construcción de una anastomosis (BAR), el cual contiene algunas de las características básicas del “botón de Murphy” pero con menos complicaciones demostradas (120). A día de hoy prosigue la evolución y recientemente se ha descrito un nuevo método basado en un clip anastomótico de compresión (Hand CAC) (Fig.7). El clip es elíptico de 30 mm de diámetro y está formado por una aleación de níquel-titanio que se coloca en los extremos seccionados colocados en paralelo de forma anisoperistáltico (126).

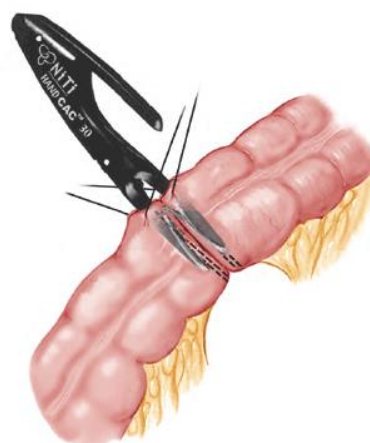


Fig.7 Dispositivo Hand CAC

Actualmente se están llevando a cabo ensayos en animales para la colocación de dispositivos autoorientados de base magnética para la realización de anastomosis

intestinales, estos dispositivos ya han demostrado ser prometedores en anastomosis biliares y vasculares (119).

——— Técnicas actuales: sutura manual y mecánica ———

La correcta realización de una anastomosis digestiva está sujeta a una serie de condicionantes, tanto locales como sistémicos, pero además debe cumplir unos **principios fundamentales**. Estos principios tienen que ver con la realización adecuada de la anastomosis que procuren unas condiciones perfectas para favorecer la cicatrización (127):

- los cabos a anastomosar deben estar **bien irrigados**
- deben ser **similares** en cuanto a diámetro
- las capas intestinales deben ser **coincidentes y estar bien enfrentadas** (mucosa con mucosas, submucosa con submucosa, muscular con muscular, serosa con serosa)
- deben realizarse de forma **hermética**
- **evitar tensión** y angulaciones en la sutura
- comprobar que **no exista obstrucción** distal intestinal con respecto a la anastomosis

A nivel local, algunas **características anatómicas y fisiológicas** influyen en la realización de la anastomosis. Por un lado, no todos los segmentos del tubo digestivo se comportan igual cuando se confecciona una anastomosis y, por otro lado, la localización del segmento a anastomosar implica una mayor o menor dificultad, como ocurre a nivel del esófago y del recto. Además, las condiciones en que se realicen también son un elemento a tener en cuenta, es importante realizarlas en un ambiente aséptico y sin presencia de líquidos patológicos como material purulento o ascitis.

A **nivel sistémico** existen situaciones que potencialmente pueden tener relación con peores resultados anastomóticos. Algunos pueden ser más o menos modificables como inestabilidad hemodinámica, desnutrición proteico-calórica, hipoalbuminemia, administración de fármacos inmunosupresores o que alteran la cicatrización (ej.-corticoides). Otras enfermedades sistémicas no pueden ser evitadas, aunque sí

optimizadas de cara a una inminente intervención: diabetes, EPOC, insuficiencia renal, insuficiencia hepática, HIV...

Otros aspectos influyentes, que dependen sobre todo del cirujano y su experiencia, se centran en las **características técnicas en la realización de la anastomosis** y el tipo de material utilizado para realizarla. Con lo que las anastomosis se pueden clasificar dependiendo de estos criterios (127):

1. Según la forma en la que abocan los segmentos del tracto digestivo involucrados en la reconstrucción: anastomosis termino-terminales, termino-laterales, latero- terminales o anastomosis latero-laterales (se nombra primero el segmento del tracto digestivo proximal).
2. Según la técnica que empleemos en su confección podemos hablar de anastomosis mediante sutura manual, sutura mecánica (grapadora), mecanismos o instrumentos de compresión, pegamentos biológicos y termofusión.
3. La forma de aplicarlos sobre el tejido: sutura con puntos sueltos o separados versus sutura continua, en un plano o en dos planos, puntos extramucosos o de espesor total.
4. Según los materiales utilizados para las suturas manuales. A)Tipo reabsorbible: ácido poliglicólico, poliglactina 910, polidioxanona (PDS), poligliconato y poliglecaptoprona. B) irreabsorbible: polipropileno.
5. En las anastomosis mediante grapadoras mecánicas: doble línea de grapado, separación entre unidad de grapado y tamaño de grapas metálicas utilizadas.

SUTURA MANUAL

En la actualidad, la sutura manual forma parte fundamental en la actividad del cirujano digestivo. Existe una gran variedad de técnicas para realizar suturas manuales en la anastomosis intestinal que va a depender de ciertos aspectos a elección del cirujano que la realiza (normalmente basados en su propia experiencia) como: el material de sutura utilizado, el formato de sutura aplicado (tamaño, espesor, distancia y tensión de los puntos; configuración del punto y la posibilidad de utilizar puntos invertidos y evertidos), anastomosis en uno o dos planos, suturas continuas o

entrecortadas y la posición de los extremos intestinales enfrentados (128); (127). La sutura ideal sería aquella que no genera rechazo y por tanto no causa inflamación, manteniendo la adecuada tensión durante el proceso de cicatrización, sin riesgo de contaminación al pasar por los tejidos y que proporcione un manejo sencillo.

A. Materiales de sutura

A lo largo del tiempo se han utilizado muchos materiales para la construcción de la anastomosis como la seda, el lino o el catgut... (128). Actualmente existen unos materiales más modernos reabsorbibles que son bien tolerados por los tejidos y mantienen la fuerza tensil durante el tiempo suficiente para que se produzca el proceso de cicatrización: el ácido poliglicólico, poliglactina 910, PDS, poligliconato y poliglecapróna. Además el material ideal debe procurar escasa reacción histológica y la mínima adherencia bacteriana al material de sutura, criterios que cumplen aquellas suturas que están formadas por un único filamento (monofilamento) en contra de las formadas por múltiples filamentos (multifilamento) (128). Las últimas innovaciones en suturas incluyen el transporte de células madre mesenquimales junto con doxiciclina, que parecen tener resultados prometedores aunque a día de hoy no concluyentes (129) (130).

B. Confección de la sutura

Se pueden utilizar muchas variantes para la confección de la anastomosis:

- Suturas **continuas frente a puntos entrecortados**. Las suturas de puntos sueltos pueden ocasionar menos isquemia sobre el tejido, permite la aposición del tejido exacto y minimiza el riesgo de la implantación de las células malignas (131). Mientras que las suturas continuas son más rápidas de realizar e igualmente eficaces incluso en situaciones anatómicas más complejas (132). La mayoría de los estudios que realizan una comparativa entre estos dos tipos no evidencian de forma significativa cuál es la mejor técnica en cuanto a menos complicaciones secundarias (128). Aunque algunos estudios con grandes series inciden en que la anastomosis intestinal con puntos entrecortados sigue siendo el gold standard, excepto en algunas localizaciones más dificultosas, como en uniones colorrectales (133).
- En cuanto a la **distancia que deben tener los puntos con respecto al borde** seccionado se establece que distancias de 5 y 10 mm es adecuada con buenos resultados. La configuración de los puntos empleados depende de otros

aspectos como el **espesor englobado**, pudiéndose distinguir entre puntos de espesor total o sero-submucosos, sin embargo, no parece que existan diferencias en cuanto a mayor incidencia de dehiscencia de suturas entre ambos. Finalmente la tensión empleada es otro elemento diferencial entre cirujanos, ya que, una mayor tensión podría disminuir la fuga de anastomosis pero como contrapartida también puede comprometer la irrigación del tejido anudado (128).

- Suturas **en un plano o en dos planos**. La técnica en un plano consiste en enfrentar los extremos intestinales mediante una única sutura, ya sea continua o entrecortada, o por medio de puntos totales o sero-submucosos (131). Sus ventajas potenciales pasan por consumir menos tiempo en su realización, generar menos reacción de cuerpo extraño, menor isquemia y un coste menor (134). Si agregamos una segunda sutura de refuerzo en las capas externas, tipo sero-serosa y normalmente mediante puntos entrecortados, se define la técnica en dos planos. Con intención de aumentar la estanqueidad y disminuir la tensión sobre la línea de sutura anterior (134). Sin embargo, al comparar las dos opciones técnicas no existen diferencias significativas que demuestren la superioridad de una frente a la otra. Aunque en términos de tiempo y económicos parece que la técnica en un plano ofrece algunas ventajas a considerar (135).
- Un aspecto que queda más claro es la necesidad de realizar las suturas intestinales mediante **puntos invertidos** y no evertidos (136).

SUTURA MECÁNICA

La anatomía de la anastomosis intestinal grapada se asemeja a la anastomosis manual tradicional en dos planos, de manera que las grapas mantienen los extremos unidos invertidos hasta que se produce la cicatrización (131). Desde su introducción a principios del siglo XX no han dejado de evolucionar (122), ofreciendo actualmente una alternativa importante a la sutura manual. Por un lado, el material de **titanio** con el que están confeccionadas las grapas, que quedarán incluidas en el tejido, causa menor reacción inflamatoria y por tanto menos reacción de cuerpo extraño. Por otro lado, los tiempos quirúrgicos se acortan, se pueden emplear en localizaciones anatómicas más complejas y las anastomosis mantienen una mayor uniformidad. Se ha producido más notoriamente un gran impacto tras la introducción en la cirugía colorrectal y esofágica. Pero no todo son ventajas, el **alto coste** de estos instrumentos mecánicos hace que no se puedan utilizar de forma generalizada e incluso justificar su uso en aquellas localizaciones donde se puede realizar una anastomosis manual con total

seguridad (125), además se ha descrito un mayor riesgo de sangrado y estenosis en las líneas de sutura (137).

Los instrumentos se dividen fundamentalmente por el dibujo que forma la sección y el grapado que producen, diferenciándose en **circulares y lineales**. Formas que se utilizarán según la coyuntura anatómica y el tipo de anastomosis que se pretende realizar: término-terminal, término-lateral o latero-lateral, en función de la posición de los extremos enfrentados. Éstos instrumentos han ido adaptando su fisionomía para su utilización por vía laparoscópica en las mismas condiciones de seguridad y versatilidad.

Además, existen otras diferencias sustanciales en cuanto a las **características de las grapas** que varían en su número, anchura, profundidad de la grapa cerrada y la distancia entre las grapas. De esta forma se puede adecuar cada tipo de grapa con las particularidades del tejido. Cuestión esta importante, ya que la grapa debe ajustarse perfectamente a la longitud y espesor del tejido para lograr una correcta hemostasia sin llegar a isquemizarlo.

Actualmente no existe una superioridad comparativa entre los grupos de técnicas manuales y mecánicas, tampoco se ha podido demostrar hasta la fecha que exista mayor número de complicaciones de las suturas realizadas manualmente o mecánicamente, independientemente de la localización de la anastomosis. Y por tanto, la elección de unas u otras técnicas se debe más a la preferencia y experiencia del cirujano, junto a factores económicos y de disponibilidad (138). Sin embargo, sí queda claro que el avance de las suturas mecánicas ha aportado la posibilidad de realizar anastomosis en situaciones anatómicas muy complejas donde anteriormente no podían realizarse con total seguridad e incluso en cirugía colorrectal se han podido evitar cirugías más radicales en favor de la reconstrucción del tránsito intestinal muy distal. Además con el auge de la cirugía laparoscópica se han acortado mucho los tiempos quirúrgicos realizando un abordaje menos invasivo pero obteniéndose unas anastomosis del tracto digestivos seguras y fiables, tanto como las suturas manuales (137).

1.5 Modelo experimental en el estudio de anastomosis intestinales

Modelos animales

El significado y validez con respecto a la utilidad en términos de “extrapolabilidad” de resultados generados en un modelo animal depende de la selección de un apropiado modelo animal. Un buen conocimiento de la anatomía y fisiología comparadas es una ventaja obvia para desarrollar un correcto modelo animal. Para lo cual debe seleccionarse la especie, raza, cepa o estirpe más adecuada

A lo largo de los años se ha pretendido estudiar la cicatrización y la fuga anastomótica con el objetivo de disminuir sus tasas o estudiar aquellos factores que pueden favorecerla. Para ello se han ideado técnicas y suturas de nueva confección o se han utilizado materiales o sustancias que refuercen la anastomosis como pegamentos, parches de distintos materiales, instrumentos mecánicos, stents (139); (140)... que son aplicados inicialmente en un modelo animal experimental. Sin embargo, es difícil extrapolar los resultados de estos estudios experimentales a los seres humanos. La anatomía y la fisiología de los seres humanos son distintas a los modelos animales, además las características fisiopatológicas que reúne el ser humano, contexto en el que se produce el fallo de anastomosis, es difícil de imitar en un modelo animal (141). Por tanto, un aspecto importante que se debe tener en cuenta al plantear un estudio de experimentación es el modelo animal ideal a utilizar, que sea extrapolable a las características humanas y que esté normalizado. Cada especie animal tiene características propias que pueden convertirse en criterios de elección para el investigador. Obviamente, para realizar un experimento eficaz, deben conocerse esas características.

Durante décadas se han propuesto y utilizado diferentes modelos animales con este fin empero, lejos de llegar a un consenso, esto ha conducido a una heterogeneidad anatómica y fisiológica. Actualmente parece que sigue sin encontrarse un modelo que sea realmente práctico, válido y reproducible (142).

A priori parece que los **cerdos** son los animales disponibles anatómicamente más comparables para los experimentos quirúrgicos, siendo una de las mayores áreas de investigación quirúrgica la de los trasplantes de órganos. Su piel ha sido ampliamente estudiada en ensayos de cirugía plástica reconstructiva y en estudios de fisiopatología,

por ser más similar a la humana que otras especies. Además, son animales muy prolíficos, que se adaptan bien a cualquier entorno y alcanza la pubertad a una temprana edad, características que facilitan su uso como animal de experimentación. No obstante, pueden resultar menos adecuados por su difícil manejo debido al tamaño que adquiere y su carácter agresivo.

Los roedores presentan unas características que los hacen muy adecuados para su uso en laboratorio por su pequeño tamaño, prolificidad, su facilidad de manejo y mantenimiento. El ratón es el más conocido y utilizado en la experimentación *in vivo* en biología y medicina, muchos expertos lo consideran el modelo animal casi perfecto porque tiene una alta tasa reproductiva con un corto período gestacional, es de fácil y económico mantenimiento, su genoma es perfectamente conocido y es uno de los animales más sofisticados que puede ser utilizado para investigación (143). Además, presenta otras características experimentales, como la susceptibilidad de desarrollar tumores y escasa longevidad, que los hacen adecuados en estudios en otros campos como en toxicología, inmunología y oncología. Una revisión sistemática realizada en 2011 analiza las características de varias especies animales para seleccionar el modelo más adecuado para el estudio de la dehiscencia de anastomosis colónica, concluyendo que el **ratón** se acerca más al modelo idóneo dadas sus características (144).

No obstante, en publicaciones posteriores la tendencia es utilizar la **rata**, probablemente por la menor complicación técnica dado su mayor tamaño (145), utilizada también en investigaciones nutricionales, comportamentales, endocrinológicas y muy utilizado en microcirugía. A pesar de ello, la rata manifiesta una respuesta clínica muy disminuida comparada con lo que ocurre en el humano, produciéndose menor tasa de peritonitis y/o abscesos intraabdominales secundarios a fuga anastomótica de lo que cabría esperar (146). Esto puede explicarse por varias circunstancias, por un lado, la rata es más resistente a las infecciones de forma general y, además posee un sistema inmune intraabdominal más eficiente. Y, por otro lado, la gran consistencia fecal de la zona más distal del colon de la rata disminuye el número de fugas clínicas, e incluso fugas producidas en zonas más proximales (colon transversal) también han sido muy resistentes a provocar una clínica florida (141). De esta forma, en roedores e incluso en otros modelos animales, la tasa de dehiscencia anastomótica espontánea cuando estas se realizan técnicamente perfectas es muy baja y no es comparable a la anastomosis de colon en condiciones clínicas en humanos. En modelos de roedores y porcinos, incluso las anastomosis colónicas dehiscentes primarias no logran reproducir la historia natural de las fugas anastomóticas y sus graves consecuencias comparables al

escenario humano (147). A pesar de estos inconvenientes, las ratas se consideran como un modelo de experimentación muy adecuado para estudios que evalúan las características anastomóticas y su comportamiento (141) (148), debiéndose utilizar los criterios y los métodos adecuados para determinar la efectividad del sellado anastomótico en la cicatrización del colon.

Parámetros de medición

En estudios experimentales se desarrolla frecuentemente la observación y descripción de **parámetros meramente histológicos** que se correlacionan con el proceso de cicatrización de los tejidos. Se comparan los acontecimientos que ocurren en la cicatrización cutánea normal, que son los más estudiados y por tanto conocidos, con los que ocurren a nivel de otros tejidos, en este caso del tejido gastrointestinal. Se lleva a cabo un examen histológico donde se analizan: la reepitelización de la mucosa, la infiltración de células inflamatorias tanto neutrófilos como células gigantes, la actividad fibroblástica, el depósito de colágeno y la neovascularización o neoangiogénesis (85). Mediante la observación y estudio microscópico de cortes representativos de anastomosis de colon bajo tinción con **hematoxilina-eosina** y **tinción tricrómica de Masson**. Sin embargo, este método tiene el inconveniente de no ser cuantificable de forma exacta y estar sometido en gran medida a la subjetividad por parte del evaluador (149). En fases iniciales de la cicatrización, histológicamente se observa una fuerte infiltración de células polimorfonucleares como neutrófilos, eosinófilos e histiocitos sobre todo en la lámina propia de línea de anastomosis y circundante al material de sutura, acompañado de edema. Luego comienza a hacerse evidente la migración de fibroblastos que se describen en los bordes anastomosados y la angiogénesis que se visualiza en la submucosa. A continuación, se reconocen los puentes de fibras de colágeno que se extienden desde las capas submucosas de un borde al contralateral de la herida. A partir del séptimo día aproximadamente, el edema va desapareciendo y se advierte un tejido de granulación bien organizado que va envolviendo el material utilizado para la sutura de la anastomosis, formando una reacción a cuerpo extraño donde abundan las células gigantes, y puede observarse cómo los macrófagos están presentes para retirar las células y el tejido sobrante en el proceso de cicatrización. Para que más adelante, se aprecie la regeneración epitelial completa con sus células columnares glandulares (88).

Muy extendida en la experimentación es la utilización de parámetros biomecánicos para medir la resistencia de las suturas, mediante pruebas de presión de rotura y de

resistencia a la tracción de la anastomosis (150). No se puede establecer una correlación de los resultados obtenidos al utilizarlas en la misma fase de cicatrización anastomótica (151). En el primer caso se trata de aumentar la presión intraluminal progresivamente mediante la instilación de suero fisiológico hasta alcanzar la rotura, de esta forma se evalúa la integridad y el riesgo de producirse una fuga. Dado que la presión de rotura aumenta progresivamente una vez realizada la anastomosis colónica puede ser un método útil para detectar cambios tempranos en la misma (150), coincidiendo con la fase inflamatoria (152). La fuerza ejercida durante la prueba de presión a la rotura es similar a la que se produce de forma natural intraluminalmente contra la sutura anastomótica, aplicándose a lo largo de toda la circunferencia interna (153). En contraste, la resistencia a la tracción consiste en aplicar una fuerza de tracción perpendicular a la línea de anastomosis creciente (de 0,03 a 0,05 N/s) hasta alcanzar la rotura (152). Aunque existe variabilidad entre diferentes autores, es menos sensible para detectar cambios durante los 3-4 primeros días tras la realización de una anastomosis colónica (150) (154), pudiendo ser más idónea en el período comprendido entre los 7 y los 28 días postoperatorios (150), relacionado con fases más avanzadas de la cicatrización como proliferación y maduración (152). A partir de los 14 días postoperatorios la resistencia se atribuye más claramente al proceso de cicatrización en lugar de a la sutura aplicada (155). Con la utilización de dispositivos precisos en modelos experimentales se han estimado los valores de presión de rotura y de resistencia a la tracción de una anastomosis mediante el estudio de varias variables: presión de rotura, la resistencia a la tracción mínima y la resistencia a la tracción máxima. Al contrario de lo que se afirma anteriormente, el cálculo de la resistencia a la tracción mínima, es decir la fuerza de tracción mínima necesaria para provocar una rotura parcial de la anastomosis, parece ser el parámetro recomendado para evaluar la curación de la anastomosis colónica (151).. Cuando disminuye la resistencia anastomótica no se puede establecer una correlación directa con el contenido de colágeno de la misma durante el proceso de cicatrización (155).

Como se ha explicado, en la curación de las heridas también intervienen los fibroblastos que reemplazan la matriz extracelular provisional formada en las fases iniciales de inflamación por un tejido de granulación rico en colágeno. Por tanto, la síntesis y degradación de este material puede interpretarse como marcadores de la cicatrización de la anastomosis. La presencia de colágeno se advierte de forma indirecta mediante la detección de **hidroxiprolina**. Esta se correlaciona con la cantidad de colágeno depositado o sintetizado (156).

La presencia de hidroxiprolina era específica para el colágeno hasta que ha sido descubierto en otras proteínas como: elastina, C1q (un subcomponente del sistema del complemento) y acetilcolinesterasa. Aun así, es un aminoácido que se encuentra casi exclusivamente en el colágeno, por ello la cantidad de hidroxiprolina se toma como medida de colágeno que contienen los tejidos. En la anastomosis intestinal, la concentración de hidroxiprolina que se mide se puede usar generalmente como parámetro bioquímico de la cicatrización de la misma. Sin embargo, la interpretación de estos datos debe hacerse con cuidado y moderación, ya que, a lo largo de la longitud del colon la cantidad de colágeno es bastante variable y aún más en las anastomosis intestinales, como se ha demostrado en muchos estudios sobre el metabolismo del colágeno usando modelos animales. Además, no proporciona información sobre subtipos, madurez y por tanto tampoco ofrece datos de la fuerza adquirida por el nuevo tejido. Por tanto, la detección de prolina, hidroxiprolina o metaloproteasas, según algunas publicaciones, son marcadores menos específicos y con una relación indirecta con la síntesis y la destrucción del colágeno (149).

Para algunos autores, la utilización de nuevos elementos medibles para cuantificar el grado de cicatrización, como las moléculas de procolágeno y de telopéptido terminal del colágeno tipo I, abren nuevas puertas para cuantificar el grado de cicatrización de heridas intestinales, pudiéndose emplear como marcadores de síntesis y de destrucción, respectivamente. Las técnicas de radioinmunoanálisis pueden identificar la cantidad de colágeno tipo I depositado en el tejido cólico tomando estos marcadores como indicadores del metabolismo del colágeno (157). Un estudio realizado por Álamo JM y colaboradores comprobó un aumento en el metabolismo del colágeno reflejado en un incremento estadísticamente significativo tanto en los niveles de síntesis como de destrucción, probablemente este aumento de destrucción del colágeno se deba al momento en el que se realizó el análisis, solapándose tanto el momento de producción de colágeno por parte de las células fibroblásticas como la fase de remodelación (149).

1.6 Dehiscencia de anastomosis intestinal

Definición e incidencia

La definición más aceptada universalmente es la propuesta en 1991 por el United Kingdom Surgical Infection Study Group como **“la salida de contenido intraluminal desde la unión quirúrgica de dos vísceras huecas”**. Estos contenidos pueden salir a

través de heridas o drenajes o acumularse en la vecindad de la anastomosis. Sin embargo, esta definición continúa ofreciendo una visión muy general y no cuenta con otros aspectos que también se relacionan con la dehiscencia de anastomosis como los hallazgos radiológicos, la clínica del paciente o el tratamiento necesario. Por ello en 2001 **Bruce** y colaboradores recomiendan una subdivisión en tres grupos de la definición de dehiscencia anastomótica que tiene en cuenta algunos más parámetros relacionados (158):

- o **Radiológica** → hallazgo radiológico casual en estudio de paciente asintomático con antecedentes de cirugía colorrectal.
- o **Clínica menor** → confirmada radiológicamente en paciente sintomático con fiebre $>38^{\circ}\text{C}$, leucocitosis $>10000/\text{L}$ y secreción intestinal o purulenta a través de herida o drenajes, pero que no requieren reintervención quirúrgica aunque alargan la estancia hospitalaria del paciente.
- o **Clínica mayor** → que a diferencia de la anterior sí requiere reintervención quirúrgica por el grado de dehiscencia anastomótica y sus consecuencias clínicas.

Esta subclasificación es similar a la realizada en 2010 por el **Grupo Internacional de Estudio del Cáncer Rectal** (ISGRC), donde la comunicación entre los compartimentos intraluminales y extraluminales da lugar a una clínica y una actitud terapéutica que se agrupa en tres niveles y es capaz de englobar todas las situaciones de dehiscencias:

Grado A: no requiere intervención terapéutica activa, los pacientes están asintomáticos por lo que se detectan de forma casual tras realización de pruebas radiológicas.

Grado B: requiere intervención terapéutica activa, pero sin necesidad de relaparotomía. Respondiendo habitualmente a tratamiento antibiótico y/o drenajes percutáneos.

Grado C: requieren relaparotomía para su tratamiento (159) (160).

En la literatura, existe una gran variación en cuanto a la **incidencia** de fuga anastomótica, que oscila desde el **1% al 30%** según las series (161) (162), aunque en cirugía colorrectal la incidencia oscila en torno a un **1,8-15,9%** (163) y si valoramos los

pacientes con repercusión clínica la prevalencia disminuye situándose entre el 3% y el 6% de los casos (164). Las tasas de dehiscencias más altas descritas en la literatura se asocian a un diagnóstico incidental durante la realización de un examen radiológico de rutina postoperatorio (165). La explicación a esta variabilidad puede residir en gran medida en tres aspectos: en primer lugar, la definición de fuga anastomótica o dehiscencia de sutura que aceptan los distintos autores a la hora de calcular su incidencia. En segundo lugar y en clara relación con lo anterior, el método de diagnóstico de la existencia de la misma. Un tercer factor, es la localización anatómica donde se haya realizado la anastomosis que se estudia (166). Así, la mayoría de estudios que investigan la etiología y tasa de fugas anastomóticas utilizan diferentes variables clínicas para identificarla como la peritonitis, el absceso, la fiebre, el drenaje de material intestinal a través de heridas y drenaje intraabdominal, y los parámetros radiológicos (167).

El impacto en los pacientes cuando ocurre es desastrosa, ya que está asociada a unos **elevados niveles de morbilidad y a un impacto importante de la mortalidad alcanzando cifras del 10 al 15%**. A esto hay que añadir que la dehiscencia que ocurre en el contexto de una cirugía oncológica colorrectal se ha asociado con un aumento de la recidiva local y una disminución de la supervivencia tras la cirugía (168). Además, su tratamiento frecuentemente requiere múltiples intervenciones, estomas transitorios o definitivos, asistencia en una unidad de cuidados intensivos y, por ende, un mayor tiempo de estancia hospitalaria y mayores costes sanitarios (162).

Factores asociados

Los factores de riesgo implicados en el proceso de cicatrización, así como en la fuga anastomótica, son numerosos y variados. Se pueden clasificar y agrupar de diferentes maneras, así Telem y colaboradores los dividieron en factores asociados al paciente o preoperatorios, factores intraoperatorios y comorbilidades del paciente (169). Desde otro punto de vista, Platell y colaboradores realizaron un estudio prospectivo analizando más de 1500 intervenciones de cirugía colorrectal, donde se incluían pacientes tanto con enfermedad oncológica como inflamatoria. Los resultados desvelaron una serie de factores de riesgo que más tarde diferenciaron en función de la localización de la cirugía, distinguiendo entre cirugía extraperitoneal y cirugía intraperitoneal (165). Estudios más recientes como el de Kingham et al, clasifican estos factores de riesgo en tres grupos: los preoperatorios específicos de cada paciente, los intraoperatorios y los específicos de la resección anterior de recto (167).

Para su estudio más sencillo a continuación se establecen dos amplios grupos que engloban la mayor parte de los factores de riesgo conocidos en la actualidad. El primer grupo queda establecido preoperatoriamente, están relacionados con el estado basal del paciente (estado nutricional, obesidad...), las condiciones patológicas (diabetes mellitus, cardiopatías, neumopatías...), los hábitos tóxicos (tabaquismo, alcoholismo), la medicación habitual (uso de corticoides, anticoagulantes...) o el tratamiento neoadyuvante (historia de radioterapia o quimioterapia previa); también se engloban otros factores preoperatorios que no son modificables como la edad o el sexo. El segundo grupo queda definido durante el desarrollo del acto quirúrgico en sí, son los propiamente intraoperatorios, por lo que están relacionados con la técnica quirúrgica como el uso o no de drenaje intraabdominal, la tensión anastomótica y la transfusión sanguínea perioperatoria; además se ha de incluir los factores locales dependientes del segmento del tubo digestivo afecto, como aquellos que son específicos para la anastomosis rectal (166) o si se trata de cirugía electiva o urgente.

A pesar de que muchos de estos factores son reconocidos y estudiados, sigue siendo difícil predecir el desarrollo de dehiscencia de anastomosis intestinal de forma individualizada (170). Todos los cirujanos están de acuerdo en aquellos aspectos cualitativos que llevan a las mejores condiciones de la anastomosis: una **adecuada irrigación sanguínea** y **aproximación sin tensión** de la línea de sutura **sin compromiso hermético** de la luz intestinal (171).

A. FACTORES PREOPERATORIOS

Son aquellos que quedan definidos antes de la intervención quirúrgica, algunos pueden ser modificables antes de la intervención y otros no. Los más reconocidos por la mayoría de autores son el sexo masculino, tanto la obesidad como el estado nutricional deficitario, el abuso de alcohol y tabaco, la valoración según la escala ASA (American Society of Anesthesiologists) y el uso crónico de ciertos medicamentos como esteroides. Sin embargo, otros factores presentan más controversia a la hora de relacionarlos con la dehiscencia de sutura como la edad, la administración de ciertos fármacos como AINEs, la radioterapia y/o quimioterapia neoadyuvante, estados patológicos cardiovasculares o endocrinos, la preparación mecánica del intestino... Por otra parte, también existen factores que están en estudio como ciertos fármacos (antibióticos, quimioterápicos), la arteriosclerosis...

- **Estado nutricional: desnutrición, obesidad**

La **desnutrición** del paciente se asocia con un mayor riesgo de dehiscencia de anastomosis, ya que, influye en procesos que tienen que ver con la síntesis de colágeno, la síntesis de sulfato (mucopolisacáridos) y en procesos que intervienen en la proliferación de fibroblastos (172). La medición de esta se lleva a cabo determinando unos niveles bajos de albúmina, algunos autores han establecido el límite por debajo de los 3,5 gr/dL (173) otros autores han relacionado la desnutrición con una disminución de la concentración de proteínas séricas por debajo de los 6 gr/dL e incluso por una pérdida de peso pronunciada, mayor a 5kg de peso. En este sentido, un reciente y amplio estudio retrospectivo realizado por Kang y colaboradores establece una correlación entre la pérdida de peso y la desnutrición preoperatoria y la incidencia de dehiscencia de anastomosis, junto con otros factores que se describirán más adelante (174).

Además, hay que tener en cuenta que normalmente coexisten con la desnutrición otros muchos factores que pueden influir en la cicatrización de los tejidos mermando, como por ejemplo la anemia que acompaña a los pacientes desnutridos, de esta forma se ejerce un efecto potencial que disminuye el proceso de cicatrización anastomótica (172).

En la situación opuesta, la **obesidad** también se ha relacionado con mayor índice de dehiscencia anastomótica, explicado sobre todo por la dificultad técnica pero también por la mayor isquemia, secundaria a unos mesos gruesos y cortos que pueden ser deficitarios en cuanto a las necesidades de aporte sanguíneo a la anastomosis. También debido a una mayor tensión que se ejerce en los bordes anastomosados. La medición de la obesidad, según diversos estudios, es más precisa si se realiza estimando la grasa visceral, tomando la medida de la circunferencia de la cintura o la relación de la cintura/cadera (175). Por lo tanto, más que la obesidad en general, el aumento de la grasa visceral puede considerarse como un factor independiente de dehiscencia anastomótica (173). A pesar de estas consideraciones, en un metaanálisis que estudia los factores de riesgo involucrados en la dehiscencia de anastomosis tras resección anterior de recto laparoscópica algunos de los estudios relacionan un índice de masa corporal (IMC) mayor de 25 kg/m² con incremento significativo de dehiscencia anastomótica (176).

- **Condición patológica**

La comorbilidad del paciente puede establecerse como factor de riesgo para desarrollar dehiscencia de anastomosis. Tales patologías pueden incluir diabetes

mellitus, enfermedad pulmonar subyacente, enfermedad vascular como arteriosclerosis, enfermedad renal, diverticulosis (que produce una hipertrofia de la pared muscular sobre la que se asienta la anastomosis)... Sin embargo, existe controversia acerca de la seguridad de considerarse factores independientes o no para incrementar este riesgo, según los estudios que se analicen. Parece haber un mayor consenso si se analizan estas enfermedades en conjunto mediante ciertos sistemas de valoración de comorbilidades como el sistema de puntuación ASA o el CCI (Charlson Comorbidity Index). Incluso, si se comparan estos dos sistemas, el ASA puede tener una predicción superior que el sistema CCI (173).

En un metaanálisis que analiza estudios que correlacionan los grados de puntuación ASA con dehiscencia de anastomosis se observa cómo el riesgo de ésta se incrementa significativamente en pacientes con puntuación > de 2 (176). De manera que por cada incremento de una unidad de la puntuación ASA puede aumentar hasta 2,5 veces el riesgo de dehiscencia de anastomosis (164) (172). Por consiguiente, los grados II al V del sistema ASA parecen estar relacionados con mayores tasas de dehiscencia de anastomosis debido a que algunas comorbilidades como la diabetes, la HTA y las alteraciones cardíacas tienen su base patológica en la afectación de la microcirculación, fundamental para la integridad de la anastomosis (173).

Otros estudios analizan la correlación de CCI con el riesgo de dehiscencia de anastomosis (177). Este índice evalúa tanto el número de comorbilidades que coexisten en el paciente como el grado de gravedad de éstas estableciendo una puntuación global, parece que una puntuación mayor de 3 en este índice supone un mayor riesgo.

- **Hábitos tóxicos**

Es bien conocido el papel etiológico del tabaco y el alcohol en patologías relacionadas con neoplasias de diferentes órganos, enfermedades del aparato respiratorio, aparato urinario, aparato digestivo, circulatorio... a esta larga lista de afecciones también se puede sumar la implicación como factor de riesgo en la dehiscencia de anastomosis digestiva. Por un lado, el tabaco es responsable de alteraciones importantes de la microcirculación, que podría estar relacionada con la isquemia y subsiguiente potenciación de la dehiscencia. Existen varios estudios que establecen que los antecedentes de fumador importante (al menos 40 paquetes de tabaco al año) como factor de riesgo independiente (178) (179) (180). Por otro lado, el alcohol se vincula con un estado nutricional deficiente, sobre todo en ingestas mantenidas e

importantes (175), así antecedentes de más de 21 unidades semanales de alcohol está relacionado con mayor riesgo de dehiscencia anastomótica (173).

- **Medicación habitual**

Cada vez existen más pacientes polimedicados, con frecuencia muchos de estos tratamientos están relacionados con una merma la de la respuesta inflamatoria y/o cicatricial, necesarias para una correcta cicatrización anastomótica. Tal es el caso de tratamientos inmunosupresores, inmunomoduladores, uso prolongado de corticoides e incluso el tratamiento de AINEs perioperatorios (173).

El **uso prolongado de corticosteroides** puede ser un factor de riesgo para dehiscencias anastomóticas, ya que, influye sobre la cicatrización disminuyéndola, el riesgo se ha constatado que aumenta cuando se combina con otros fármacos inmunosupresores (175). Una revisión sistemática reciente informó que la tasa de dehiscencia fue del 6,8% en el grupo de pacientes tratados con corticosteroides en comparación con el 3,3% en el grupo no tratados con corticosteroides, aunque la duración y dosis del tratamiento con corticosteroides fueron heterogéneos (181). En esta misma línea, Konishi et al realiza un análisis multivariante de un estudio prospectivo donde se incluyen 391 pacientes con resección de colon y anastomosis, los resultaron desvelan una mayor tasa de dehiscencia de hasta el 11,8% en el grupo de pacientes tratados con esteroides frente a una tasa del 2,4% en el grupo de pacientes no tratados con esteroides (182). Otros estudios prospectivos también relacionan el consumo de corticosteroides con la fuga anastomótica, incluso evitando el sesgo de la enfermedad inflamatoria intestinal como diana para la administración de esta medicación y que puede suponer otro factor por sí mismo (183).

Los **AINEs** inhiben la enzima ciclooxigenasa (COX) evitando la producción de prostaglandinas que contribuyen a la inflamación postquirúrgica, sensibiliza las terminaciones nerviosas periféricas nociceptivas y también sensibiliza el cordón espinal responsable de la hiperalgesia postoperatoria. Por lo que la disminución de su producción disminuye el dolor pero las prostaglandinas también están involucradas en proceso de cicatrización (184). Se han realizado estudios de diferentes tipos, desde prospectivos hasta metaanálisis, que inicialmente se relacionan con aumento de la tasa de dehiscencias anastomóticas con el uso de AINEs perioperatorios, sin embargo, estos estudios a menudo tienen sesgos y los datos son heterogéneos por lo que no se puede concluir con suficiente evidencia su relación. Pero sí se debe recomendar su uso

responsable y evitar la administración si existen otros factores de riesgo asociados (184); (175).

El tratamiento con **inmunosupresores**, en el contexto de pacientes trasplantados o en otras patologías, como ciclosporinas, micofenolato mofetil, tacrolimus, everolimus... mayoritariamente en estudios experimentales, se ha comprobado que se relacionan con la dehiscencia de anastomosis (173).

- **Radioterapia y quimioterapia neoadyuvante**

La radioterapia preoperatoria tiene un papel importante en la reducción de recidivas locales de ciertos tumores con afectación rectal sobre todo, pero por otro lado son causantes de un amplio abanico de efectos perjudiciales (185), de hecho existen muchos estudios retrospectivos que la relacionan con la dehiscencia de anastomosis. Así, Kobayashi y colaboradores encontraron una tasa de fuga del 6.3% en pacientes con radioterapia preoperatoria por lo que podía considerarse como factor de riesgo independiente (186). Otros estudios han mostrado resultados contrarios como uno realizado en Holanda con 1530 pacientes intervenidos de resección total de mesorrecto, comparando dos grupos de pacientes (a un grupo se le realiza resección total de mesorrecto y al otro resección total del mesorrecto y radioterapia preoperatoria de ciclo corto), no se encontraron diferencias en cuanto a complicaciones postoperatorias ni aumento de tasas de dehiscencia de anastomosis de un grupo con respecto al otro (187). Parece que los ciclos cortos de radioterapia preoperatoria son seguros frente a la radioterapia preoperatoria de ciclo largo que puede estar relacionado con mayores complicaciones postoperatorias.

El uso de **quimioterápicos** que actúan a nivel de la proliferación angiogénica o la mitosis tumorales limitándolas, por su propio efecto antitumoral, se vinculan con el aumento de riesgo de dehiscencia anastomótica. En este grupo se puede situar como ejemplo al **Bevacizumab**, que es un anticuerpo monoclonal antifactor de crecimiento del endotelio vascular (173) y disminuye por tanto la neovascularización afectando al proceso de cicatrización. Incluso se han publicado casos de perforación intestinal en pacientes tratados con este medicamento en probable relación con áreas isquémicas secundaria a microtromboembolismos (175). Por todo ello, se recomienda programar la intervención quirúrgica de 30 días hasta 60 días tras la última administración del tratamiento.

La quimioterapia intraperitoneal hipertérmica con **cisplatino**, **doxorrubicina** y **mitomicina C** también se ha asociado con un aumento del riesgo de dehiscencia anastomótica sobre todo en anastomosis distales (172). En un metaanálisis reciente que analiza varios estudios que investigan la influencia de la quimioterapia con la aparición de dehiscencia de anastomosis concluye que sí existe esta relación, aunque estos estudios fueron muy heterogéneos entre sí (176).

- **Sexo**

En este apartado se ha demostrado con claridad que los hombres tienen mayor riesgo de dehiscencia anastomótica que las mujeres. Las diferencias anatómicas parecen ser una de las causas, en donde las menores dimensiones y la mayor profundidad de la pelvis masculina dificultan las maniobras técnicas para la realización de la disección rectal y la anastomosis. Por otro lado, las hormonas andrógenas influyen en la microcirculación influyendo en los tejidos de la misma (173). Esto ocurre tanto en la cirugía abierta como laparoscópica pero sobre todo cuando se trata de resecciones más distales (175), ya que, en resecciones colónicas más proximales pocos estudios establecen una relación entre sexo masculino y dehiscencia de anastomosis (188). A nivel molecular existen diferencias entre sexos que radican en la diferencia de depósito de colágeno en la zona de cicatrización, en los hombres el depósito durante la primera semana postoperatoria es menor que en las mujeres, lo que se traduce en una menor fuerza de la anastomosis (189). Esta diferencia es inapreciable si se comparan hombres jóvenes y mujeres de cualquier edad (190).

Varios autores han publicado resultados que avalan esta relación como Rullier y colaboradores (191), que realizaron 272 resecciones rectales anteriores objetivándose mayor tasa de dehiscencia en hombres que en mujeres. Law y colaboradores (192) también apreciaron una mayor tasa de dehiscencia en hombres tras realización de resección de recto con resección total del mesorrecto, al igual que Lipska y colaboradores (193) en donde se intervinieron 541 pacientes con resecciones distales.

- **Edad**

Existen estudios que apuntan a que pacientes mayores de 60 años pueden tener mayor riesgo de dehiscencia de anastomosis, aunque no hay un número suficiente de estudios que puedan afirmarlo con datos estadísticamente significativos. A pesar de esto, actualmente la edad no es una contraindicación para la indicación de cirugía colorrectal (173). Si se comparan grupos de edad y sexo, los pacientes hombres de mayor

edad pueden tener una mayor debilidad de la anastomosis al disminuir el depósito de colágeno necesario para la cicatrización (190).

B. FACTORES INTRAOPERATORIOS

Son aquellos que se establecen según las condiciones intraoperatorias y por tanto atienden a caracterizarse por circunstancias dependientes del cirujano y de la dificultad técnica y anatómica. Definen tiempo operatorio, pérdida sanguínea y transfusión de concentrados de hematíes, nivel de anastomosis, contaminación intraabdominal y otras circunstancias que pueden influir en la anastomosis intestinal.

- **Tiempo operatorio**

La duración de la cirugía es un factor de riesgo controvertido, en muchas ocasiones se identifica con una cirugía más compleja en donde las adhesiones intestinales, la localización anatómica, la obesidad, la radioterapia previa, el sangrado y la experiencia del equipo quirúrgico son determinantes de la misma (175) (172). La importancia del tiempo quirúrgico radica en la influencia de los cambios de actividad de los mediadores inflamatorios derivando en mayores complicaciones isquémicas e infecciosas (194), ya que la exposición bacteriana y el daño de los tejidos aumenta causando mayor inflamación y mayor probabilidad de dehiscencia de la anastomosis. Cuando una intervención quirúrgica se prolonga durante un período mayor a 300 minutos se considera como un tiempo operatorio prolongado y por consiguiente con mayores posibilidades de complicaciones (176). En un estudio monocéntrico prospectivo donde se realiza cirugía colorrectal a 811 pacientes se analizan diversos factores de riesgo de dehiscencia, relacionándose entre otros el tiempo prolongado de intervención con esta complicación (164). Kim y colaboradores establece que a partir de los 200 minutos de intervención puede considerarse un tiempo prolongado operatorio y lo relaciona con mayor probabilidad de complicaciones como dehiscencia (195). Igualmente ocurre en un metaanálisis que compara tiempos quirúrgicos cortos y largos y su relación con la dehiscencia de anastomosis, esta fue significativamente mayor en los pacientes con tiempo quirúrgico superior a 300 minutos (176).

- **Técnica quirúrgica e influencia del cirujano**

La realización de una anastomosis debe cumplir unas pautas esenciales para que esta sea fiable. Las más significantes son asegurar un flujo sanguíneo adecuado a los

extremos anastomosados, evitar la tensión y minimizar la exposición del contenido intraluminal. Todas estas circunstancias pueden ser controladas en mayor o menor medida por el cirujano, de ahí la importancia del mismo y su influencia en las complicaciones anastomóticas. Por tanto, la experiencia del equipo quirúrgico es un elemento a tener en cuenta. Existen estudios que apoyan la hipótesis de que la experiencia de un cirujano colorrectal o un grupo quirúrgico con elevado número de casos tienen menor número de complicaciones y menor tasa de dehiscencia. Estudios del Cochrane Cancer Group apoyan la asociación entre el cirujano y el desarrollo de complicaciones, obteniendo mejores resultados los cirujanos con mayor experiencia en la técnica quirúrgica. Otros estudios como el realizado por Biondo y colaboradores, que realiza un análisis de 1046 pacientes intervenidos de cirugía colorrectal urgente, identifica menos complicaciones en el grupo de pacientes intervenidos por cirujanos especialistas en este campo quirúrgico (196).

La **vascularización** es otra característica muy importante a tener en cuenta, por un lado, aporta todos los nutrientes y oxigenación necesarios para la nutrición del tejido además de retirar los metabolitos que ya no son necesarios y, por otro lado, juega un papel fundamental en el proceso de cicatrización (194). Existen varios factores que pueden alterar la vascularización de una anastomosis, algunos de ellos se detallan a continuación. Durante la cirugía debe hacerse una correcta ligadura de los vasos nutricios del segmento colónico a resecar de forma que facilite la anastomosis, que tenga las características oncológicas necesarias si precisa y que permita una correcta viabilidad de los tejidos anastomosados; sin embargo, en algunas ocasiones sobre todo en la ligadura de la arteria mesentérica inferior, es causa de debate el nivel de sección más correcto por la posible relación con la desvascularización de los tejidos. Aunque en estudios recientes no se han establecido diferencias significativas. La tensión anastomótica se relaciona con una vascularización deficiente de los bordes anastomosados y con la dehiscencia subsiguiente, por lo menos de forma teórica porque no existen estudios experimentales que hayan valorado esta cuestión posiblemente por la dificultad del diseño del mismo (194). De todas formas, para ejecutar una técnica correcta se aconseja la movilización adecuada de los extremos colónicos a anastomosar (194).

En cuanto a la **técnica de realización de la anastomosis**, no parece que haya diferencias significativas si se comparan la anastomosis mecánica grapada o la realizada manualmente con la aparición de fistula en el postoperatorio. Estas conclusiones se desprenden tanto de un metaanálisis que analiza 13 ensayos como de

una revisión de Cochrane formada por 9 ensayos (197) (198). La técnica laparoscópica, por sus propias características, entraña una mayor dificultad en el momento de realizar la sección colónica y la anastomosis intestinal, sobre todo si esta es rectal. Se ha comprobado que el número de disparos se relaciona con la calidad de la sección y de la anastomosis, un número superior a dos disparos para la sección rectal puede conllevar pequeños defectos en las líneas de grapas que en algunos casos conduce a dehiscencia de anastomosis (176). Todas las maniobras encaminadas a realizar la menor cantidad de disparos son necesarias al igual que una óptima colocación de los trócares, la utilización de un acceso suprapúbico transversal, la coordinación correcta entre cirujano y asistentes, evitar que las líneas de grapas se crucen entre sí... (175). Otro aspecto que hay que tener en cuenta es el diámetro utilizado de las endograpadoras circulares para la realización de las anastomosis mecánicas circulares termino-terminales, algunos autores como Kim y colaboradores han advertido que un mayor diámetro en estas endograpadoras (igual o mayores de 31-33 mm) pueden aumentar las tasas de dehiscencias de anastomosis (195). El incremento de la distensión del segmento distal a anastomosar tras la utilización de diámetros mayores conlleva también un adelgazamiento más acusado de la pared intestinal impidiendo una adecuada vascularización (176). No obstante, otros estudios no encuentran esta relación.

- **Cirugía de urgencias**

La cirugía urgente implica una serie de circunstancias que no se producen normalmente en la cirugía programada y que pueden influir en la calidad de la anastomosis intestinal. Puede tratarse de un colon muy dilatado y por tanto con paredes intestinales adelgazadas en el contexto de una obstrucción de colon prolongada en el tiempo, influyendo de forma negativa en la vascularización. En otras ocasiones se dan unas condiciones de infección intraabdominal e incluso sistémicas que repercuten negativamente en la viabilidad de una anastomosis. A esto se adiciona una mayor dificultad técnica que puede alargar el tiempo operatorio y aumentar la pérdida sanguínea. Así como el probable deterioro del estado basal del paciente previo a la intervención, sobre todo referente al déficit nutricional y descenso de hemoglobina entre otros (173).

- **Uso de drenajes intraabdominales**

El uso de drenajes intraabdominales tras realización de resección colorrectal se ha debatido ampliamente a lo largo del tiempo. Existen dos razones principales que podrían

justificar su uso: Una de ellas se basa en drenar todo el líquido acumulado seroso o hemático, sobre todo en espacios presacros tras resecciones de recto, evitando la alteración de la anastomosis contigua tanto por el establecimiento de una sobreinfección muy próxima (176) como por la presión extrínseca que puede ejercer sobre la misma (194). Tanto es así que un metaanálisis que analiza un total de 2277 pacientes donde se comparan pacientes intervenidos de cirugía rectal con drenajes y sin ellos, concluye que los pacientes con la presencia de drenajes se reduce la incidencia de dehiscencia de anastomosis rectal e incluso disminuye la tasa de reintervención (199). La segunda razón es el valor diagnóstico y terapéutico que puede jugar un drenaje perianastomótico tras una dehiscencia de la sutura anastomótica. A pesar de esto, también existen estudios que concluyen que su uso no parece que disminuya la incidencia de tasas de dehiscencias anastomóticas (200).

- **Pérdida de sangre y necesidad de transfusión**

La pérdida de sangre intraoperatoria significativa o la necesidad de transfusión de concentrados de hematíes intraoperatoria o en el postoperatorio, son un claro factor de riesgo según la mayoría de autores que realizan estudios con estas variables (176). El consenso a la hora de marcar este límite no es unánime, existen distintas opiniones para establecer el volumen perdido de sangre o la cantidad de concentrados de hematíes transfundidos a partir del cual se incrementa el riesgo real de dehiscencia de anastomosis. Algunos autores determinan que a partir de pérdidas mayores de 100 mL puede considerarse un riesgo para dehiscencia (175) (201), otros autores aumentan el riesgo a partir 200 mL (169) o 250 mL (202) de pérdidas.

La explicación de esta relación reside en 3 conceptos fisiopatológicos (194):

1) Las complicaciones sépticas, que pueden desencadenarse por los propios mecanismos de transfusión de concentrados de hematíes, cada vez más se asocia la transfusión sanguínea con las infecciones nosocomiales (203).

2) Respuesta inmune celular mermada, sobre todo con afectación de linfocitos T y macrófagos, indispensable para desarrollar las primeras fases de la cicatrización (172).

3) Hemodilución sanguínea de proteínas necesarias para la fase de cicatrización en la anastomosis intestinal como hidroxiprolina, alterándose cualitativamente el colágeno. Además, la hiperhidratación perioperatoria provoca

un exceso de acumulación de líquidos en los vasos sanguíneos perianastomóticos. Estos dos aspectos conllevan una disminución de la resistencia de la nueva cicatrización que se está produciendo. Se ha demostrado en un metaanálisis, donde se analizan varios ensayos clínicos aleatorizados, que es preferible la restricción de fluidos que la fluidoterapia estándar para reducir las complicaciones postoperatorias de la anastomosis colorrectal (194).

La pérdida de volumen sanguíneo puede ser también la consecuencia indirecta de una mala técnica quirúrgica o una cirugía agresiva (175), lo que lleva a evaluar la técnica quirúrgica inadecuada como causa potencial de la alteración anastomótica. Al igual, que esta disminución del volumen sanguíneo deriva en una hipotensión grave intraoperatoria, que si se mantiene en el tiempo incrementa el riesgo de dehiscencia anastomótica particularmente en pacientes con presión arterial preoperatoria elevada (202).

- **Nivel de anastomosis y características de la lesión colónica**

La localización anatómica de la lesión del colon determina realizar la anastomosis intestinal en diferentes tramos del intestino grueso, las características cambian de una localización a otra en cuanto a accesibilidad, dificultad técnica, irrigación vascular, tensión... La diferencia de estas circunstancias puede implicar que el riesgo de dehiscencia sea mayor. Existe un consenso más o menos amplio que relaciona una anastomosis más distal con un riesgo aumentado de dehiscencia de la misma (175), máxime en distancias menores a 5 cms. desde el borde anal, como se evidencia en varios estudios realizados (176). Uno de ellos analiza a 156 pacientes intervenidos y sus complicaciones de forma prospectiva estableciéndose una tasa de dehiscencia mayor en aquellos pacientes con anastomosis a una distancia inferior a 5 cms. del margen anal (204). El grupo de Rose (205) por un lado y Trencheva por otro en sendos estudios, identifican una tasa de dehiscencia cercano al 17% en anastomosis realizadas por debajo de los 10 cms. distales desde el margen anal (177).

No solo hay que tener en cuenta la localización anatómica, sino que el tamaño tumoral también puede ser considerado un factor de riesgo, cuanto mayor sea este el pronóstico de la enfermedad maligna empeora, además dimensiones superiores a 5 cms. puede significar un incremento del riesgo de dehiscencia. En un metaanálisis realizado por Qu y colaboradores donde se analizan varios estudios que toman el tamaño del tumor como posible factor de riesgo, se concluye que el riesgo de

dehiscencia de anastomosis es significativamente mayor en tumores con un diámetro igual o mayor a 5 cms. con respecto a tumores menores de 5 cms., un 8,3% frente a un 4,9% respectivamente (176). Un reciente estudio japonés multicéntrico analiza casos intervenidos laparoscópicamente y destaca que existen más complicaciones postoperatorias, incluidas dehiscencias, en aquellos casos en donde el tamaño del tumor sobrepasaba los 4 cms. (206).

— Presentación clínica y diagnóstico. Complicaciones —

Como se detalla en el apartado anterior, existen muchos factores de riesgo que individualmente o sinérgicamente se asocian con el incremento de dehiscencia de anastomosis, a pesar de ello es difícil predecir el riesgo en cada paciente. Además, en el postoperatorio inmediato, la diferenciación entre la respuesta inflamatoria sistémica debido a una complicación postquirúrgica frente a la respuesta fisiológica al estrés quirúrgico no siempre puede establecerse (163).

Tras una dehiscencia de anastomosis, la sintomatología puede manifestarse en cualquier momento del postoperatorio inmediato y varía de acuerdo a su localización y severidad. El período que cuenta con una probabilidad más elevada de sintomatología, según la literatura publicada, es el período comprendido entre el 5º y el 8º día postoperatorio. La clínica abarca un amplio abanico de posibilidades, desde una presentación insidiosa como fiebre, íleo intestinal, dolor abdominal, distensión abdominal y taquicardia, síntomas frecuentes pero con bajo valor predictivo positivo si se analizan por separado (207). Hasta síntomas más importantes y reveladores en el contexto de una peritonitis focal (normalmente en forma de abscesos) o generalizada, e incluso, presencia de débito fecaloideo a través del drenaje intraperitoneal o herida quirúrgica. En otras ocasiones, el deterioro puede sucederse repentinamente hacia shock séptico como resultado de contaminación importante y rápida de la cavidad peritoneal (166) (208). Llegado a este punto los signos más frecuentes son taquicardia, hipotensión, taquipnea y fiebre aunque cuando se implican gérmenes gram negativos puede aparecer hipotensión, bradicardia e hipotermia (209).

Es muy importante detectar aquellos pacientes intervenidos de cirugía colorrectal que no progresan de la forma esperada para evitar el retraso diagnóstico, que puede traducirse en una actitud terapéutica tardía y por tanto en un peor pronóstico. Lo más habitual es establecer el diagnóstico de dehiscencia tras la presencia de síntomas clínicos y elevación de reactantes de fase aguda en pruebas de laboratorio que llevan a

la indicación de pruebas de imagen dirigidas (210). Lo que significa que ya se ha establecido una fase clínica y el proceso puede estar más o menos avanzado, en un período entre los 6 y los 13 días tras la intervención (211), por lo que la morbimortalidad es mucho más elevada que si este se realizara más tempranamente (166). En este grupo de pacientes la mortalidad es sensiblemente mayor (cercana al 16%) comparada con aquellos sin fuga anastomótica (alrededor del 3%) (212), además se incrementa la estancia hospitalaria, duplicándose incluso triplicándose (213).

Se han evaluado ampliamente los resultados oncológicos a largo plazo en pacientes con antecedentes de dehiscencia de anastomosis mediante el estudio de la recurrencia local, la extensión de la enfermedad y la supervivencia. En un metaanálisis realizado en 2011 donde se incluyen 21902 pacientes en un total de 21 estudios, se concluye con significación estadística que puede existir un aumento de la tasa de recurrencia local y disminución de la supervivencia de pacientes intervenidos de carcinoma colorrectal que han desarrollado dehiscencia anastomótica postoperatoria (214). Los mecanismos que llevan a esta situación no son conocidos suficientemente, pero parece que la respuesta inflamatoria local y ciertas proteínas proinflamatorias (IL, VEGF, MMP...) asociadas a la dehiscencia podrían estar implicadas en la proliferación de células cancerosas propiciando un ambiente favorable que lleva a la recidiva tumoral (214). Sin embargo, en este metaanálisis se excluyen algunos estudios importantes que no tienen resultados en la misma dirección, y aquellos que se incluyen son heterogéneos en cuanto a protocolos diagnósticos utilizados y con el concepto de recurrencia de enfermedad. En contraposición, otros estudios no evidencian variación de los resultados oncológicos tras dehiscencia de anastomosis (215). Es difícil posicionarse a favor o en contra de la influencia de la dehiscencia de anastomosis con respecto a los resultados oncológicos a largo plazo, debido a que la comparación de estudios plantea una serie de problemas: en muchos casos se incluyen conjuntamente cáncer de recto y de otras localizaciones del colon, tampoco hay uniformidad en la terapia neoadyuvante y adyuvante de los mismos y, por último, tanto las técnicas quirúrgicas como el protocolo de seguimiento no están estandarizados.

Se plantean una serie de inconvenientes para llegar a un diagnóstico temprano en la dehiscencia de anastomosis (216):

1. Variabilidad del curso clínico. La presentación clínica no siempre es similar y varía desde la aparición repentina de sepsis fulminante pasando por otras formas más insidiosas, que cursan con íleo intestinal y falta de progresión

en el postoperatorio, hasta formas subclínicas, donde sólo es detectable mediante la obtención de imágenes radiológicas.

2. Variabilidad diagnóstica en la práctica clínica. Motivado por la insuficiente información que detallan las características predictivas de los diferentes métodos diagnósticos disponibles.

El diagnóstico se sustenta actualmente en una sospecha inicial, atendiendo fundamentalmente a la clínica y datos de laboratorio, y en una posterior confirmación mediante pruebas diagnósticas de imagen como TAC o enema hidrosoluble. Sin embargo, las líneas de trabajo de los grupos de cirujanos coloproctológicos están dirigidas a detectar y diagnosticar lo más precozmente posible esta complicación, lo que disminuiría de forma considerable la morbimortalidad, permitiendo tratamientos menos agresivos. Por ello, muchos grupos están trabajando en la búsqueda de predictores clínicos, analíticos y biomarcadores que tengan la capacidad de diagnosticar la fuga anastomótica de manera fiable y específica en una fase preclínica.

❖ Métodos Clínicos

Muchos estudios se están centrando en la detección en la fase preclínica, ya que un diagnóstico precoz puede proteger de las consecuencias sépticas secundarias. Algunos de estos estudios se centran en la clasificación de los pacientes en diferentes grupos de riesgo en función de factores de riesgo descritos, algunos de ellos intrínsecos al paciente (comorbilidad) y otros extrínsecos dependientes de las características de la intervención como localización de resección, técnica quirúrgica y eventos adversos intraoperatorios (177) (217). A pesar de tener en cuenta todos estos factores de riesgo el retraso en el diagnóstico sigue siendo común.

Otros autores como Den Dulk et al. han desarrollado un protocolo de vigilancia postoperatoria estandarizada en pacientes sometidos a cirugía colorrectal para llegar a un diagnóstico precoz de dehiscencia anastomótica donde se puntúan una serie de ítems, la mayoría obtenidos de la anamnesis y la exploración física diaria del paciente. La puntuación final determina la actitud a seguir: ≤ 3 puntos (no actuar), 4 a 7 puntos (reevaluación y complementar con análisis de laboratorio dentro de las 12 horas siguientes, decidir realización de tomografía computerizada con contraste rectal) y ≥ 8 puntos (realización de tomografía computerizada con contraste rectal) (208).

o Técnicas Intraoperatorias

La comprobación intraoperatoria de la estanqueidad anastomótica mediante la administración de azul de metileno o fuga de aire ha sido estudiada en varios trabajos publicados. Con la aplicación de estos test se pretende aumentar la detección de fugas disminuyendo por tanto la aparición a lo largo del postoperatorio, en algún caso podría reducirse el número, pero siguen diagnosticándose casos de dehiscencias postoperatorias. Cuentan con algunas ventajas importantes: son fáciles de realizar, baratos y pueden ser de utilidad para la detección y reparación inmediata, ya que cuando el resultado del test es negativo es poco probable que exista una fuga (166); (218).

Existen otras técnicas descritas en la literatura como la endoscopia intraoperatoria, mediante la cual se puede estudiar la anastomosis por visualización directa, descartando por tanto fugas así como otros problemas *in situ* de la anastomosis como el sangrado (219). No ha demostrado que la realización de forma rutinaria sea superior comparándola con la realización selectiva.

Otros estudios intentan correlacionar la probabilidad de dehiscencia de anastomosis con el grado de perfusión de la misma, bien directamente mediante angiografía fluoresceínica o indirectamente midiendo la concentración de oxígeno por medio de espectroscopia de infrarrojo (220). La aplicación de verde de indocianina u otros fluoróforos junto con el estudio angiográfico con cámara infrarroja permite obtener una imagen en tiempo real de la perfusión vascular, puede ser utilizada en varias fases de la cirugía colorrectal: durante movilización completa del colon, estudio de división de la irrigación colónica y ligadura de pedículos, localización anatómica más correcta de sección colónica y valoración de la irrigación de la anastomosis realizada (221). Actualmente muchos estudios con series retrospectivas han evaluado la aplicación de técnicas fluoresceínicas, afirmando que su utilización afecta a las decisiones intraoperatorias y parece que influye en los resultados postoperatorios disminuyendo la tasa de incidencia de dehiscencia anastomótica (222). Ensayos prospectivos, multicéntricos y aleatorizados, como el llamado PILLAR II (223) y otros en curso como el PILLAR III, también informa de unos resultados similares y prometedores. Esta tecnología está en pleno desarrollo y sus aplicaciones siguen aumentando como apoyo a la toma de decisiones durante la cirugía colorrectal (222).

- o Técnicas de laboratorio y biomarcadores

El análisis bioquímico sanguíneo y las determinaciones microbiológicas y celulares del microambiente de la anastomosis también se utilizan y siguen desarrollándose para el diagnóstico. Así se pueden medir las moléculas y las células que participan en las distintas fases de la dehiscencia: isquemia, inflamación e infección perilesional, y correlacionarlas con un diagnóstico precoz.

Muchos estudios han considerado la elevación de la proteína C reactiva (PCR) aislada, de forma que niveles elevados serológicos podrían estar presentes antes del comienzo de la clínica habitual. Estos autores se basan en la capacidad que tiene esta molécula para elevarse rápidamente y alcanzar valores máximos a las 48 horas con el estímulo inflamatorio, con valores de corte de entre 120mg/L a 190mg/L, y descender también rápidamente cuando desaparece este (224) (225). Según un metaanálisis realizado recientemente, la PCR tiene un valor predictivo negativo de hasta un 97% por lo que determinaciones bajas de PCR a partir del 3^o-4^o día postoperatorio podría ser de utilidad para descartar fugas anastomóticas, sin embargo no es buen predictor positivo (170).

La procalcitonina sérica (PCT) es una proteína de 116 aminoácidos prohormona de la calcitonina, los niveles en sangre aumentan significativamente en pacientes con infecciones bacterianas graves y sepsis, pero no ante inflamaciones no secundarias a infección, al contrario que la PCR. Por eso también se ha descrito como marcador biológico predictivo de las complicaciones infecciosas tras la cirugía colorrectal. La PCT se mantiene elevada hasta el 3^o-5^o día postoperatorio, a partir de este momento si existe una dehiscencia de la sutura anastomótica permanecerá elevada, punto de corte 0,31 ng/ml, mientras que si no existe descenderá. Se han realizado estudios, aunque con poblaciones pequeñas, con buenos niveles de sensibilidad y especificidad. Además puede subrayarse que la determinación de niveles bajos de PCT en sangre a partir del 5^o día postoperatorio se correlacionan con una existencia casi nula de dehiscencia de anastomosis (226) (227).

En la fase de inflamación aguda existen un gran número de células, mediadores inflamatorios, como citoquinas y factores de crecimiento, e iones que migran desde la sangre hacia el exudado local. Circunstancia que puede ser de utilidad, ya que se pueden medir y establecerse una correlación con la fuga anastomótica. Además, estos

mediadores inflamatorios alcanzan mayores concentraciones a nivel local que sistémico. En esta dirección se han analizado ILs (IL1, IL6 y IL10), MMPs de la MEC (MPM 8 y MPM 9) y TNF α a partir del fluido del drenaje intraperitoneal, comparando los niveles de pacientes con complicación anastomótica frente a pacientes sin complicaciones. Los resultados concluyen que pueden elevarse los niveles de citoquinas significativamente cuando existen complicaciones postquirúrgicas y por tanto medirse a través del fluido de drenaje en los primeros días postoperatorios. Pero existen algunas limitaciones importantes: muestras pequeñas de pacientes, en algunos casos no se estudian separadamente las indicaciones quirúrgicas y el método de evaluación de las muestras mediante ELISA y citometría hacen que estas pruebas se encarezcan limitando su disponibilidad (228) (229). Si consideramos que el microambiente inflamatorio perilesional de una anastomosis colorrectal se caracteriza por la disminución del pH, otro parámetro que puede ser medido como predictor precoz de dehiscencia de anastomosis es la concentración de protones del fluido de drenaje. Estudios recientes evalúan secuencialmente los niveles de pH del fluido de drenaje a lo largo del postoperatorio, arrojando unos resultados prometedores con una relación significativa del descenso de pH, niveles inferiores a 7, en el grupo de pacientes con dehiscencia de la sutura anastomótica a partir del 3º día postoperatorio (230).

Existen otros estudios, muy limitados todavía, donde se examinan nuevas moléculas que pueden medirse en el fluido de drenaje y que pueden funcionar como posibles biomarcadores. Como las lisozimas producidas por macrófagos frente a la pared celular de bacterias Gram negativas o ciertos polisacáridos que forman parte de la propia pared de las bacterias implicadas. Cambios en la relación lactato/piruvato obtenida del líquido de drenaje han sido descritos como posible predictor con resultados prometedores pero escasos actualmente. Para terminar, el cultivo bacteriano del contenido del drenaje también podría utilizarse para establecer un patrón bacteriológico determinado que pueda predecir la dehiscencia anastomótica en fase preclínica (166) (216).

o Técnicas radiológicas

Las técnicas radiológicas disponibles para el diagnóstico de fugas anastomóticas son: radiografía simple de abdomen (RSA), enema con contraste hidrosoluble (ECH) y tomografía computerizada (TC).

No siempre son necesarias de forma generalizada, ya que si existe una alta sospecha clínica de dehiscencia anastomótica realizarlas supone retrasar el tratamiento quirúrgico. Es de mayor utilidad en aquellos casos de clínica insidiosa o subclínicos.

Los estudios realizados coinciden en que la exactitud del diagnóstico varía según la localización de la anastomosis, el momento postoperatorio en el que se realiza y la experiencia del radiólogo.

La RSA puede ser de utilidad si están presentes algunos de los signos inequívocos de dehiscencia de anastomosis, tales como la identificación de aire libre intraperitoneal o la alteración de la integridad de la línea de grapas. Además, es una técnica rápida y con baja exposición radiológica, sin embargo, ofrece mucha menos información que otras técnicas.

El ECH se basa en el escape de contraste en la zona de anastomosis. Algunos autores han demostrado una sensibilidad baja del 52% pero una especificidad mayor de hasta un 86% en dehiscencias localizadas en colon izquierdo y colorrectales, otros estudios la comparan con la TC otorgando una mayor sensibilidad a la ECH cuando se trata de anastomosis rectales (216).

La TC presenta una sensibilidad que varía de unos estudios a otros debido a la falta de consenso en cuanto a la definición de dehiscencia anastomótica, con un valor predictivo negativo cercano del 75%. Este porcentaje tiende a ser menor en el postoperatorio inmediato y cuando se valoran anastomosis proximales. Existen diferentes signos radiológicos compatibles como líquido libre intraperitoneal, gas extraluminal, realce de la anastomosis intestinal etc. pero parece que la circunstancia más común es la presencia de colecciones perianastomosis asociadas a la dehiscencia (231). Cuando se utilizan estos criterios indirectos la precisión mejora significativamente llegando en algunos casos al 100% (166). La sensibilidad y la especificidad aumentan considerablemente cuando además se administra contraste oral, contraste intravenoso y contraste rectal.

1.7 Factores de crecimiento

Papel de las plaquetas

▪ Definición, morfología y estructura

Son fragmentos citoplasmáticos discoides anucleados, formados a partir de los megacariocitos situados en la médula ósea, que pasan al torrente sanguíneo. Son corpúsculos pequeños y muy numerosos, no sobrepasan los 5-7 μm de largo por 3 μm

ancho, con una vida media útil de apenas 8-10 días antes de ser eliminados por los macrófagos. Durante su período de viabilidad, realizan funciones muy importantes en el organismo y participan en los procesos de hemostasia, inflamación y cicatrización (232). También se han descrito funciones defensivas: a) Son capaces de interactuar directamente con los microorganismos contribuyendo por un lado, a la eliminación de patógenos y, por otro lado participan activamente en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos frente a patógenos microbianos b) Expresan receptores de inmunoglobulina G y fragmentos del complemento C3a/C5a c) Pueden generar metabolitos de oxígeno antimicrobiano (superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales libres de hidroxilo) (8).

Para llevar a cabo todas estas funciones las plaquetas cuentan con una serie de características tanto estructurales como secretoras:

A) La **membrana celular** de las plaquetas contiene glucoproteínas que pertenecen a diversas superfamilias de integrinas, selectinas, inmunoglobulinas... que actúan como receptores agonistas entre plaquetas y permiten que interactúen con otros tipos celulares para potenciar las funciones en las que están implicadas: adhesión, agregación y coagulación.

B) El **citoesqueleto** plaquetario, formado por microtúbulos de actina y miosina principalmente. No sólo mantiene la forma celular sino que está implicado en el cambio de forma plaquetario tras su activación, que pasa de discoide a ovalado, en la formación y extensión de pseudópodos, y en la adhesión, agregación, secreción y retracción del coágulo (233).

C) Los **gránulos citoplasmáticos** se forman a partir de moléculas sintetizadas inicialmente en la célula preexistente (megacariocitos) o partir de la captación de proteínas del plasma que se incorporan a los gránulos, dando lugar a gránulos σ (o densos), gránulos α y gránulos λ (o lisosómicos). El contenido molecular de los mismos interviene en los procesos de coagulación, fibrinólisis, alteración del tono vascular, inflamación y cicatrización de heridas.

a. **Gránulos σ** → contienen moléculas que alteran el tono vascular tales como serotonina, adenosín difosfato (ADP), eicosanoides, tromboxano A₂, calcio y magnesio.

b. **Gránulos λ** → contienen hidrolasas ácidas, glicosidasas, proteasas, proteínas catiónicas, fosfolipasas y quinasas. Estas últimas actúan como enzimas proteolíticas e hidrolíticas

c. **Gránulos α** → contienen proteínas implicadas en funciones hemostáticas. Pueden llegar a liberar más de 30 citoquinas distintas (8) que, según su acción principal, se pueden clasificar:

i. Adhesión: fibrinógeno, trombospondina, vitronectina, laminina y factor de von Willebrand.

ii. Modulación de la coagulación:

- Plasminógeno, tromboxano α_2 (Inhibidor de la plasmina y trombastenina), glicoproteínas (GPIb, GPIIb, GPIIIa), trombospondina, fibronectina, α -gránulo específico de proteína P-selectina (233) (234).

- GFs (3):

1. Factor de crecimiento transformador (TGF- α , TGF- β)

2. Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y factor derivados de las plaquetas (PDGF)

3. Factor de crecimiento epidérmico (EGF)

4. Factor de crecimiento similar a insulina (IGF-I)

5. Factor de crecimiento tejido conectivo (CTGF)

6. Factor de crecimiento de fibroblastos (aFGF, bFGF)

▪ **Activación y función plaquetaria**

La cascada de la coagulación se inicia por dos vías, intrínseca y extrínseca, desarrollándose posteriormente una serie de acontecimientos que finalizan con la formación de un coágulo estable que permite una correcta hemostasia y promover el proceso de cicatrización necesario (235):

1. **Vía extrínseca:** la cascada de la coagulación se activa mediante el contacto de las células sanguíneas con elementos ajenos a los componentes sanguíneos, el llamado factor tisular. Es una proteína que se encuentra integrada en la membrana de las células del subendotelio vascular y que contacta con los elementos de la sangre cuando se daña el endotelio vascular. Actúa como cofactor del factor VII de la cascada de la coagulación. Este complejo se activa en presencia de fosfolípidos y calcio (236).

2. **Vía intrínseca:** se inicia la cascada tras un daño o alteración del endotelio vascular formándose inicialmente un pequeño tapón de plaquetas, en este momento se produce el contacto del factor XII de la coagulación (factor de Hageman), que circula por la sangre en forma inactiva, con las cargas negativas de la membrana de las plaquetas activándose, gracias también a la actividad proteolítica de la calicreína (237).

Cuando se produce el daño tisular vascular se expone el colágeno, la fibronectina o la laminina del tejido subendotelial lesionado. A continuación, el factor de von Willebrand, que circula en el plasma, se une a glucoproteínas de membrana plaquetaria facilitando la fijación de las primeras plaquetas a la zona dañada instaurándose la primera fase de la coagulación, llamada **adhesión plaquetaria**. Sin embargo, el número de plaquetas es todavía insuficiente para la formación de un coágulo, por lo que se sucede la segunda fase o **agregación**. Gracias a la activación del tromboxano A₂, mediante el incremento del calcio citoplasmático produce contracción plaquetaria que permite la agregación de muchas más plaquetas a la zona de lesión. Finalmente tiene lugar la formación de un **coágulo estable** (232).

En el momento que se produce la adhesión plaquetaria cambia la morfología ovoide a circular y se secretan las moléculas contenidas en los gránulos intracitoplasmáticos, mediante un proceso de exocitosis (232). En este proceso se liberan diversas citoquinas que promueven la fase inflamatoria para comenzar paralelamente el proceso de cicatrización y además influyen en todas las fases de la cicatrización, entre estos los más importantes son los GFs, ya que juegan un papel importante en la migración celular dirigida (quimiotaxis), diferenciación y proliferación celular, quimiotaxis, angiogénesis y liberación de proteínas por otras células (3). El 70% de los GFs se liberan en los primeros 10 minutos tras la activación plaquetaria y la coagulación, esta liberación se prolonga durante la siguiente hora alcanzando entonces casi el 100% de todos los factores contenidos en los gránulos (232). Otras moléculas bioactivas secretadas por las plaquetas como serotonina, histamina, dopamina, adenosina y calcio van a tener un

papel muy relevante influyendo de forma decisiva en el proceso de cicatrización. La permeabilidad capilar se ve incrementada con la liberación de histamina y serotonina, permitiendo un mayor acceso de células inflamatorias al lugar de la lesión. A esto hay que sumar la función de andamiaje que el coágulo desempeña (malla de fibrina), actuando como área de adhesión de las células implicadas en la curación de la herida (3).

Pero no sólo las plaquetas van a secretar estas proteínas, otras células implicadas en la cicatrización también lo hacen como **macrófagos** (TGF- α , TGF- β , EGF, PDGF, aFGF, bFGF, VEGF, IGF-I), **linfocitos** (TGF- β), **eosinófilos** (TGF- α), **fibroblastos** (TGF- β , PDGF, IGF- I, aFGF, bFGF) y células del **endotelio vascular** (PDGF, aFGF, bFGF).

Plasma rico en plaquetas

La **sangre** es considerada un tejido completo en donde interactúan tanto células como MEC, aunque su consistencia es líquida, adquiere estabilización y solidez en determinadas situaciones como en el daño tisular, activándose la cascada de la coagulación para responder al daño formando un coágulo. Ciertos elementos de la sangre son conocidos por su importancia en los procesos de cicatrización entre ellas las **plaquetas**, que asumen un papel relevante actuando como el reservorio más destacado de GFs del organismo. Igualmente, otros componentes sanguíneos también están relacionados con la cicatrización en mayor o menor medida. A partir de esta premisa se han establecido diferentes metodologías para la obtención de estos elementos claves para potenciar la cicatrización a partir de sangre completa. Los primeros derivados de la sangre utilizados con el fin de sellar heridas y estimular la cicatrización fueron las **colas de fibrina**, formadas por fibrinógeno concentrado (9). Más tarde en 1970 se desarrolló por primera vez el **plasma rico en plaquetas (PRP)**, popularizándose a partir de 1980 (8). Se trata de la fracción de plasma derivada de sangre completa tras ser procesada, presentando una concentración de plaquetas de 3 a 5 veces el nivel basal (150.000-300.000 plaquetas/mL) (238). En la actualidad se están desarrollando otros concentrados de segunda generación llamados **fibrina rica en plaquetas (PRF)** que no necesitan interactuar con la trombina y el cloruro de calcio, a diferencia de lo que ocurre con el PRP, para iniciar la última fase de la coagulación y la polimerización de la fibrina (239). La densidad de la red de fibrina está determinada principalmente por la concentración del fibrinógeno.

Las propiedades de las distintas familias de concentrados de plaquetas son mucho más complejas que los efectos de una simple solución de factor de crecimiento o el impacto de un pegamento de fibrina mono-constituyente (8) debido a los diversos componentes que influyen conjuntamente en los procesos de cicatrización. El recuento leucocitario contenido en las concentraciones obtenidas puede variar ostensiblemente. Algunas de las principales células descritas son los macrófagos y los neutrófilos, muy importantes en **funciones defensivas locales y fagocíticas** de restos celulares, necróticos y microbios, aunque se ha demostrado que la ausencia de estos en algunos concentrados no ha mermado la capacidad de inhibición del crecimiento bacteriano. Los **macrófagos** se consideran una de las células clave implicadas en la secreción de GFs durante la curación de heridas, incluyendo el **TGF- β , PDGF y VEGF** (240). Para llevar a cabo sus funciones los leucocitos liberan sustancias que pueden influir en los procesos de cicatrización de una manera u otra como: **a) GFs** que contribuyen a la angiogénesis, la formación de MEC y la atracción celular **b) citoquinas inflamatorias** que pueden perpetuar el estado inflamatorio local (241) y **c) MMPs** que pueden influir sobre la cicatrización, negativamente en algunos casos (242). El plasma es una **fuentes rica de muchas proteínas e iones** de partículas orgánicas e inorgánicas, las cuales toman una importancia relevante en el mecanismo de curación de los tejidos. Pero definitivamente, las plaquetas aportan la mayoría de los GFs efectivos que participan en la cicatrización. Cuando estas se ponen en contacto con la trombina y los iones de calcio se activan y comienza la formación del coágulo, transcurridos 10 minutos se inicia la secreción de las proteínas almacenadas en los Gránulos α al medio. En el plazo de **1 hora, más del 95% de los GFs presintetizados han sido liberados**, durante toda la vida útil plaquetaria va a continuar esta síntesis de proteínas y liberación local, entre 5 y 10 días (243). Los GFs son capaces de modificar las respuestas biológicas celulares, regulando la migración, proliferación diferenciación, metabolismo celular e incluso la apoptosis. Debe evitarse o reducirse en la medida de lo posible la presencia de eritrocitos en las preparaciones de concentrados de plasma o fibrina, ya que durante la fase de estrés oxidativo el hierro que forma parte del grupo hemo puede generar radicales libres que pueden ser dañinos frente a las células (244).

Existen múltiples protocolos para la obtención de las familias de concentrados: mediante “técnica cerrada”, para este fin existen diferentes dispositivos desechables comercializados actualmente, o de forma manual mediante “técnica abierta”. Una manera eficaz de aislar componentes del plasma con concentraciones suficientes de plaquetas consiste en la centrifugación de la sangre completa, dando lugar a fracciones separadas y definidas. Lo habitual es realizar una centrifugación a 3200 rpm durante 15

minutos o realizar dos centrifugaciones: la primera durante 15 minutos y seguidamente otra durante 8 minutos a 1800 rpm (245).

Según el método y la técnica que se utilice las concentraciones de plaquetas, leucocitos, eritrocitos y GFs pueden variar, se obtienen diferentes fracciones que se pueden clasificar en los siguientes preparados (245):

- Preparado rico en GFs (PRGF)
- Plasma rico en plaquetas y GFs (PRPGF)
- Plasma rico en plaquetas (PRP)
- Plasma pobre en plaquetas (PPP)
- Plasma rico en plaquetas y leucocitos (LR-PRP)
- Plasma rico en plaquetas y pobre en leucocitos (LP-PRP)

Con otras técnicas de centrifugación de la sangre completa sin utilización de trombina se ha desarrollado la obtención de un biomaterial a base de fibrina activada y no una suspensión líquida de plaquetas, se trata de la fibrina **rica en plaquetas (FRP)**. Es similar a la matriz cicatricial formada en la curación natural de las heridas, donde se presenta una mayor concentración de fibrina, una polimerización más fuerte y unas propiedades biomecánicas más elevadas (8) (9):

- Fibrina rica en plaquetas puro (P-PRF)
- Fibrina rica en plaquetas y leucocitos (L-PRF)

Definición y tipos de factores de crecimiento. Implicación en el proceso de cicatrización

En organismos compuestos por múltiples células es necesario desarrollar y mantener una sociedad celular, en donde las células son capaces de interactuar unas con otras y mantener la homeostasis. En este complejo proceso de señalización e interacción intercelular a nivel molecular toman un papel fundamental los GFs (246). Se trata de proteínas tipo hormonal que pertenecen a un grupo más amplio de citoquinas, junto con otras proteínas como el factor de necrosis tumoral, interferón, interleuquinas y

factor estimulante de colonias. Son primeros mensajeros que se unen a receptores glicoproteicos de membrana para iniciar la transducción de una señal, o bien tipo receptor catalítico directo o acoplado a proteína G (247), alcanzando sus funciones fisiológicas a menor concentración que otros mensajeros como las hormonas. Estos GFs no sólo se encuentran como formas solubles en la sangre y otros fluidos corporales sino que también existen como proteínas ancladas a la membrana, actuando tanto como precursores de futuros factores solubles como moléculas biológicamente activas en sí mismas (246).

Se reconocen hasta 6 familias de GFs implicados en la cicatrización de heridas (Tabla 2). Característica atribuida sobre todo a la gran capacidad de quimiotaxis, inducción de la proliferación celular, angiogénesis y actuación sobre la MEC, desde la regulación de la síntesis hasta la degradación de la misma. Dentro de una misma familia comparten similitudes estructurales e incluso receptores o familias de receptores comunes (248). La mayoría de estos receptores poseen dominios intracelulares con actividad tirosina quinasa, que parece que guardan relación con la regulación de la proliferación celular tras el daño tisular (248).

Una vez liberado, el GF pueden actuar sobre la misma célula que lo secretó (estímulo autocrino) como el factor TGF- β , sobre células adyacentes (estímulo paracrino) como los factores PDGF, TGF- α y TGF- β o sobre células distantes al lugar de secreción (estimulación endocrina) como los factores IGF-I e IGF-II (247). E incluso inducir retroalimentación positiva incrementando su propia producción (8). La duración de la actividad de estas proteínas va a marcar también la acción sobre el ciclo celular de las células diana. Así, factores como PDGF y FGF actúan en la fase G₀ del ciclo celular, llamados de competencia, y otros como IGF lo hacen sobre las fases S y G₂, llamados de progresión (247), con la finalidad de llevar a cabo diversas acciones generales (249):

- **Quimiotaxis:** atracción celular al lugar de la herida
- **Mitosis:** inducción de proliferación celular
- **Angiogénesis**
- **Regulación de la síntesis y degradación de componentes de la MEC**

FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMADOR (TGF):

El **TGF- β** es una superfamilia de proteínas que incluye más de 40 miembros, son termoestables al igual que son estables en ambientes ácidos, de un peso molecular de 25 kDa (250). Originariamente se caracterizó como una proteína secretada por una línea celular tumoral que era capaz de inducir en cultivo, un fenotipo diferente de células no neoplásicas, con efecto reversible tras la retirada de la influencia de esta proteína, de ahí el nombre que persiste como factor transformador (250). Engloba una amplia gama de proteínas que están relacionadas estructuralmente pero diferenciados desde el punto de vista funcional (251), ya que influyen en una gran cantidad de procesos celulares que van desde la regulación de la diferenciación y proliferación celular hasta procesos fisiológicos complejos como la inflamación y la cicatrización de tejidos (252). Algunas de estas proteínas son los TGF- β , las activinas e inhibinas, las proteínas formadoras de hueso (BMPs), los factores de crecimiento y diferenciación (GDFs), la sustancia inhibidora Muleriana (MIS) y los factores neurotróficos derivados de la glia (GDNFs) (253).

En el grupo del TGF- β existen diferentes isoformas: **TGF- β 1**, **TGF- β 2** y **TGF- β 3**, que llegan a compartir desde un 60% a un 80% de aminoácidos homólogos (252). Las isoformas TGF- β 1 y TGF- β 2 son producidas por muchos tipos celulares mientras que las TGF- β 3 son únicamente sintetizadas por células mesenquimatosas (254). En el proceso de cicatrización, tienen funciones distintas pero necesarias que se superponen durante todo el proceso. Las tres poseen efectos antiproliferativos potentes sobre diferentes tipos celulares. Sin embargo, las isoformas TGF- β 1 y TGF- β 2 son inductores de la formación de MEC, además de promover la proliferación de fibroblastos y transformarlos en fenotipo miofibroblástico, potenciando la fase de contracción (255).

Se sintetizan como una molécula precursora inactiva formada por un péptido maduro y un predominio de longitud variable, intracelularmente antes de su secreción se escinde por un proceso de proteólisis separándose estos dos fragmentos diferenciados. La molécula activa dimérica se une no covalentemente al péptido asociado a la latencia (LAP), que corresponde al predominio escindido con anterioridad, para formar complejos latentes pequeños. En la mayoría de las ocasiones, estos complejos latentes pequeños se unen a unas terceras proteínas llamadas proteínas de fijación al TGF- β latente o Latent TGF- β -Binding Protein (LTBP) mediante puentes disulfuro, dando lugar a un nuevo complejo conocido como complejo latente largo. Las LTBP no tienen capacidad de inducir latencia del TGF- β , ese papel recae en las LAP; sin embargo, sí que poseen un papel en la secreción de estos complejos fuera de la célula productora,

en el almacenamiento extracelular de los complejos latentes y en la activación extracelular del TGF- β (256).

Una vez secretado los complejos pequeños y largos, pueden tomar varios caminos:

A. La activación extracelular del TGF- β , que mediante acciones autocrina y paracrina se unen a los receptores de membrana de las células diana precipitando la cascada de señalización intracelular.

B. Pasar a la circulación sanguínea unidos a ciertas proteínas plasmáticas como trombospondina, inmunoglobulinas o macroglobulinas, evitando la desnaturalización de los complejos cuya vida media es muy corta, de apenas 2-3 minutos. Para poder ser transportados y actuar en tejidos distintos de donde fueron formados y secretados.

C. La mayor parte de los complejos, gracias a las LTBP, se unen a la MEC constituyendo un reservorio de TGF- β , que se irá liberando según las necesidades fisiológicas (257). El TGF- β es liberado en su forma biológicamente activa por la acción de proteasas, como plasmina o elastasa, o por entrecruzamiento mediado por transglutaminasa 2 (TG2) de LTBP y/o LAP. De este modo, el TGF- β activo (proteínas homodiméricas o heterodiméricas activas) se unirá a sus receptores diméricos de membrana con actividad serina/treonina cinasa tipo I o tipo II para llevar a cabo sus funciones biológicas, iniciando la compleja vía de señalización en las células diana (252).

Se producen grandes cantidades tras el daño tisular, secretadas localmente en un primer momento por plaquetas y posteriormente por neutrófilos, macrófagos y fibroblastos. Tienen capacidad de autoregulación actuando de manera autocrina y paracrina sobre los macrófagos, además estimulan la producción de otros GFs como FGF, PDGF y TNF- α gracias a su interacción con monocitos (250). Los complejos quedan en forma latente secuestrados en la MEC desde donde son liberados sostenida y continuamente a lo largo del proceso de cicatrización gracias a ciertas sustancias proteolíticas como plasmina, trombospondina-1, MMP-2, MMP-9 e integrinas (251) expresadas en la superficie de fibroblastos, células epiteliales y células dendríticas.

Las funciones fisiológicas y fisiopatológicas del TGF- β son extensas, ya que casi todos los tipos celulares pueden secretarlo y además expresar sus receptores (253):

1. Intervienen en la **proliferación celular, diferenciación y expresión génica** de todos los tipos de células principales implicados en la cicatrización de heridas (250), tanto células epiteliales, endoteliales como hematopoyéticas. Pero a diferencia de otras citoquinas, **inducen la inhibición**. Llevan a la apoptosis celular en algunos casos.

2. Poseen **propiedades inmunorreguladoras**, por lo que ejerce una función importante como regulador negativo de las respuestas inmunitarias pro-inflamatorias en diversos órganos, entre los que se encuentra el intestino (258). Para ello controlan la diferenciación celular del sistema inmune y, además, tienen un papel importante en la inhibición de la secreción de anticuerpos de linfocitos B, inhiben la acción citolítica de linfocitos T, NK y células LAK. Inhiben el efecto y/o la producción de IFN- γ , TNF- α y TNF- β e interleuquinas 1,2 y 3 (IL-1, IL-2, IL-3).

3. **Estimulan la quimiotaxis** de fibroblastos, linfocitos, neutrófilos y macrófagos.

4. **Promueven la angiogénesis** mediante la inducción de dos polipéptidos relacionados con monocitos, IL-1 y TNF- α (247).

5. Una de sus funciones principales está relacionada con la **modulación de la MEC**. La producción de MEC representa su acción más importante en las células mesenquimatosas, para ello se superponen diferentes acciones: incremento de la expresión de proteínas de la MEC como fibronectina, vitronectina, preteoglicanos, tenascina y colágeno por los fibroblastos (250), la supresión de la expresión de proteasas degradadoras de la matriz, la inducción de la expresión de inhibidores de proteasas (TIMPs) y la regulación de la expresión de integrinas que actúan como receptores de diversos componentes de la MEC (257). La conjunción de todas estas acciones se dirige hacia un aumento de la formación de MEC y en la interacción de las células con la matriz. Estas funciones son muy importantes en el proceso de cicatrización, sobre todo en fases más tardías de la misma.

Cuando se alteran la activación de la citoquina o la transcripción de la señal intracelular de las células diana se produce una disfunción que explica el papel fisiopatológico del TGF- β en enfermedades como fibrosis, cicatrización anormal, enfermedades autoinmunes (enfermedad inflamatoria intestinal o enfermedad celíaca) (258), enfermedades parasitarias y cáncer. Los principales reguladores de la expresión

in vivo del TGF- β son cambios en los niveles de hormonas esteroides, daño celular, estrés, o infecciones virales o parasitarias (253).

El **TGF- β 1** es la molécula prototipo de esta superfamilia y por lo tanto ha sido la más estudiada (253). Al igual que la familia a la que pertenece, el TGF- β 1 se secreta en forma de complejos latentes que inmediatamente se unen a proteínas de la MEC provocando su almacenamiento. Por lo tanto, la secreción de este factor por las células productoras no se correlaciona temporalmente con la función que realiza cuando está activo. A consecuencia de una variedad de desencadenantes físicos, químicos y biológicos tales como temperatura elevada, pH ácido, especies reactivas de oxígeno, integrinas, proteasas (plasmina...), trombospondina-1, el TGF- β 1 se libera de la LAP activándose (259). Una vez activo tiene capacidad de autoregulación, ejerciendo una retroalimentación negativa disminuyendo la liberación de otras moléculas de su reservorio (257). Algunos estudios han profundizado en la regulación genética del TGF- β 1, donde parece que la presencia o ausencia de proteínas de la MEC pueden influir en la expresión de esta molécula de forma negativa, cuando existen menos interacciones celulares con proteínas de la MEC se induce la formación de nuevas proteínas para que formen parte de la MEC (254). Su señalización está estrechamente regulada en tres entornos distintos: en el espacio extracelular, en la membrana celular y en la región intracelular, como ocurre intracelularmente en la célula diana por el sistema smad (259). Es multifuncional, ya que regula la diferenciación, la apoptosis, la migración y cicatrización de heridas (259). Es un potente modulador de la MEC: a) mejora la síntesis de colágeno y disminuye su degradación regulando la expresión de varios genes que codifican las MMPs, capaz de inhibir la escisión de colágeno actuando sobre las MMP-1, MMP-3 y MMP-9 (260), b) actúa sobre fibroblastos, osteoclastos y células endoteliales estimulando la síntesis y depósito de proteínas de la MEC, además incrementa la expresión de integrinas y receptores que median las interacciones celulares con proteínas de la MEC (254). Es el inhibidor más potente de la proliferación de células de origen mieloide, mesenquimal, epitelial, linfoide, endotelial y de varios tipos de células malignas. Sin embargo, puede estimular la proliferación de fibroblastos normales, de células no epiteliales y ciertos tipos de células mesenquimales (261). En este sentido, se ha demostrado que induce la activación y diferenciación de los fibroblastos en miofibroblastos, gracias a una regulación positiva de la expresión de la actina- α del músculo liso (α -SMA), facilitándose la fase de contracción, lo que permite la aproximación de los bordes de la herida para completar la cicatrización (258) (262). Esto podría tener importancia en la fase temprana de cicatrización de anastomosis intestinal donde está asociada con incrementos locales de la expresión de TGF- β 1 (263).

FACTOR DERIVADO DE LAS PLAQUETAS (PDGF):

El **PDGF** se descubrió en 1970, es una proteína termoestable de 30-32 kDa de peso molecular formada por dos cadenas peptídicas unidas por puentes disulfuro identificadas como A y B, combinadas de manera homodiméricas o heterodiméricas lo que da lugar a diferentes isoformas: **PDGF-AA**, **PDGF-AB**, **PDGF-BB**, **PDGF-CC**, y **PDGF-DD** (250). La principal fuente de estas proteínas son las plaquetas, pero también es secretado por macrófagos, monocitos, fibroblastos, células endoteliales, células del músculo liso vascular y queratinocitos (250). Para llevar a cabo su función necesita unirse a tres diferentes receptores transmembrana del tipo tirosina quinasa estructurados por cadenas heterodiméricas u homodiméricas tipo α y β (251). Estos receptores se expresan en fibroblastos, células de músculo liso, células endoteliales microvasculares y plaquetas (264). Para conseguir un efecto considerable en el proceso de cicatrización es necesario que estén presentes localmente en altas concentraciones, no altera la secuencia del proceso pero acelera la tasa de cicatrización (265). Ya que, la producción en el lugar del daño tisular no es constante y los aumentos en la concentración se ha correlacionado con una mayor formación de tejido conectivo (247).

Principales papeles en la cicatrización:

1. Presenta un **efecto mitógeno** sobre células mesenquimales tales como células gliales, musculares y fibroblastos (250).
2. **Quimiotaxis** para Neutrófilos, macrófagos y fibroblastos (265).
3. Potencia la **diferenciación fenotípica de miofibroblastos** a partir de fibroblastos, ayudando a la contracción de la herida (264).
4. Es el factor más importante en la **activación de las proteasas de la matriz** permitiendo la escisión del colágeno (colagenasas) (250).
5. Además, es uno de los factores que actúa de forma más directa en el efecto de enyesado o rellenado de las lesiones, ya que, gracias a los fibroblastos se incrementa la formación de MEC mediante la producción de fibronectina, proteoglicanos y ácido hialurónico. Fomenta la **deposición de colágeno** (264).
6. **Producción y secreción de otros GFs** al actuar sobre macrófagos (265).

En cuanto a la isoforma **PDGF-B**, su expresión se concentra principalmente en neuronas, células endoteliales vasculares y megacariocitos. Una vez sintetizado por

estas células presenta un predominio N-terminal, el cual debe ser escindido para llevar a su activación, intracelularmente o bien extracelularmente tras su secreción, gracias a la que parece la enzima más probable la proprotein convertasa (266). El extremo C-terminal se une a componentes de heparán sulfato de la MEC o de la superficie del endotelio permitiendo su reservorio en lugares adecuados. Finalmente, gracias a la proteólisis por trombina se liberan para activar los receptores celulares específicos α o β (267).

En función de la unión a unos u otros receptores:

a) Puede dar lugar a **quimiotaxis** cuando están involucrados receptores α , provocando la atracción de células implicadas en el proceso inflamatorio y cicatricial (neutrófilos, monocitos y fibroblastos).

b) O el impulso de la **proliferación tisular y modulación** de otros factores, cuando intervienen receptores β .

El estudio de los patrones de comportamiento del PDGF y de la expresión de sus receptores en modelos experimentales tanto *in vitro* como *in vivo* han demostrado que tras la lesión se liberan tempranamente y abundantemente, una vez originada la degranulación de las plaquetas durante la fase de coagulación (251) (264) y su modo de acción es similar a la actividad autocrina y paracrina hormonal (264). En estudios experimentales en donde se ha utilizado, parece que se aprecian estas cualidades que se describen incrementando la vascularización y la proliferación celular, mejorando la calidad de la cicatrización con la deposición abundante de colágeno bien organizado (268). Sin embargo, cuando se producen alteraciones en la señalización normal del PDGF se dan situaciones patológicas en donde se descontrola la proliferación celular, el aumento patológico de fibroblastos en su fenotipo miofibroblástico, así como el depósito aumentado de MEC (267). El papel patológico principal del PDGF se basa en su alta capacidad mitógena (269), como consecuencia aparece fibrosis en aquellas localizaciones donde debería desarrollarse una cicatrización normal, su extensión puede alterar la función normal del órgano afecto (269) (267).

OTROS FACTORES DE CRECIMIENTO:

La angiogénesis también adquiere un papel crucial para la cicatrización de las heridas. Los factores de crecimiento reguladores de la neovascularización más importantes son el **VEGF** y el **FGF**, además de la estimulación de la migración de

queratinocitos y fibroblastos, juega un papel fundamental en el incremento de nuevos vasos sanguíneos en la zona perilesional (270).

La familia de **VEGF** son glucoproteínas que incluye 6 isoformas: **factor de crecimiento placentario** (PlGF), **VEGF-A**, **VEGF-B**, **VEGF-C**, **VEGF-D** y **VEGF-E**. Llevan a cabo sus funciones biológicas cuando se unen a receptores de superficie tirosina quinasa (VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3) (255) (271). Las isoformas de VEGF son secretadas como dímeros antiparalelos ligados a cisteína. Una vez extracelularmente e inactivas por diversos inhibidores, son secuestradas por proteoglicanos heparán-sulfato de la MEC (272). Cuando existe demanda de VEGF en situaciones de inflamación o tumorigénesis, diversas proteasas como la MMP-9 escinden los péptidos de VEGF (273) permitiendo que estos actúen sobre sus receptores específicos.

En la cicatrización de heridas el VEGF se centra en varios pilares fundamentales dirigidos a desarrollar angiogénesis y permeabilidad vascular.

A) Antes de iniciar la formación de nuevos vasos sanguíneos el entorno donde se ha producido el daño comienza a cambiar para favorecer la migración de células endoteliales, paso previo a la proliferación de las mismas. Para ello, se dan unas condiciones proteolíticas especiales promovidas por VEGF que destruye elementos de la membrana basal y la MEC **facilitando la migración celular endotelial** al tejido dañado. **Induce factores procoagulantes** en el endotelio como el factor de Von Willebrand, que favorece la adherencia y agregación de plaquetas. Éstas a su vez son capaces de sintetizar y liberar VEGF y otras proteínas, que activan y mantienen la cascada de la coagulación necesaria para formación última de trombina y fibrina (271). El VEGF aumenta directamente la secreción de colagenasas por las células endoteliales (MMP-1, MMP-3 y MMP-9), inhibidores de proteasas, TIMPs, gelatinasa A (MMP-2), uroquinasa, activador del plasminógeno (uPA y tPA) así como plasminógeno activador inhibitor-1 (PAI-1) (271).

B) Sus funciones se centran activamente sobre las células endoteliales de forma mitogénica y morfogénica, **potenciando la angiogénesis y la linfangiogénesis**. Mantiene la integridad y la supervivencia de las células endoteliales por medio de la activación de las vías antiapoptóticas (274), aumentando la vida útil absoluta de las células endoteliales. Además, potencia la proliferación y la migración de células endoteliales por la MEC. Todas estas acciones van encaminadas a la **formación de nuevos vasos sanguíneos**, muy

importante para dar lugar al tejido de granulación o fibrovascular formado por fibroblastos, colágeno y vasos sanguíneos (271). En este contexto, hay estudios que sugieren que el VEGF, aunque no induce la proliferación de fibroblastos, sí parece funcionar como factor quimiotáctico de estos hacia el tejido dañado (272).

C) **Incrementa la permeabilidad y vasodilatación** de microvasos en el tejido dañado mediante la inducción de NO y prostaciclina (271), lo que fomenta la llegada de las proteínas y los elementos necesarios para la cicatrización (275).

En cuanto a la regulación, la tasa de secreción del factor de crecimiento es un elemento clave de la angiogénesis (273), bajos niveles de VEGF son esenciales para la homeostasis de los vasos mientras que altos niveles producidos por células del estroma hipóxicas o tumorales inducen ramificaciones de nuevos vasos (272). La isquemia y la hipoxia son características del daño tisular, descendiendo la tasa de oxígeno tisular de 40-50 mmHg en la normalidad hasta 6-7 mmHg en el tejido dañado. En esta situación hipóxica se inducen factores como el 1α , que conlleva la regulación positiva de la expresión de VEGF y sus receptores, que a su vez promueven una angiogénesis para reestablecer la microcirculación y aumentar la tasa de oxigenación de los tejidos (271). Por otro lado, las enzimas proteolíticas son importantes moduladores de VEGF extracelular con una función dicotómica. Tanto es así que la liberación de las mismas se puede considerar como un agente proangiogénico y, sin embargo, en otras ocasiones puede inhibir la angiogénesis. Esto se explica por el mecanismo de acción de estas proteasas sobre el VEGF, que inicialmente escinden los péptidos de la MEC liberándolo pero en otras circunstancias pueden adquirir una actividad altamente proteolítica degradando el factor de crecimiento y frenando su capacidad angiogénica (273).

La isoforma **VEGF-A** se ha identificado como un estimulador potente de la mitogénesis de la célula endotelial, migración de células, efecto vasodilatador y un mediador de la permeabilidad microvascular (70). Otra potente isoforma, la **PIGF**, es capaz de estimular la angiogénesis evitando efectos secundarios comunes para VEGF como el edema y la hipotensión (276), pero sólo se ha aislado en la placenta. Ishii y colaboradores es el primer grupo en aplicar VEGF-A intraoperatoriamente mediante inyección en la muscularis propia de la línea de sutura de anastomosis de colon de conejos comparado con otro grupo en los que sólo se inyectó solución salina (73). Los resultados fueron significativos en el día 4 postoperatorio pero no en los días 3 y 7; encontrando mayores presiones de rotura, el análisis histológico y microangiográfico reveló un aumento considerable del recuento de capilares submucosos y además se

observaron incrementos significativos de infiltrado inflamatorio celular y proliferación fibroblástica (73).

El **FGF** es una familia de GFs vinculada a la heparina, que protege de la inactivación por calor, en donde se han identificado más de 20 isoformas diferentes. Involucrada tanto en el desarrollo como en la homeostasis del tejido adulto, pero también en la regulación metabólica, en la cicatrización de heridas y en la regulación de la actividad celular como diferenciación, migración y proliferación. Sus funciones están mediadas por la unión a receptores de superficie de células endoteliales tipo integrinas, proteoglicanos heparán-sulfato y otros con actividad tirosina quinasa (FGFRs) (277). Uno de los objetivos principales, al igual que el VEGF, es la **inducción de angiogénesis**. Pero previamente el FGF realiza una función importante de **degradación de la MEC** gracias a la actividad proteolítica del sistema activador plasmina-plasminógeno y metaloproteinasas de la MEC. Simultáneamente se sucede un efecto quimiotáctico y proliferativo de las células endoteliales que van a dar lugar a los nuevos vasos sanguíneos (278). La administración de FGF ha demostrado que promueve significativamente la proliferación y migración de fibroblastos en la anastomosis así como la neovascularización y el depósito denso de colágeno, lo que puede ayudar a la calidad del tejido de granulación de la cicatrización según Katsuno y colaboradores (279).

El **EGF** es un pequeño péptido de apenas 6 kDa de peso molecular sintetizado principalmente por los macrófagos, plaquetas, linfocitos y fibroblastos (280), como una preproteína glucosilada transmembrana de mayor tamaño que luego se escinde por proteólisis en péptidos más pequeños que dan lugar al EGF. Tiene un papel importante en la cicatrización de heridas debido a la **capacidad mitogénica** sobre una amplia variedad de células tales como hepatocitos, fibroblastos y células epiteliales (281). Induciendo crecimiento celular, proliferación celular (282) y diferenciación (283). Para llevar a cabo sus funciones necesita de unos receptores distribuidos en la superficie celular de las células diana con actividad tirosina quinasa llamados **receptores del factor de crecimiento epidérmico** (EGFR) (284). Se ha constatado el papel que ejercen las integrinas, como canalizador de la vía de señalización intracelular, y el EGF necesario para activarlas en la reepitelización de los tejidos dañados (280). El receptor y la proteína tirosina quinasa citoplasmática juegan un importante papel en el control de una variedad de procesos celulares durante el desarrollo embriológico y en la regulación de muchos procesos metabólicos y fisiológicos (285). Sin embargo, se ha podido comprobar que la sobreexpresión de estos receptores en ciertas líneas celulares tumorales se asocia con

un peor pronóstico y disminución de la supervivencia a diferencia de su presencia normalizada (283).

El **IGF** es una familia de péptidos hormonales, estructuralmente homólogo a la insulina, formada por tres tipos diferentes de péptidos que presentan hasta un 50% de aminoácidos homólogos. Actúan de forma paracrina o autocrina sobre receptores asociados a la membrana de alta afinidad en las células diana, su principal fuente es el hígado pero también se conocen otras células que lo producen como macrófagos y fibroblastos (286). La hormona de crecimiento actúa sobre receptores hepáticos induciendo la transcripción de genes del IGF liberándose este factor a la circulación, sobre todo en el tipo I de la familia. En el torrente sanguíneo circulan unidos a proteínas de unión, el tipo 3 de estas proteínas es el que se une mayoritariamente a IGF (hasta en el 95% de los casos). Estas proteínas de unión, que también se producen en el hígado y en menor medida por otros tipos celulares, limitan el acceso del IGF a los tejidos y sus receptores (287). Se forman dímeros de IGF-proteínas de unión y éstos a su vez dan lugar a complejos cuando se adhieren a una subunidad ácido-lábil, gracias a estos complejos la semivida sérica del IGF se prolonga durante muchas horas (287). En el momento que los péptidos de IGF se liberan de estos complejos pueden acceder a los tejidos e interactuar con receptores específicos (287), que han sido caracterizados en todo el tracto gastrointestinal (65). Tiene una amplia gama de efectos biológicos y actúa en una gran cantidad de tejidos diferentes, promueven la proliferación, supervivencia y diferenciación de muchos tipos celulares, incluidos los miofibroblastos (288). Se ha comprobado *in vitro* cómo este factor actúa sobre la morfología de queratinocitos alterando su forma y acelerando la epitelización del tejido dañado (286). Están involucrados en la síntesis de proteínas y de mielina, en la formación ósea e incrementan la supervivencia neuronal (287). Además, poseen funciones metabólicas variadas, algunas similares a la insulina como la disminución de la glucosa plasmática tras su inyección en seres vivos o la captación de glucosa por células *in vitro* ((288). En esta misma línea, durante la infraalimentación invierte el balance de nitrógeno e inhibe degradación de proteínas en el músculo (65). Sobre las células endoteliales, juega un papel significativo en su fisiología, en el estímulo de la síntesis de NO y favoreciendo la migración con la finalidad de formar nuevos vasos sanguíneos (288), en cuyo proceso intervienen los miembros de la familia de receptores de la integrina (289). No obstante, la disfunción del correcto funcionamiento de la familia de factores IGF puede dar lugar a importantes consecuencias patológicas, está implicado en complicaciones diabéticas, arteriosclerosis, desórdenes inflamatorios y procesos oncológicos (288).

El **factor de crecimiento de hepatocitos/factor de dispersión (HGF/SF)** es una molécula de 186 kDa de peso molecular heterodimérica unida por puentes disulfuro (290), llamado así por tratarse de un factor que se identificó independientemente como factor de crecimiento de hepatocitos y también como factor de movilidad de células derivadas de fibroblastos (291). Es producido por células mesenquimales, como ejemplo en el hígado se produce por las células de Ito y en riñón por células endoteliales y mesangiales, que realiza su acción por mecanismos endocrinos y paracrinos sobre los receptores del factor de crecimiento de hepatocitos (HGFR), tipo tirosina quinasa y producto del protooncogen c-Met, que se encuentran en epitelios y melanocitos. Es un modulador pleiotrópico de la proliferación, morfogénesis y desplazamiento epitelial (291). Las respuestas celulares a la estimulación del c-Met por el HGF/SF son importantes para la mediación de una amplia gama de actividades biológicas, incluido el desarrollo embriológico y homeostasis tisular (290), cicatrización de heridas (292) (293), actividad antiinflamatoria (292), regeneración de tejidos, angiogénesis, crecimiento, invasión y diferenciación morfológica:

1. **Función de dispersión celular:** muy importante, implicada en diversos procesos tanto fisiológicos como el desarrollo normal, y patológicos como por ejemplo la tumorigénesis y las metástasis. Donde se suceden una serie de eventos como diseminación celular y disociación celular para finalmente promover la migración de células, sobre todo epiteliales. El HGF/SF es un potente efector de dispersión celular, por lo tanto induce de forma importante, previa a la migración, la disociación celular atenuando o disolviendo los enlaces intercelulares (291).

2. **Angiogénesis:** el HGF/SF actúa directamente sobre las células endoteliales vasculares promoviendo su migración, proliferación, invasión de tejido diana y estimulando su organización formando capilares. Pero también actúa indirectamente estimulando otros factores angiogénicos como el VEGF o la IL-8 (291).

3. **Apoptosis y proliferación celular:** la señalización HGF/SF-Met puede afectar tanto la proliferación como la apoptosis dependiendo del contexto celular (291). El proceso de apoptosis es un proceso de muerte celular programada altamente regulado, en este contexto el HGF impide las señales apoptóticas mediante la inhibición de la actividad de la caspasa-3 o a través de la inducción de otras moléculas anti-apoptóticas tales como Bcl – xL (290).

4. **Modulación antiinflamatoria:** la regulación y disminución de las moléculas de adhesión de la superficie de células endoteliales por parte del HGF inhibe la infiltración de neutrófilos, también influye sobre eosinófilos inhibiendo su migración a través de la regulación negativa de mediadores inflamatorios. En cuanto a los macrófagos, el HGF es capaz de actuar sobre las citoquinas producidas por estos, suprimiendo su producción. Además, inhibe la diferenciación de macrófagos en otros tipos celulares más específicos en la respuesta inflamatorias (290).

5. **Motilidad celular:** el HGF/SF aumenta la motilidad de las células epiteliales, ya que incrementa la polimerización de la actina, la formación de los filamentos de actina y la adherencia local, procesos que intervienen en la motilidad celular normal (291).

En diversos estudios se ha constatado el importante papel que desempeña el HGF/SF cuando es secretado tras el daño tisular, induciendo respuestas concretas de autoreparación del tejido dañado en numerosos órganos. Normalmente, se secreta como una forma biológicamente inactiva y latente que con el estímulo adecuado en las zonas de lesión pasa a forma activada, lo que puede explicar que sólo se active localmente en los órganos dañados (290).

Factor	Célula productora	Blanco	Efectos biológicos	Participación en proceso de curación
TGF-β	Plaquetas, linfocitos TH1 activadas, macrófagos/monocitos, neutrófilos, matriz ósea y cartilaginosa	Fibroblastos, cél. estaminales de la médula ósea, cél. endoteliales, pre-osteoblastos	Estimula angiogénesis. Estimula mitosis endotelial, fibroblástica y osteoblástica. Estimula formación de MEC. Quimiotaxis endotelial y osteoblástica. Inhibe formación osteoclastos	Inflamación Formación tejido de granulación Reepitelización Formación y remodelación de MEC
PDGF	Plaquetas, macrófagos, monocitos, cél. endoteliales, cél. musculares lisas	Fibroblastos, músculo liso, cél. gliales, macrófagos, neutrófilos	Estimula síntesis de proteínas y ADN en tej. óseo. Facilita la formación de colágeno tipo I. Mitogénesis cél. mesenquimales, osteoblastos y endoteliales. Mitogénesis y quimiotaxis cél. fibroblásticas, glial y músculo liso. Efecto angiogénico en cél. endoteliales. Activador de macrófagos	Inflamación Formación tejido de granulación Reepitelización Formación y remodelación de MEC
VEGF	Plaquetas, fibroblastos, macrófagos, queratinocitos, células mesenquimales y céls. del estroma	Cél. endoteliales, monocitos, macrófagos, neuronas, cél. epiteliales renales, cél. tumorales	Quimiotaxis y proliferación de cél. endoteliales. Angiogénesis. Hipermeabilidad vascular	Formación tejido de granulación
FGF	Plaquetas, macrófagos, fibroblastos, queratinocitos, astrocitos, condrocitos	Fibroblastos	Mitogénesis, crecimiento y diferenciación de condrocitos y osteoblastos. Proliferación fibroblastos e inducción fibronectina. Quimiotaxis cél. endoteliales	Formación tejido de granulación Reepitelización Formación y remodelación de MEC
EGF	Queratinocitos, fibroblastos, cél. endoteliales, macrófagos	Cél. epiteliales, cél. endoteliales	Estimula quimiotaxis endotelial y angiogénesis. Regula secreción de colagenasas. Estimula mitogénesis de cél. mesenquimales y epiteliales	Reepitelización
IGF	Fibroblastos, macrófagos, monocitos, neutrófilos, hepatocitos	Fibroblastos, condroblastos, osteoblastos	Proliferación y diferenciación de cél. mesenquimales y de revestimiento. Síntesis de colágeno. Estimulación síntesis de matriz ósea. Potencian la acción de la insulina	Formación tejido de granulación Reepitelización
HGF/SF	Cél. mesenquimales (cél. de Ito, endoteliales y mesangiales)	Cél. epiteliales, melanocitos	Estimula migración, proliferación y producción de metaloproteinasas de la matriz. Neovascularización.	Formación tejido de granulación

Tabla 2 Resumen producción, células diana y función de factores de crecimiento

Rutas de aplicación de los factores de crecimiento y plasma rico en plaquetas

A lo largo de los diferentes estudios experimentales se han puesto a prueba una amplia variedad de transportes y aplicabilidad de GFs. Generalmente estos tienen una semivida muy corta y las células implicadas necesitan una exposición más prolongada, hecho que ha promovido la introducción de formas de cesión de estas proteínas con capacidad de prolongar su bioactividad (249).

Se pueden dividir según la vía de administración del fármaco, como sistémico o local, y según el momento en el que se administren, desde la aplicación preoperatoria hasta la administración postoperatoria repetida.

La dosis necesaria a administrar es otro punto de controversia. En estudios experimentales se ha comprobado que se necesitan dosis mayores *in vivo* comparadas con las dosis necesarias para estimular a las células *in vitro*. Esto se debe probablemente a la dispersión de las proteínas por el tejido circundante a la herida y por la acción de diversas proteasas que actúan sobre los GFs aplicados (249).

Las rutas sistémicas incluyen las vías intravenosa, subcutánea e intraperitoneal (59) (59) (64) (63) (65). En algunos estudios se administra de forma continua por bombas osmóticas implantadas subcutáneamente (294) o intraperitonealmente (295). La administración intravenosa de GFs podría estar limitada por un período de vida media bastante corto debido a la degradación rápida por las proteasas del suero (296). En la cicatrización de anastomosis experimental intestinal, las aplicaciones intravenosas de GFs no se investigaron, posiblemente debido al tamaño del animal y por la disponibilidad de otras rutas de administración más fáciles y accesibles, aunque sí existen algunos estudios que han utilizado la administración endovenosa para administración de GFs (296) (297). Además, la administración sistémica también podría aumentar el riesgo de efectos secundarios indeseables y daño orgánico a distancia, como la tumorigénesis, donde está implicado la administración de altas dosis de GFs y/o de dosis repetidas menores a lo largo de períodos largos de tiempo para alcanzar efectos terapéuticos (298). Por lo tanto, el objetivo debe ser el de hallar medicamentos compuestos por GFs que alcancen el suficiente nivel terapéutico con la aplicación de dosis más limitadas limitar la dosis sistémica tanto como sea posible, pero consiguiendo un suficiente nivel terapéutico en el sitio de la anastomosis.

La mayoría de autores administraron los GFs en el momento de la cirugía (299) (236) (300), aplicándolos localmente justo en el sitio donde se espera su efecto (73) (5) (68) (67), lo cual sólo es posible a través de un acceso directo durante el procedimiento quirúrgico. La aplicación intraluminal de GF incluye sonda nasogástrica u oral (72), enemas (301) e incluso administración vía colostomía de vectores adenovirales para la transferencia génica. En este sentido, también se ha utilizado la inyección de plásmidos bacterianos para permitir la transferencia (302) (303).

Para la aplicación local se ha experimentado con diversos procedimientos: suspensiones, como la de colágeno, o películas, como las de gelatina ácida de hidrogel. El pegamento de fibrina ha sido utilizado en las anastomosis intestinales experimentalmente y clínicamente per se, pero también en los últimos años como transporte de factores de crecimiento (67). Al igual que en otros tejidos como el cartílago, piel o en la regeneración nerviosa, el pegamento de fibrina se ha utilizado con éxito como transporte de factores de crecimiento para bFGF, PDGF y factor de crecimiento del nervio (NGF) (304). La inyección subserosa o intramuscular en la zona de anastomosis intraoperatoriamente ha sido utilizada por varios autores; sin embargo, se ha descrito que la concentración no se mantiene constante, sino que alcanza un pico máximo durante las primeras 24 horas postoperatorias y luego disminuye con el tiempo debido a la acción de las proteasas.

En un intento por conseguir una liberación local sostenida de factores de crecimiento y al mismo tiempo protegerlos de la actividad de las proteasas del suero se han desarrollado varios transportes como alginato (305), dextrano, ácido hialurónico, heparina, alcohol de polivinilo y polímeros de ácido láctico y ácido glicólico (PLGA), todos se han utilizado hasta ahora para la reparación y regeneración vascular, curación de heridas y otras aplicaciones (Fig. 8). Sin embargo, estos materiales poliméricos tienen sus propias desventajas como la degradación rápida, desnaturalización de GFs debido a los complejos irreversibles, déficit de proliferación celular y ambientes ácidos por la isquemia periherida, lo que podría provocar la reducción de la funcionalidad de la proteína, además de causar potenciales respuestas inmunes e inflamatorias agudas (306).

El material ideal para la fabricación de andamios para el transporte debe reunir una serie de características básicas como proporcionar un ambiente adecuado para permitir la función, migración y proliferación celular. También deben tener en cuenta la regeneración y desarrollo del tejido. Y lo más importante es que no debe provocar ninguna reacción inmune (306).

Entre los polímeros utilizados en el desarrollo de micropartículas para la liberación controlada de moléculas activas destacan los poliésteres alifáticos, formados por unidades monoméricas de ácido láctico y de ácido glicólico. Estos biopolímeros están disponibles para uso médico y han sido aprobados por la FDA (Food and drug Administration) para elaborar sistemas para la administración de sustancias activas por vía parenteral, además gracias a su biocompatibilidad han sido empleados en numerosas aplicaciones biomédicas, tales como suturas reabsorbibles e implantes (307).

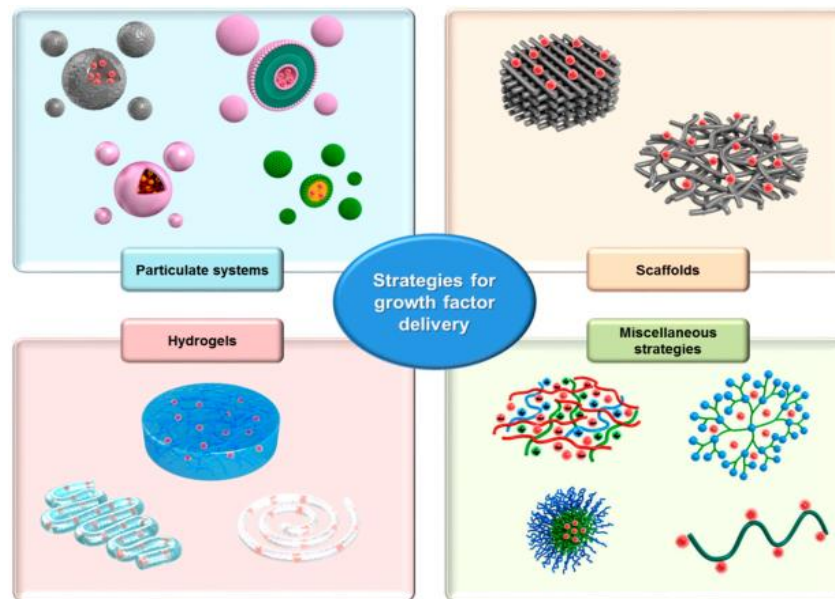


Fig. 8 Ilustración esquemática de los sistemas de administración de fármacos cargados con factor de crecimiento

Tomado de Park et al (308)

La literatura reciente ha mostrado que la degradación de PLGA puede ser empleada para la liberación sostenida de medicamentos en dosis deseables mediante implantación sin procedimientos quirúrgicos. Así mismo, es posible modular las propiedades físicas del polímero controlando parámetros relevantes como peso molecular, proporción de láctico/glicólico frente a concentración de molécula activa para conseguir una dosis deseada y unos intervalos de liberación determinados (309).

Se han llevado a cabo varios estudios en donde se han construido andamios de alginato poroso junto con la incorporación de microesferas de PLGA. En uno de ellos las microesferas se cargaron con bFGF y se implantó en la capa mesentérica del peritoneo de rata, comprobándose que el número de capilares que penetran en los andamios liberadores de bFGF fue cuatro veces superior al grupo control en el que se implantaron los andamios sin bFGF (310). En otro estudio, las microesferas de PLGA se cargaron con EGF recombinante y se incorporaron a andamios de alginato para el tratamiento de heridas en ratas diabéticas, objetivándose una aceleración en la curación

de la herida. Los estudios *in vitro* también demostraron la bioactividad del EGF recombinante encapsulado y la proliferación de fibroblastos en presencia del GF encapsulado (311). En el primer trabajo publicado, por Han y cols. en 2001, se describe la preparación de microesferas de poli (ácido L-láctico) cargadas con EGF cuya liberación sostenida mejoró la cicatrización de úlceras gástricas provocadas en ratas (312). Katsuno describió la aplicación local de microesferas de PLGA cargadas con bFGF incorporados a hidrogeles de gelatina, que se inyectaron en la subserosa de la anastomosis (279) y Sakallioğlu utilizó microesferas con EGF en esponjas de gelatina, que se colocaron envolviendo la anastomosis alrededor y fijadas con suturas (313).

Con la misma finalidad, se han utilizado suturas recubiertas con PLGA como vehículo para GF permitiendo su liberación sostenida en el lugar de la anastomosis. En la literatura existen varios estudios de estas características, en donde se realiza una anastomosis de colon de rata con sutura reabsorbible recubierta por PLGA cargada de IGF-1 evaluándose posteriormente las características histológicas de la línea de sutura, la proliferación de células, la neovascularización y la presión de rotura de la anastomosis. Uno de ellos comparaba de forma aleatorizada grupos de ratas sanas en los que se utilizó sutura reabsorbible recubierta o no (5). En el otro estudio, la anastomosis intestinal se estudió en ratas en las que se había inducido una colitis controlada, comparándose también de forma aleatorizada grupos en los que se había utilizado suturas recubiertas o no (68). Los resultados parecen alentadores mostrándose un aumento de la neoangiogénesis y de los depósitos de colágeno, también mejoraron las presiones de rotura durante una fase temprana. El principio de sutura recubierta para la distribución de medicamentos también fue aplicado por Pasternak (130), quien usó suturas cubiertas de fibrinógeno para la liberación local de doxiciclina, que reduce la degradación de la matriz a través de la inhibición de MMPs.

De forma indirecta, se ha pretendido mantener la bioactividad de los GFs mediante la administración de compuestos miméticos al heparán-sulfato, como el llamado OTR4120, compensado su degradación endógena (314). Hasta la fecha no se han obtenidos resultados verdaderamente positivos por esta vía de investigación.

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

1.1 Justificación

Las anastomosis intestinales pueden presentar complicaciones muy graves incluso en las mejores condiciones tanto técnicas como fisiológicas, siendo el más importante por sus consecuencias la dehiscencia. No cabe la menor duda de que la incidencia se incrementa cuando coexisten diversos factores de riesgo, que influyen negativamente en los procesos de cicatrización de los tejidos. En la actualidad no existe aún un mecanismo, material o técnica que minimice esta complicación, siendo ésta una línea de investigación de gran predicamento.

Por otro lado, el uso de GFs abre una gama completamente nueva de posibilidades, ya que ha demostrado su capacidad para estimular el crecimiento celular en una variedad de tejidos y su participación en el complejo proceso de la regeneración de los tejidos, lo que puede conducir a una reducción de las importantes complicaciones cuando la cicatrización no se produce con normalidad (59), además de participar en la regulación de otros mecanismos como la inflamación.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, proponemos la siguiente hipótesis de trabajo:

“La aplicación de factores de crecimiento, procedentes de plasma rico en plaquetas, en anastomosis de colon mejora la cicatrización intestinal, disminuyendo la probabilidad de dehiscencia de sutura”.

2.2 Objetivos

General

Evaluar el impacto sobre la cicatrización de anastomosis colónica en modelo animal tras la inmersión de la misma en factores de crecimiento procedentes de plasma rico en factores de crecimiento alogénico durante 15 minutos.

Específicos

- A) Estudio histológico de la anastomosis
- B) Estudio molecular de la anastomosis mediante medición de hidroxiprolina
- C) Evaluar la aparición de complicaciones postoperatoria

3. MATERIAL Y METODO

3.1 Experimentos previos al ensayo

Como prueba preliminar y clave antes de comenzar el proyecto de investigación consideramos que es fundamental demostrar que, tras sumergir las anastomosis en PRGF durante tiempos variados, éstas se impregnan con factores de crecimiento. El factor de crecimiento elegido es el TGF- β 1, puesto que mediante análisis de ELISA es el que se encuentra en mayor concentración en las muestras de PRGF extraído.

Comparación tiempos de inmersión

El tejido es sumergido durante diferentes intervalos de tiempo: 5, 10 y 15 minutos en solución de PRGF y es sometido a un primer análisis inmunohistoquímico para detectar el anticuerpo elegido (TGF- β 1) y su correspondencia con el intervalo de tiempo de inmersión.

La técnica consiste en incluir las muestras de tejido, sumergido en los diferentes intervalos, en parafina para poderlo cortar en secciones de 4 μ m de grosor y realizar la tinción. El datasheet del anticuerpo elegido (TGF- β 1 (TB21), sc-52893) nos recomienda un rango de dilución 1:50-1:500, por ello se realizó una primera tinción para determinar la concentración adecuada: la seleccionada finalmente es la 1:50.

Tan sólo a partir de los 15 minutos se observó algo de marcaje positivo, por lo que se realizó una segunda tinción con muestras sumergidas a 15 y 20 minutos. Sin embargo, no se obtuvieron los resultados esperados por lo que se decide someter a las muestras a una segunda técnica más específica llamada Western blot [\(315\)](#).

Se decidió someter a esta segunda técnica los tejidos sumergidos en PRGF durante intervalos de tiempo de 15 minutos, ya que es el único intervalo que arrojó un marcaje positivo leve en inmunohistoquímica. Además, se compara con otra muestra de tejido no sumergida en PRGF a modo de control.

Los tejidos a estudiar se introducen en nitrógeno líquido, posteriormente se disgrega el tejido empleando un polytron homogeneizer, adicionando 1,5 mL de solución de lisis y homogeneización. Por último, se somete la solución a centrifugación a 13.000 rpm durante 5 minutos y se obtiene el sobrenadante. Una vez cuantificadas las proteínas y preparadas las muestras se carga un gel de acrilamida al 12%. Tras revelar la membrana obtenemos el siguiente resultado [\(Fig.9\)](#):

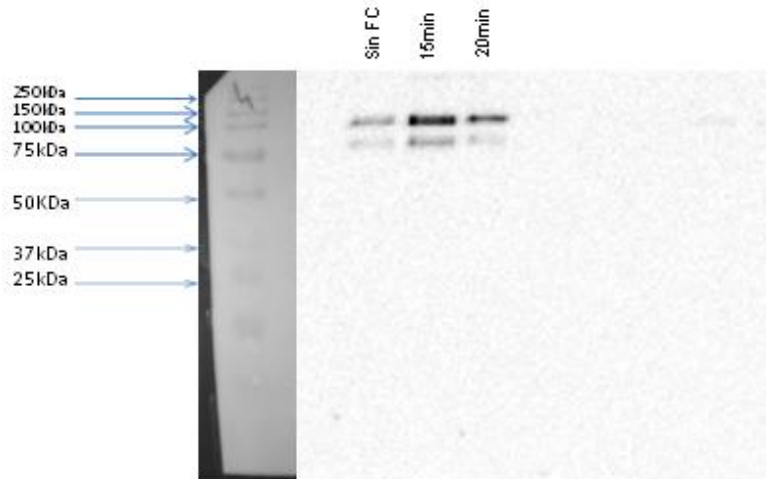


Fig.9 Revelado Western blot para determinación de GFs

El TGF- β 1 tiene un peso molecular de 25kDa (dímero) y 12,5kDa (monómero). Se prepararon varios geles con distintas concentraciones, diluciones con solución de lisis... y, en todos los casos, las bandas aparecieron por encima de su peso molecular. Para poder cuantificar las bandas se incubaron las membranas con GAPDH (37kDa) y β -Actina (42kDa) pero en ambos casos no se obtuvo ningún resultado. Lo cual nos hace pensar que el problema es de la muestra, que no se desnaturaliza correctamente no permitiendo la aparición de bandas a pesos moleculares inferiores. En cualquier caso, se demuestra la presencia de GFs en las muestras sumergidas durante intervalos de 15 minutos.

— Determinación factores crecimiento tras descongelación —

Para este ensayo hemos empleado plasma de ratas donantes para obtener, mediante el método de Anitua (234), plasma alogénico. Siendo necesaria la congelación para su preservación hasta que llega el momento de utilizarlos. Esta etapa es un paso imprescindible para conocer los posibles cambios y/o alteraciones potenciales de las propiedades, naturaleza y/o cantidad de GFs presentes en los concentrados preservados mediante congelación.

Los preparados de plaquetas pueden obtenerse por diferentes procedimientos, igualmente la liberación de los GFs al medio puede desencadenarse por diferentes métodos: adicción de trombina (con o sin calcio) o por estrés mecánico de las plaquetas llegando a su lisis mediante ciclos de congelación-descongelación, dando lugar a una

variabilidad en las concentraciones finales de GFs. Se han descrito lisis plaquetarias con distintos ciclos de congelación-descongelación, incluso con un solo ciclo (316) (317), aunque en este caso no se induce una liberación efectiva de los GFs, según algunos estudios (317) (318). El mecanismo no es más que la formación de cristales de hielo intracelular que daña de forma irreversible la membrana celular con la consiguiente lisis, principalmente a temperaturas muy bajas (-80°C) o ante mayores temperaturas (-20°C) durante un largo tiempo de conservación, se consigue lisis casi completa de las células contenidas en una muestra de sangre total (319).

Cuando se trata de concentrados plaquetarios existen estudios que hacen referencia a la lisis plaquetaria y su activación mediante este método de congelación-descongelación, determinándose los GFs secretados al medio. Parece que tras un ciclo de congelación-descongelación se expresan en forma constante los GFs almacenados en las plaquetas, e incluso se incrementan los siguientes: TGF-β1, EGF, PDGF-AB / BB, PF-4 y FGF-2 (316). Otros estudios previos realizados demuestran cómo tras la descongelación los concentrados de PRGF liberan GFs, como el realizado por Wen y colaboradores (320) que determina VEGF, FGF-b, PDGF-AB, EGF y TGF-β tras la descongelación de las muestras de PRP. Hosnuter (321) estudia la viabilidad de los GFs tras congelación a una mayor temperatura (-20°C) con unos buenos resultados en cuanto a viabilidad de los GFs. Aisladamente se ha demostrado una actividad conservada de ciertos GFs después de la criopreservación, como PDGF-BB (322).

Sin embargo, no conviene someterlos a una temperatura extremadamente baja (-80°C) ni tampoco descongelarlos por medio de un aumento rápido de la misma (hasta alcanzar los 37°C) porque, aunque provoca la interrupción de la membrana plaquetaria induciendo su lisis (318) y la liberación pasiva de GFs (317), puede provocar daño celular plaquetario irreversible destruyéndolas, alteración en el patrón de liberación fisiológico de los GFs e incluso cambios en las características de estos. A ello contribuyen los daños típicos que se pueden encontrar durante el proceso de criopreservación a muy baja temperatura: hielo intracelular, incremento o reducción de la presión osmótica, daño de fractura e hielo extracelular (323).

Teniendo en cuenta todo lo anterior, en nuestro ensayo realizamos preservación de los concentrados plaquetarios ricos en GFs mediante congelación a -42°C durante un período inferior a un mes y descongelación, previa a su utilización, a temperatura ambiente. Evitando así alterar sus características, su patrón de liberación y la consiguiente pérdida de eficacia.

3.2 Experimentos del ensayo

Población del estudio

Se trata de un ensayo controlado y aleatorizado experimental en modelo animal. Se han utilizado 80 animales de experimentación de orden *rodentia* y familia *muridae*, concretamente **rata wistar albina macho** (Fig.10) de la especie *Rattus norvegicus*.



Fig.10 Animal de experimentación

Utilizamos animales de líneas consanguíneas, que adquiere las siguientes características: Isogenicidad (todos los individuos son genéticamente iguales), alto porcentaje de homocigosis, individualidad con respecto a sus cualidades (importante a tener en cuenta al elegir una línea para una investigación determinada), uniformidad fenotípica, estabilidad genética a lo largo del tiempo y, además, permite la comparación de resultados entre diferentes laboratorios y a lo largo del tiempo.

Son muy utilizadas en experimentación biomédica (sobre todo en estudios de oncología, toxicología, teratogénesis, nutrición y propósitos generales), por lo tanto, ha sido empleada como modelo experimental en estudios previos similares. Sobre todo debido a: su carácter dócil, fácil manejo, coste relativamente bajo y alta tasa reproductiva (mantiene una capacidad de concebir de unos 18-20 meses, una duración de la gestación de 21-22 días y camadas de 7-14 crías por parto).

El aparato digestivo está formado por el canal alimentario y las glándulas digestivas, se trata de una estructura tubular que va desde la boca hasta el ano demarcado por diferentes regiones con funciones específicas (Fig.11). Algunas de sus peculiaridades son:

- El canal digestivo distal está formado por intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon), ciego, colon ascendente, colon descendente y recto. El colon sigmoides está ausente
- El colon tiene una longitud media de 15 cms. y carece de tenias
- El ciego está adaptado para la peculiar digestión fibrosa: es una estructura móvil con un amplio mesenterio, formado por unas paredes delgadas y un voluminoso tamaño
- El aparato digestivo de la rata está adaptado para digerir la fibra y así generar ácidos grasos y vitaminas, que son aprovechadas por el organismo del animal

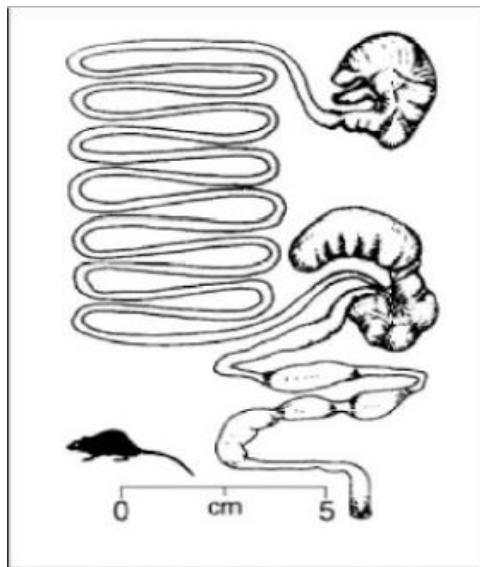


Fig. 12 Aparato digestivo de la rata

Diseño del estudio

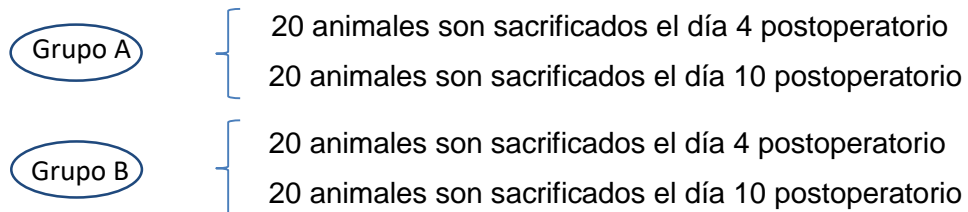
El número total de animales de experimentación utilizados, 80 en total, se ha calculado en base a una fórmula matemática que permite comparar proporciones, tomando intervalos de confianza del 95% y error β del 20%, con una diferencia esperada de 20% entre los grupos.

Estos 80 animales se distribuyen de manera aleatoria en 2 grupos, 40 ratas en cada uno de ellos:

- **Grupo 1** → Anastomosis cólica con sutura reabsorbible de poliglactina 910 5-0.

➤ **Grupo 2** → Anastomosis cólica con sutura reabsorbible de poliglactina 910 5-0 e inmersión de la misma durante 15 minutos en plasma rico en factores de crecimiento alogénico.

Además, se realizan dos subgrupos en cada uno de ellos (A y B) asignándole un período postoperatorio distinto



La aleatorización se realiza mediante un programa informático para evitar el sesgo de selección y asegurarnos que el efecto observado en las variables a estudio se deba realmente al tratamiento aplicado y no a otros factores ([Anexo 2](#)).

Instalaciones y material quirúrgico

Las intervenciones de los animales, así como su posterior estabulación y seguimiento hasta el sacrificio, se llevaron a cabo en el Servicio de Producción y Experimentación Animal del Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS)/HUVR (Centro registrado y autorizado ES410910008015), espacio de investigación biomédica multidisciplinar creado en marzo 2006 ([Figs.12 y 13](#)).



Fig.12 Edificio Instituto Biomedicina de Sevilla



Fig.13 Quirófano utilizado para la fase de experimentación

El material quirúrgico utilizado, consta de:

- Sustancia antiséptica: clorhexidina al 2%
- Instrumental quirúrgico (pinzas de disección, porta-agujas, tijeras, escarpelo)
- Paños fenestrados estériles
- Guantes estériles
- Suturas:
 - Poliglactina 910 con calibre USP de 5-0 (el diámetro se encuentra en un mínimo de 0,1 mm y un máximo de 0,149 mm). Sutura de poliglactina 910 con calibre de 2-0 (el diámetro se encuentra en un mínimo de 0,3 mm y un máximo de 0,339 mm). Son hilos multifilamentos trenzados que se degradan por hidrólisis química no enzimática trascurridos 90 días aproximadamente.
 - Sutura de seda 3-0 (el diámetro se encuentra en un mínimo de 0,1 mm y un máximo de 0,149 mm), no reabsorbible.

Período preoperatorio

Los animales tuvieron un periodo de aclimatación de 72 horas previas a la intervención, realizando durante este tiempo inspección clínica diaria para detectar cualquier signo de enfermedad. El alimento administrado ha sido pienso concentrado estándar para roedores suministrado en pequeñas bolas (pellets).

No se realizó ayuno preoperatorio, teniendo los animales acceso al agua y comida *ad libitum*, ya que, los roedores no vomitan o lo hacen muy raramente y no supone un riesgo durante el período anestésico. No se realizó profilaxis antibiótica ni preparación intestinal.

Extracción y procesamiento posterior del plasma rico en factores de crecimiento

1. Extracción sanguínea de la rata wistar donante mediante punción en la cavidad cardíaca.
2. La sangre se recepciona en tubos estériles con citrato al 3,8% como anticoagulante.
3. Centrifugación de la sangre completa en una centrifugadora digital que permita controlar los parámetros de tiempo y velocidad. Tiempo = 8 minutos. Velocidad = 1.800 rpm (280G), a temperatura ambiente.
4. Tras la centrifugación resultan tres estratos desde fondo a superficie: serie roja, serie blanca y plasma. Ésta última a su vez se divide en tres fracciones plasmáticas según su contenido en plaquetas: fracción 1 más superficial y pobre en plaquetas; fracción 2, más profunda en contacto con los leucocitos, y rica en plaquetas, por tanto, plasma rico en factores de crecimiento. Ésta última será la fracción a utilizar, presenta un color amarillento (exento de leucocitos y hematíes).
5. Selección del sobrenadante. Tras el centrifugado se procede a seleccionar la fracción adecuada de plasma rico en factores de crecimiento, mediante pipetas estériles o jeringa. Se divide el plasma amarillo en dos partes iguales. Se aspira primero la superior (pobre en plaquetas); y se deposita todo en un tubo estéril y se etiqueta como pobre (PPP). Se mide la cantidad.

6. Se aspira luego esta fracción rica, teniendo sumo cuidado de no contaminarse con los leucocitos y se deposita en otro tubo, se etiqueta como rica (PRGF).

7. Activación de la solución. Depositado en un tubo de ensayo, se añaden 50 μ L de cloruro de calcio (10%) por ml de plasma (lo que permitirá activar las plaquetas, exocitosis de gránulos y agregación) para liberar el contenido proteico y factores de crecimiento plaquetario, además de activarse la cascada de la coagulación para la formación de trombina.

8. El plasma rico en factores de crecimiento obtenido y activado se almacena en un ultracongelador a -42° C, a la espera para ser descongelado previamente a su aplicación en el animal de experimentación correspondiente según la aleatorización, es por tanto un plasma rico en factores de crecimiento alógeno, que será el empleado en la experimentación.

Anitua propuso en 1999 este método simple para la obtención de PRP que se ha utilizado con frecuencia en estudios posteriores y en aplicaciones clínicas, considerándose la fracción superior como PPP debido a que los autores argumentan que la densidad de las plaquetas aumenta gradualmente desde la parte superior a la capa leucocítica (324).

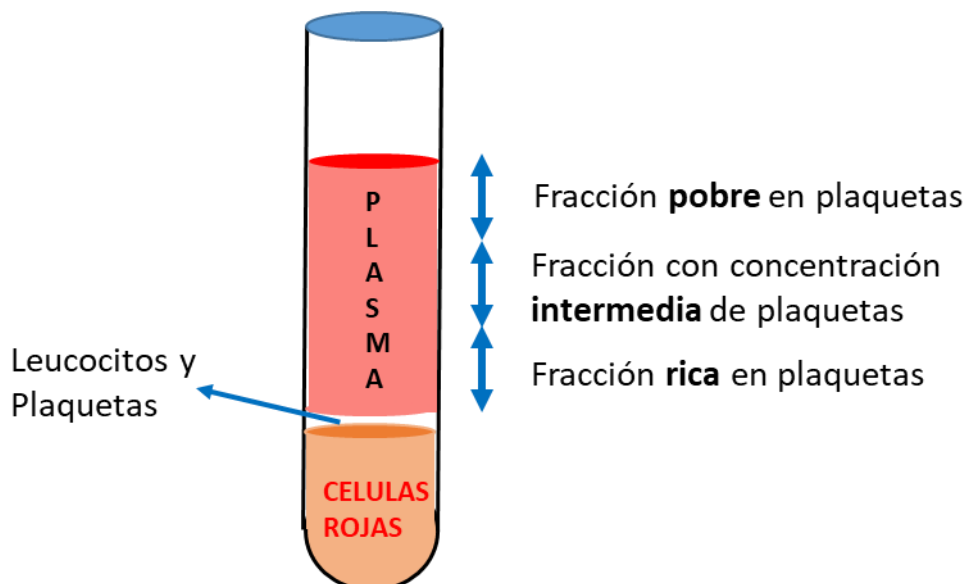


Fig.14 Esquema separación fracciones sanguíneas tras centrifugación

Técnica anestésica y analgésica

ANESTESIA

Empleamos anestesia intraperitoneal con **ketamina** a dosis de **80 mg/kg** y **xilacina** a **10 mg/kg** de peso. La punción se llevó a cabo con una aguja hipodérmica de 25G-23G lateral a la línea media, próxima al vértice de la vejiga. Sin embargo, para realizar la extracción sanguínea y el sacrificio se utiliza una inducción inhalatoria en cámara mediante **isofluorano al 4%**.

Las técnicas anestésicas han sido llevadas a cabo por el mismo personal veterinario, que ha supervisado al animal de experimentación durante todo el procedimiento quirúrgico.

Las necesidades de analgesia intraoperatoria no dependerán de la duración de la anestesia sino de la intensidad del estímulo doloroso provocado por el procedimiento que estaremos realizando.

Durante la intervención se realizó control de la profundidad anestésica (no existencia de movimientos de respuesta a la estimulación podal). Los reflejos podal, de la cola y pinzamiento de la oreja quedan abolidos en planos de anestesia quirúrgicos. En los casos en que se requirió una nueva administración, se utilizó la mitad de la dosis inicial.

ANALGESIA

Ante la imposibilidad de utilizar AINES, ya que los GFs empleados en el experimento se inactivan, se empleó **Morfina 0.5 mg/Kg IM**.

Técnica quirúrgica

Se utilizaron instrumentos limpios no estériles para realizar la intervención. La rata se coloca en decúbito supino con las cuatro extremidades fijadas a la mesa operatoria. Se procede a rasurado de abdomen, aplicación de Clorhexidina al 2% sobre el mismo y colocación de campo quirúrgico.

- 1) Mediante laparotomía de 3-4 cm en línea media se accede a cavidad peritoneal, realizando una sección en colon derecho a 5 cm de la válvula ileocecal y posterior sutura con Poliglactina 5-0 (Polyglactin: multifilamento trenzado reabsorbible) (Fig.15). El PRGF se descongela a temperatura ambiente previamente a su utilización, se depositan en recipientes para albergar unos 2-3 mL de volumen en donde se realiza la inmersión o no de la sutura anastomótica en la solución de PRGF durante 15 minutos (Fig.16), según el grupo al que pertenezca el animal, de forma ininterrumpida y con la precaución de que se encuentre totalmente englobada por solución.
- 2) El cierre de pared se realizó con sutura biplano (Polyglactin 2/0 y seda 3-0) (Fig.17). Se aplica de nuevo Clorhexidina al 2% sobre la herida y se coloca el animal en su jaula correspondiente.
- 3) Se depositaron los animales individualmente con observación directa de su recuperación en el mismo quirófano. Prevención de hipotermia mediante la aplicación de calor por lámparas halógenas.

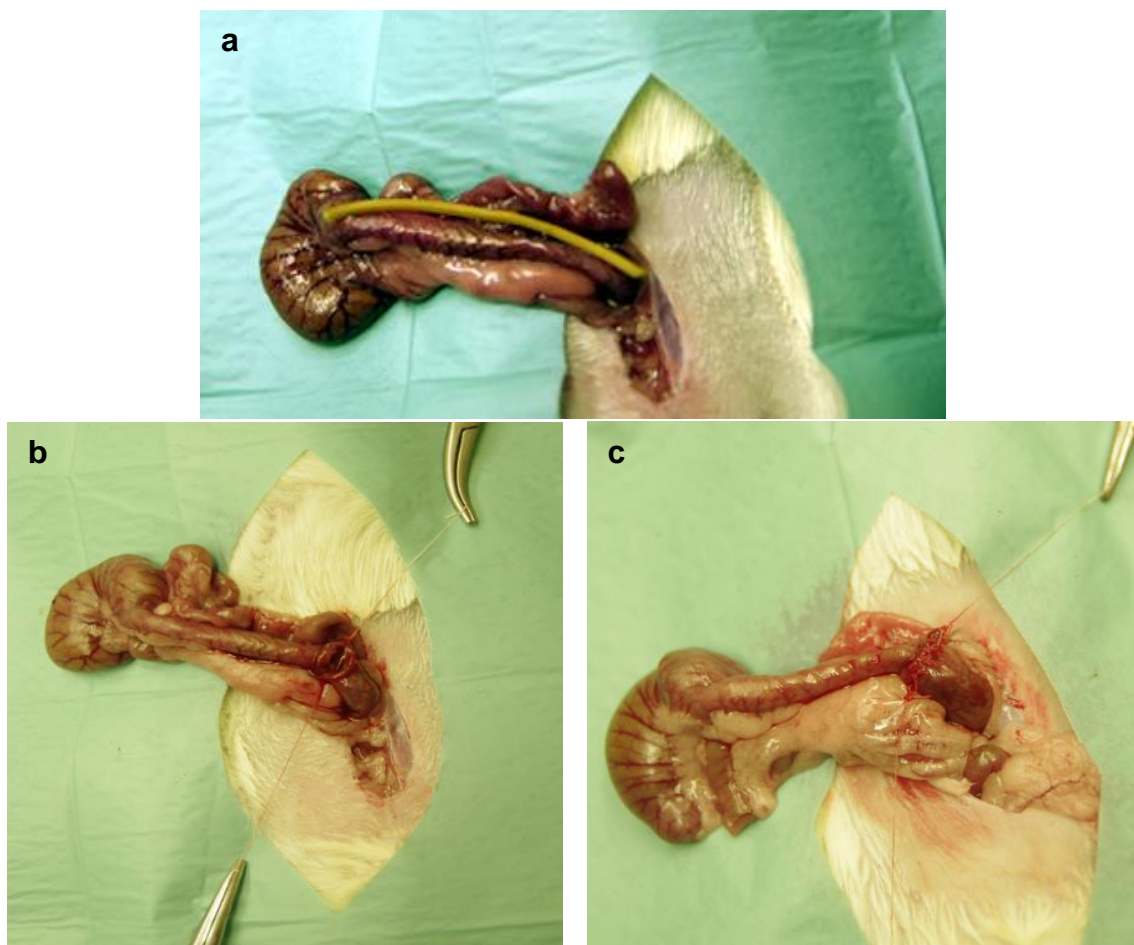


Fig. 15 Fase quirúrgica animal a) Medición colon derecho a 5 cm de la válvula ileocecal b) Colon derecho seccionado c) Anastomosis colon derecho

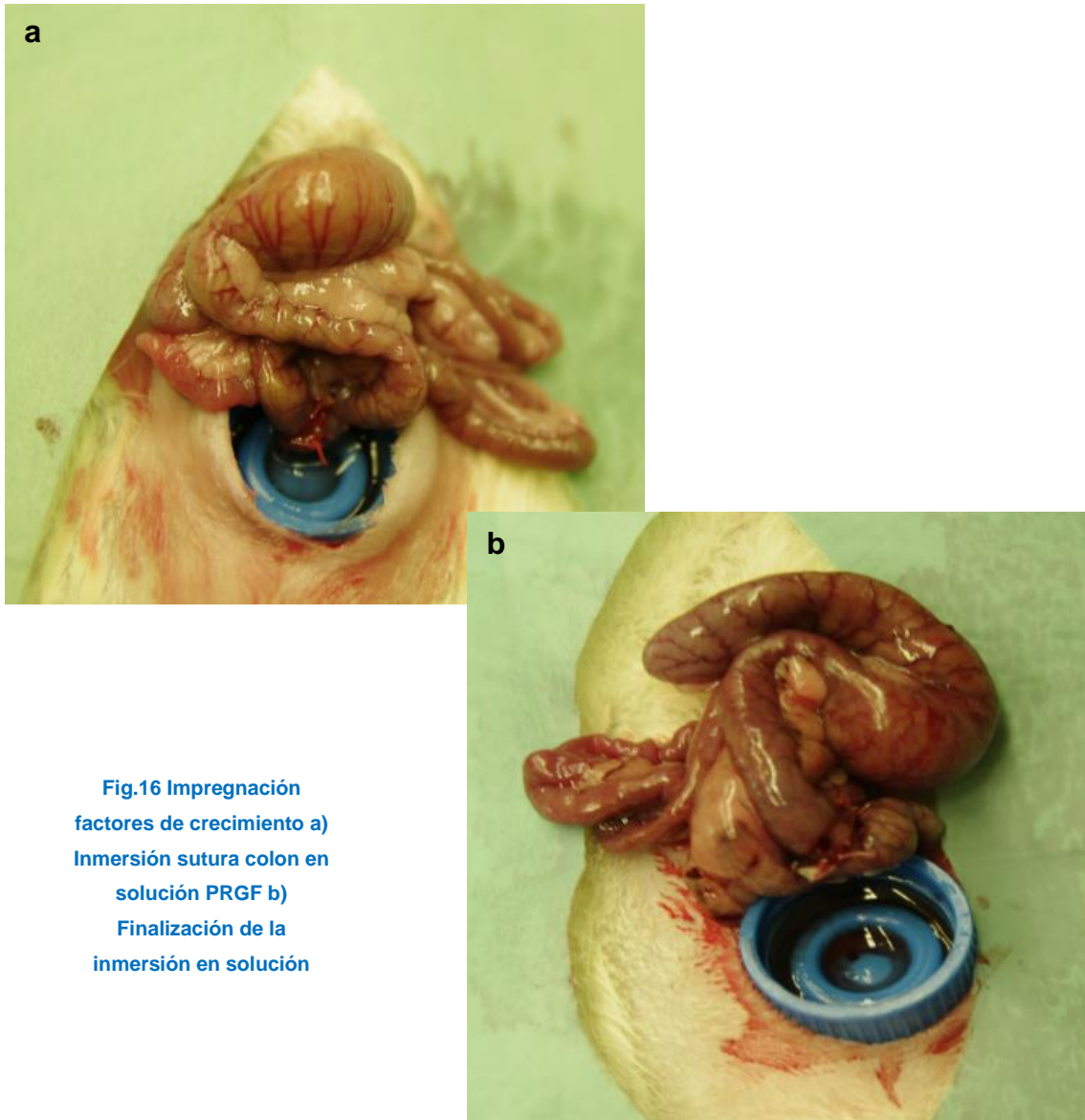


Fig.16 Impregnación factores de crecimiento a) Inmersión sutura colon en solución PRGF b) Finalización de la inmersión en solución

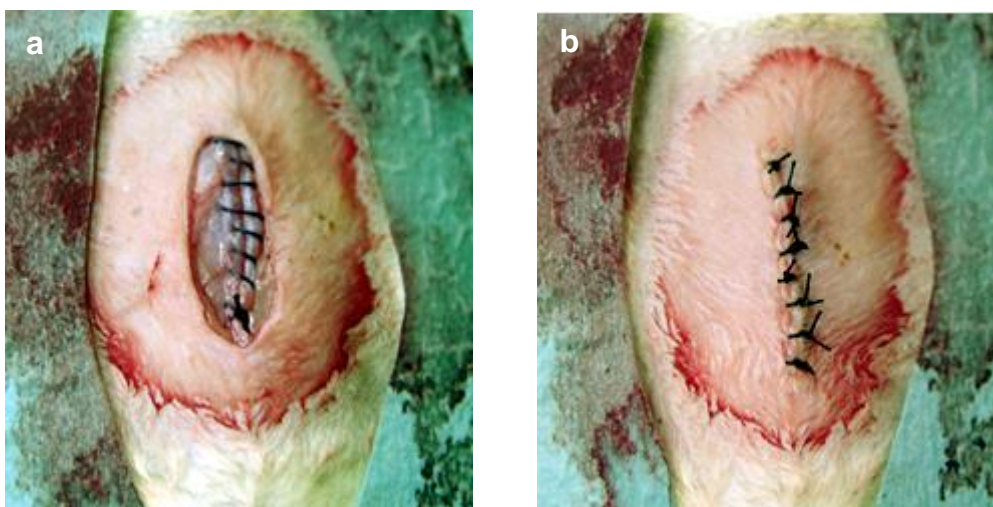


Fig.17 Fase quirúrgica final a) Cierre plano musculoaponeurótico b) Cierre de piel

Período postoperatorio y estabulación

Los animales se mantuvieron en una sala anexa al quirófano hasta la recuperación de la consciencia. Posteriormente fueron estabulados en jaulas metálicas.

En el postoperatorio se realizó evaluación clínica diaria de cada animal, valorando parámetros como postración, anorexia, hundimiento del globo ocular, piloerección y, en general, alteración del comportamiento habitual que pudiera traducir complicación postoperatoria.

Sacrificio y obtención pieza quirúrgica

Mediante inducción anestésica con isoflurano al 4% en cámara y posterior dislocación, los animales son sacrificados en los días 4 y 10 postoperatorios, realizando relaparotomía, exteriorización del paquete intestinal (Fig.18).

En un primer momento se realizó una descripción macroscópica de la situación intraperitoneal, características cuantitativas y cualitativas de adherencias, estado de la anastomosis colónica y toma de medidas de diámetro pre y postanastomótico. En segundo lugar, resección del segmento anastomótico (4 cm de colon), tomando 2 cms de colon a cada lado de la anastomosis. Cada segmento es a su vez dividido longitudinalmente obteniendo dos fragmentos similares (Fig.19):

- Uno de los segmentos de cada muestra se fija en formaldehído al 4% y es procesada para análisis histológico posterior (tinción de Hematoxilina-Eosina tras deshidratación e inclusión en parafina y la tinción Masson)
- El otro fragmento es congelado en niveles inferiores a los 0°C, para determinar la concentración de hidroxiprolina



Fig.18 Relaparotomía con exposición de anastomosis

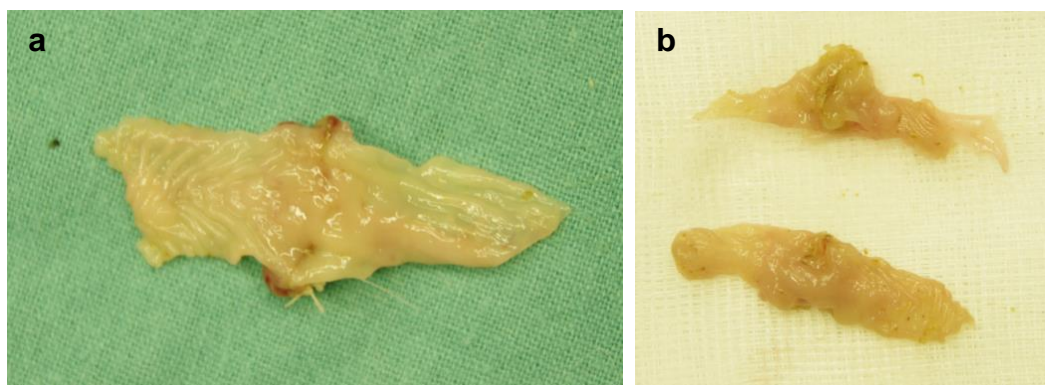


Fig.19 Sección pieza quirúrgica a) Anastomosis en colon seccionada b) División de la muestra

Estudio histológico y morfológico anastomótico

A. Tinción mediante hematoxilina-eosina:

- Inicialmente la muestra es hidratada, para ello se sumerge en baños sucesivos de xilol y etanol en concentraciones descendentes desde los 100° a los 70° y finalmente en agua.
- En este punto se sumerge la muestra en hematoxilina durante un tiempo aproximado a los 10 minutos.

- Tras unos breves lavados con agua y alcohol para eliminar el exceso de hematoxilina se tiñe durante 30 segundos en eosina.
- Finalmente se realizan baños en alcoholes de concentraciones crecientes, para deshidratar la muestra de nuevo y permitir la fijación previa a la observación de la muestra en el microscopio.

B. Determinación de hidroxiprolina (ELISA): (325)

Para nuestro ensayo hemos usado el Kit de ELISA de Cloud-Clone-Corp® (China) en el que un anticuerpo monoclonal específico para la hidroxiprolina ha sido pre-revestido en una microplaca. Se pone en marcha una reacción de inhibición competitiva entre la hidroxiprolina marcada con biotina y la hidroxiprolina no marcada (estándar o muestras) con el anticuerpo específico de la hidroxiprolina. Después de la incubación el conjugado no unido se lava. Después avidina conjugada con peroxidasa de rábano (HRP) se añade a cada pocillo y se incuba. La cantidad de HRP conjugado es inversamente proporcional a la concentración de hidroxiprolina en la muestra. Después de la adición de la solución de sustrato, la intensidad del color revelado es inversamente proporcional a la concentración de hidroxiprolina en la muestra (326).

Homogeneización de la muestra

1. Se trituró la muestra en el homogeneizador, previamente cortándola con bisturí en una placa de Petri, añadiendo 1 ml de PBS sin calcio y homogeneizamos en un Corning, seguidamente limpiamos el Corning con 2 ml más de PBS y recogimos los 3 ml en un Falcon de 50 ml. En el caso en que la muestra superase el tamaño medio añadimos 5 ml totales en lugar de 3 ml.

2. Procedimos a la congelación a -80°C durante una hora de todas las muestras para posteriormente descongelarlas ayudándonos de agua templada. Repetimos el proceso de congelación/descongelación. Esto nos permitió la rotura de membranas. Tras este proceso llevamos la muestra a 10 ml (añadiendo 7 ml o 5 ml en el caso de las muestras grandes).

3. Centrifugamos a 5000 g durante 5 minutos, para separar el tejido del sobrenadante. Algunas muestras hubo que centrifugarlas más de una vez por el hecho de que no existía diferenciación.

4. De los 10 ml de la muestra tomamos 3 ml repartidos en 3 tubos eppendorf, uno para el test y dos de repuesto.

5. Del eppendorf con 1 ml tomamos 75 μ l que mezclamos con 25 μ l de PBS (dilución 1:4) y de los 100 μ l que nos quedan en el total tomamos 50 μ l.

Método (327) (328)

1. Las partes alícuotas de hidroxiprolina (2-20 ~ g), preparado a partir de la solución y las muestras de ensayo con contenido de hidroxiprolina bajo 10 ~ Lg / ml., se mezclan suavemente con hidróxido de sodio (2N concentración final) en un volumen total de 50 ~ L.

2. Las muestras se hidrolizan en autoclave a 120 ° C durante 20 min.

3. Los 450 ~ l de cloramina -T contenida en el hidrolizado, se mezcla suavemente, y la oxidación se deja proceder durante 25 min a temperatura ambiente.

4. 500 ~ LL del reactivo aldehído de Ehrlich se añade a cada muestra, se mezcla suavemente, y el cromóforo se desarrolla por la incubación de las muestras a 65 ° C durante 20 min.

5. Absorbancia de cada muestra se leyó a 550 nm utilizando un espectrofotómetro.

Cuantificación de proteínas

Realizamos la cuantificación de proteínas totales en la muestra para posteriormente determinar qué porcentaje de hidroxiprolina teníamos en cada una de ellas, ya que todas las muestras no tenían el mismo tamaño y la cuantificación de proteínas nos dio una aproximación.

1. Añadimos la muestra a los pocillos.

2. Encima de la muestra añadimos 20 μ l del reactivo A y 200 μ l del reactivo B.

3. Incubamos durante 15 minutos y procedimos a la lectura por espectrofotometría.

3.3 Variables de estudio

Variables independientes

Anastomosis cólica (sumergida durante 15 minutos en factores de crecimiento).

Día postoperatorio de sacrificio: al 4º día o al 10º día tras intervención quirúrgica.

Variables dependientes

- a) Mortalidad
- b) Absceso
- c) Peritonitis
- d) Dehiscencia de sutura
- e) Estenosis de anastomosis
- f) Grado de adherencias
- g) Examen bioquímico
- h) Examen histológico

Definición de variables

- a) **Mortalidad:** cese de la vida del animal de experimentación durante la intervención o en el postoperatorio (periodo que transcurre desde la intervención hasta el momento del sacrificio)
- b) **Absceso:** existencia de colección purulenta perianastomótica.
- c) **Peritonitis:** detección de exudado purulento o fecaloideo en la cavidad intraperitoneal.
- d) **Dehiscencia de sutura:** Solución de continuidad mínima, parcial o total a lo largo del diámetro de la anastomosis, con o sin salida de material intraluminal.

e) **Estenosis de anastomosis:** Se utilizará el denominado índice anastomótico (IA), basado en los trabajos de DziKi (329) y Orsay (330), definido como el doble del diámetro anastomótico dividido entre la suma de los diámetros proximal y distal a la anastomosis.

$$IA = \frac{2 \times \varnothing \text{ anastomosis}}{\varnothing \text{ proximal} + \varnothing \text{ distal}}$$

El colon completamente alineado tras la anastomosis tendría un IA de uno, un estrechamiento a nivel de la sutura o una dilatación proximal nos daría un índice inferior a uno. Esta fórmula considera estenosis de anastomosis si el índice anastomótico es inferior a uno (IA<1).

f) **Grado de adherencias:** según la clasificación cualitativa de Knightly (331) (Tabla 3).

GRADOS ADHERENCIA	
GRADO	DEFINICION
0	Sin adherencias
1	Adherencia única, delgada, fácil de separar
2	Adherencias débiles, poco numerosas
3	Adherencias numerosas con extensiones parietales
4	Adherencias numerosas en mesenterio, intestino, omento y pared abdominal

Tabla 3 Grados de adherencias (clasificación de Knightly)

g) **Examen bioquímico:**

La hidroxiprolina es un producto que resulta de la hidroxilación de la prolina catalizada por una enzima prohidroxilasa. Debido a su distribución casi exclusiva del colágeno del tejido conjuntivo su metabolismo es estudiado para medir el contenido de hidroxiprolina.

h) **Examen histológico:** de acuerdo a los siguientes parámetros descritos por Houdart y Hutschenreiter (332) (Tabla 4).

VARIABLES HISTOLOGICAS	
Reepitelización de la mucosa	
1 punto	No epitelización
2 puntos	Epitelización incompleta (capa celular simple)
3 puntos	Epitelización completa (epitelio glandular)
Infiltrado de células inflamatorias (neutrófilos)	
1 punto	Leve (< 25%)
2 puntos	Moderado (25 – 75%)
3 puntos	Severo (> 75%)
Infiltrado de células inflamatorias (células gigantes)	
1 punto	Leve (< 25%)
2 puntos	Moderado (25 – 75%)
3 puntos	Severo (> 75%)
Actividad fibroblástica	
1 punto	Leve (< 25%)
2 puntos	Moderado (25 – 75%)
3 puntos	Severo (> 75%)
Depósito de colágeno	
1 punto	Leve (< 25%)
2 puntos	Moderado (25 – 75%)
3 puntos	Severo (> 75%)
Neovascularización	
1 punto	Leve (< 25%)
2 puntos	Moderado (25 – 75%)
3 puntos	Severa (> 75%)

Tabla 4. Variables histológicas y puntuación (modificado de Houdart y Hutschenreiter)

3.4 Modelo estadístico

Hemos realizado estadística descriptiva de las variables del estudio. Para ello usamos frecuencias absolutas y relativas en el caso de las variables cualitativas.

Las variables cuantitativas, según sigan o no una distribución normal (Shapiro-Wilk ($n < 50$)), son resumidas mediante $Md \pm SD$ (media, desviación estándar) y rango (mínimo y máximo) o P50 [P25 - P75] (mediana, rango intercuartílico) respectivamente.

Para comparar los dos grupos en las diferentes variables, se aplica el test Chi-cuadrado de Pearson o el test exacto de Fisher, para variables cualitativas, según proceda.

Para analizar las variables cuantitativas se utiliza la ANOVA y pruebas post-hoc o H de Kruskal-Wallis y la U Mann-Whitney aplicando la corrección de Bonferroni (alpha/número de comparaciones posibles).

El nivel de significación estadística, se establece en $p < 0.05$.

El análisis estadístico se realiza con el paquete IBM® SPSS® Statistics 19.

3.5 Consideraciones legales y éticas

Es preceptivo asegurar un óptimo cuidado y un adecuado uso de los animales de experimentación, tanto en el aspecto científico y técnico como en proporcionar unas condiciones humanitariamente apropiadas. Estas normas y recomendaciones generales están recogidas en guías publicadas por prestigiosas asociaciones internacionales, detallándose la aplicación del principio de las tres “Rs” donde los animales de experimentación deben ser reemplazados, reducidos y refinados de forma adecuada (333). Lo que lleva a un uso racional del animal de experimentación, desde buscar otras alternativas factibles al propio animal hasta en el caso de no existir, utilizar el mínimo número de animales posible para llevar a cabo el estudio con garantías, minimizar las causas de dolor y el estrés. Además, se establecen las bases para la planificación y conducción de los experimentos con animales (334). Actualmente, la constitución de comités locales y nacionales son los encargados de evaluar los protocolos de investigación y asegurar que todos los procedimientos se realicen según las reglamentaciones vigentes (335).

Se ha garantizado el reemplazo y reducción de animales en los procedimientos del proyecto, así como el refinamiento en la cría, alojamiento, cuidados y utilización de los mismos. Se les ha concedido un trato respetuoso evitando al máximo el dolor, sufrimiento y estrés y todo aquello que pudiera interferir en las buenas condiciones de salud y bienestar de los animales. Esto se consigue gracias a los analgésicos y los anestésicos, las reducciones de situaciones estresantes y el adecuado mantenimiento de los lugares donde se alojen los animales, la utilización de métodos no invasivos y la aplicación del protocolo de eutanasia en caso de que el sufrimiento del animal lo requiriese. En cuanto al procedimiento de sacrificio, se ha realizado siguiendo las directrices presentes en la Directiva Europea mencionada anteriormente, la cual hace referencia al sacrificio humanitario de los animales. El uso de este modelo experimental está justificado en animales al no existir ningún otro medio que permita obtener los resultados que se esperan, como complejos sistemas matemáticos, simuladores de ordenador o sistemas biológicos *in vitro*, que intentan en cierta medida reemplazar la utilización de animales vivos. Por lo tanto, se ha utilizado el mínimo número de animales posibles para alcanzar unos resultados interpretables.

NORMATIVA

La investigación con animales está regulada y cuenta con leyes específicas y reglamentos para el uso, manejo y experimentación ya sea con fines educativos o fines de investigación, a distintos niveles: en el ámbito de la Unión Europea, a nivel nacional y de la comunidad autónoma (Andalucía).

A nivel europeo:

- DIRECTIVA DEL CONSEJO DE EUROPA 86/609/CEE, sobre aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados miembros respecto a protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. 24 de noviembre de 1986. Esta directiva tuvo como fin integrar las leyes de los estados componentes de Europa con respecto a la experimentación en un marco conjunto para mejorar la calidad de las investigaciones, y desde su entrada en vigor se comenzó a tener un punto de vista más objetivo y cuidadoso con la vida de los animales de laboratorio.

- El Tratado de Funcionamiento de la Unión Europea dispone en su artículo 13 que todos los estados miembros deben tener en cuenta el bienestar de los animales cuando apliquen sus políticas de investigación, y más particularmente, el 22 de septiembre de 2010 el Consejo y el Parlamento de Europa pusieron en marcha la DIRECTIVA 2010/63/UE, que se refiere a la protección de los animales utilizados para los fines científicos, y por supuesto España también lo incorporó a su ordenamiento jurídico.

A nivel nacional:

- REAL DECRETO 223/1988, de 14 de marzo sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. B.O.E. de 18 de marzo de 1988. Material y métodos

- INSTRUMENTO de Ratificación del Convenio Europeo sobre protección de los animales vertebrados utilizados con fines experimentales y otros fines científicos, hecho en Estrasburgo el 18 de marzo de 1986. B.O.E. 25 de octubre de 1990.

- Un hito en el derecho español sobre el cuidado de los animales en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio lo encontramos en la LEY 32/2007, del 7 de Noviembre la cual proviene de la obligación impuesta por la Unión Europea en el artículo 55 del Reglamento (CE) nº 882/2004 de 29 de abril de 2004 para la alimentación y el artículo 25 del Reglamento (CE) nº 1/2005 del Consejo, de 22 de diciembre de 2004 sobre las normas durante el transporte, y además engloba otros muchos aspectos de bienestar animal deficitariamente regulados hasta este momento. En esta ley se incluyen aspectos sobre las inspecciones legales en centros de investigación, señalándose que se debe colaborar sin ninguna reserva y poner a disposición del agente inspector todos los datos que requiera respecto a las condiciones de los animales y el procedimiento experimental que se lleva a cabo con ellos.

- REAL DECRETO 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. Es la ley más reciente vigente en nuestro país y hace hincapié principalmente en lo relativo al bienestar animal que ya se mencionó en la ley de 2007 mediante el principio de las tres erres, reemplazo, reducción y refinamiento, que han de sentar las bases para cualquier tipo de experimentación animal.

A nivel autonómico (Andalucía):

- LEY 11/2003, de 24 de noviembre, de Protección de los Animales. (BOJA nº 237, de 10 de diciembre de 2003). Donde se establece la protección y cuidados de los animales dedicados a la realización de experimentos, la necesidad de autorización previa de la Consejería, siempre bajo la dirección del personal facultativo correspondiente y que los animales deben ser sacrificados de forma rápida e indolora si estos no pueden desarrollar una vida normal.

- DECRETO 142/2002, de 7 de mayo, por el que se crea y regula el Registro de establecimientos de cría, suministradores y usuarios de animales de experimentación y otros fines científicos. (BOJA nº 55 de 11 de mayo de 2002).

- DECRETO 199/2005, de 20 de septiembre, por el que se modifica el Decreto 142/2002, de 7 de mayo (BOJA 189).

2. RESULTADOS

4.1 Mortalidad

Se intervienen un total de **79 animales de experimentación**, ya que uno de ellos falleció durante la inducción anestésica ($1/80 = 1,25\%$). Otro de los animales fallece en el postoperatorio inmediato debido a una isquemia segmentaria postquirúrgica ($1/79 = 1,26\%$). Finalmente, **78 (97,5%)** de los 80 animales completan el protocolo de estudio, recuperándose de forma satisfactoria del procedimiento anestésico y quirúrgico, sin incidencias desde el punto de vista cardíaco ni respiratorio durante el seguimiento postoperatorio.

Estos animales que no forman parte en el análisis final de datos pertenecen a cada uno de los grupos determinados por la variable independiente: No aplicación de PRGF/Aplicación PRGF.

4.2 Evaluación macroscópica

Análisis descriptivo de la existencia de complicaciones macroscópicas como variable dicotómica, observando o no la característica. Entre las que se encuentran la existencia o no de absceso intraabdominal, peritonitis, dehiscencia de sutura anastomótica y estenosis.

ABSCESO

No se han encontrado abscesos intraabdominales en ninguno de los casos intervenidos.

PERITONITIS

De los animales intervenidos (79) sólo se encontraron **2 casos de peritonitis macroscópica** (2,5%). Todos ellos en el grupo de animales en los que se aplicó PRGF: uno de ellos tras el fallecimiento prematuro del animal de experimentación, otro tras sacrificio del animal en el 10º día postoperatorio. En el grupo de animales en donde no se aplica factor de crecimiento no se detecta peritonitis postoperatoria.

DEHISCENCIA

Un total de **11 animales (14,1%)** evidencian signos de dehiscencia de anastomosis en diferente grado (Figs.20 y 21) (tomando como definición de dehiscencia la apertura mínima de la serosa anastomosis hasta aperturas mayores). De éstos, 5 dehiscencias (12,8%) corresponden con el grupo de animales no tratados con PRGF, mientras que 6 (15,4%) son contabilizadas en el grupo en el que sí se aplicó PRGF (Tabla 5). Todos los casos ocurren en el grupo de animales sacrificados en el 4º día postoperatorio (Fig.22) y ninguno en el grupo de ratas sacrificadas en el 10º día postoperatorio (Fig.23). No existen diferencias significativas de la variable dehiscencia de anastomosis si comparamos los grupos con aplicación o no de factor de crecimiento ($p=0,745$).

VARIABLE		GRUPO PRGF	GRUPO NO PRGF (CONTROL)	P (Prueba†)
DEHISCENCIA	4º DIA POSTOPERAT	6/20 (30%)	5/20 (25%)	0,999
	10º DIA POSTOPERAT	0/19 (0%)	0/19 (0%)	
	Prueba† → Exacta de Fisher			

Tabla 5 Expresión por grupos variable dehiscencia



Fig.20 Dehiscencia de anastomosis colon a) y b)



Fig.21 Dehiscencia en fragmento seccionado a) y b)

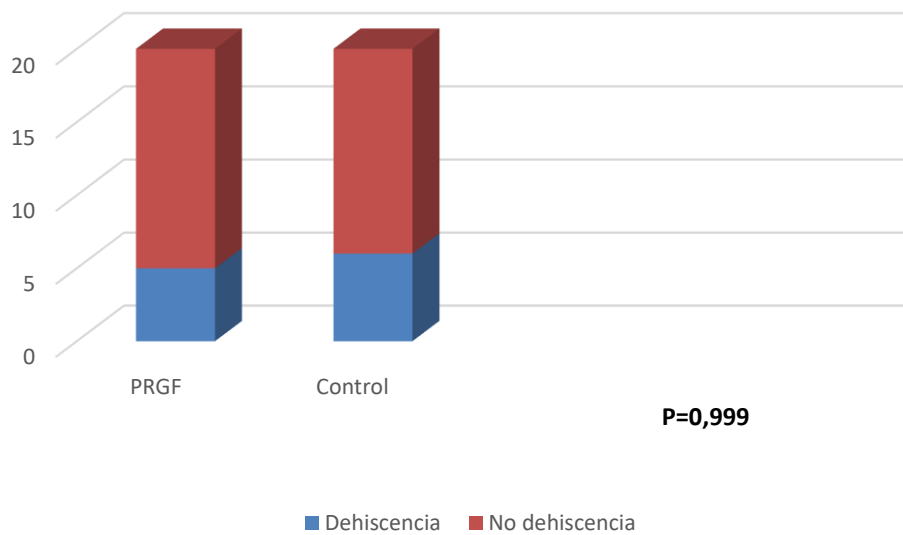


Fig.22 Distribución variable dehiscencia al 4º día

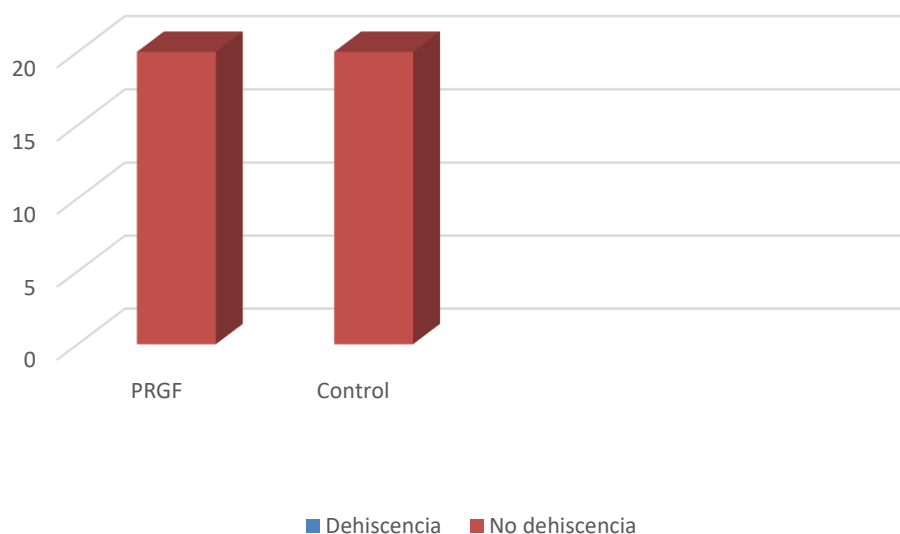


Fig.23 Distribución variable dehiscencia al 10º día

ESTENOSIS

Aplicando el índice de estenosis tras la apertura longitudinal de la pieza extirpada se establecen 2 casos de estenosis anastomótica (5,1%) en el grupo de animales en donde no se aplicó factor de crecimiento y 1 caso (2,6%) en el grupo en el que sí se aplicó factor de crecimiento. En total se reconocen 3 casos de estenosis (3,8%) y todos ellos se identifican en el grupo de animales sacrificados al 4º día postoperatorio (Tabla 6) (Figs.24 y 25). Tampoco se establece una significación estadística en el porcentaje de estenosis al aplicar o no PRGF.

VARIABLE		GRUPO PRGF	GRUPO NO PRGF (CONTROL)	P (Prueba†)
ESTENOSIS	4º DIA POSTOPERAT	1/20 (5%)	2/20 (10%)	0,999
	10º DIA POSTOPERAT	0/19 (0%)	0/19 (0%)	
	Prueba† → Exacta de Fisher			

Tabla 6 Expresión por grupos variable estenosis

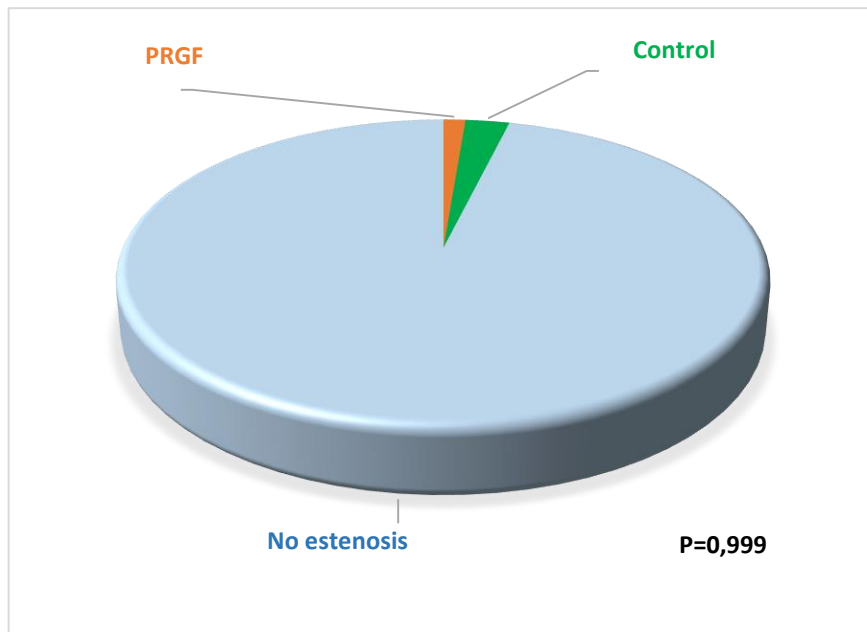


Fig.24 Distribución variable estenosis al 4º día

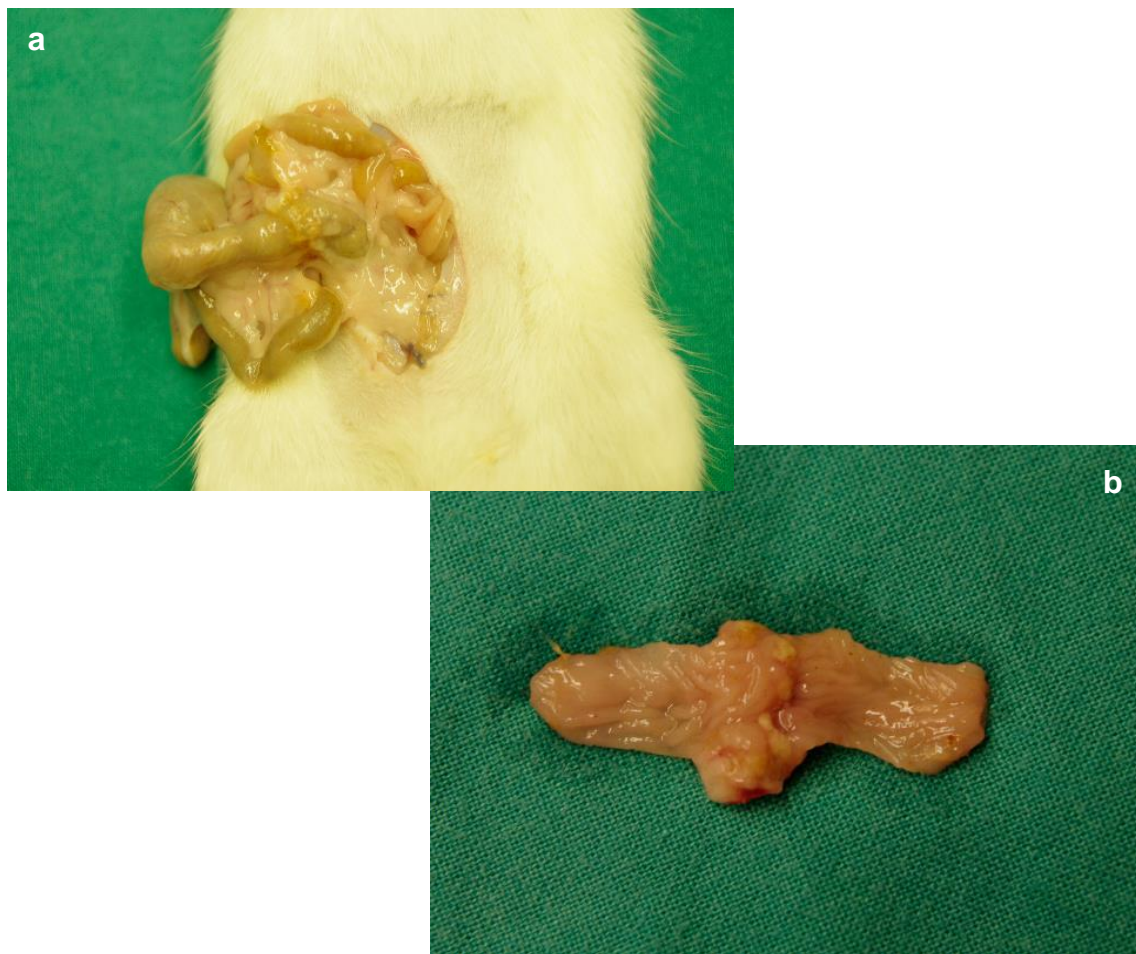


Fig.25 Estenosis. a) Anastomosis b) Sección longitudinal anastomosis

ADHERENCIA

La evaluación macroscópica del grado de adherencias entre los grupos de animales control (M=1,54) y en el que se aplica PRGF (M=1,77) no establece diferencias, pudiendo observarse unos resultados homogéneos, situados entre los niveles de 2 y 3 de la escala gradual de adherencias (Figs.26 y 27).

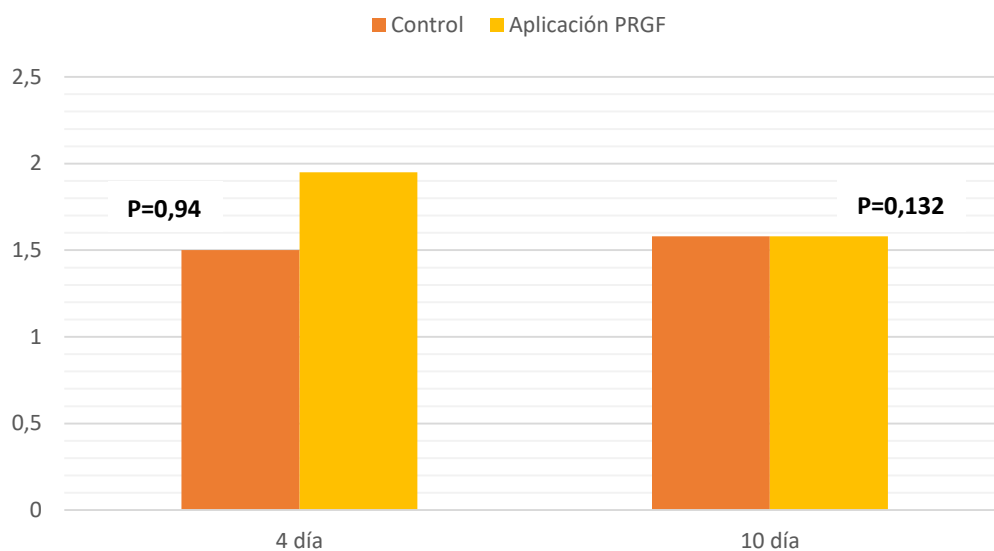


Fig.26 Distribución variable adherencia

No existen diferencias significativas entre grupos ni en función de los días postoperatorios analizados, según las pruebas no paramétricas de Mann-Whitney que compara las variables (Tabla 7).

Día postoperatorio	GRUPO (M±DS)		p*
	Control	PRGF	
4	1,5 ± 1,147	1,95 ± 1,146	0,94
10	1,58 ± 1,216	1,58 ± 1,071	0,132

*P<0,05. Prueba de Mann-Whitney
M±DS: Media ± Desviación estándar

Tabla 7 Distribución variable adherencia



Fig.27 Adherencias intestino delgado y epliplón a anastomosis

4.3 Evaluación microscópica

Análisis según el día postoperatorio

Se realiza análisis de las diferentes variables microscópicas: reepitelización mucosa, infiltración de células inflamatorias neutrófilos, infiltración de macrófagos, infiltración de eosinófilos, formación de nuevos vasos sanguíneos, determinación de fibroblastos y de colágeno.

ANALISIS 4º DIA POSTOPERATORIO

VARIABLE	GRUPO (M±DS)		p*
	Control	PRGF	
Reepitelización	2,65 ± 0,489	1,75 ± 0,716	<0,001
Neutrófilos	2,05 ± 0,999	2,25 ± 0,967	0,517
Cél. Gigantes	1,05 ± 0,224	2,2 ± 0,768	0,317
Eosinófilos	1,95 ± 0,826	1,9 ± 0,968	0,816
Neovascularización	1,75 ± 0,851	1,5 ± 0,688	0,367
Fibroblastos	2,076 ± 0,739	2,35 ± 0,668	0,191
Colágeno	1,85 ± 0,745	1,4 ± 0,598	0,044

*P<0,05. Prueba de Mann-Whitney
M±DS: Media ± Desviación estándar

Tabla 8 Distribución Variables 4º día

Existen dos variables con resultado estadísticamente significativo en el análisis temprano al 4^o día postoperatorio entre los grupos control y PRGF, son las correspondientes a reepitelización de la mucosa ($p < 0,001$) y actividad fibroblástica ($p = 0,044$) (Figs.28 y 29) (Tabla 8).

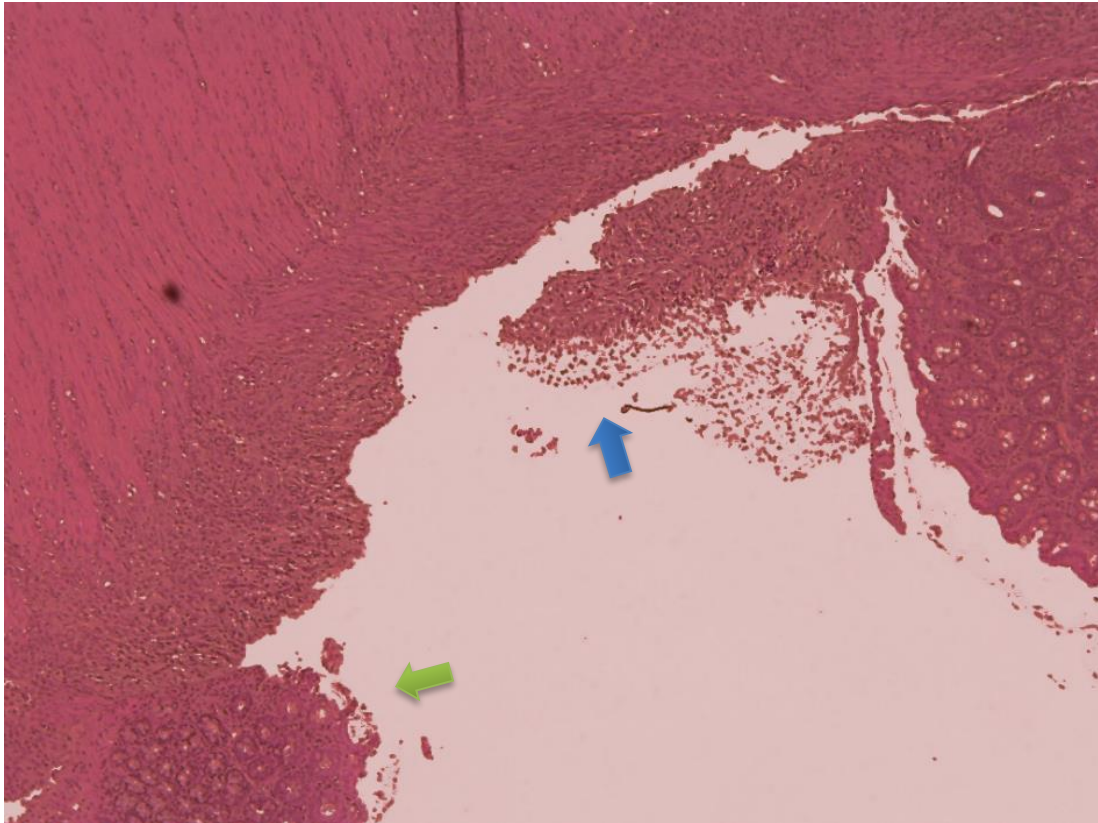




Fig.28 Corte histológico tinción hetamoxilina-eosina. Rata sacrificada al 4^o día postoperatorio (5x aumentos)

-  Borde epitelial de anastomosis interrumpido
-  Reepitelización parcial de los extremos anastomosados

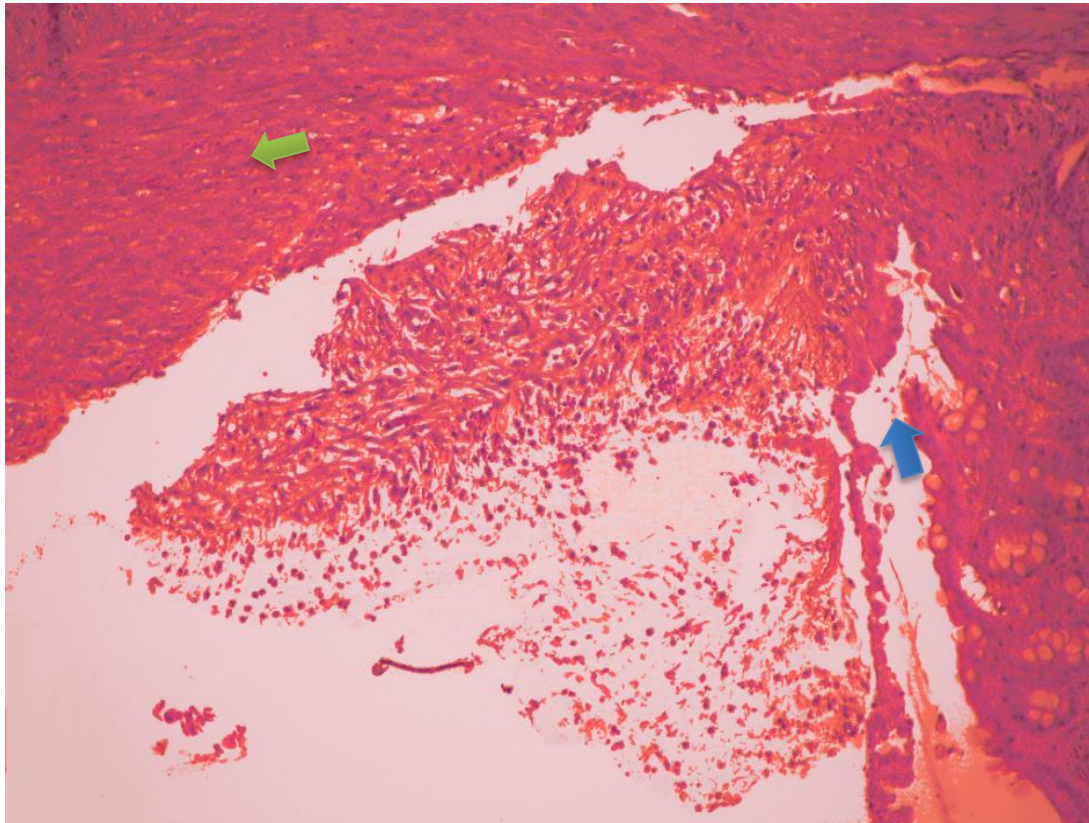


Fig.29 Corte histológico tinción hetamoxilina-eosina. Rata sacrificada al 4º día postoperatorio (10x aumentos)

- ➡ Polimorfonucleares (Neutrófilos) en borde anastomótico
- ➡ Formación de nuevo epitelio glandular

Se puede observar que en el grupo control existe un mayor nivel de reepitelización que en el grupo en el que se ha aplicado PRGF en la anastomosis en fases tempranas de la cicatrización (Fig.30).

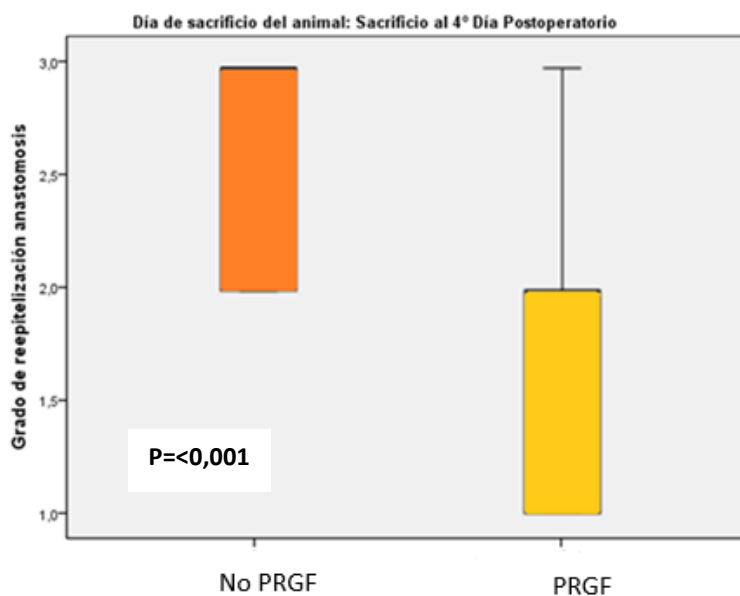


Fig.30 Grado de reepitelización en función de la aplicación o no de PRGF

Si analizamos el grado de reepitelización por grupos puede observarse cómo existe un mayor porcentaje del nivel máximo de la escala de reepitelización (46,2%) del grupo control con respecto al grupo con tratamiento, es decir, que casi la mitad de los animales no tratados con factores de crecimiento tienen un alto nivel de reepitelización. Este porcentaje desciende (hasta el 20,5%) en el brazo de animales tratados con PRGF. La determinación de colágeno (Fig.31) también evidencia diferencias estadísticamente significativas en fases tempranas de la cicatrización, con niveles de la escala cuantitativa muy similares, aunque con tendencia al alza en el grupo control.

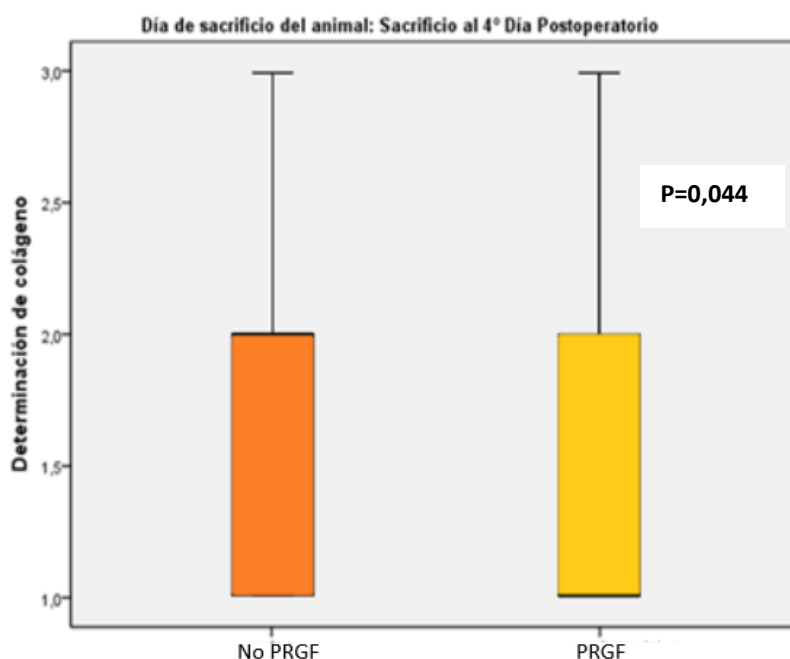


Fig.31 Determinación de colágeno en función de aplicación o no de PRGF

ANÁLISIS 10º DIA POSTOPERATORIO

VARIABLE	GRUPO (M±DS)		p*
	Control	PRGF	
Reepitelización	1,89 ± 0,809	2 ± 0,745	0,662
Neutrófilos	1,58 ± 0,138	1,68 ± 0,885	0,713
Cél. Gigantes	1,84 ± 0,602	1,68 ± 0,671	0,402
Eosinófilos	1,26 ± 0,562	1,53 ± 0,772	0,256
Neovascularización	2,21 ± 0,713	2,16 ± 0,834	0,9

Fibroblastos	1,95 ± 0,705	2,21 ± 0,631	0,236
Colágeno	1,37 ± 0,597	1,47 ± 0,612	0,535

*P<0,05. Prueba de Mann-Whitney
M±DS: Media ± Desviación estándar

Tabla 9 Distribución Variables 10º día

En el análisis de los resultados en fases de cicatrización más avanzada en el tiempo (10º día) no se encuentran diferencias estadísticamente significativas en la comparación de grupos control y aplicación de PRGF (Tabla 9).

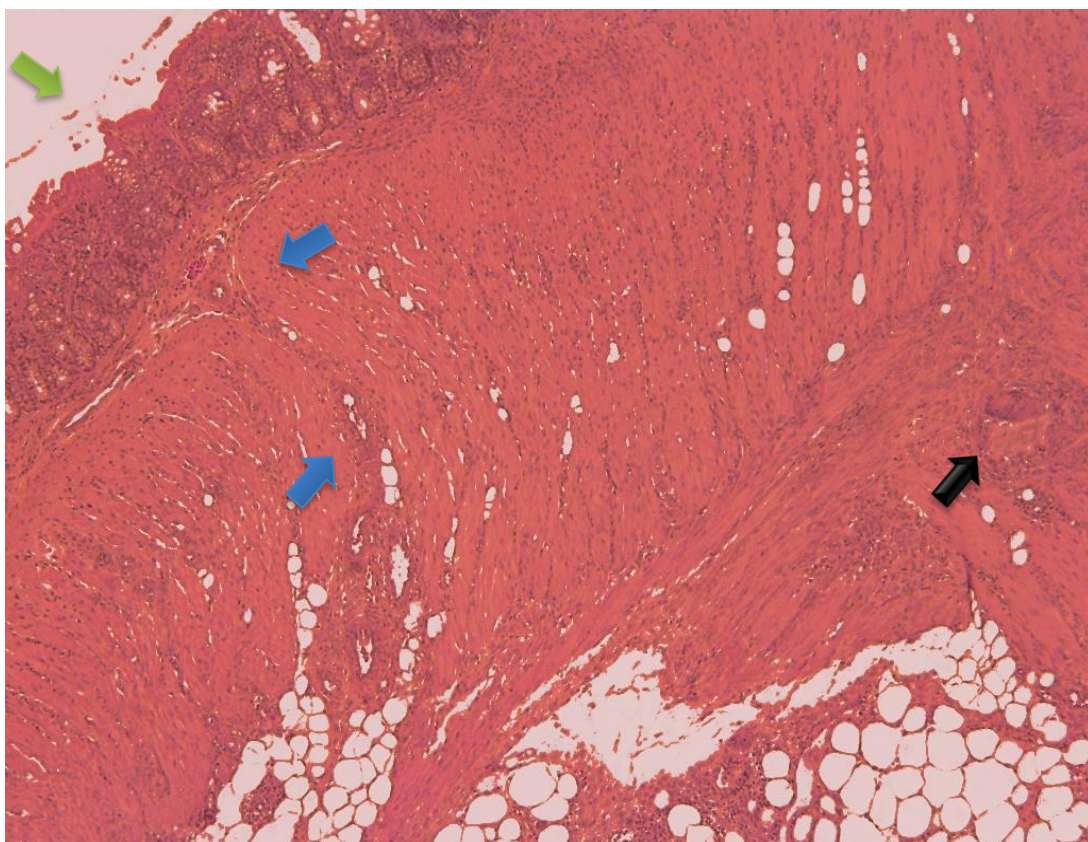


Fig.33 Corte histológico tinción hetamoxilina-eosina. Rata sacrificada al 10º día postoperatorio (10x aumentos)

- ➡ Reepitelización casi completa de extremos anastomosados
- ➡ Línea cicatricial de extremos anastomosados junto con PMN (Neutrófilos) en menor número
- ➡ Célula multinucleada formando reacción granulomatosa a cuerpo extraño alrededor del hilo de sutura

4.4 Evolución temporal del proceso de cicatrización

Podemos establecer una correlación de todos los parámetros incluidos en el estudio siguiendo su comportamiento en el tiempo: de forma global en todos los animales intervenidos y por grupos (control y aplicación de PRGF) (Fig.34).

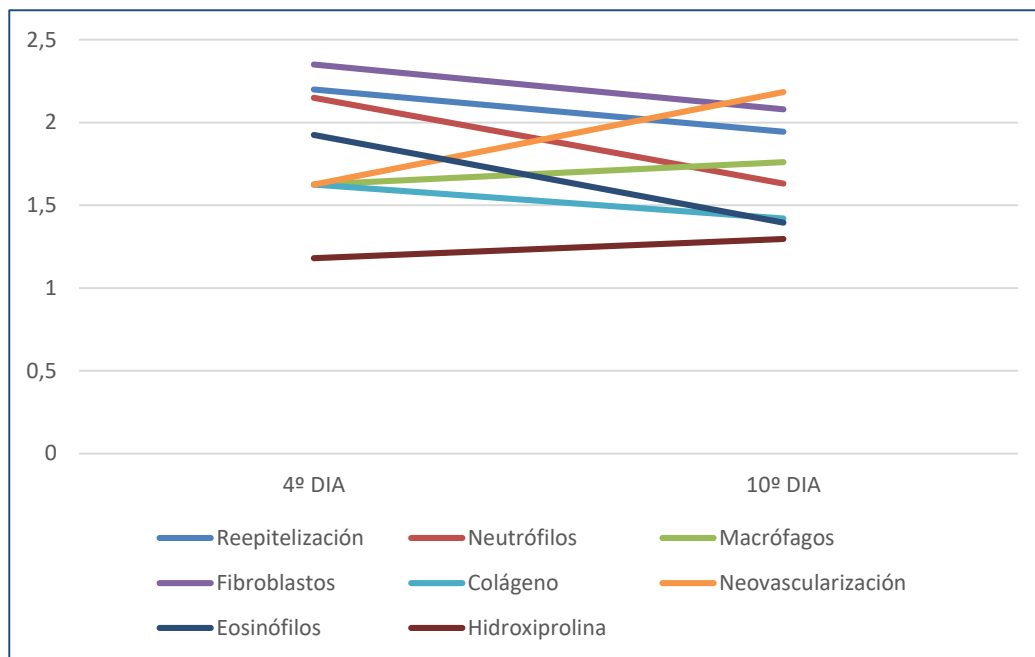


Fig.34 Evolución global durante la cicatrización intestinal

La neovascularización, los macrófagos y la determinación de hidroxiprolina son los únicos parámetros que aumentan de forma global a lo largo del tiempo, experimentando un incremento en etapas más posteriores de la cicatrización (día 10º). Esta diferencia es más acusada en la formación de nuevos vasos sanguíneos en la anastomosis. Las demás variables (reepitelización de la mucosa, neutrófilos, eosinófilos, colágeno y actividad fibroblástica) describen un decremento evolutivo. La infiltración inflamatoria (neutrófilos y eosinófilos) es elevada en las fases iniciales de la cicatrización (Figs.35 y 36) y desciende en etapas más avanzadas del proceso cuando son sustituidas progresivamente por los macrófagos en el tejido en cicatrización.

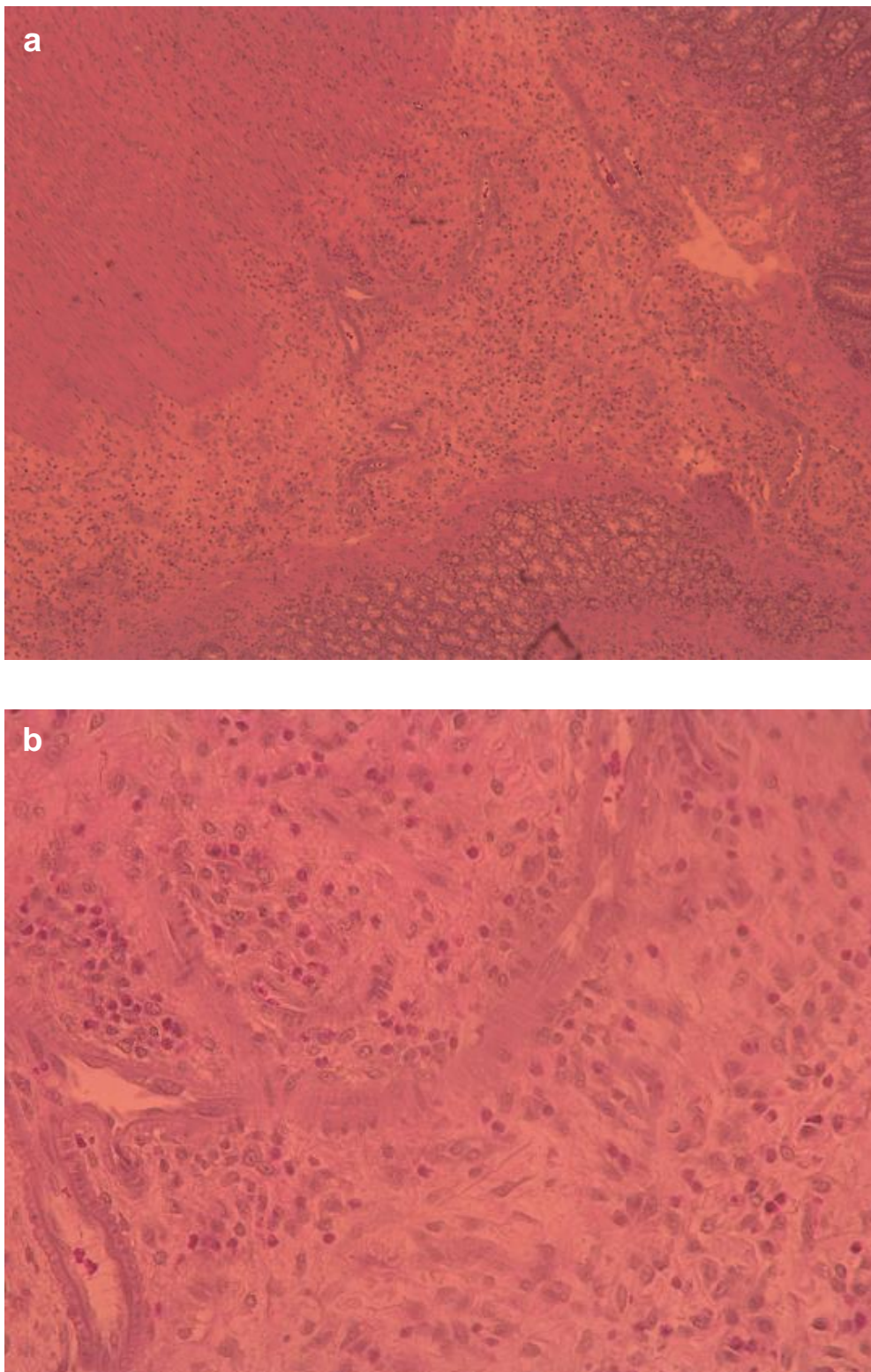


Fig.35 Corte histológico tinción hematoxilina-eosina en fase temprana de la cicatrización
a) Distribución de polimorfonucleares (5x aumentos) b) Detalle de distribución de eosinófilos (10x aumentos)

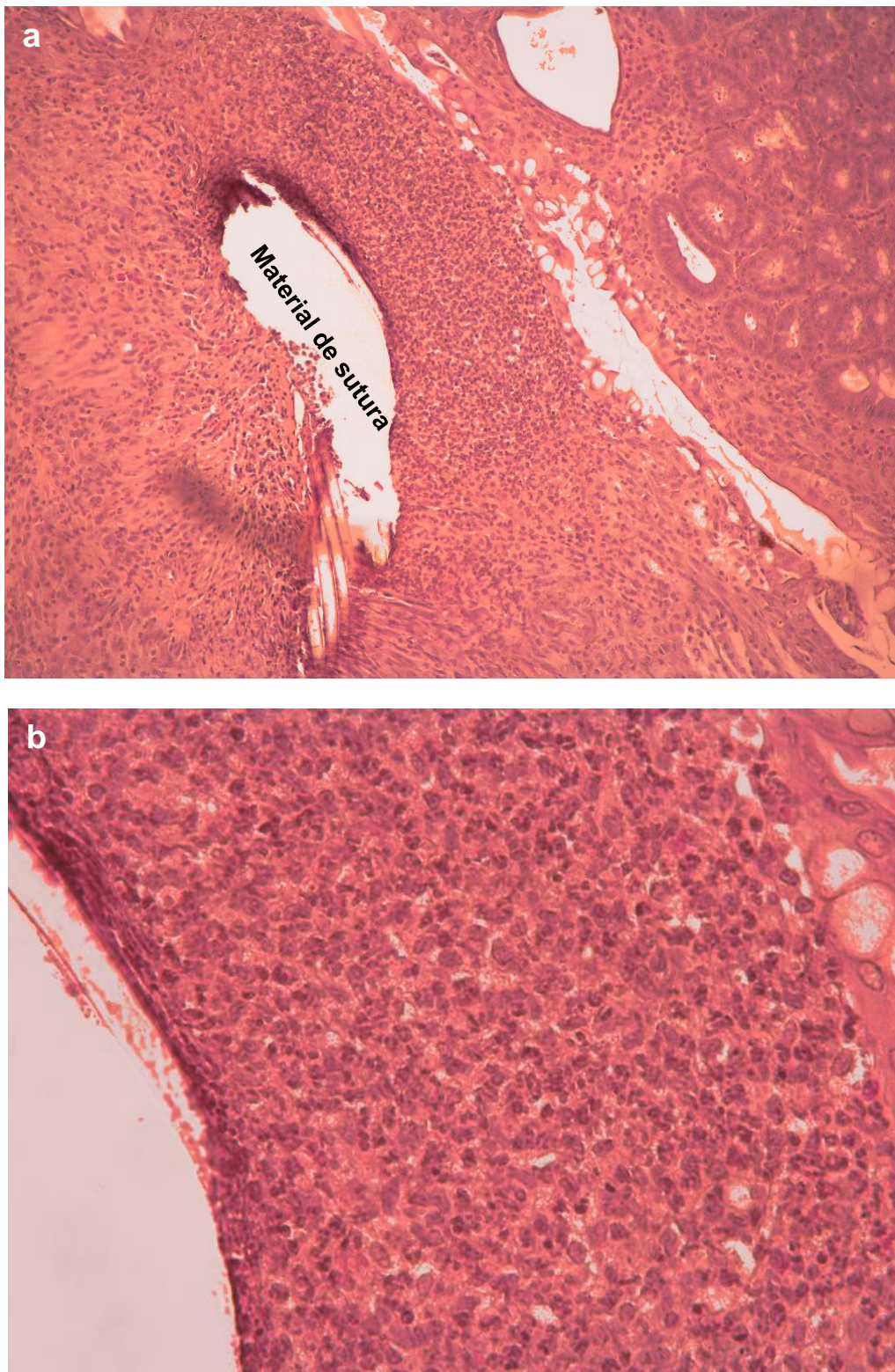


Fig.36 Corte histológico tinción hematoxilina-eosina en fase temprana de la cicatrización
a) Distribución de polimorfonucleares alrededor punto de sutura (5x aumentos) b) Detalle de distribución de neutrófilos (10x aumentos)

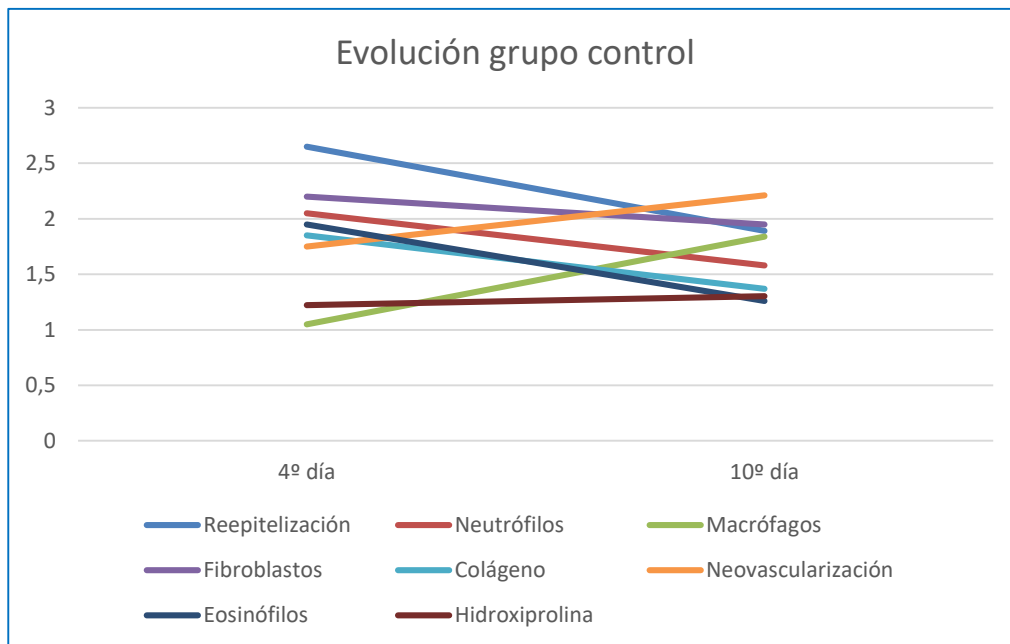


Fig.37 Evolución de la cicatrización en el grupo control

En el grupo de animales en el que no se aplica PRGF existe una progresión creciente a lo largo de la cicatrización en la formación de nuevos vasos sanguíneos y macrófagos. La infiltración inflamatoria (neutrófilos, eosinófilos) descienden desde las fases iniciales de la cicatrización a fases más tardías, cuando los polimorfonucleares son sustituidos por macrófagos que continúan con funciones de secreción de sustancias necesarias y en la recogida de restos celulares y otros elementos no necesarios. La reepitelización también experimenta un descenso en la evolución temporal. Por otro lado, los elementos imprescindibles en la fibroplasia como actividad fibroblástica y colágeno descienden mínimamente; la determinación de hidroxiprolina varía escasamente y se estabiliza en el tiempo (Fig.37).

En el grupo de animales en el que se aplica PRGF existe una progresión creciente a lo largo de la cicatrización en la formación de nuevos vasos sanguíneos. La infiltración inflamatoria (neutrófilos, eosinófilos) desciende desde las fases iniciales de la cicatrización a fases más tardías junto con un descenso de los macrófagos casi de forma paralela. La reepitelización, a diferencia de lo que ocurre en la evolución temporal global y en el grupo control, experimenta un incremento en la cicatrización más avanzada (Figs.38 y 39). La actividad fibroblástica desciende, a diferencia de lo que ocurre con la determinación de colágeno (Fig.40) e hidroxiprolina.

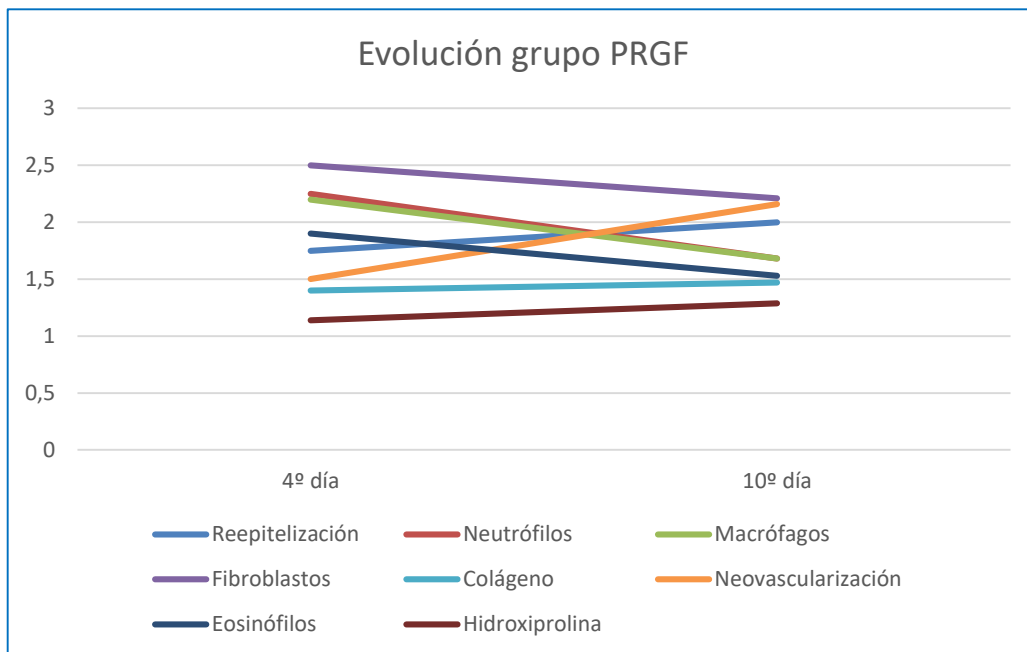


Fig.38 Evolución de la cicatrización en el grupo con aplicación de PRGF

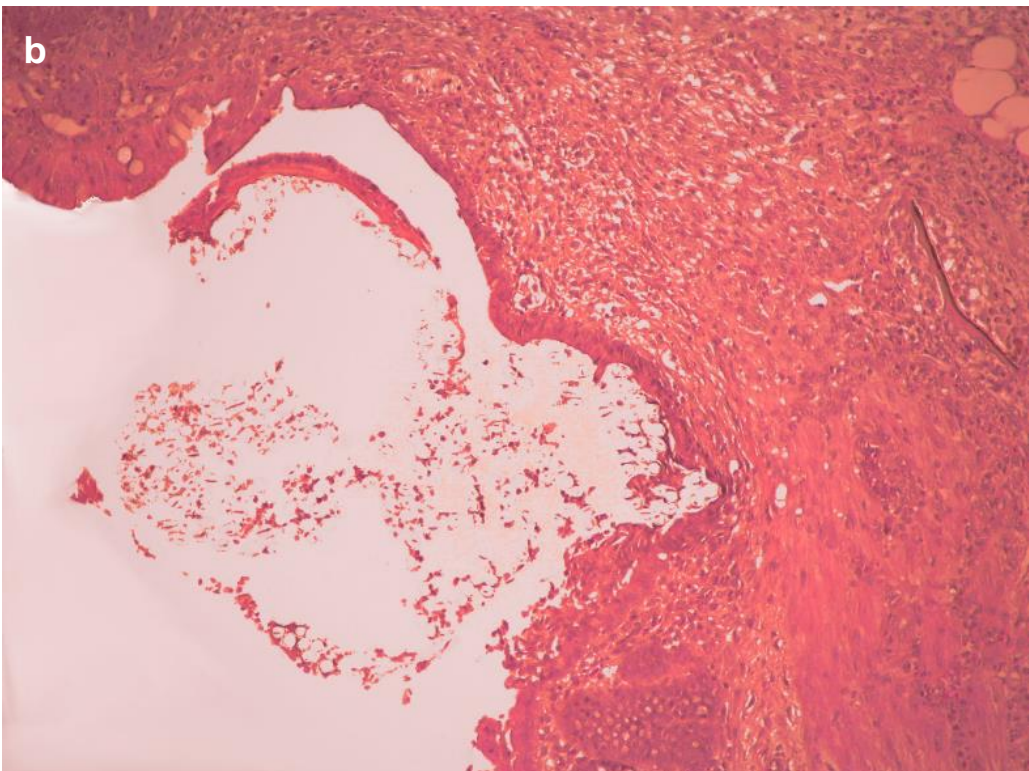
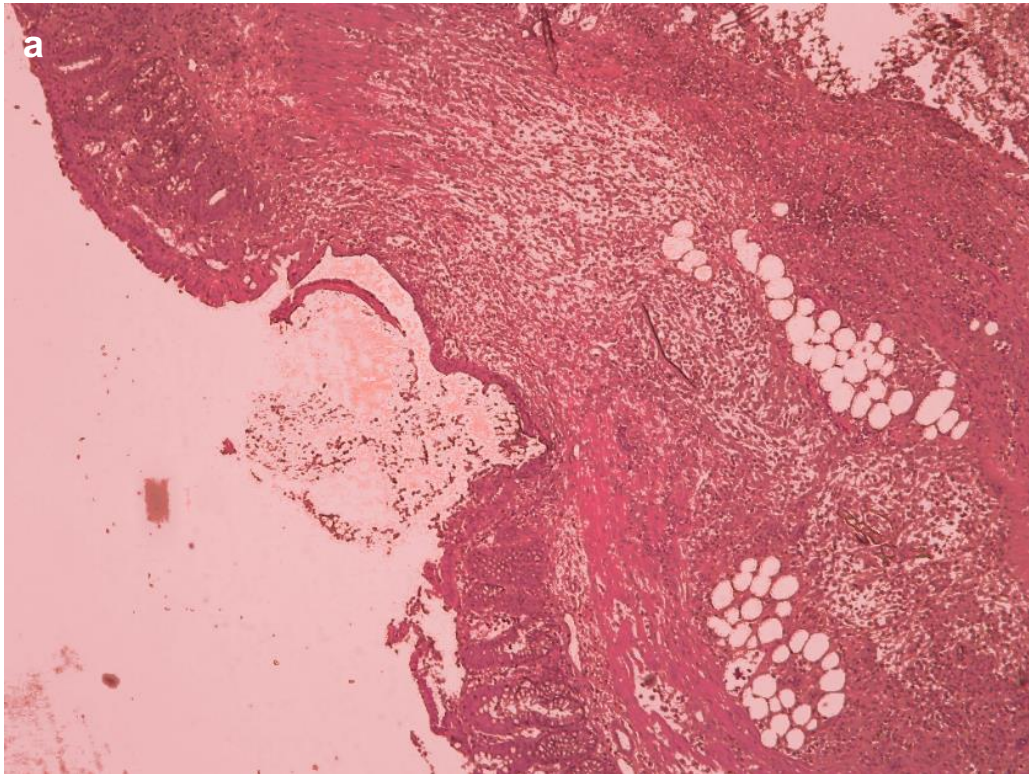


Fig.39 Corte histológico tinción hematoxilina-eosina en fase más tardía de la cicatrización
a) Incremento de la reepitelización, aumento de epitelio glandular epitelial (5x aumentos)
b) Detalle reepitelización a mayor aumento (10x aumentos)

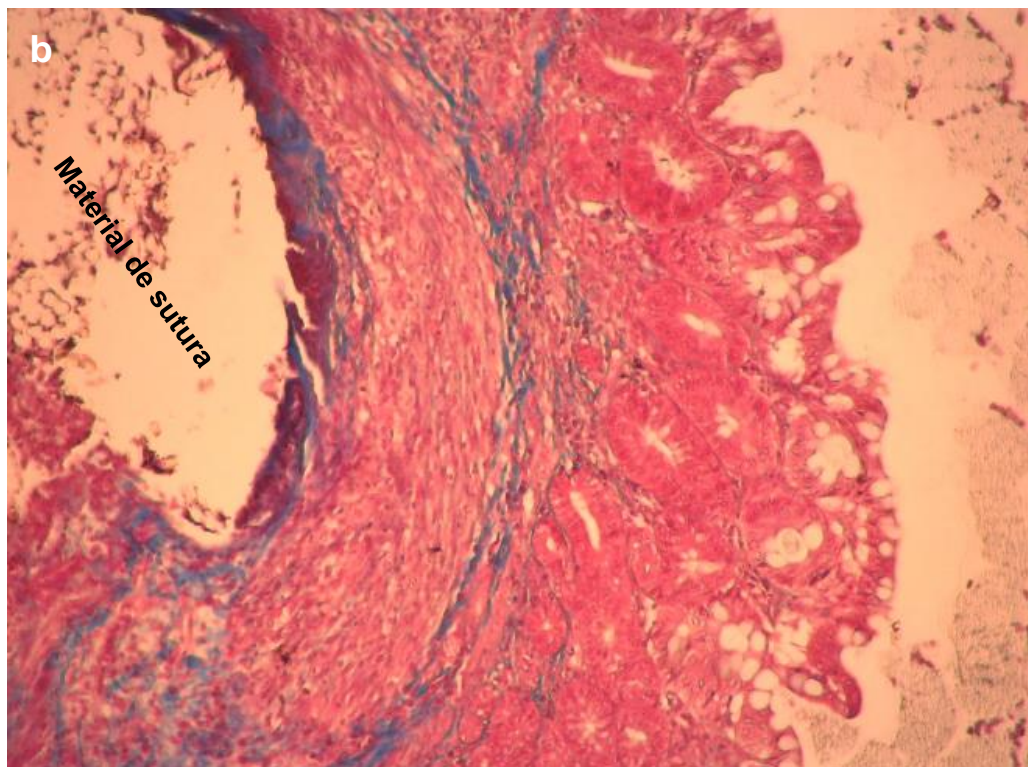
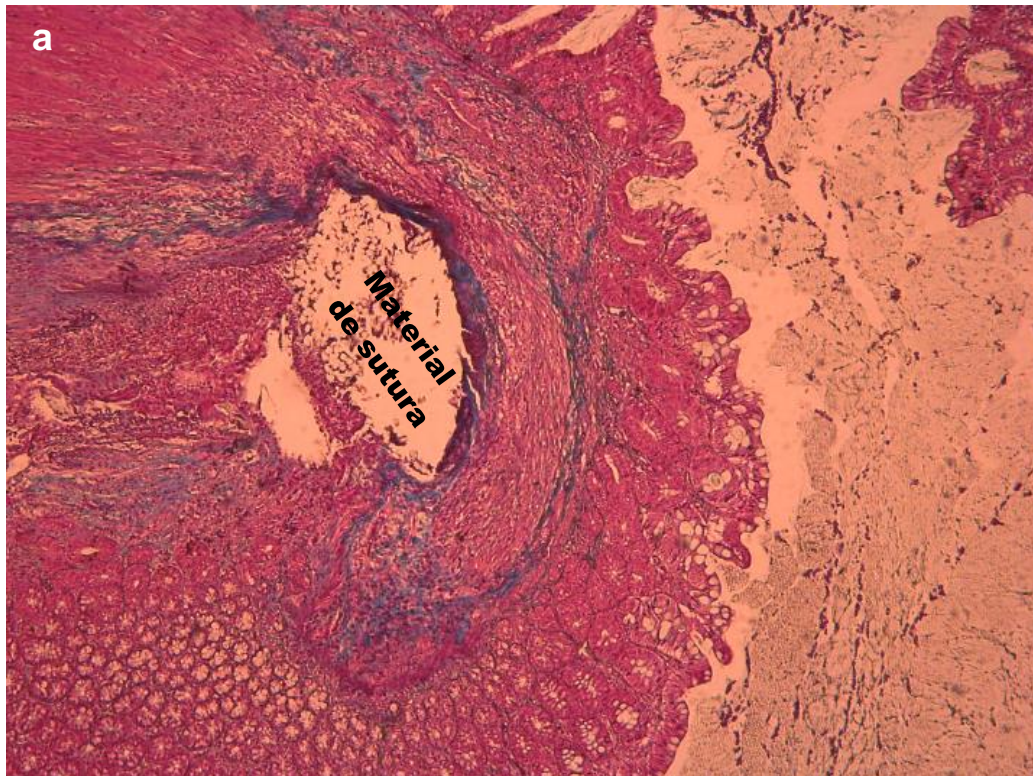


Fig.40 Corte histológico tinción Tricrómico de Masson en fase tardía de la cicatrización
a) Las fibras de colágeno quedan teñidas en azul (5x aumentos) b) Detalle fibras de colágeno teñidas de azul alrededor del material de sutura y nuevo epitelio glandular (10x aumentos)

4.5 Análisis de la cicatrización mediante la determinación de hidroxiprolina en los tejidos

Al utilizar la inhibición competitiva en la técnica de ELISA existe una correlación inversa entre la concentración de hidroxiprolina en la muestra y la intensidad de señal del ensayo. Creamos una curva estándar con el logaritmo de la concentración de hidroxiprolina en el eje Y y la absorbancia en el eje X. Dibujamos la línea más recta posible entre los puntos y calculamos la ecuación de la recta utilizando Microsoft Office Excel 2007 (Tabla 10 y Fig.41).

<i>Abs</i>	<i>Concent.</i>	<i>Log</i>
0,47999999	5000	3,699
0,6275	1666,7	3,222
1,0668	555,6	2,745
1,32480001	185,2	2,268

Tabla 10 Valores estándares

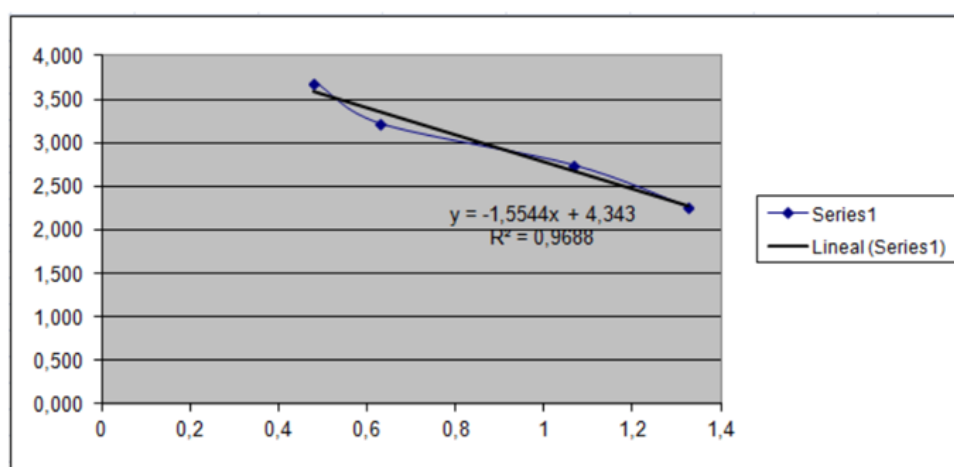


Fig.41 Curva estándar. Concentración eje X, absorbancia eje Y

Tras calcular la ecuación de la recta, obtenemos la concentración de hidroxiprolina de cada una de las muestras a partir de su absorbancia (Fig.41). El tamaño de las diferentes muestras utilizadas en el estudio es distinto, lo que puede repercutir en la cantidad de hidroxiprolina determinada, de manera que puede existir un aumento directamente proporcional entre la cantidad de hidroxiprolina y la cantidad de tejido de la misma. Para salvar este problema, se cuantifica la concentración de proteínas de

cada una de las muestras y se establece como valor válido de la variable hidroxiprolina el cociente entre hidroxiprolina/proteínas.

HIDROXIPROLINA	4º DIA		10º DIA	
	Grupo Control	Grupo PRGF	Grupo Control	Grupo PRGF
Mínimo	0,676	0,598	0,991	0,875
Máximo	1,751	1,546	1,736	1,559
Media ± Desv. Típica	1,223 ± 0,263	1,139 ± 0,205	1,303 ± 0,21	1,288 ± 0,173
Varianza	0,07	0,042	0,044	0,03
P*	0,148		0,827	

*P<0,05. Prueba de Mann-Whitney
M±DS: Media ± Desviación estándar

Tabla 11 Estadísticos descriptivos variable hidroxiprolina

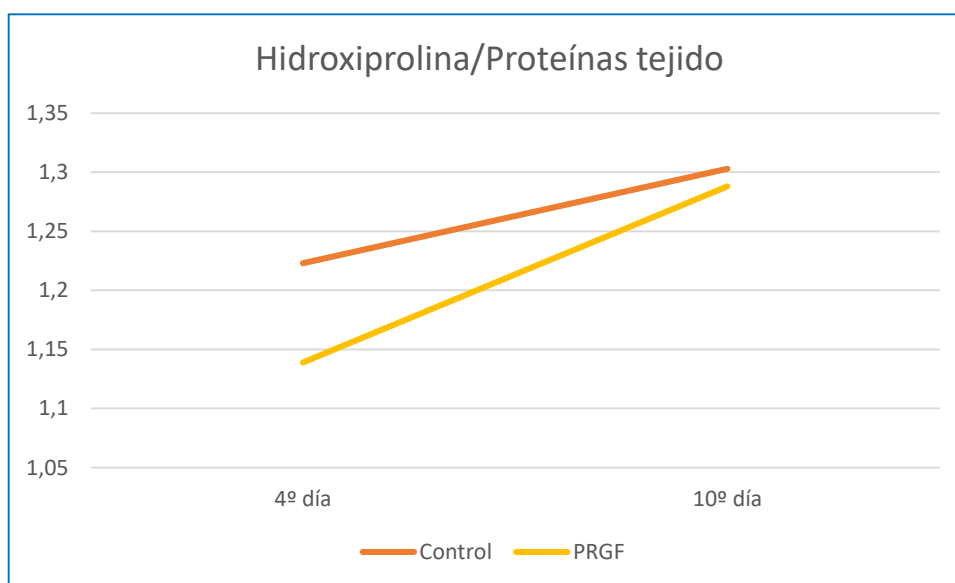


Fig.42 Evolución temporal de la hidroxiprolina en la cicatrización

En cada uno de los grupos analizados observamos una mayor expresión de hidroxiprolina/proteínas en etapas más avanzadas de la cicatrización con respecto a etapas iniciales. Esta tendencia ascendente es más pronunciada en el grupo de anastomosis impregnadas en PRGF (Tabla 11 y Fig.42).

4. DISCUSIÓN

A pesar de la evolución en diversos campos de la medicina, tanto perioperatorios como quirúrgicos, y la especialización en la cirugía colorrectal alcanzando un alto grado de experiencia en la realización de resecciones y anastomosis intestinales, la incidencia de dehiscencia y fugas no ha disminuido significativamente (183) (167). Permanece en porcentajes no despreciables con tasas que varían del 1% al 19% según la localización anatómica proximal o distal, respectivamente (336). Las consecuencias pueden llegar a ser muy graves, con incrementos de la morbilidad y la mortalidad, largas estancias hospitalarias y pobres resultados oncológicos.

La creciente información relativa a los mecanismos implicados, el estudio exhaustivo del proceso de cicatrización y la proliferación de estudios experimentales que aplican diferentes estrategias no han podido evitar su aparición. En este sentido, se han descrito y estudiado pormenorizadamente los factores de riesgo involucrados: sexo masculino, tiempo quirúrgico prolongado, historia de tabaquismo, inmunosupresión o uso crónico de esteroides (337). Paralelamente, se han ideado numerosas metodologías encaminadas a evitar la dehiscencia o favorecer la cicatrización de los tejidos en condiciones de normalidad y/o adversas: utilización de diferentes dispositivos para realizar la anastomosis (grapado quirúrgico mecánico (338), clip de compresión (126), dispositivos magnéticos (339)...), aplicación de GFs a través de distintas vías (localmente o sistémicamente) y soportes de administración biocompatibles (biosuturas (5), liposomas (340), colágeno (341), alginato (305) (342), dextrano (343), ácido hialurónico (344) (345), heparina, chitosán (346), alcohol de polivinilo, polímeros de ácido láctico y ácido glicólico, hidrogel (69)...) (308).

Aunque generalmente se han informado de unos resultados preliminares satisfactorios, queda bastante para confirmar su utilidad en la cicatrización de los tejidos.

Sin embargo, uno de los problemas más importantes es alcanzar unas concentraciones y gradientes óptimos de GFs adecuados en el lugar preciso y durante el tiempo necesario. Por ello, el sistema de administración de los GFs debe liberarlos en dosis suficientes y con una cinética similar a la biológica (347).

No cabe la menor duda que los concentrados plaquetarios tienen un efecto global sobre la regeneración y/o reparación de los tejidos, actuando no sólo sobre las células diana sino también sobre la MEC. Aunque existen estudios con resultados prometedores que los utilizan de formas muy diversas, no se ha conseguido un aumento global de todos los parámetros implicados en la cicatrización. Esto puede ser debido a la falta de respuestas a las múltiples variables que intervienen en el procedimiento como: la

concentración exacta de plaquetas más eficaz, el volumen necesario de PRP que se debe aplicar, la relación de éstas con la extensión y localización de la lesión y la condición médica general del individuo (348).

En nuestro estudio, la aplicación de GFs mediante inmersión de la anastomosis no ha permitido obtener resultados beneficiosos relacionados con la cicatrización de los tejidos.

EVALUACIÓN DEL PROCESO DE CICATRIZACIÓN

En condiciones normales, a pesar de la infiltración de células inflamatorias, el edema de los tejidos y la formación del coágulo de fibrina, la herida no adquiere la resistencia suficiente inicialmente. Los GFs secretados por las plaquetas agregadas en el tapón de fibrina son sumamente importantes, incrementando la neoangiogénesis y la epitelización en estos primeros días. Seguidamente, en la fase proliferativa, donde se implementan fundamentalmente la fibroplasia y la deposición de colágeno. Se sabe que la fuerza anastomótica depende de la presencia de redes de colágeno producidas por los fibroblastos que infiltran el sitio durante las primeras etapas después de la cirugía (102). Es en esta etapa inicial en la que existe una mayor debilidad de la herida y, por tanto, un mayor riesgo de dehiscencia. La aplicación de las suturas en los extremos de la herida es necesaria para establecer resistencia en las fases iniciales mientras se desarrollan el resto de procesos de la cicatrización, pero en ocasiones no evita la dehiscencia. La aplicación de PRGF en estas fases iniciales trata de intensificar la acción de los GFs y potenciar el proceso de cicatrización, disminuyendo la debilidad biológica y evitando la dehiscencia.

En esta investigación, todos los **casos dehiscentes** ocurrieron en los animales sacrificados en el 4^o día postoperatorio, distribuidos de forma similar tanto en el grupo control como en el grupo tratado con PRGF. Fundamentalmente se ha identificado en los animales sacrificados a los 4 días tras la realización de la anastomosis. Este período coincide con la fase inflamatoria e inicio de la proliferativa, donde la migración y proliferación de fibroblastos son claves en la formación de colágeno, que aporta resistencia a la anastomosis. Pero a su vez, coexisten acciones dirigidas a la degradación del mismo, en un equilibrio que acaba sustituyendo unas fibras de colágeno por otras (349).

La infiltración de células PMN en la herida se correspondió con patrones normales de cicatrización, sin embargo, se observó que el recuento de **neutrófilos** en el período inicial de la cicatrización fue mayor en el grupo de animales tratados con PRGF. Aunque los datos no son estadísticamente significativos, sí puede deducirse el efecto quimiotáctico de los GFs administrados y la importancia que este mayor reclutamiento de células inflamatorias puede tener en la cicatrización. Su función principal es la protección de la infección, fagocitando microorganismos y detritus celulares derivados del tejido dañado, pero además producen sustancias denominadas metaloproteinasas, implicadas en la degradación de proteínas de la MEC como colágeno y proteoglicanos (350).

Tras la fase inflamatoria comienza solapadamente la **fase de proliferación**. En el proceso normal se debe observar una disminución de los acontecimientos inflamatorios con la caída de la infiltración celular, partícipes de la inflamación aguda, y posteriormente un aumento de los integrantes de la siguiente fase: proliferación de fibroblastos y deposición de colágeno. Los neutrófilos descienden paulatinamente, siendo sustituidos por los macrófagos que asumen funciones de fagocitosis de detritus y secreción de GFs que potencian la fibroplasia y neoangiogénesis.

Este comportamiento se describió en el grupo de animales control, donde el descenso progresivo de neutrófilos se acompañó de un aumento progresivo de los macrófagos, sin embargo, no ocurrió lo mismo en el grupo tratado con PRGF donde existió un decrecimiento paralelo de neutrófilos y macrófagos. Esta infiltración inflamatoria pobre en la fase proliferativa está de acuerdo con los resultados de otros autores (351) (352), que describen una menor determinación de células inflamatorias en fases más tardías del estudio de las muestras con aplicación de terapias ricas en plaquetas.

Otra diferencia se estableció en la mayor deposición de **colágeno** y sobretodo el incremento marcado de la **reepitelización** en el grupo tratado con PRGF, siendo imperceptibles o negativas en el grupo control. Aunque estas no son estadísticamente significativas, el ascenso preponderante en el grupo tratado con PRGF se explicaría por la acción local de los GFs secretados sobre la anastomosis.

Las determinaciones de vasos **sanguíneos neoformados** e **hidroxiprolina** en ambos grupos tienen una tendencia ascendente, pero esta es manifiestamente mayor en el grupo tratado con PRGF, aunque tampoco es significativa.

EVALUACIÓN ANASTOMÓTICA

La integridad anastomótica se puede estudiar desde varios puntos de vista, evaluando diferentes características de la misma desde **parámetros mecánicos/tensiométricos** hasta **histológicos** y **bioquímicos**. Sin embargo, actualmente no existe un método ideal con la capacidad de estimar globalmente todos los aspectos de la cicatrización de heridas.

En nuestro estudio no utilizamos medidas mecánicas ni estudios tensiométricos para evaluar la resistencia anastomótica, aunque existen muchos estudios experimentales en donde sí se desarrollan e incluso en algunos círculos se considera el estándar de oro (353). Se trata fundamentalmente de pruebas que someten a la línea de cicatrización colónica a fuerzas de tracción/resistencia, o bien, a aumentos de presión intraluminal.

La más utilizada actualmente es la medida de la **presión de ruptura a la distensión**, ya que representa la fuerza ejercida por la presión intraluminal que sería la que naturalmente actúa sobre las suturas intestinales. Se mide de esta manera la capacidad de mantenerse intacta la anastomosis a incrementos progresivos de fuerza y establecerse en qué valor de la misma se produce la rotura (153). No obstante, los autores no alcanzan un consenso que defina la técnica más fiable ni el momento postoperatorio más adecuado en el que realizarlo, para que proporcionen una información fiable y con aproximación real a la resistencia de la cicatrización anastomótica.

La anastomosis pierde un alto porcentaje de resistencia en las primeras 72 horas en su evolución natural, incrementándose progresivamente hasta valores cercanos a zonas de pared intestinal íntegras, cuando se alcanza el 7º día postoperatorio. Bajo esta premisa, se considera que cambios de presión de ruptura aumentados se pueden corresponder paralelamente con una mejor cicatrización, basada sobre todo en mayor deposición de colágeno (354).

En contraste, autores como Masson (150) no consideran que la prueba de resistencia a la rotura tenga la sensibilidad suficiente para ser utilizada durante los 3 primeros días postoperatorios, donde ya Weiber y colaboradores (154) describen que la resistencia a la rotura es constante hasta 4 días después de la formación de anastomosis colónica, por lo que no se esperaría un gran rendimiento en su utilización. En la variabilidad de los resultados pueden estar implicados varios factores como la propia técnica quirúrgica y la aplicabilidad de las fuerzas directamente sobre la sutura. Por consiguiente, puede entenderse que la aplicación de fuerzas de rotura es, a día de hoy, una técnica

controvertida para obtener unos resultados fidedignos que midan la resistencia de la anastomosis, por lo menos en los primeros días postoperatorios.

Los valores de **presión de estallido** parecen ser más sensibles para medir la resistencia anastomótica, aunque también presenta limitaciones y no se correlaciona de forma fehaciente con otras pruebas de resistencia. Además, es difícil realizar comparativas entre los diferentes estudios que la utilizan (355). Otras publicaciones han demostrado que la resistencia a la rotura aumenta gradualmente después de la fase proliferativa, coincidiendo con la deposición progresiva del colágeno tipo I y III. Se ha intentado sin mucho éxito instaurar una correlación entre ambas técnicas de resistencia en esta fase de la cicatrización, mediante la comparación de resultados de resistencia de anastomosis en el 7º día postoperatorio (152).

En nuestro estudio, el análisis de la cicatrización se realiza mediante **análisis bioquímico de los restos de hidroxiprolina** que contienen las proteínas de colágeno, necesarias para estabilizar la triple hélice que constituye el mismo. De esta forma, medimos de manera indirecta la cantidad de colágeno que se distribuye en el área de cicatrización.

Durante la cicatrización de la herida quirúrgica existe una fase crítica, cuyo cenit se produce a los 3 y 4 días desde el inicio del proceso, debido a una mayor expresión de las colagenasas (metaloproteinasas) inducidas en esta fase tras la lesión de la pared intestinal (356). Transcurrido este tiempo, la expresión génica aumenta y la actividad colagenolítica se normaliza hacia el 7º día, incrementándose por tanto la deposición de colágeno en la capa submucosa (357) (358). Incluso existen estudios que avalan esta variabilidad de las concentraciones de colágeno de forma indirecta a través del análisis de hidroxiprolina. Describiéndose una disminución inicial de hasta un 43%, sobre todo en la zona perianastomótica, continuando con una elevación progresiva hasta el nivel basal a los 7 días (359).

Cantidades óptimas proporcionan a las suturas un anclaje firme esencial para la integridad anastomótica en la fase temprana, esencialmente gracias a la resistencia que se establece mediante la mayor proporción colágeno tipo I/colágeno tipo III (357). Una disminución en el contenido de colágeno de la capa submucosa en estas fases iniciales implica una menor calidad de la cicatrización de los tejidos, más notable a partir de la pérdida del 25% del mismo (360).

En el presente estudio, los niveles de hidroxiprolina marcaron una tendencia ascendente a lo largo del tiempo, en paralelo con el incremento de colágeno, así en

fases más avanzadas de la cicatrización los niveles de hidroxiprolina son mayores. Aunque estos resultados no son significativamente más acusados en el grupo tratado con GFs, la cuantificación de la hidroxiprolina muestra un incremento perceptible pero no acentuado. La explicación podría radicar en la degradación del colágeno en el lugar de la herida quirúrgica, debido a la acción de las colagenasas (donde están implicados los neutrófilos), también por la dilución de la propia hidroxiprolina o a una combinación de ambos. La hidroxiprolina se expresa en μg de hidroxiprolina / mg de tejido seco, por lo que el incremento del tejido seco es inversamente proporcional a los niveles de hidroxiprolina cuando se mantiene constante la cantidad de colágeno, a ello contribuyen el infiltrado inflamatorio considerable que acude al tejido y el acúmulo de componentes de la MEC (360).

PRGF UTILIZADO, VÍA DE ADMINISTRACIÓN Y TIEMPOS DE CONTACTO

Es probable que el efecto del PRGF sobre la cicatrización de una herida esté condicionada por muchas variables, algunas relacionadas directamente con las características del PRGF a utilizar (concentración de plaquetas, activación y volumen) y otras con las condiciones de la herida a tratar (localización, extensión y tipo de tejido a tratar) y del paciente (situación médica global).

Utilizamos **PRGF alogénico** obtenido manualmente en una sola fase de centrifugación y mediante pipeteo posterior manual, separando las fases de plasma pobre en plaquetas (PPP) del plasma rico en plaquetas (PRGF) y desechando en la medida de lo posible la porción rica en leucocitos.

Si se analiza bioquímicamente el PRGF, se reconocen componentes diversos como plasma, leucocitos, plaquetas en número por encima de su concentración plasmática basal y GFs. Evidentemente, de todos estos, los GFs son los elementos más importantes al participar de forma activa en el desarrollo de la cicatrización, incidiendo en diferentes fases: promoviendo la inflamación, proliferación de células inflamatorias involucradas, epitelización, angiogénesis, fibroplasia, proliferación y depósito de colágeno (348). Su aplicación representa una mayor similitud con el proceso de curación natural, precisamente por albergar múltiples GFs en sus proporciones biológicamente determinadas, frente a la aplicación de alguno de ellos individualizadamente.

En la literatura encontramos resultados opuestos en el análisis de estudios experimentales e incluso controversias en la eficacia terapéutica. Una de las explicaciones radica en la variabilidad del PRGF obtenido a partir de la sangre completa del animal de experimentación o el paciente: desde el contenido total de plaquetas, lo que influirá en la cantidad absoluta de GFs, hasta en la cantidad de leucocitos, cuyo incremento otorga una mayor capacidad proinflamatoria que antagoniza con la capacidad anabólica de las proteínas secretadas por las plaquetas (361). Una mayor concentración de estas células inflamatorias en la herida podría explicar algunos de los resultados del estudio, donde la cantidad de colágeno es mayor de forma significativa en la fase inflamatoria del grupo control frente al grupo tratado con PRGF localmente. Y consecuentemente una menor concentración de hidroxiprolina, tanto por la mayor degradación de colágeno como por la alteración del cociente μg de hidroxiprolina / mg de tejido seco.

A pesar de las diferentes **vías** que se pueden utilizar para la administración de los GFs, cuando se trata de estudios experimentales de cicatrización intestinal, la inoculación intraperitoneal es la más utilizada. Probablemente por la facilidad de administración, máxime cuando se trata de animales de pequeño tamaño, y por alcanzar las concentraciones locales significativas para lograr el efecto deseado. Sin embargo, en la literatura se describe que la liberación lenta de éstos proporcionada por la aplicación de un depósito de plaquetas en forma de tapón de fibrina es más efectiva que la liberación acelerada tras la administración en bolo. Por ello optamos por la aplicación y actuación local directa del PRGF en la zona del daño tisular durante los primeros minutos de la cicatrización de los tejidos anastomosados, de forma que se evita la pérdida, destrucción y difusión del mismo más allá del lugar que interesa, manteniendo la acción directa durante todo el tiempo de exposición.

En experimentos preliminares tratamos de evaluar el **parámetro tiempo** de contacto de la solución de PRGF con el área de anastomosis, el cual debe ser suficientemente prolongado como para considerar que los componentes activos y promotores de la cicatrización impregnan y actúan plenamente en la superficie que interesa. La detección de estas proteínas mediante ELISA nos muestra unos resultados positivos transcurridos 15 minutos de exposición continuada, a diferencia de la metodología de estudios experimentales precedentes, donde Fresno (352), Giusto (242) y sus colaboradores proceden a impregnar los extremos seccionados de intestino delgado de cerdos en PRP o PRGF durante 10 minutos antes de realizar la anastomosis. Optamos por realizar la inmersión en la solución de PRGF tras realización de la anastomosis por los problemas

descritos en estas experimentaciones anteriores, puesto que los bordes intestinales seccionados presentan propensión al sangrado y además existe potencialidad de contaminación con el contenido intestinal, pudiendo interferir en los resultados finales al modificar concentraciones y eficacia de la terapia rica en plaquetas.

Es conocido que transcurridos 10 minutos desde el inicio de la agregación plaquetaria dirigido a la formación del coágulo comienza la secreción activa de estos polipéptidos almacenados en los gránulos α , liberándose más del 95% de los GFs pre sintetizados en el lapso de una hora (348) (362). La incorporación de cloruro de calcio a la solución de concentrado de plaquetas produce una **activación del proceso** de la coagulación similar a la fisiológica, promoviendo la producción de trombina nativa y seguidamente la liberación sostenida de GFs (363). Además, parece que la viabilidad de los GFs liberados es más fiable cuando esta activación se realiza *in vivo* en el momento de la aplicación, en contraposición a la realizada *in vitro* previamente a la aplicación (364). Por ello, la aplicación debe llevarse a cabo dentro de los 10 minutos siguientes al comienzo de la coagulación plaquetaria e iniciarse *in vivo* si es posible para asegurar una liberación sostenida y viable de GFs en la zona a tratar. Las plaquetas no viables o dañadas no liberan GFs biológicamente activos. Más avanzado en el tiempo tras la liberación proteica masiva, los trombocitos continúan sintetizando y secretando proteínas entre 5-10 días más de forma prolongada en el tiempo hasta que los macrófagos asumen este papel (348).

En nuestro ensayo, la activación de la solución de PRGF se realizó *in vitro* previamente a la aplicación de la anastomosis colónica. Los estudios preliminares detectan GFs con técnicas de ELISA en los tejidos anastomosados transcurridos 15 minutos de inmersión en PRGF, sin embargo, no podemos asegurar que estos permanezcan suficientemente activos cualitativamente y cuantitativamente para potenciar las fases de cicatrización. Tampoco sabemos si, tras la aplicación localmente y por este medio, quedan plaquetas activas en número significativo que puedan continuar con esta liberación de GFs más retardada. Probablemente estos hechos contribuyen a la falta de resultados positivos comparativamente en el estudio.

Un tema controvertido, donde diversos autores no llegan a un consenso, es la **concentración óptima de plaquetas y GFs** más eficaz para su utilización en la regeneración de tejidos. Al comienzo del empleo de estas técnicas se promovieron sistemas capaces de obtener concentraciones superiores de GFs, bajo la creencia de que éstos en mayor número potencian aún más la cicatrización, empero a falta de una reflexión profunda acerca de las verdaderas características del concentrado alcanzado

y sus efectos. Más recientemente, se está replanteando esta forma de obtener los distintos preparados ricos en plaquetas en virtud a diversos estudios *in vitro*. Estos han observado comportamientos contrarios a los esperados cuando la concentración de plaquetas sobrepasa un cierto nivel (365); (366), en consecuencia incrementos progresivos de la concentración de plaquetas, a pesar de la idea establecida, no promueve proporcionalmente la respuesta proliferativa celular al no generarse el ambiente adecuado, sobre todo cuando estas concentraciones superan en 4,2 a 5,5 veces la concentración basal. Liu y colaboradores contribuyen a este pensamiento con una explicación plausible que se basa en los cambios de pH del entorno de la cicatrización, lo que podría afectar negativamente a estos procesos (367). Incluso en estudios experimentales, llevados a cabo por Yamaguchi (362), se sugiere que las concentraciones que ofrecen mejores resultados en la cicatrización intestinal de rata es aquella que se eleva 2,5 veces a la basal de sangre completa del animal frente a concentraciones excesivas de plaquetas por encima de este valor. En cuyo caso, no solo parece que no favorece la cicatrización sino que puede resultar en sentido negativo, aunque ciertamente no se conoce con exactitud el mecanismo por el cual sucede.

También puede resultar negativo el déficit de plaquetas contenidas en la solución, si nos ajustamos a la definición de concentración plaquetaria biológicamente activa establecida por algunos autores, que abogan por unos límites de 2 a 4 veces del número plaquetario basal (368). Estos estudios preliminares no defienden su obtención de forma estandarizada mediante una única centrifugación por el riesgo de contener un número insuficiente de plaquetas en la solución, en incluso describen maniobras que pueden interferir desfavorablemente por la activación prematura de GFs, como la utilización de pipetas y centrifugaciones a altas velocidades (369). En el presente estudio se utilizan concentraciones de PRGF estandarizadas obtenidas a partir de la centrifugación de las muestras y el pipeteo de la porción rica en plaquetas, no se utiliza un kit comercial para tal fin. Así, las concentraciones extraídas podrían variar entre sí y no se controla la proporción exacta de plaquetas que se encuentra en cada solución de PRGF extraída, pudiendo interferir en los resultados finales del estudio. Actualmente, el gran número de variables sin concretar y su potencial interacción es la razón por la que no existe una recomendación única sobre el nivel de aumento de plaquetas que debe producir el PRP sobre la línea base para ofrecer sus efectos de la manera más óptima.

A día de hoy no se han definido con claridad las condiciones ideales en las que debe aplicarse PRP o el PRGF para obtener el máximo rendimiento en cuanto a cicatrización global y no sólo de algunas de sus fases o características concretas. Referente a dosis,

concentración, tiempo de exposición, número de repeticiones necesarias y vía de administración. Por tanto, son necesarios más estudios dirigidos a definir estas condiciones ideales para cada tipo de tejido diana y establecer un protocolo de actuación dependiendo de las condiciones y localización del mismo.

LIMITACIONES DEL ENSAYO

El análisis de los resultados obtenidos y la comparación con la literatura existente, ha permitido identificar una serie de limitaciones en nuestro estudio que serán tenidas en cuenta por los autores para futuras investigaciones:

- ❖ La condición alogénica del PRGF utilizado en nuestro ensayo podría conllevar una respuesta inmune del organismo receptor donde se aplica el tratamiento. Los antígenos de superficie plaquetarios tales como antígenos leucocitarios, antígeno del grupo sanguíneo ABO y un grupo específico de glicoproteínas que constituye el aloantígeno plaquetario, inician la activación de la respuesta inmune por medio de Células T CD4 y CD8 por vías directas e indirectas frente a las plaquetas alogénicas. Todo este proceso acaba destruyendo las plaquetas utilizadas para el tratamiento derivando en falsos negativos (367).
- ❖ La concentración de plaquetas no fue medida, por lo que desconocemos la cantidad de plaquetas existentes en cada preparado de PRGF utilizado. Este dato puede ser necesario para valorar la efectividad del concentrado preparado en procesos de cicatrización, según algunos autores (362) (370) (371).
- ❖ Se determinó la expresión de TGF- β 1 en los tejidos anastomosados tras inmersión durante 15 minutos en PRGF, pero no así el resto de GFs contenidos en los gránulos de secreción de las plaquetas (PDGF, VEGF, EGF, IGF, PF4...) (362).
- ❖ En algunos estudios (370) (372) (373) se demuestra que ciertas variables como cantidad de plaquetas, de leucocitos y otros componentes de los concentrados de plaquetas influyen en la liberación de GFs, por tanto sus características pueden alterarse según la metodología empleada. No utilizar un kit estandarizado para obtener PRGF, como es el caso de nuestro ensayo, puede generar una variabilidad entre los diferentes concentrados de plaquetas obtenidos y por consiguiente a su efectividad (374).

- ❖ El peso de los animales de experimentación no fue tomado durante el ensayo. En la mayoría de los estudios valorados este no es un parámetro determinante que explique o influya en los resultados (73) (67) (59) (61) (68) (64) (69), e incluso en otros estudios no se hace referencia al peso de los animales que intervienen durante la fase de experimentación (5) (72) (71) (242). Existen algunas excepciones cuando el tratamiento administrado actúa en el metabolismo del animal pudiendo variar el peso corporal, como el efecto anabólico que produce la administración de IGF-I (63) (65), o en situaciones experimentales inducidas que provocan un efecto secundario en el metabolismo, la exposición a corticosteroides (375) es un ejemplo de ello. La IGF-I estimula el crecimiento independientemente de la hormona de crecimiento, su efecto anabólico desempeña un papel importante en el metabolismo de proteínas y grasas, aumenta la proliferación celular y, por lo tanto, media el peso corporal (376).

7. CONCLUSIONES

- La aplicación local de PRGF alogénico en anastomosis de colon mediante inmersión no permite obtener una mejor cicatrización de los tejidos anastomosados de forma global y tampoco una disminución de la incidencia de dehiscencia anastomótica.

- La influencia local de PRGF tiende a aumentar el reclutamiento de neutrófilos en la anastomosis en fases iniciales de la cicatrización, aunque no significativamente.

- La aplicación de PRGF produce, en el postoperatorio tardío, un aumento no significativo de la neovascularización, reepitelización y deposición de colágeno en los tejidos.

- La expresión de hidroxiprolina es mayor en el grupo de animales sacrificados en el décimo día, sobre todo tras la aplicación local de PRGF, sin significación estadística.

- No se ha descrito un número mayor de complicaciones postoperatorias en el grupo de animales en el que se aplica PRGF frente al grupo control.

Anexo 1: FIGURAS

Fig.1	Evolución temporal fases de la cicatrización	Pág.35
Fig.2	Evolución temporal fase inflamatoria de la cicatrización	Pág.36
Fig.3	Evolución temporal fase proliferativa de la cicatrización	Pág.41
Fig.4	a) Botón de Murphy b) Disposición en la anastomosis	Pág.51
Fig.5	Dispositivo de Von Petz	Pág.52
Fig.6	Instrumento mecánico grapador circular	Pág.54
Fig.7	Dispositivo Hand CAC	Pág.54
Fig.8	Ilustración esquemática de los sistemas de administración de fármacos cargados con factor de crecimiento.	Pág.107
Fig.9	Revelado Western blot para determinación de GFs	Pág.116
Fig.10	Animal de experimentación	Pág.118
Fig.11	Aparato digestivo de la rata	Pág.119
Fig.12	Edificio Instituto Biomedicina de Sevilla	Pág.120
Fig.13	Quirófano utilizado para la fase de experimentación	Pág.121
Fig.14	Esquema separación fracciones sanguíneas tras centrifugación	Pág.123
Fig.15	Fase quirúrgica animal	Pág.125
Fig.16	Impregnación factores de crecimiento	Pág.126
Fig.17	Fase quirúrgica final	Pág.126
Fig.18	Relaparotomía con exposición de anastomosis	Pág.128
Fig.19	Sección pieza quirúrgica	Pág.128
Fig.20	Dehiscencia de anastomosis colon	Pág.140
Fig.21	Dehiscencia en fragmento seccionado	Pág.141
Fig.22	Distribución variable dehiscencia al 4º día	Pág.141

Fig.23	Distribución variable dehiscencia al 10º día	Pág.142
Fig.24	Distribución variable estenosis	Pág.143
Fig.25	Estenosis	Pág.143
Fig.26	Distribución variable adherencia	Pág.144
Fig.27	Adherencias intestino delgado y epliplón a anastomosis	Pág.145
Fig.28	Corte histológico tinción hematoxilina-eosina. Rata sacrificada al 4º día postoperatorio (5x aumentos)	Pág.146
Fig.29	Corte histológico tinción hematoxilina-eosina. Rata sacrificada al 4º día postoperatorio (10x aumentos)	Pág.147
Fig.30	Grado de reepitelización en función de la aplicación o no de PRGF	Pág.147
Fig.31	Determinación de colágeno en función aplicación o no de PRGF	Pág.148
Fig.33	Corte histológico tinción hematoxilina-eosina. Rata sacrificada al 10º día postoperatorio (10x aumentos)	Pág.149
Fig.34	Evolución global durante la cicatrización intestinal	Pág.150
Fig.35	Corte histológico tinción hematoxilina-eosina en fase temprana de la cicatrización (5x aumentos) (10x aumentos)	Pág.151
Fig.36	Corte histológico tinción hematoxilina-eosina en fase temprana de la cicatrización (5x aumentos) (10x aumentos)	Pág.152
Fig.37	Evolución de la cicatrización en el grupo control	Pág.153
Fig.38	Evolución de la cicatrización en el grupo con aplicación de PRGF	Pág.154
Fig.39	Corte histológico tinción hematoxilina-eosina en fase más tardía de la cicatrización (5x aumentos) (10x aumentos)	Pág.155
Fig.40	Corte histológico tinción Tricrómico de Masson en fase tardía de la cicatrización (5x aumentos) (10x aumentos)	Pág.156
Fig.41	Curva estándar. Concentración eje X, absorbancia eje Y	Pág.157
Fig.42	Evolución temporal de la hidroxiprolina en la cicatrización	Pág.158

Anexo 2: TABLAS

Tabla 1	Revisión de estudios en los que se utiliza GFs en tracto digestivo	Pág.29
Tabla 2	Resumen producción, células diana y función de factores de crecimiento	Pág.104
Tabla 3	Grados de adherencias	Pág.132
Tabla 4	Variables histológicas y puntuación	Pág.133
Tabla 5	Expresión por grupos variable dehiscencia	Pág.140
Tabla 6	Expresión por grupos variable estenosis	Pág.142
Tabla 7	Distribución variable adherencia	Pág.144
Tabla 8	Distribución variables 4º día	Pág.145
Tabla 9	Distribución variables 10º día	Pág.149
Tabla 10	Valores estándares	Pág.157
Tabla 11	Estadísticos descriptivos variable hidroxiprolina	Pág.158

Anexo 3

JUNTA DE ANDALUCÍA

CONSEJERÍA DE IGUALDAD, SALUD Y POLÍTICAS SOCIALES
Dirección General de Calidad, Investigación, Desarrollo e Innovación
Comité Coordinador de Ética de la Investigación Biomédica de Andalucía

DICTAMEN ÚNICO EN LA COMUNIDAD AUTÓNOMA DE ANDALUCÍA

D/Dª: Jose Salas Turrents como secretario/a del CEI de los hospitales universitarios Virgen Macarena-Virgen del Rocio

CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado la propuesta de (No hay promotor/a asociado/a) para realizar el estudio de investigación titulado:

TÍTULO DEL ESTUDIO: Estudio experimental del uso local de factores de crecimiento sobre la cicatrización de anastomosis cólica

Protocolo, Versión: 2

HIP, Versión:

CI, Versión:

Y que considera que:

Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y se ajusta a los principios éticos aplicables a este tipo de estudios.

La capacidad del/de la investigador/a y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

Están justificados los riesgos y molestias previsibles para los participantes.

Que los aspectos económicos involucrados en el proyecto, no interfieren con respecto a los postulados éticos.

Y que este Comité considera, que dicho estudio puede ser realizado en los Centros de la Comunidad Autónoma de Andalucía que se relacionan, para lo cual corresponde a la Dirección del Centro correspondiente determinar si la capacidad y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

Lo que firmo en SEVILLA a 04/09/2015

D/Dª. Jose Salas Turrents, como Secretario/a del CEI de los hospitales universitarios Virgen Macarena-Virgen del Rocio



Código Seguro De Verificación:	81b314b88a20e57cb30dc7cb36dbf1b63de6909e	Fecha	04/09/2015	
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la Ley 59/2003, de 19 de diciembre, de firma electrónica.			
Firmado Por	Jose Salas Turrents			
Url De Verificación	https://www.juntadeandalucia.es/salud/portaldeetica/xhtml/ayuda/verificarFirmaDocumento.iface/code/81b314b88a20e57cb30dc7cb36dbf1b63de6909e	Página	1/2	

CERTIFICA

Que este Comité ha ponderado y evaluado en sesión celebrada el 24/07/2015 y recogida en acta 07/2015 la propuesta del/de la Promotor/a (No hay promotor/a asociado/a), para realizar el estudio de investigación titulado:

TÍTULO DEL ESTUDIO: Estudio experimental del uso local de factores de crecimiento sobre la cicatrización de anastomosis cólica
 Protocolo, Versión: 2
 HIP, Versión:
 CI, Versión:

Que a dicha sesión asistieron los siguientes integrantes del Comité:

Presidente/a

D/D^a. Víctor Sánchez Margalet

Vicepresidente/a

D/D^a. Dolores Jiménez Hernández

Secretario/a

D/D^a. Jose Salas Turrents

Vocales

D/D^a. María Pilar Guadix

D/D^a. ANTONIO PÉREZ PÉREZ

D/D^a. Enrique Calderón Sandubete

D/D^a. Amancio Carnero Moya

D/D^a. Enrique de Álava Casado

D/D^a. Antonio Hevia Alonso

D/D^a. Juan Ramón Lacalle Remigio

D/D^a. M LORENA LOPEZ CERERO

D/D^a. Luis Lopez Rodriguez

D/D^a. CRISTOBAL MORALES PORTILLO

D/D^a. Cristina Pichardo Guerrero

D/D^a. Joaquin Quiralte Enriquez

D/D^a. Gabriel Ramírez Soto

D/D^a. Javier Vitorica Fernandez

D/D^a. MARIA EUGENIA ACOSTA MOSQUERA

D/D^a. Regina Sandra Benavente Cantalejo

D/D^a. EVA MARIA DELGADO CUESTA

D/D^a. Adoración Valiente Mendez

D/D^a. Juan Carlos Gomez Rosado

Que dicho Comité, está constituido y actúa de acuerdo con la normativa vigente y las directrices de la Conferencia Internacional de Buena Práctica Clínica.



Lo que firmo en SEVILLA a 04/09/2015

Código Seguro De Verificación:	81b314b88a20e57cb30dc7cb36dbf1b63de6909e	Fecha	04/09/2015	
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la Ley 59/2003, de 19 de diciembre, de firma electrónica.			
Firmado Por	Jose Salas Turrents			
Uri De Verificación	https://www.juntadeandalucia.es/salud/portaldeetica/xhtml/ayuda/verificarFirmaDocumento.iface/code/81b314b88a20e57cb30dc7cb36dbf1b63de6909e	Página	2/2	

Anexo 4

Rata	Intervención	Días sacrificio	Rata	Intervención	Días sacrificio
1	PRGF	10	41	PRGF	4
2	Control	10	42	PRGF	10
3	Control	10	43	PRGF	4
4	Control	4	44	Control	10
5	PRGF	10	45	Control	4
6	PRGF	4	46	PRGF	10
7	PRGF	10	47	Control	4
8	Control	10	48	Control	4
9	Control	4	49	Control	10
10	PRGF	4	50	PRGF	10
11	Control	4	51	PRGF	4
12	PRGF	10	52	PRGF	4
13	PRGF	4	53	Control	4
4	Control	10	54	PRGF	10
15	PRGF	4	55	Control	4
16	PRGF	10	56	PRGF	10
17	PRGF	10	57	PRGF	4
18	PRGF	4	58	Control	10
19	Control	4	59	Control	4
20	Control	4	60	PRGF	10
21	Control	10	61	PRGF	4
22	PRGF	10	62	PRGF	4
23	Control	10	63	PRGF	4
24	PRGF	4	64	PRGF	10
25	Control	4	65	Control	10
26	PRGF	4	66	PRGF	10
27	PRGF	4	67	Control	4
6	Control	10	68	Control	4
29	PRGF	10	69	Control	4
30	Control	4	70	Control	10
31	PRGF	4	71	Control	10

32	Control	10	72	Control	10
33	PRGF	10	73	Control	10
34	PRGF	4	74	PRGF	4
35	PRGF	4	75	PRGF	10
36	Control	4	76	Control	4
37	PRGF	10	77	Control	10
38	Control	10	78	Control	10
39	Control	4	79	Control	4
40	Control	10	80	PRGF	10

Anexo 5



PRESENTACIÓN DE TESIS DOCTORAL

REGULADO POR R.D. 99/2011 (NORMATIVA REGULADA POR ACUERDO 7.2/CG 17-6-11)

La Comisión Académica del programa de doctorado
Biología Molecular, Biomedicina e Investigación clínica

utilizando el procedimiento acordado por la misma, previo informe del director/es, así como del tutor, ha acordado

AUTORIZAR **NO AUTORIZAR** la presentación de la tesis doctoral cuyos datos se citan a continuación:

DOCTORANDO

NOMBRE APELLIDOS

Alejandro Ortega Carrasco

DENOMINACIÓN DEL PROGRAMA DE DOCTORADO CURSADO POR EL DOCTORANDO

Biología Molecular, Biomedicina e Investigación clínica

DIRECTOR/ES DE LA TESIS DOCTORAL

NOMBRE Y APELLIDOS DNI UNIVERSIDAD / CENTRO / DEPARTAMENTO / INSTITUTO

Fernando De La Portilla de Juan 28886519Z

Ana María García Cabrera 26213616X

TUTOR/A DE LA TESIS DOCTORAL

NOMBRE Y APELLIDOS

Francisco Javier PAdillo Ruiz

DENOMINACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL

Estudio experimental de la aplicación de plasma rico en factores de crecimiento sobre la cicatrización de anastomosis cólica

Sevilla, 09 de SEPTIEMBRE de 2019

El director (1)

Fdo. Fernando de la Portilla de Juan

El director (2)

Fdo. Ana María García Cabrera

El director (3)

Fdo.

El tutor

Fdo. Francisco Javier Padillo Ruiz

El Presidente de Comisión Académica

Fdo.

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA
Avda. Doctor Fedriani, s/n - C.P. 41009 SEVILLA
Tel: 954 551 700 Fax: 954 551 700

SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE DOCTORADO

¹ Firmado previamente por el director del departamento responsable, en el caso del programa de doctorado Biología Molecular, Biomedicina e Investigación Clínica

BIBLIOGRAFÍA

1. Cohen S, Levi-Montalcini R. A Nerve Growth-Stimulating Factor Isolated from Snake Venom. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1956;42(9):571-4.
2. Cohen S. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J Biol Chem*. 1962;237:1555-62.
3. Foster TE, Puskas BL, Mandelbaum BR, Gerhardt MB, Rodeo SA. Platelet-rich plasma: from basic science to clinical applications. *Am J Sports Med*. 2009;37(11):2259-72.
4. Knighton DR, Ciresi KF, Fiegel VD, Austin LL, Butler EL. Classification and treatment of chronic nonhealing wounds. Successful treatment with autologous platelet-derived wound healing factors (PDWHF). *Ann Surg*. 1986;204(3):322-30.
5. Fuchs TF, Surke C, Stange R, Quandt S, Wildemann B, Raschke MJ, et al. Local delivery of growth factors using coated suture material. *ScientificWorldJournal*. 2012;2012:109216.
6. Anitua E, Zalduendo MM, Alkhraisat MH, Orive G. Release kinetics of platelet-derived and plasma-derived growth factors from autologous plasma rich in growth factors. *Ann Anat*. 2013;195(5):461-6.
7. Carter MJ, Fylling CP, Parnell LK. Use of platelet rich plasma gel on wound healing: a systematic review and meta-analysis. *Eplasty*. 2011;11:e38.
8. Bielecki T, M. Dohan Ehrenfest D. Platelet-Rich Plasma (PRP) and Platelet-Rich Fibrin (PRF): Surgical Adjuvants, Preparations for In Situ Regenerative Medicine and Tools for Tissue Engineering. *Curr Pharm Biotechnol*. 2012 Jun;13(7):1121-30.
9. 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*. 2009;27(3):158-67.
10. Schepull T, Kvist J, Norrman H, Trinks M, Berlin G, Aspenberg P. Autologous Platelets Have No Effect on the Healing of Human Achilles Tendon Ruptures: A Randomized Single-Blind Study. *Am J Sports Med*. 2011;39(1):38-47.
11. Gianakos A, Zambrana L, Savage-Elliott I, Lane JM, Kennedy JG. Platelet-Rich Plasma in the Animal Long-Bone Model: An Analysis of Basic Science Evidence. *Orthopedics*. 2015;38(12):e1079-90.
12. Dallari D, Fini M, Stagni C, Torricelli P, Nicoli Aldini N, Giavaresi G, et al. In vivo study on the healing of bone defects treated with bone marrow stromal cells, platelet-rich plasma, and freeze-dried bone allografts, alone and in combination. *J Bone Miner Res*. 2006;24(5):877-88.

13. Hokugo A, Ozeki M, Kawakami O, Sugimoto K, Mushimoto K, Morita S, et al. Augmented bone regeneration activity of platelet-rich plasma by biodegradable gelatin hydrogel. *Tissue Eng.* 2005;11(7-8):1224-33.
14. Kanthan SR, Kavitha G, Addi S, Choon DS, Kamarul T. Platelet-rich plasma (PRP) enhances bone healing in non-union critical-sized defects: a preliminary study involving rabbit models. *Injury.* 2011;42(8):782-9.
15. Kasten P, Vogel J, Geiger F, Niemeyer P, Luginbuhl R, Szalay K. The effect of platelet-rich plasma on healing in critical-size long-bone defects. *Biomaterials.* 2008;29(29):3983-92.
16. Kroese-Deutman HC, Vehof JW, Spauwen PH, Stoelinga PJ, Jansen JA. Orthotopic bone formation in titanium fiber mesh loaded with platelet-rich plasma and placed in segmental defects. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2008;37(6):542-9.
17. Kurikchy MQ, Al-Rawi NH, Ayoub RS, Mohammed SS. Histological evaluation of bone healing using organic bovine bone in combination with platelet-rich plasma (an experimental study on rabbits). *Clin Oral Investig.* 2013;17(3):897-904.
18. Lin BN, Whu SW, Chen CH, Hsu FY, Chen JC, Liu HW, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells, platelet-rich plasma and nanohydroxyapatite-type I collagen beads were integral parts of biomimetic bone substitutes for bone regeneration. *J Tissue Eng Regen Med.* 2013;7(11):841-54.
19. Lysiak-Drwal K, Dominiak M, Solski L, Zywicka B, Pielka S, Konopka T, et al. Early histological evaluation of bone defect healing with and without guided bone regeneration techniques: experimental animal studies. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 2008;62:282-8.
20. Nather A, Wong KL, David V, Pereira BP. Allografts with autogenous platelet-rich plasma for tibial defect reconstruction: a rabbit study. *J Orthop Surg (Hong Kong).* 2012;20(3):375-80.
21. Parizi AM, Oryan A, Shafiei-Sarvestani Z, Bigham AS. Human platelet rich plasma plus Persian Gulf coral effects on experimental bone healing in rabbit model: radiological, histological, macroscopical and biomechanical evaluation. *J Mater Sci Mater Med.* 2012;23(2):473-83.
22. Zhang ZY, Huang AW, Fan JJ, Wei K, Jin D, Chen B, et al. The potential use of allogeneic platelet-rich plasma for large bone defect treatment: immunogenicity and defect healing efficacy. *Cell Transplant.* 2013;22(1):175-87.
23. Guzel Y, Karalezli N, Bilge O, Kacira BK, Esen H, Karadag H, et al. The biomechanical and histological effects of platelet-rich plasma on fracture healing. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2015;23(5):1378-83.
24. Sugimori E, Shintani S, Ishikawa K, Hamakawa H. Effects of apatite foam combined with platelet-rich plasma on regeneration of bone defects. *Dent Mater J.* 2006;25(3):591-6.
25. Cho K, Kim JM, Kim MH, Kang SS, Kim G, Choi SH. Scintigraphic evaluation of osseointegrative response around calcium phosphate-coated titanium implants in tibia bone: effect of platelet-rich plasma on bone healing in dogs. *Eur Surg Res.* 2013;51(3-4):138-45.
26. Malhotra A, Pelletier M, Oliver R, Christou C, Walsh WR. Platelet-rich plasma and bone defect healing. *Tissue Eng Part A.* 2014;20(19-20):2614-33.

27. Jungbluth P, Wild M, Grassmann JP, Ar E, Sager M, Herten M, et al. Platelet-rich plasma on calcium phosphate granules promotes metaphyseal bone healing in mini-pigs. *J Bone Miner Res.* 2010;28(11):1448-55.
28. Hakimi M, Jungbluth P, Sager M, Betsch M, Herten M, Becker J, et al. Combined use of platelet-rich plasma and autologous bone grafts in the treatment of long bone defects in mini-pigs. *Injury.* 2010;41(7):717-23.
29. Lowery GL, Kulkarni S, Pennisi AE. Use of autologous growth factors in lumbar spinal fusion. *Bone.* 1999;25(2 Suppl):47S-50S.
30. Narita A, Takahara M, Sato D, Ogino T, Fukushima S, Kimura Y, et al. Biodegradable gelatin hydrogels incorporating fibroblast growth factor 2 promote healing of horizontal tears in rabbit meniscus. *Arthroscopy.* 2012;28(2):255-63.
31. Uggen C, Dines J, McGarry M, Grande D, Lee T, Limpisvasti O. The effect of recombinant human platelet-derived growth factor BB-coated sutures on rotator cuff healing in a sheep model. *Arthroscopy.* 2010;26(11):1456-62.
32. Cummings SH, Grande DA, Hee CK, Kestler HK, Roden CM, Shah NV, et al. Effect of recombinant human platelet-derived growth factor-BB-coated sutures on Achilles tendon healing in a rat model: A histological and biomechanical study. *J Tissue Eng.* 2012;3(1):2041731412453577.
33. Arnoczky SP AL, Fanelli G, Ho S, Mishra A, Sgaglione. The role of platelet-rich plasma in connective tissue repair. *Orthopedics Today.* 2009;26:29.
34. Sanchez M, Anitua E, Azofra J, Andia I, Padilla S, Mujika I. Comparison of surgically repaired Achilles tendon tears using platelet-rich fibrin matrices. *Am J Sports Med.* 2007;35(2):245-51.
35. Sandrey MA. Autologous growth factor injections in chronic tendinopathy. *J Athl Train.* 2014;49(3):428-30.
36. Sanchez M, Anitua E, Azofra J, Aguirre JJ, Andia I. Intra-articular injection of an autologous preparation rich in growth factors for the treatment of knee OA: a retrospective cohort study. *Clin Exp Rheumatol.* 2008;26(5):910-3.
37. Radice D FYD, Roberto; Gutierrez B, Vicente; Pinedo B, Miguel; Rosales, Julio; Coda, Sebastian. Uso de concentrado autologo rico en factores de crecimiento en la reconstrucción del ligamento cruzado anterior. *Artroscopia.* 2008;15(1):31-40.
38. Sanchez M, Anitua E, Orive G, Mujika I, Andia I. Platelet-rich therapies in the treatment of orthopaedic sport injuries. *Sports Med.* 2009;39(5):345-54.
39. Cugat R. Platelet derived growth factors: Experience in soft tissue injuries and in joint trauma. Presented at the Seventh Biennial International Society of Arthroscopy, Knee Surgery & Orthopaedic Sports Medicine Congress. 2009.
40. Moraes VY, Lenza M, Tamaoki MJ, Faloppa F, Belloti JC. Platelet-rich therapies for musculoskeletal soft tissue injuries. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014(4):CD010071.

41. Martínez-Zapata MJ, Martí-Carvajal AJ, Sola I, Exposito JA, Bolibar I, Rodríguez L, et al. Autologous platelet-rich plasma for treating chronic wounds. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016(5):CD006899.
42. Anitua E, Aguirre JJ, Algorta J, Ayerdi E, Cabezasa AI, Orive G, et al. Effectiveness of autologous preparation rich in growth factors for the treatment of chronic cutaneous ulcers. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2008;84(2):415-21.
43. Montón Echeverría J, Pérez Redondo S, Gómez Bajo GJ. Clinical experience related to the use of autologous platelet rich plasma. *Cir plást iberolatinoam*. 2007;33(3):155-161.
44. Frykberg RG, Driver VR, Carman D, Lucero B, Borris-Hale C, Fylling CP, et al. Chronic wounds treated with a physiologically relevant concentration of platelet-rich plasma gel: a prospective case series. *Ostomy Wound Manage*. 2010;56(6):36-44.
45. San Sebastian KM, Lobato I, Hernandez I, Burgos-Alonso N, Gomez-Fernandez MC, Lopez JL, et al. Efficacy and safety of autologous platelet rich plasma for the treatment of vascular ulcers in primary care: Phase III study. *BMC Fam Pract*. 2014;15:211.
46. Wieman TJ, Smiell JM, Su Y. Efficacy and safety of a topical gel formulation of recombinant human platelet-derived growth factor-BB (becaplermin) in patients with chronic neuropathic diabetic ulcers. A phase III randomized placebo-controlled double-blind study. *Diabetes care*. 1998;21(5):822-7.
47. Smiell JM, Wieman TJ, Steed DL, Perry BH, Sampson AR, Schwab BH. Efficacy and safety of becaplermin (recombinant human platelet-derived growth factor-BB) in patients with nonhealing, lower extremity diabetic ulcers: a combined analysis of four randomized studies. *Wound Repair Regen*. 1999;7(5):335-46.
48. Steed DL. Clinical evaluation of recombinant human platelet-derived growth factor for the treatment of lower extremity ulcers. *Plast Reconstr Surg*. 2006;117(7 Suppl):143S-9S; discussion 50S-51S.
49. Buchberger B, Follmann M, Freyer D, Huppertz H, Ehm A, Wasem J. The evidence for the use of growth factors and active skin substitutes for the treatment of non-infected diabetic foot ulcers (DFU): a health technology assessment (HTA). *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2011;119(8):472-9.
50. Gilligan AM, Waycaster CR, Motley TA. Cost-effectiveness of becaplermin gel on wound healing of diabetic foot ulcers. *Wound Repair Regen*. 2015;23(3):353-60.
51. Villela DL, Santos VL. Evidence on the use of platelet-rich plasma for diabetic ulcer: a systematic review. *Growth Factors*. 2010;28(2):111-6.
52. Spyridakis M, Christodoulidis G, Chatzitheofilou C, Symeonidis D, Tepetes K. The role of the platelet-rich plasma in accelerating the wound-healing process and recovery in patients being operated for pilonidal sinus disease: preliminary results. *World J Surg*. 2009;33(8):1764-9.
53. Litmathe J, Philipp C, Kurt M, Boeken U, Gams E, Feindt P. The use of autologous platelet gel (APG) for high-risk patients in cardiac surgery -- is it beneficial? *Perfusion*. 2009;24(6):381-7.

54. Lawlor DK, Derose G, Harris KA, Lovell MB, Novick TV, Forbes TL. The role of platelet-rich plasma in inguinal wound healing in vascular surgery patients. *Vasc Endovascular Surg.* 2011;45(3):241-5.
55. Kazakos K, Lyras DN, Verettas D, Tilkeridis K, Tryfonidis M. The use of autologous PRP gel as an aid in the management of acute trauma wounds. *Injury.* 2009;40(8):801-5.
56. Gould L, Stuntz M, Giovannelli M, Ahmad A, Aslam R, Mullen-Fortino M, et al. Wound Healing Society 2015 update on guidelines for pressure ulcers. *Wound Repair Regen.* 2016;24(1):145-62.
57. Lavery LA, Davis KE, Berriman SJ, Braun L, Nichols A, Kim PJ, et al. WHS guidelines update: Diabetic foot ulcer treatment guidelines. *Wound Repair Regen.* 2016;24(1):112-26.
58. Marston W, Tang J, Kirsner RS, Ennis W. Wound Healing Society 2015 update on guidelines for venous ulcers. *Wound Repair Regen.* 2016;24(1):136-44.
59. Egger B, Tolmos J, Procaccino F, Sarosi I, Friess H, Buchler MW, et al. Keratinocyte growth factor promotes healing of left-sided colon anastomoses. *Am J Surg.* 1998;176(1):18-24.
60. Housley RM, Morris CF, Boyle W, Ring B, Biltz R, Tarpley JE, et al. Keratinocyte growth factor induces proliferation of hepatocytes and epithelial cells throughout the rat gastrointestinal tract. *J Clin Invest.* 1994;94(5):1764-77.
61. Egger B, Inglin R, Zeeh J, Dirsch O, Huang Y, Buchler MW. Insulin-like growth factor I and truncated keratinocyte growth factor accelerate healing of left-sided colonic anastomoses. *Br J Surg.* 2001;88(1):90-8.
62. Howarth GS, Cool JC, Bourne AJ, Ballard FJ, Read LC. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) stimulates regrowth of the damaged intestine in rats, when administered following, but not concurrent with, methotrexate. *Growth Factors.* 1998;15(4):279-92.
63. Mantzoros I, Kanellos I, Angelopoulos S, Koliakos G, Pramateftakis MG, Kanellos D, et al. The effect of insulin-like growth factor I on healing of colonic anastomoses in cortisone-treated rats. *Dis Colon Rectum.* 2006;49(9):1431-8.
64. Inglin RA, Baumann G, Wagner OJ, Candinas D, Egger B. Insulin-like growth factor I improves aspects of mycophenolate mofetil-impaired anastomotic healing in an experimental model. *Br J Surg.* 2008;95(6):793-8.
65. Zacharakis E, Demetriades H, Kanellos D, Sapidis N, Zacharakis E, Mantzoros I, et al. Contribution of insulin-like growth factor I to the healing of colonic anastomoses in rats. *J Invest Surg.* 2007;20(1):9-14.
66. Yang J, Radulescu A, Chen CL, Zhang HY, James IO, Besner GE. Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor improves intestinal barrier function and reduces mortality in a murine model of peritonitis. *Surgery.* 2013;153(1):52-62.
67. Li Z, Wang W, Wang X, Jiang L, Wang F, Liu Q. Sustained-released mixture of vascular endothelial growth factor 165 and fibrin glue strengthens healing of ileal anastomoses in a rabbit model with intraperitoneal infection. *Ann Surg Treat Res.* 2017;93(3):159-65.

68. Rijcken E, Fuchs T, Sachs L, Kersting CM, Bruewer M, Krieglstein CF. Insulin-like growth factor 1-coated sutures improve anastomotic healing in an experimental model of colitis. *Br J Surg.* 2010;97(2):258-65.
69. Hirai K, Tabata Y, Hasegawa S, Sakai Y. Enhanced intestinal anastomotic healing with gelatin hydrogel incorporating basic fibroblast growth factor. *J Tissue Eng Regen Med.* 2016;10(10):E433-E42.
70. Adas G, Percem A, Adas M, Kemik O, Arikan S, Ustek D, et al. VEGF-A and FGF gene therapy accelerate healing of ischemic colonic anastomoses (experimental study). *Int J Surg.* 2011;9(6):467-71.
71. Enestvedt CK, Hosack L, Hoppo T, Perry KA, O'Rourke RW, Winn SR, et al. Recombinant vascular endothelial growth factor165 gene therapy improves anastomotic healing in an animal model of ischemic esophagostomy. *Dis Esophagus.* 2012;25(5):456-64.
72. Radulescu A, Zhang HY, Chen CL, Chen Y, Zhou Y, Yu X, et al. Heparin-binding EGF-like growth factor promotes intestinal anastomotic healing. *J Surg Res.* 2011;171(2):540-50.
73. Ishii M, Tanaka E, Imaizumi T, Sugio Y, Sekka T, Tanaka M, et al. Local VEGF administration enhances healing of colonic anastomoses in a rabbit model. *Eur Surg Res.* 2009;42(4):249-57.
74. Geneser F. Tracto esofagogastrointestinal. In: Panamericana Em, editor. *Histología.* Tercera ed ed. Madrid 2000. p. 485-505.
75. Ross MP, W. Aparato digestivo II: esófago, estómago e intestino. In: panamericana Em, editor. *Histología: texto y atlas color con biología celular y molecular.* Madrid 2007. p. 563-622.
76. Gregersen H, Christensen J. *Clinical Mechanics in the Gut: An Introduction.* Sharjah, U.A.E.: Bentham Science Publishers; 2017.
77. Leeson TS, Leeson CR, Paparo AA. *Texto-atlas de histología: Interamericana McGraw-Hill;* 1989.
78. Hannezo E, Prost J, Joanny JF. Growth, homeostatic regulation and stem cell dynamics in tissues. *J R Soc Interface.* 2014;11(93):20130895.
79. Kagnoff MF. The intestinal epithelium is an integral component of a communications network. *J Clin Invest.* 2014;124(7):2841-3.
80. Mammen JM, Matthews JB. Mucosal repair in the gastrointestinal tract. *Crit Care Med.* 2003;31(8 Suppl):S532-7.
81. Iizuka M, Konno S. Wound healing of intestinal epithelial cells. *World J Gastroenterol.* 2011;17(17):2161-71.
82. Gabella G. The cross-ply arrangement of collagen fibres in the submucosa of the mammalian small intestine. *Cell and Tissue Research.* 1987;248(3):491-7.
83. Vagholkar K. Healing of anastomosis in the gastrointestinal tract:retrospective study of 35 Cases. *The Bombay Hospital journal* 2001;43(2).

84. Thornton FJ, Barbul A. Healing in the gastrointestinal tract. *Surg Clin North Am.* 1997;77(3):549-73.
85. Bosmans JW, Jongen AC, Bouvy ND, Derikx JP. Colorectal anastomotic healing: why the biological processes that lead to anastomotic leakage should be revealed prior to conducting intervention studies. *BMC gastroenterology.* 2015;15:180.
86. Stadelmann WK, Digenis AG, Tobin GR. Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. *Am J Surg.* 1998;176(2A Suppl):26S-38S.
87. Witte MB, Barbul A. General principles of wound healing. *Surg Clin North Am.* 1997;77(3):509-28.
88. Kilicoglu SS, Kilicoglu B, Erdemli E. Ultrastructural view of colon anastomosis under polipolis effect by transmission electron microscopy. *World J Gastroenterol.* 2008;14(30):4763-70.
89. Engelhardt E, Toksoy A, Goebeler M, Debus S, Brocker EB, Gillitzer R. Chemokines IL-8, GROalpha, MCP-1, IP-10, and Mig are sequentially and differentially expressed during phase-specific infiltration of leukocyte subsets in human wound healing. *Am J Pathol.* 1998;153(6):1849-60.
90. Demidova-Rice TN, Hamblin MR, Herman IM. Acute and impaired wound healing: pathophysiology and current methods for drug delivery, part 1: normal and chronic wounds: biology, causes, and approaches to care. *Adv Skin Wound Care.* 2012;25(7):304-14.
91. Rieder F, Brenmoehl J, Leeb S, Scholmerich J, Rogler G. Wound healing and fibrosis in intestinal disease. *Gut.* 2007;56(1):130-9.
92. Speca S, Giusti I, Rieder F, Latella G. Cellular and molecular mechanisms of intestinal fibrosis. *World J Gastroenterol.* 2012;18(28):3635-61.
93. Mendonca RJ, Coutinho-Netto J. Cellular aspects of wound healing. *An Bras Dermatol.* 2009;84(3):257-62.
94. Zubaidi AM, Hussain T, Alzoghaibi MA. The time course of cytokine expressions plays a determining role in faster healing of intestinal and colonic anastomatic wounds. *Saudi J gastroenterol.* 2015;21(6):412-7.
95. Alzoghaibi MA, Zubaidi AM. Upregulation of the proinflammatory cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1 and monocyte chemoattractant protein-1 in rats' intestinal anastomotic wound healing--does it matter? *Asian J Surg.* 2014;37(2):86-92.
96. Rijcken E, Sachs L, Fuchs T, Spiegel HU, Neumann PA. Growth factors and gastrointestinal anastomotic healing. *J Surg Res.* 2014;187(1):202-10.
97. Leeb SN, Vogl D, Grossmann J, Falk W, Scholmerich J, Rogler G, et al. Autocrine fibronectin-induced migration of human colonic fibroblasts. *Am J Gastroenterol.* 2004;99(2):335-40.

98. Jobson TM, Billington CK, Hall IP. Regulation of proliferation of human colonic subepithelial myofibroblasts by mediators important in intestinal inflammation. *J Clin Invest.* 1998;101(12):2650-7.
99. Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JI, West AB. Myofibroblasts. II. Intestinal subepithelial myofibroblasts. *Am J Physiol.* 1999;277(2 Pt 1):C183-201.
100. Martens MF, Huyben CM, Hendriks T. Collagen synthesis in fibroblasts from human colon: regulatory aspects and differences with skin fibroblasts. *Gut.* 1992;33(12):1664-70.
101. Mast BA. Healing in other tissues. *Surg Clin North Am.* 1997;77(3):529-47.
102. Thompson SK, Chang EY, Jobe BA. Clinical review: Healing in gastrointestinal anastomoses, part I. *Microsurgery.* 2006;26(3):131-6.
103. Dogmus M, Ersoy E, Anadol AZ, Ozel U, Bilgehan A. Effect of calcitonin gene-related peptide on anastomotic healing in the presence of endotoxin. *ANZ J Surg.* 2005;75(12):1106-10.
104. Demidova-Rice TN, Durham JT, Herman IM. Wound Healing Angiogenesis: Innovations and Challenges in Acute and Chronic Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2012;1(1):17-22.
105. Midwood KS, Valenick LV, Hsia HC, Schwarzbauer JE. Coregulation of fibronectin signaling and matrix contraction by tenascin-C and syndecan-4. *Mol Biol Cell.* 2004;15(12):5670-7.
106. Murali A, Rajalingam K. Small Rho GTPases in the control of cell shape and mobility. *Cell Mol Life Sci.* 2014;71(9):1703-21.
107. Panjwani N. Role of galectins in re-epithelialization of wounds. *Ann Transl Med.* 2014;2(9):89.
108. Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, et al. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science.* 2003;302(5651):1704-9.
109. Hall A. Rho GTPases and the control of cell behaviour. *Biochem Soc Trans.* 2005;33(Pt 5):891-5.
110. Seidelin JB, Larsen S, Linnemann D, Vainer B, Coskun M, Troelsen JT, et al. Cellular inhibitor of apoptosis protein 2 controls human colonic epithelial restitution, migration, and Rac1 activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2015;308(2):G92-9.
111. Parlato M, Yeretssian G. NOD-like receptors in intestinal homeostasis and epithelial tissue repair. *Int J Mol Sci.* 2014;15(6):9594-627.
112. Sipos F, Valcz G, Molnar B. Physiological and pathological role of local and immigrating colonic stem cells. *World J Gastroenterol.* 2012;18(4):295-301.
113. Kernochan LE, Tran BN, Tangkijvanich P, Melton AC, Tam SP, Yee HF, Jr. Endothelin-1 stimulates human colonic myofibroblast contraction and migration. *Gut.* 2002;50(1):65-70.

114. Garcia-Fernandez B, Campos I, Geiger J, Santos AC, Jacinto A. Epithelial resealing. *Int J Dev Biol.* 2009;53(8-10):1549-56.
115. Peeters KC, Tollenaar RA, Marijnen CA, Klein Kranenbarg E, Steup WH, Wiggers T, et al. Risk factors for anastomotic failure after total mesorectal excision of rectal cancer. *Br J Surg.* 2005;92(2):211-6.
116. de Hingh IH, de Man BM, Lomme RM, van Goor H, Hendriks T. Colonic anastomotic strength and matrix metalloproteinase activity in an experimental model of bacterial peritonitis. *Br J Surg.* 2003;90(8):981-8.
117. Dietz UA, Debus ES. Intestinal anastomoses prior to 1882; a legacy of ingenuity, persistence, and research form a foundation for modern gastrointestinal surgery. *World J Surg.* 2005;29(3):396-401.
118. Kaidar-Person O, Rosenthal RJ, Wexner SD, Szomstein S, Person B. Compression anastomosis: history and clinical considerations. *Am J Surg.* 2008;195(6):818-26.
119. Ho YH, Ashour MA. Techniques for colorectal anastomosis. *World J Gastroenterol.* 2010;16(13):1610-21.
120. Forde KA, McLarty AJ, Tsai J, Ghalili K, Delany HM. Murphy's Button revisited. Clinical experience with the biofragmentable anastomotic ring. *Ann Surg.* 1993;217(1):78-81.
121. Mooloughi S, Joudi M, Dalili A, Dalili A. Different types of anastomotic methods: a review of literature. *Reviews in Clinical Medicine.* 2015;2(4):178-81.
122. Moran BJ. Stapling instruments for intestinal anastomosis in colorectal surgery. *Br J Surg.* 1996;83(7):902-9.
123. Steichen FM, Ravitch MM. Mechanical sutures in esophageal surgery. *Ann Surg.* 1980;191(3):373-81.
124. Benítez P G, Saade C R, París P A, Scorzza R. Historia de los instrumentos de autosutura con grapas en la cirugía gastro esofágica. *RFM.* 2005;28:36-9.
125. Germain P F, Cortés R J, Villavicencio V B. Análisis de las complicaciones de la anastomosis ileo-cólica grapada: Técnica de Barcelona. *Rev Med Chil.* 2009;61:48-51..
126. Lee HY, Woo JH, Park SY, Kang NW, Park KJ, Choi HJ. Intestinal Anastomosis by Use of a Memory-shaped Compression Anastomosis Clip (Hand CAC 30): Early Clinical Experience. *J Korean Soc Coloproctol.* 2012;28(2):83-8.
127. Goulder F. Bowel anastomoses: The theory, the practice and the evidence base. *World J Gastrointest Surg.* 2012;4(9):208-13.
128. Slieker JC, Daams F, Mulder IM, Jeekel J, Lange JF. Systematic review of the technique of colorectal anastomosis. *JAMA surgery.* 2013;148(2):190-201.
129. Pascual I, de Miguel GF, Gomez-Pinedo UA, de Miguel F, Arranz MG, Garcia-Olmo D. Adipose-derived mesenchymal stem cells in biosutures do not improve healing of experimental colonic anastomoses. *Br J Surg.* 2008;95(9):1180-4.

130. Pasternak B, Rehn M, Andersen L, Agren MS, Heegaard AM, Tengvall P, et al. Doxycycline-coated sutures improve mechanical strength of intestinal anastomoses. *Int J Colorectal Dis.* 2008;23(3):271-6.
131. McKinley AJ, Krukowski ZH. Intestinal anastomoses. *Surgery (Oxford).* 2006;24(7):224-8..
132. Li GC, Zhang YC, Xu Y, Zhang FC, Huang WH, Xu JQ, et al. Single-layer continuous suture contributes to the reduction of surgical complications in digestive tract anastomosis involving special anatomical locations. *Mol Clin Oncol.* 2014;2(1):159-65.
133. Leslie A, Steele RJ. The interrupted serosubmucosal anastomosis - still the gold standard. *Colorectal Dis.* 2003;5(4):362-6.
134. Shikata S, Yamagishi H, Taji Y, Shimada T, Noguchi Y. Single- versus two- layer intestinal anastomosis: a meta-analysis of randomized controlled trials. *BMC surgery.* 2006;6:2.
135. Sajid MS, Siddiqui MR, Baig MK. Single layer versus double layer suture anastomosis of the gastrointestinal tract. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012;1:CD005477.
136. Burch JM, Franciose RJ, Moore EE, Biffl WL, Offner PJ. Single-layer continuous versus two-layer interrupted intestinal anastomosis: a prospective randomized trial. *Ann Surg.* 2000;231(6):832-7.
137. Brisinda G, Vanella S, Cadeddu F, Civello IM, Brandara F, Nigro C, et al. End-to-end versus end-to-side stapled anastomoses after anterior resection for rectal cancer. *J Surg Oncol.* 2009;99(1):75-9.
138. Neutzling CB, Lustosa SA, Proenca IM, da Silva EM, Matos D. Stapled versus handsewn methods for colorectal anastomosis surgery. *The Cochrane database of systematic reviews.* 2012(2):CD003144.
139. Pommergaard HC, Achiam MP, Rosenberg J. External coating of colonic anastomoses: a systematic review. *Int J Colorectal Dis.* 2012;27(10):1247-58.
140. Pommergaard HC, Achiam MP, Burcharth J, Rosenberg J. Decreased leakage rate of colonic anastomoses by tachosil coating: an experimental study. *Int Surg.* 2014;99(4):359-63.
141. Pommergaard HC. Experimental evaluation of clinical colon anastomotic leakage. *Dan Med J.* 2014;61(3):B4821.
142. Bosmans JW, Moosdorff M, Al-TaHER M, van Beek L, Derikx JP, Bouvy ND. International consensus statement regarding the use of animal models for research on anastomoses in the lower gastrointestinal tract. *Int J Colorectal Dis.* 2016;31(5):1021-30.
143. Benavides FJ GJ. *Manual de Genética de Roedores de Laboratorio: Principios Básicos y Aplicaciones.* Alcalá de Henares: Alcalá: Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio (SECAL)- Universidad de Alcalá; 2003. 312 p.
144. Pommergaard HC, Rosenberg J, Schumacher-Petersen C, Achiam MP. Choosing the best animal species to mimic clinical colon anastomotic leakage in humans: a qualitative systematic review. *Eur Surg Res.* 2011;47(3):173-81.

145. Yauw ST, Wever KE, Hoesseini A, Ritskes-Hoitinga M, van Goor H. Systematic review of experimental studies on intestinal anastomosis. *Br J Surg*. 2015;102(7):726-34.
146. Komen N, van der Wal HC, Ditzel M, Kleinrensink GJ, Jeekel H, Lange JF. Colorectal anastomotic leakage: a new experimental model. *J Surg Res*. 2009;155(1):7-12.
147. Nordentoft T, Sorensen M. Leakage of colon anastomoses: development of an experimental model in pigs. *Eur Surg Res*. 2007;39(1):14-6.
148. Stergios K, Kontzoglou K, Pergialiotis V, Korou LM, Frountzas M, Lalude O, et al. The potential effect of biological sealants on colorectal anastomosis healing in experimental research involving severe diabetes. *Ann R Coll Surg Engl*. 2017;99(3):189-92.
149. Alamo JM, Galindo A, Morales S, Daza G, Socas M, Suarez-Artacho G, et al. [Role of malnutrition in intestinal anastomosis collagenization: an analysis of procollagen (PINP) and carboxyterminal telopeptide (ICTP) by radioimmunoassay]. *Rev Esp Enferm Dig*. 2007;99(2):76-83.
150. Mansson P, Zhang XW, Jeppsson B, Thorlacius H. Anastomotic healing in the rat colon: comparison between a radiological method, breaking strength and bursting pressure. *Int J Colorectal Dis*. 2002;17(6):420-5.
151. Ikeuchi D, Onodera H, Aung T, Kan S, Kawamoto K, Imamura M, et al. Correlation of Tensile Strength with Bursting Pressure in the Evaluation of Intestinal Anastomosis. *Dig Surg*. 1999;16(6):478-85.
152. Duraes Lde C, Duraes EF, Lobato LF, Oliveira PG, Sousa JB. Correlation between bursting pressure and breaking strength in colonic anastomosis. *Acta Cir Bras*. 2013;28(6):447-52
153. Soares Júnior C, Souza Cd. Uso de 2-octil cianoacrilato em anastomose colônica: estudo experimental em ratos wistar. *Rev Col Bras Cir*. 2010;37:128-34.
154. Weiber S, Jiborn H, Zederfeldt B. Preoperative irradiation and colonic healing. *Eur J Surg Suppl*. 1994;160(1):47-51
155. Soares C. Fatores intervenientes e métodos de avaliação das anastomoses gastrointestinais. *Rev Med Minas Gerais*. 2010;20.3:273-388
156. Oxlund H, Christensen H, Seyer-Hansen M, Andreassen TT. Collagen deposition and mechanical strength of colon anastomoses and skin incisional wounds of rats. *J Surg Res*. 1996;66(1):25-30.
157. Bode MK, Karttunen TJ, Makela J, Risteli L, Risteli J. Type I and III collagens in human colon cancer and diverticulosis. *Scand J Gastroenterol*. 2000;35(7):747-52.
158. Bruce J, Krukowski ZH, Al-Khairy G, Russell EM, Park KG. Systematic review of the definition and measurement of anastomotic leak after gastrointestinal surgery. *Br J Surg*. 2001;88(9):1157-68.

159. Cong ZJ, Hu LH, Bian ZQ, Ye GY, Yu MH, Gao YH, et al. Systematic review of anastomotic leakage rate according to an international grading system following anterior resection for rectal cancer. *PloS one*. 2013;8(9):e75519.
160. Rahbari NN, Weitz J, Hohenberger W, Heald RJ, Moran B, Ulrich A, et al. Definition and grading of anastomotic leakage following anterior resection of the rectum: a proposal by the International Study Group of Rectal Cancer. *Surgery*. 2010;147(3):339-51.
161. Nasirkhan MU, Abir F, Longo W, Kozol R. Anastomotic disruption after large bowel resection. *World J Gastroenterol*. 2006;12(16):2497-504.
162. Morse BC, Simpson JP, Jones YR, Johnson BL, Knott BM, Kotrady JA. Determination of independent predictive factors for anastomotic leak: analysis of 682 intestinal anastomoses. *Am J Surg*. 2013;206(6):950-5; discussion 5-6.
163. Ortega A, Sánchez D. Fuga anastomótica en colon y recto. In: JM RR, editor. *Cuadernos de coloproctología*. 1ª ed. Zaragoza: Prensas de la Universidad de Zaragoza; 2015. p. 123-38.
164. Buchs NC, Gervaz P, Secic M, Bucher P, Mugnier-Konrad B, Morel P. Incidence, consequences, and risk factors for anastomotic dehiscence after colorectal surgery: a prospective monocentric study. *Int J Colorectal Dis*. 2008;23(3):265-70.
165. Platell C, Barwood N, Dorfmann G, Makin G. The incidence of anastomotic leaks in patients undergoing colorectal surgery. *Colorectal Dis*. 2007;9(1):71-9.
166. Daams F, Wu Z, Lahaye MJ, Jeekel J, Lange JF. Prediction and diagnosis of colorectal anastomotic leakage: A systematic review of literature. *World J Gastrointest Surg*. 2014;6(2):14-26.
167. Kingham TP, Pachter HL. Colonic anastomotic leak: risk factors, diagnosis, and treatment. *J Am Coll Surg*. 2009;208(2):269-78.
168. Hyman N, Manchester TL, Osler T, Burns B, Cataldo PA. Anastomotic leaks after intestinal anastomosis: it's later than you think. *Ann Surg*. 2007;245(2):254-8.
169. Telem DA, Chin EH, Nguyen SQ, Divino CM. Risk factors for anastomotic leak following colorectal surgery: a case-control study. *Arch Surg*. 2010;145(4):371-6; discussion 6.
170. Singh PP, Zeng IS, Srinivasa S, Lemanu DP, Connolly AB, Hill AG. Systematic review and meta-analysis of use of serum C-reactive protein levels to predict anastomotic leak after colorectal surgery. *Br J Surg*. 2014;101(4):339-46.
171. Mann B, Kleinschmidt S, Stremmel W. Prospective study of hand-sutured anastomosis after colorectal resection. *Br J Surg*. 1996;83(1):29-31.
172. Vasiliu EC, Zarnescu NO, Costea R, Neagu S. Review of Risk Factors for Anastomotic Leakage in Colorectal Surgery. *Chirurgia (Bucur)*. 2015;110(4):319-26.
173. McDermott FD, Heeney A, Kelly ME, Steele RJ, Carlson GL, Winter DC. Systematic review of preoperative, intraoperative and postoperative risk factors for colorectal anastomotic leaks. *Br J Surg*. 2015;102(5):462-79.

174. Kang CY, Halabi WJ, Chaudhry OO, Nguyen V, Pigazzi A, Carmichael JC, et al. Risk factors for anastomotic leakage after anterior resection for rectal cancer. *JAMA surgery*. 2013;148(1):65-71.
175. Kawada K, Sakai Y. Preoperative, intraoperative and postoperative risk factors for anastomotic leakage after laparoscopic low anterior resection with double stapling technique anastomosis. *World J Gastroenterol*. 2016;22(25):5718-27.
176. Qu H, Liu Y, Bi DS. Clinical risk factors for anastomotic leakage after laparoscopic anterior resection for rectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Surg Endosc*. 2015;29(12):3608-17.
177. Trencheva K, Morrissey KP, Wells M, Mancuso CA, Lee SW, Sonoda T, et al. Identifying important predictors for anastomotic leak after colon and rectal resection: prospective study on 616 patients. *Ann Surg*. 2013;257(1):108-13.
178. Kim MJ, Shin R, Oh HK, Park JW, Jeong SY, Park JG. The impact of heavy smoking on anastomotic leakage and stricture after low anterior resection in rectal cancer patients. *World J Surg*. 2011;35(12):2806-10.
179. Moran B, Heald R. Anastomotic leakage after colorectal anastomosis. *Semin Surg Oncol*. 2000;18(3):244-8.
180. Baucom RB, Poulouse BK, Herline AJ, Muldoon RL, Cone MM, Geiger TM. Smoking as dominant risk factor for anastomotic leak after left colon resection. *Am J Surg*. 2015;210(1):1-5.
181. Eriksen TF, Lassen CB, Gogenur I. Treatment with corticosteroids and the risk of anastomotic leakage following lower gastrointestinal surgery: a literature survey. *Colorectal Dis*. 2014;16(5):O154-60.
182. Konishi T, Watanabe T, Kishimoto J, Nagawa H. Risk factors for anastomotic leakage after surgery for colorectal cancer: results of prospective surveillance. *J Am Coll Surg*. 2006;202(3):439-44..
183. Slieker JC, Komen N, Mannaerts GH, Karsten TM, Willemsen P, Murawska M, et al. Long-term and perioperative corticosteroids in anastomotic leakage: a prospective study of 259 left-sided colorectal anastomoses. *Arch Surg*. 2012;147(5):447-52.
184. Slim K, Joris J, Beloeil H, Groupe Francophone de Rehabilitation Ameliorée apres C. Colonic anastomoses and non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Visc Surg*. 2016;153(4):269-75.
185. Pommergaard HC, Gessler B, Burcharth J, Angenete E, Haglind E, Rosenberg J. Preoperative risk factors for anastomotic leakage after resection for colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Colorectal Dis*. 2014;16(9):662-71.
186. Kobayashi M, Mohri Y, Ohi M, Inoue Y, Araki T, Okita Y, et al. Risk factors for anastomotic leakage and favorable antimicrobial treatment as empirical therapy for intra-abdominal infection in patients undergoing colorectal surgery. *Surg Today*. 2014;44(3):487-93.
187. Marijnen CA, Kapiteijn E, van de Velde CJ, Martijn H, Steup WH, Wiggers T, et al. Acute side effects and complications after short-term preoperative radiotherapy combined with total

mesorectal excision in primary rectal cancer: report of a multicenter randomized trial. *J Clin Oncol*. 2002;20(3):817-25.

188. Park JS, Huh JW, Park YA, Cho YB, Yun SH, Kim HC, et al. Risk Factors of Anastomotic Leakage and Long-Term Survival After Colorectal Surgery. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95(8):e2890.

189. Hu X, Cheng Y. A Clinical Parameters-Based Model Predicts Anastomotic Leakage After a Laparoscopic Total Mesorectal Excision: A Large Study With Data From China. *Medicine (Baltimore)*. 2015;94(26):e1003.

190. Lenhardt R, Hopf HW, Marker E, Akca O, Kurz A, Scheuenstuhl H, et al. Perioperative collagen deposition in elderly and young men and women. *Arch Surg*. 2000;135(1):71-4.

191. Rullier E, Laurent C, Garrelon JL, Michel P, Saric J, Parneix M. Risk factors for anastomotic leakage after resection of rectal cancer. *BJS*. 1998;85(3):355-8.

192. Law W-I, Chu K-W, Ho JWC, Chan C-W. Risk factors for anastomotic leakage after low anterior resection with total mesorectal excision. *Am J Surg*. 2000;179(2):92-6.

193. Lipska MA, Bissett IP, Parry BR, Merrie AEH. Anastomotic leakage after lower gastrointestinal anastomosis: men are at a higher risk. *ANZ J Surg*. 2006;76(7):579-85.

194. Caziuc A, Dindelegan GC, Mironiuc A. Operator-related risk factors of anastomotic leaks after colorectal surgery: an up-to-date. *Clujul Med*. 2015;88(2):124-7.

195. Kim JS, Cho SY, Min BS, Kim NK. Risk factors for anastomotic leakage after laparoscopic intracorporeal colorectal anastomosis with a double stapling technique. *J Am Coll Surg*. 2009;209(6):694-701.

196. Biondo S, Kreisler E, Millan M, Fraccalvieri D, Golda T, Frago R, et al. Impact of surgical specialization on emergency colorectal surgery outcomes. *Arch Surg*. 2010;145(1):79-86.

197. MacRae HM, McLeod RS. Handsewn vs. stapled anastomoses in colon and rectal surgery: a meta-analysis. *Dis Colon Rectum*. 1998;41(2):180-9.

198. Lustosa SA, Matos D, Atallah AN, Castro AA. Stapled versus handsewn methods for colorectal anastomosis surgery: a systematic review of randomized controlled trials. *Sao Paulo Med J*. 2002;120(5):132-6.

199. Rondelli F, Bugiantella W, Vedovati MC, Balzarotti R, Avenia N, Mariani E, et al. To drain or not to drain extraperitoneal colorectal anastomosis? A systematic review and meta-analysis. *Colorectal Dis*. 2014;16(2):O35-42.

200. Karliczek A, Jesus EC, Matos D, Castro AA, Atallah AN, Wiggers T. Drainage or nondrainage in elective colorectal anastomosis: a systematic review and meta-analysis. *Colorectal Dis*. 2006;8(4):259-65.

201. Leichtle SW, Mouawad NJ, Welch KB, Lampman RM, Cleary RK. Risk factors for anastomotic leakage after colectomy. *Dis Colon Rectum*. 2012;55(5):569-75.

202. Post IL, Verheijen PM, Pronk A, Siccama I, Houweling PL. Intraoperative blood pressure changes as a risk factor for anastomotic leakage in colorectal surgery. *Int J Colorectal Dis.* 2012;27(6):765-72.
203. Phillips B. Reducing gastrointestinal anastomotic leak rates: review of challenges and solutions. *Department of Surgery Faculty Papers.* 2016;9:5-14.
204. Choi DH, Hwang JK, Ko YT, Jang HJ, Shin HK, Lee YC, et al. Risk factors for anastomotic leakage after laparoscopic rectal resection. *J Korean Soc Coloproctol.* 2010;26(4):265-73.
205. Rose J, Schneider C, Yildirim C, Geers P, Scheidbach H, Köckerling F. Complications in laparoscopic colorectal surgery: Results of a multicentre trial. *Tech Coloproctol.* 2004 Nov;8 Suppl 1:s25-8.
206. Yasui M, Takemasa I, Miyake Y, Hata T, Ikeda M, Miyake Y, et al. Tumor Size as an Independent Risk Factor for Postoperative Complications in Laparoscopic Low Anterior Resection for Advanced Rectal Cancer: A Multicenter Japanese Study. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech.* 2017;27(2):98-103.
207. Daams F, Luyer M, Lange JF. Colorectal anastomotic leakage: aspects of prevention, detection and treatment. *World J Gastroenterol.* 2013;19(15):2293-7.
208. den Dulk M, Witvliet MJ, Kortram K, Neijenhuis PA, de Hingh IH, Engel AF, et al. The DULK (Dutch leakage) and modified DULK score compared: actively seek the leak. *Colorectal Dis.* 2013;15(9):e528-33.
209. Ruiz-Tovar J, Morales-Castineirasc V, Lobo-Martinez E. Postoperative complications of colon surgery. *Cir Cir.* 2010;78(3):281-88.
210. Dupre A, Slim K. Anastomotic leakage after colorectal surgery: can it be detected earlier and more easily? *J Visc Surg.* 2012;149(5):e287-8.
211. Komen N, Slieker J, Willemsen P, Mannaerts G, Pattyn P, Karsten T, et al. Acute phase proteins in drain fluid: a new screening tool for colorectal anastomotic leakage? The APPEAL study: analysis of parameters predictive for evident anastomotic leakage. *Am J Surg.* 2014;208(3):317-23.
212. Bakker IS, Grossmann I, Henneman D, Havenga K, Wiggers T. Risk factors for anastomotic leakage and leak-related mortality after colonic cancer surgery in a nationwide audit. *Br J Surg.* 2014;101(4):424-32; discussion 432.
213. Ashraf SQ, Burns EM, Jani A, Altman S, Young JD, Cunningham C, et al. The economic impact of anastomotic leakage after anterior resections in English NHS hospitals: are we adequately remunerating them? *Colorectal Dis.* 2013;15(4):e190-8.
214. Mirnezami A, Mirnezami R, Chandrakumaran K, Sasapu K, Sagar P, Finan P. Increased local recurrence and reduced survival from colorectal cancer following anastomotic leak: systematic review and meta-analysis. *Ann Surg.* 2011;253(5):890-9.
215. Espin E, Ciga MA, Pera M, Ortiz H, Spanish Rectal Cancer P. Oncological outcome following anastomotic leak in rectal surgery. *Br J Surg.* 2015;102(4):416-22.

216. Hirst NA, Tiernan JP, Millner PA, Jayne DG. Systematic review of methods to predict and detect anastomotic leakage in colorectal surgery. *Colorectal Dis.* 2014;16(2):95-109.
217. Dekker JW, Liefers GJ, de Mol van Otterloo JC, Putter H, Tollenaar RA. Predicting the risk of anastomotic leakage in left-sided colorectal surgery using a colon leakage score. *J Surg Res.* 2011;166(1):e27-34.
218. Ricciardi R, Roberts PL, Marcello PW, Hall JF, Read TE, Schoetz DJ. Anastomotic leak testing after colorectal resection: what are the data? *Arch Surg.* 2009;144(5):407-11; discussion 411-2.
219. Li VK, Wexner SD, Pulido N, Wang H, Jin HY, Weiss EG, et al. Use of routine intraoperative endoscopy in elective laparoscopic colorectal surgery: can it further avoid anastomotic failure? *Surg Endosc.* 2009;23(11):2459-65.
220. Karliczek A, Benaron DA, Baas PC, Zeebregts CJ, Wiggers T, Van Dam GM. Intraoperative assessment of microperfusion with visible light spectroscopy for prediction of anastomotic leakage in colorectal anastomoses. *Colorectal Dis.* 2010;12(10):1018-25.
221. Sujatha-Bhaskar S, Jafari M, Stamos M. The Role of Fluorescent Angiography in Anastomotic Leaks. *Surg Technol Int.* 2017 Jul 25;30:83-88.
222. Keller DS, Ishizawa T, Cohen R, Chand M. Indocyanine green fluorescence imaging in colorectal surgery: overview, applications, and future directions. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2017;2(10):757-66.
223. Jafari MD, Wexner SD, Martz JE, McLemore EC, Margolin DA, Sherwinter DA, et al. Perfusion Assessment in Laparoscopic Left-Sided/Anterior Resection (PILLAR II): A Multi-Institutional Study. *J Am Coll Surg.* 2015;220(1):82-92.e1.
224. Almeida AB, Faria G, Moreira H, Pinto-de-Sousa J, Correia-da-Silva P, Maia JC. Elevated serum C-reactive protein as a predictive factor for anastomotic leakage in colorectal surgery. *Int J Surg.* 2012;10(2):87-91.
225. Nason GJ, Barry BD, Obinwa O, McMacken E, Rajaretnam NS, Neary PC. Early rise in C-reactive protein is a marker for infective complications in laparoscopic colorectal surgery. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech.* 2014;24(1):57-61.
226. Garcia-Granero A, Frasson M, Flor-Lorente B, Blanco F, Puga R, Carratala A, et al. Procalcitonin and C-reactive protein as early predictors of anastomotic leak in colorectal surgery: a prospective observational study. *Dis Colon Rectum.* 2013;56(4):475-83.
227. Giaccaglia V, Salvi PF, Cunsolo GV, Sparagna A, Antonelli MS, Nigri G, et al. Procalcitonin, as an early biomarker of colorectal anastomotic leak, facilitates enhanced recovery after surgery. *J Crit Care.* 2014;29(4):528-32.
228. Uğraş B, Giriş M, Erbil Y, Gökpınar M, Çıtlak G, İşsever H, et al. Early prediction of anastomotic leakage after colorectal surgery by measuring peritoneal cytokines: Prospective study. *Int J Surg.* 6(1):28-35.
229. Cini C, Wolthuis A, D'Hoore A. Peritoneal fluid cytokines and matrix metalloproteinases as early markers of anastomotic leakage in colorectal anastomosis: a literature review and meta-analysis. *Colorectal Dis.* 2013;15(9):1070-7.

230. Yang L, Huang XE, Xu L, Zhou X, Zhou JN, Yu DS, et al. Acidic pelvic drainage as a predictive factor for anastomotic leakage after surgery for patients with rectal cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013;14(9):5441-7.
231. Doeksen A, Tanis PJ, Wust AF, Vrouwenraets BC, van Lanschot JJ, van Tets WF. Radiological evaluation of colorectal anastomoses. *Int J Colorectal Dis*. 2008;23(9):863-8.
232. Sanchez-Gonzalez DJ, Mendez-Bolaina E, Trejo-Bahena NI. Platelet-rich plasma peptides: key for regeneration. *Int J Pept*. 2012;2012:532519.
233. Tablin F, Walker NJ, Klein SD, Field CL, Crowe JH. Animal models for studies on cold-induced platelet activation in human beings. *J Lab Clin Med*. 2000;135(4):339-46.
234. Anitua E, Andia I, Ardanza B, Nurden P, Nurden AT. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost*. 2004;91(1):4-15.
235. Kang YH, Jeon SH, Park JY, Chung JH, Choung YH, Choung HW, et al. Platelet-rich fibrin is a Bioscaffold and reservoir of growth factors for tissue regeneration. *Tissue Eng Part A*. 2011;17(3-4):349-59.
236. Steed DL. The role of growth factors in wound healing. *Surg Clin North Am*. 1997;77(3):575-86.
237. Martinuzzo M. Sistema de coagulación. *Hematología*. 2017 Aug;21:31-42.
238. Díaz-Martínez M, Ruiz-Villaverde R. Aplicaciones del plasma rico en plaquetas como terapia en dermatología. *Mas Dermatol*. 2016;24:4-10.
239. Giannini S, Cielo A, Bonanome L, Rastelli C, Derla C, Corpaci F, et al. Comparison between PRP, PRGF and PRF: lights and shadows in three similar but different protocols. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2015;19(6):927-30.
240. Miron R, Fujioka-Kobayashi M, Bishara M, Zhang Y, Hernández M, Choukroun J. Platelet Rich Fibrin and Soft Tissue Wound Healing: A Systematic Review. *Tissue Eng Part B Rev*. 2017 Feb;23(1):83-99.
241. Giusti I, Di Francesco M, D'Ascenzo S, Palumbo P, Rughetti A, Dell'Orso L, et al. Leukocyte depletion does not affect the in vitro healing ability of platelet rich plasma. *Exp Ther Med*. 2018;15(4):4029-38.
242. Giusto G, Vercelli C, Iussich S, Tursi M, Perona G, Gandini M. Comparison of the effects of platelet-rich or growth factor-rich plasma on intestinal anastomosis healing in pigs. *BMC Vet Res*. 2017;13:188.
243. Davis VL, Abukabda AB, Radio NM, Witt-Enderby PA, Clafshenkel WP, Cairone JV, et al. Platelet-Rich Preparations to Improve Healing. Part II: Platelet Activation and Enrichment, Leukocyte Inclusion, and Other Selection Criteria. *J Oral Implantol*. 2014;40(4):511-21. *Leukocyte Inclusion, and Other Selection Criteria. Journal of Oral Implantology*. 2014;40(4):511-21.
244. Wu PIK, Diaz R, Borg-Stein J. Platelet-Rich Plasma. *Phys Med Rehabil Clin N Am*. 2016;27(4):825-53.

245. Moreno R, Gaspar Carreño M, Jiménez Torres J, Alonso Herreros JM, Villimar A, López Sánchez P. Técnicas de obtención del plasma rico en plaquetas y su empleo en terapéutica osteoinductora. *Farm Hosp.* 2015;39(3):130-6.
246. Iwamoto R, Mekada E. Heparin-binding EGF-like growth factor: a juxtacrine growth factor. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2000;11(4):335-44.
247. Ganapathy N, Venkataraman SS, Daniel R, Aravind RJ, Kumarakrishnan VB. Molecular biology of wound healing. *J Pharm Bioallied Sci.* 2012;4(Suppl 2):S334-7.
248. Jones MK, Tomikawa M, Mohajer B, Tarnawski AS. Gastrointestinal mucosal regeneration: role of growth factors. *Front Biosci.* 1999;4:D303-9.
249. Traversa B, Sussman G, Bsussman G T. The role of growth factors, cytokines and proteases in wound management. *Wound practice and research : Journal of the Australian Wound Management Association.* 2001;9(4):161-7.
250. Grazul-Bilska AT, Johnson ML, Bilski JJ, Redmer DA, Reynolds LP, Abdullah A, et al. Wound healing: the role of growth factors. *Drugs Today (Barc).* 2003;39(10):787-800.
251. Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev.* 2003;83(3):835-70.
252. Penn JW, Grobbelaar AO, Rolfe KJ. The role of the TGF-beta family in wound healing, burns and scarring: a review. *Int J Burns Trauma.* 2012;2(1):18-28.
253. Sosa-Garrocho M. El factor de crecimiento transformante beta (tgf-b): funciones y vías de transducción. *REB.* 2004;1(23):3-11.
254. Peralta-Zaragoza O, Lagunas-Martinez A, Madrid-Marina V. Transforming growth factor beta-1: structure, function, and regulation mechanisms in cancer. *Salud pública Méx.* 2001;43(4):340-51.
255. Demidova-Rice TN, Hamblin MR, Herman IM. Acute and impaired wound healing: pathophysiology and current methods for drug delivery, part 2: role of growth factors in normal and pathological wound healing: therapeutic potential and methods of delivery. *Adv Skin Wound Care.* 2012;25(8):349-70.
256. Prieto M, Rivas JV, Lopez Novoa JM, Perez-Barriocanal F. TGF-beta: synthesis and mechanism of action. *Nefrologia.* 2002;22(2):135-43.
257. Taipale J, Miyazono K, Heldin CH, Keski-Oja J. Latent transforming growth factor-beta 1 associates to fibroblast extracellular matrix via latent TGF-beta binding protein. *J Cell Biol.* 1994;124(1-2):171-81.
258. Biancheri P, Giuffrida P, Docena GH, MacDonald TT, Corazza GR, Di Sabatino A. The role of transforming growth factor (TGF)-beta in modulating the immune response and fibrogenesis in the gut. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2014;25(1):45-55.
259. Venkatraman L, Chia SM, Narmada BC, White JK, Bhowmick SS, Forbes Dewey C, Jr., et al. Plasmin triggers a switch-like decrease in thrombospondin-dependent activation of TGF-beta1. *Biophys J.* 2012;103(5):1060-8.

260. White LA, Mitchell TI, Brinckerhoff CE. Transforming growth factor beta inhibitory element in the rabbit matrix metalloproteinase-1 (collagenase-1) gene functions as a repressor of constitutive transcription. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1490(3):259-68.
261. Sporn MB, Roberts AB. Transforming growth factor-beta: recent progress and new challenges. *J Cell Biol*. 1992;119(5):1017-21.
262. Fan C, Dong Y, Xie Y, Su Y, Zhang X, Leavesley D, et al. Shikonin reduces TGF-beta1-induced collagen production and contraction in hypertrophic scar-derived human skin fibroblasts. *Int J Mol Med*. 2015;36(4):985-91.
263. Fukuchi SG, Seeburger JL, Parquet G, Rolandelli RH. Influence of 5-fluorouracil on colonic healing and expression of transforming growth factor-beta 1. *J Surg Res*. 1999;84(2):121-6.
264. Beer HD, Longaker MT, Werner S. Reduced expression of PDGF and PDGF receptors during impaired wound healing. *J Invest Dermatol*. 1997;109(2):132-8.
265. Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev*. 1999;79(4):1283-316.
266. Fredriksson L, Li H, Eriksson U. The PDGF family: four gene products form five dimeric isoforms. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2004;15(4):197-204.
267. Andrae J, Gallini R, Betsholtz C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev*. 2008;22(10):1276-312.
268. Li H, Fu X, Zhang L, Huang Q, Wu Z, Sun T. Research of PDGF-BB gel on the wound healing of diabetic rats and its pharmacodynamics. *J Surg Res*. 2008;145(1):41-8.
269. Bonner JC. Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2004;15(4):255-73.
270. Akita S, Akino K, Hirano A. Basic Fibroblast Growth Factor in Scarless Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2013;2(2):44-9.
271. Bao P, Kodra A, Tomic-Canic M, Golinko MS, Ehrlich HP, Brem H. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. *J Surg Res*. 2009;153(2):347-58.
272. Moens S, Goveia J, Stapor PC, Cantelmo AR, Carmeliet P. The multifaceted activity of VEGF in angiogenesis - Implications for therapy responses. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2014;25(4):473-82.
273. Vempati P, Popel AS, Mac Gabhann F. Extracellular regulation of VEGF: isoforms, proteolysis, and vascular patterning. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2014;25(1):1-19.
274. Xie K, Wei D, Shi Q, Huang S. Constitutive and inducible expression and regulation of vascular endothelial growth factor. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2004;15(5):297-324.

275. Corral CJ, Siddiqui A, Wu L, Farrell CL, Lyons D, Mustoe TA. Vascular endothelial growth factor is more important than basic fibroblastic growth factor during ischemic wound healing. *Arch Surg.* 1999;134(2):200-5.
276. Phelps EA, Garcia AJ. Update on therapeutic vascularization strategies. *Regen Med.* 2009;4(1):65-80.
277. Boilly B, Vercoutter-Edouart AS, Hondermarck H, Nurcombe V, Le Bourhis X. FGF signals for cell proliferation and migration through different pathways. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2000;11(4):295-302.
278. Presta M, Dell'Era P, Mitola S, Moroni E, Ronca R, Rusnati M. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005;16(2):159-78.
279. Katsuno A, Aimoto T, Uchida E, Tabata Y, Miyamoto M, Tajiri T. The controlled release of basic fibroblast growth factor promotes a rapid healing of pancreaticojejunal anastomosis with potent angiogenesis and accelerates apoptosis in granulation tissue. *J Surg Res.* 2011;167(1):166-72..
280. Shen C, Sun L, Zhu N, Qi F. Kindlin-1 contributes to EGF-induced re-epithelialization in skin wound healing. *Int J Mol Med.* 2017;39(4):949-59.
281. Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. *J Biol Chem.* 1990;265(14):7709-12.
282. Palencia L, Das A, Palecek SP, Thibeault SL, Leydon C. Epidermal growth factor mediated healing in stem cell-derived vocal fold mucosa. *J Surg Res.* 2015;197(1):32-8.
283. Herbst RS. Review of epidermal growth factor receptor biology. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004;59(2 Suppl):21-6.
284. Schlessinger J. Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. *Cell.* 2002;110(6):669-72
285. Wong RW, Guillaud L. The role of epidermal growth factor and its receptors in mammalian CNS. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004;15(2-3):147-56.
286. Haase I, Evans R, Pofahl R, Watt FM. Regulation of keratinocyte shape, migration and wound epithelialization by IGF-1- and EGF-dependent signalling pathways. *J Cell Sci.* 2003;116(Pt 15):3227-38.
287. Le Roith D. Insulin-Like Growth Factors. *N Engl J Med.* 1997;336(9):633-40.
288. Bach LA. Endothelial cells and the IGF system. *J Mol Endocrinol.* 2015;54(1):R1-13.
289. Jones JI, Doerr ME, Clemmons DR. Cell migration: interactions among integrins, IGFs and IGFBPs. *Prog Growth Factor Res.* 1995;6(2-4):319-27.
290. Nakamura T, Mizuno S. The discovery of hepatocyte growth factor (HGF) and its significance for cell biology, life sciences and clinical medicine. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2010;86(6):588-610.

291. Maulik G, Shrikhande A, Kijima T, Ma PC, Morrison PT, Salgia R. Role of the hepatocyte growth factor receptor, c-Met, in oncogenesis and potential for therapeutic inhibition. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2002;13(1):41-59.
292. Omoto M, Suri K, Amouzegar A, Li M, Katikireddy KR, Mittal SK, et al. Hepatocyte Growth Factor Suppresses Inflammation and Promotes Epithelium Repair in Corneal Injury. *Mol Ther.* 2017;25(8):1881-1888.
293. van de Kamp J, Jahnen-Dechent W, Rath B, Knuechel R, Neuss S. Hepatocyte growth factor-loaded biomaterials for mesenchymal stem cell recruitment. *Stem Cells Int.* 2013;2013:892065.
294. Weber DR, Stanescu DE, Semple R, Holland C, Magge SN. Continuous subcutaneous IGF-1 therapy via insulin pump in a patient with Donohue syndrome. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2014;27(11-12):1237-41.
295. Hanaire-Broutin H, S-CB, Poncet MF, Tauber M, Bastide R, Chale JJ, Rosenfeld R, Tauber JP. Effect of intraperitoneal insulin delivery on growth hormone binding protein, insulin-like growth factor (IGF)-I, and IGF-binding protein-3 in IDDM. *Diabetologia.* 1996;39(12):1498-504.
296. Beck LS, DeGuzman L, Lee WP, Xu Y, Siegel MW, Amento EP. One systemic administration of transforming growth factor-beta 1 reverses age- or glucocorticoid-impaired wound healing. *J Clin Invest.* 1993;92(6):2841-9.
297. Mangieri CW, McCartt JC, Strode MA, Lowry JE, Balakrishna PM. Perioperative hepatocyte growth factor (HGF) infusions improve hepatic regeneration following portal branch ligation (PBL) in rodents. *Surg Endosc.* 2017;31(7):2789-97.
298. Yamakawa S, Hayashida K. Advances in surgical applications of growth factors for wound healing. *Burns Trauma.* 2019;7:10.
299. Miron RJ, Fujioka-Kobayashi M, Bishara M, Zhang Y, Hernandez M, Choukroun J. Platelet-Rich Fibrin and Soft Tissue Wound Healing: A Systematic Review. *Tissue Eng Part B Rev.* 2017;23(1):83-99.
300. Barrientos S, Brem H, Stojadinovic O, Tomic-Canic M. Clinical application of growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen.* 2014;22(5):569-78.
301. Dise RS, Frey MR, Whitehead RH, Polk DB. Epidermal growth factor stimulates Rac activation through Src and phosphatidylinositol 3-kinase to promote colonic epithelial cell migration. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2008;294(1):G276-85.
302. Vale PR, Losordo DW, Symes JF, Isner JM. Growth factors for therapeutic angiogenesis in cardiovascular diseases. *Rev Esp Cardiol.* 2001;54(10):1210-24.
303. Andree C, Swain WF, Page CP, Macklin MD, Slama J, Hatzis D, et al. In vivo transfer and expression of a human epidermal growth factor gene accelerates wound repair. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(25):12188-92.
304. Heher P, Muhleder S, Mittermayr R, Redl H, Slezak P. Fibrin-based delivery strategies for acute and chronic wound healing. *Adv Drug Deliv Rev.* 2017.

305. de la Portilla F, García-Cabrera AM, Pereira S, de Marco F, Molero M, Muntane J, et al. An Experimental Study on the Use of Calcium Alginate to Heal Colonic Anastomoses. *J Invest Surg.* 2016;29(1):32-9
306. Rajangam T, An SS. Fibrinogen and fibrin based micro and nano scaffolds incorporated with drugs, proteins, cells and genes for therapeutic biomedical applications. *Int J Nanomedicine.* 2013;8:3641-62.
307. Rosas JE, Pedraz JL. Microesferas de PLGA: un sistema para la liberación controlada de moléculas con actividad inmunogénica. *Rev Colomb Cienc Quím Farm.* 2007. 2007;36(2).
308. Park JW, Hwang SR, Yoon I-S. Advanced Growth Factor Delivery Systems in Wound Management and Skin Regeneration. *Molecules.* 2017;22(8):1259.
309. Makadia HK, Siegel SJ. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers.* 2011;3(3):1377-97.
310. Perets A, Baruch Y, Weisbuch F, Shoshany G, Neufeld G, Cohen S. Enhancing the vascularization of three-dimensional porous alginate scaffolds by incorporating controlled release basic fibroblast growth factor microspheres. *J Biomed Mater Res A.* 2003;65(4):489-97.
311. Gainza G, Aguirre JJ, Pedraz JL, Hernandez RM, Igartua M. rhEGF-loaded PLGA-Alginate microspheres enhance the healing of full-thickness excisional wounds in diabetised Wistar rats. *Eur J Pharm Sci.* 2013;50(3-4):243-52.
312. Han K, Lee KD, Gao ZG, Park JS. Preparation and evaluation of poly(L-lactic acid) microspheres containing rhEGF for chronic gastric ulcer healing. *J Control Release.* 2001;75(3):259-69.
313. Sakallioğlu AE, Yagmurlu A, Dindar H, Hasirci N, Renda N, Deveci MS. Sustained local application of low-dose epidermal growth factor on steroid-inhibited colonic wound healing. *J Pediatr Surg.* 2004;39(4):591-5.
314. Nerstrom M, Krarup PM, Jorgensen LN, Agren MS. The Effect of a Synthetic Heparan Sulfate on the Healing of Colonic Anastomoses. *Gastroenterol Res Pract.* 2017;2017:1078062.
315. Kim B. Western Blot Techniques. *Methods Mol Biol.* 2017;1606:133-9.
316. Strandberg G, Sellberg F, Sommar P, Ronaghi M, Lubenow N, Knutson F, et al. Standardizing the freeze-thaw preparation of growth factors from platelet lysate. *Transfusion.* 2017;57(4):1058-65.
317. Zimmermann R, Arnold D, Strasser E, Ringwald J, Schlegel A, Wiltfang J, et al. Sample preparation technique and white cell content influence the detectable levels of growth factors in platelet concentrates. *Vox Sang.* 2003;85(4):283-9.
318. Mageed M, Ionita C, Kissich C, Brehm W, Winter K, Ionita JC. Influence of cryopreservation and mechanical stimulation on equine Autologous Conditioned Plasma (ACP®). *Tierarztl Prax Ausg G.* 2015;43(02):97-104.

319. Lippi G, Musa R, Aloe R, Mercadanti M, Pipitone S. Influence of temperature and period of freezing on the generation of hemolysate and blood cell lysate. *Clin Biochem.* 2011;44(14):1267-9.
320. Wen Y-H, Lin W-Y, Lin C-J, Sun Y-C, Chang P-Y, Wang H-Y, et al. Sustained or higher levels of growth factors in platelet-rich plasma during 7-day storage. *Clin Chim Acta.* 2018;483:89-93.
321. Hosnuter M, Aslan C, Isik D, Caliskan G, Arslan B, Durgun M. Functional assessment of autologous platelet-rich plasma (PRP) after long-term storage at -20°C without any preservation agent. *J Plast Surg Hand Surg.* 2017;51(4):235-9.
322. Sekido Y, Morishima Y, Ohya K-i. Activity of Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) in Platelet Concentrates and Cryopreserved Platelets Determined by PDGF Bioassay. *Vox Sang.* 1987;52(1-2):27-30.
323. Ávila-Portillo L, Madero J, López C, León M. Fundamentos de criopreservación. *Rev Colomb Obstet Ginecol.* 2016;57(4):291-00.
324. 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;14(4):529-35.
325. Engvall E, Perlmann P. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Elisa. III Quantitation of Specific Antibodies by Enzyme-Labeled Anti-Immunoglobulin in Antigen-Coated Tubes. *J Immunol.* 1972;109(1):129-35.
326. Voller A, Bidwell DE, Bartlett A. Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Theory and practice. *Bull World Health Organ.* 1976;53(1):55-65.
327. JE B. The amplified ELISA: principles of and applications for the comparative quantitation of class and subclass antibodies and the distribution of antibodies and antigens in biochemical separates. *Methods Enzymol.* 1981;Pt B(73):482-523.
328. Hornbeck PV. Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. *Curr Protoc Immunol.* 2015;110(1):2.1.-2.1.23.
329. Dziki AJ DM, Harmon JW, Saini N, Malthaner RA, Trad KS, Fernicola MT, Hakki F, Ugarte RM. Advantages of handsewn over stapled bowel anastomosis. *Dis Colon Rectum.* 1991 Jun;6(34):442-8.
330. Orsay CP BE, Firfer B, Ramakrishnan V, Abcarian H. Blood flow in colon anastomotic stricture formation. *Dis Colon Rectum.* 1995 Feb;2(38):202-6.
331. Knightly JJ, Agostino D, Clifton EE. The effect of fibrinolysin and heparin on the formation of peritoneal adhesions. *Surgery.* 1962;52:250-8.
332. Houdart R, Lavergne A, Galian A, Hautefeuille P. Anatomic-pathological evolution of single-layer end-to-end digestive anastomoses. A study of 210 colonic anastomoses in rats from the 2d to the 180th day. *Gastroenterol Clin Biol.* 1983;7(5):465-73.
333. Russell WM. The development of the three Rs concept. *Altern Lab Anim.* 1995;23(3):298-304.

334. Council NR. Education and Training in the Care and Use of Laboratory Animals: A Guide for Developing Institutional Programs. Washington, DC: The National Academies Press; 1991. 152 p.
335. Obrink KJ, Reh binder C. Animal definition: a necessity for the validity of animal experiments? *Lab Anim.* 2000;34(2):121-30.
336. Ioannidis A, Zoikas A, Wexner SD. Current Evidence of Combination of Oral Antibiotics and Mechanical Bowel Preparation in Elective Colorectal Surgery and Their Impact on Anastomotic Leak. *Surg Innov.*0(0):1553350619851672.
337. Midura EF, Hanseman D, Davis BR, Atkinson SJ, Abbott DE, Shah SA, et al. Risk Factors and Consequences of Anastomotic Leak After Colectomy: A National Analysis. *Dis Colon Rectum.* 2015;58(3):333-8.
338. Nordholm-Carstensen A, Schnack Rasmussen M, Krarup P-M. Increased Leak Rates Following Stapled Versus Handsewn Ileocolic Anastomosis in Patients with Right-Sided Colon Cancer: A Nationwide Cohort Study. *Dis Colon Rectum.* 2019;62(5):542-8.
339. Zhang H, Tan K, Fan C, Du J, Li J, Yang T, et al. Magnetic compression anastomosis for enteroenterostomy under peritonitis conditions in dogs. *J Surg Res.* 2017;208:60-7.
340. Alemdaroğlu C, Degim Z, Celebi N, Şengezer M, Alömeroglu M, Nacar A. Investigation of epidermal growth factor containing liposome formulation effects on burn wound healing. *J Biomed Mater Res A.* 2008;85A(1):271-83.
341. Niiyama H KY. Development of novel wound dressing composed of hyaluronic acid and collagen sponge containing epidermal growth factor and vitamin C derivative. *J Artif Organs.* 2014;17(1):81-7.
342. Scognamiglio F, Travan A, Bussani R, Borgogna M, Donati I, Bosmans JWAM, et al. Development of hyaluronan-based membranes for the healing of intestinal surgical wounds: a preliminary study. *J Mater Sci Mater Med.* 2019;30(6):60.
343. Hardwicke J, Ferguson E, Moseley R, Stephens P, Thomas D, Duncan R. Dextrin–rhEGF conjugates as bioresponsive nanomedicines for wound repair. *J Control Release.* 2008;130(3):275-83.
344. Kim H, Kong WH, Seong K-Y, Sung DK, Jeong H, Kim JK, et al. Hyaluronate—Epidermal Growth Factor Conjugate for Skin Wound Healing and Regeneration. *Biomacromolecules.* 2016;17(11):3694-705.
345. Suárez-Barrio C, Etxebarria J, Hernáez-Moya R, Del Val-Alonso M, Rodríguez-Astigarraga M, Urkaregi A, et al. Hyaluronic Acid Combined with Serum Rich in Growth Factors in Corneal Epithelial Defects. *Int J Mol Sci.* 2019;20(7):1655.
346. Hong JP, Kim YW, Lee SK, Kim SH, Min KH. The Effect of Continuous Release of Recombinant Human Epidermal Growth Factor (rh-EGF) in Chitosan Film on Full Thickness Excisional Porcine Wounds. *Ann Plast Surg.* 2008;61(4):457-62.
347. Wang Z, Wang Z, Lu WW, Zhen W, Yang D, Peng S. Novel biomaterial strategies for controlled growth factor delivery for biomedical applications. *NPG Asia Mater.* 2017;9:e435.

348. Rodríguez Flores J, Palomar Gallego MA, Torres García-Denche J. Plasma rico en plaquetas: fundamentos biológicos y aplicaciones en cirugía maxilofacial y estética facial. *Rev Esp Cirug Oral y Maxilofac.* 2012;34(1):8-17.
349. Carlos Ligocki Campos A, Borges-Branco A, Karoline Groth A. Wound healing 2007. 51-8 p.
350. Horwitz AL, Hance AJ, Crystal RG. Granulocyte collagenase: selective digestion of type I relative to type III collagen. *Natl Acad Sci U S A.* 1977;74(3):897-901.
351. Yol S, Tekin A, Yilmaz H, Küçükkartallar T, Esen H, Çağlayan O, et al. Effects of Platelet Rich Plasma on Colonic Anastomosis. *J Surg Res.* 2008;146(2):190-4.
352. Fresno L, Fondevila D, Bambo O, Chacaltana A, Garcia F, Andaluz A. Effects of platelet-rich plasma on intestinal wound healing in pigs. *Vet J.* 2010;185(3):322-7.
353. Campos AC, Borges-Branco A, Karoline Groth A. Cicatrização de feridas. *ABCD, Arq Bras Cir Dig.* 2007;20(1):51-8.
354. Hogstrom H, Haglund U. Postoperative decrease in suture holding capacity in laparotomy wounds and anastomoses. *Acta Chir Scand.* 1985;151(6):533-5.
355. Nelsen TS, Anders CJ. Dynamic aspects of small intestinal rupture with special consideration of anastomotic strength. *Arch Surg.* 1966;93(2):309-14.
356. Hoepfner J, Wassmuth B, Marjanovic G, Timme S, Hopt UT, Keck T. Anastomotic sealing by extracellular matrices (ECM) improves healing of colonic anastomoses in the critical early phase. *J Gastrointest Surg.* 2010;14(6):977-86.
357. Brasken P, Lehto M, Renvall S. Fibronectin, laminin, and collagen types I, III, IV and V in the healing rat colon anastomosis. *Ann Chir Gynaecol.* 1990;79(2):65-71.
358. Brasken P, Renvall S, Sandberg M. Fibronectin and collagen gene expression in healing experimental colonic anastomoses. *Br J Surg.* 1991;78(9):1048-52.
359. Agren MS, Andersen TL, Mirastschijski U, Syk I, Schiodt CB, Surve V, et al. Action of matrix metalloproteinases at restricted sites in colon anastomosis repair: an immunohistochemical and biochemical study. *Surgery.* 2006;140(1):72-82.
360. Rehn M. Experimental Colonic Obstruction and Anastomotic Healing. Department of Clinical Sciences, Lund University, 2012. 124 p. (Lund University Faculty of Medicine Doctoral Dissertation Series).
361. Sundman EA, Cole BJ, Fortier LA. Growth Factor and Catabolic Cytokine Concentrations Are Influenced by the Cellular Composition of Platelet-Rich Plasma. *Am J Sports Med.* 2011;39(10):2135-40.
362. Yamaguchi R, Terashima H, Yoneyama S, Tadano S, Ohkohchi N. Effects of platelet-rich plasma on intestinal anastomotic healing in rats: PRP concentration is a key factor. *J Surg Res.* 2012;173(2):258-66.

363. Anitua E, Sánchez M, Nurden AT, Nurden P, Orive G, Andía I. New insights into and novel applications for platelet-rich fibrin therapies. *Trends Biotechnol.* 2006;24(5):227-34.
364. Brown Mahoney C, Hoffmann JJML, Schönberger JPAM, Box HAM, van Zundert A, Knape JTA. Platelet-rich plasma preparation using three devices: Implications for platelet activation and platelet growth factor release AU - Everts, Peter AM. *Growth Factors.* 2006;24(3):165-71.
365. Beca T, Hernández G, Morante S, Bascones A. Plasma rico en plaquetas: Una revisión bibliográfica. *Avances en Periodoncia.* 2007;19(1):39-52.
366. Graziani F, Ivanovski S, Cei S, Ducci F, Tonetti M, Gabriele M. The in vitro effect of different PRP concentrations on osteoblasts and fibroblasts. *Clin Oral Implants Res.* 2006;17(2):212-9.
367. Liu Y, Kalén A, Risto O, Wahlström O. Fibroblast proliferation due to exposure to a platelet concentrate in vitro is pH dependent. *Wound Repair Regen.* 2002;10(5):336-40.
368. Marx RE. Discussion. *J Oral Maxi Surg.* 2000;58(3):300-1.
369. Nagata MJH, Messoria MR, Furlaneto FAC, Fucini SE, Bosco AF, Garcia VG, et al. Effectiveness of two methods for preparation of autologous platelet-rich plasma: an experimental study in rabbits. *Eur J Dent.* 2010;4(4):395-402.
370. Perut F, Filardo G, Mariani E, Cenacchi A, Pratelli L, Devescovi V, et al. Preparation method and growth factor content of platelet concentrate influence the osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells. *Cytotherapy.* 2013;15(7):830-9.
371. Ra Hara G, Basu T. Platelet-rich plasma in regenerative medicine. *Biomedical Research and Therapy.* 2014;(1):25-31.
372. David MDE, Tomasz B, Ryo J, Giovanni B, Marco Del C, Francesco I, et al. 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 (P-PRP) Gel and a Leukocyte- and Platelet-Rich Fibrin (L-PRF). *Curr Pharm Biotechnol.* 2012;13(7):1145-52.
373. Schär MO, Diaz-Romero J, Kohl S, Zumstein MA, Nesic D. Platelet-rich concentrates differentially release growth factors and induce cell migration in vitro. *Clin Orthop Relat Res.* 2015;473(5):1635-43.
374. Kikuchi N, Yoshioka T, Taniguchi Y, Sugaya H, Arai N, Kanamori A, et al. Optimization of leukocyte-poor platelet-rich plasma preparation: a validation study of leukocyte-poor platelet-rich plasma obtained using different preparer, storage, and activation methods. *J Exp Orthop.* 2019;6(1):24.
375. Dinc S, Alagol H, Gulcelik MA, Ozbirecikli B, Kuru B, Renda N, et al. Locally Applied Granulocyte-macrophage Colony-stimulating Factor Improves the Impaired Bowel Anastomoses in Rats with Long-term Corticosteroid Treatment. *World journal of surgery.* 2002;26(10):1208-13.
376. Laron Z. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1): a growth hormone. *Mol Pathol.* 2001;54(5):311-6.