

Células estromales mesenquimales suspendidas en un gel de lisado plaquetario mejoran la cicatrización de heridas en ratones

Luciana da Rosa Zinn Sostizzo^{1,2} , Raul Marques Rodrigues² , Tuane Nerissa Alves Garcez¹ ,
Victor de Mello Palma³ , Annelise Martins Pezzi da Silva¹ , Vanessa de Souza Valim¹ ,
Ana Helena da Rosa Paz^{1,4} , Anelise Bergmann Araújo¹ , Alessandra Aparecida Paz¹ , Lucia Silla^{1,2*} 

RESUMEN

Objetivo: Evaluar la seguridad y la eficacia del tratamiento tópico de heridas con células estromales mesenquimales derivadas de médula ósea cultivadas y suspendidas en lisado plaquetario. **Método:** Estudio prospectivo, intervencionista y controlado con 42 ratones C57BL/6 con una herida por escisión inducida. Fueron divididos en cuatro grupos de tratamiento: hidrogel (tratamiento estándar para heridas), gel salino (control), gel de lisado plaquetario y gel de lisado plaquetario que contenía células estromales mesenquimales. Los análisis se realizaron el día 7 (n=5) y el día 13 (n=7) para inmunohistoquímica, y el día 21 (n=30) para seguridad. El seguimiento se llevó a cabo mediante evaluación clínica (eventos adversos, peso, dolor, comportamiento y reducción del tamaño de la herida) e histológica (cicatrización, vascularización y colagenización). **Resultados:** En relación con la seguridad, no se identificaron eventos adversos ni alteraciones fisiológicas relacionadas con el tratamiento. El grupo tratado con células presentó mejores resultados de cicatrización en las evaluaciones macro y microscópicas, seguido por el grupo tratado con gel de lisado plaquetario. **Conclusión:** La aplicación tópica de células estromales mesenquimales fue segura y mostró resultados favorables.

DESCRIPTORES: Cicatrización de Heridas. Célula Estromal Mesenquimatoso. Terapia Celular. Lisado de Plaquetas. Estomaterapia.

Mesenchymal stromal cells suspended in a platelet lysate gel improve wound healing in mice

ABSTRACT

Objective: To assess the safety and efficacy of topical wound treatment with mesenchymal stromal cells derived from bone marrow cultured and suspended in platelet lysate. **Method:** A prospective, interventional, controlled study was conducted with 42 C57BL/6 mice with induced excisional wounds. They were divided into four treatment groups: hydrogel (standard wound treatment), saline gel (control), platelet lysate gel, and platelet lysate gel containing mesenchymal stromal cells. Immunohistochemistry analyses were performed on day 7 (n=5) and day 13 (n=7), and safety on day 21 (n=30). Follow-up was conducted through clinical (adverse events,

¹Hospital de Clínicas de Porto Alegre  – Porto Alegre (RS), Brasil.

²Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Facultad de Medicina, Programa de Posgrado en Ciencias Médicas  – Porto Alegre (RS), Brasil.

³Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Facultad de Odontología  – Porto Alegre (RS), Brasil.

⁴Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde  – Porto Alegre (RS), Brasil.

*Autor correspondiente: lsilla@hcpa.edu.br

Editor de sección: Juliana Balbinot Reis Girondi 

Recibido: 25 de marzo de 2025 | Aceptado: 24 de marzo de 2026

Cómo citar: Sostizzo LRZ, Rodrigues RM, Garcez TNA, Palma VM, Silva AMP, Valim VS, et al. Células estromales mesenquimales suspendidas en un gel de lisado plaquetario mejoran la cicatrización de heridas en ratones. ESTIMA, Braz. J. Enterostomal Ther., São Paulo, v24, e1771, 2026. https://doi.org/10.30886/estima.v24.1771_ES

weight, pain, behavior, wound size reduction) and histological (healing, vascularization, collagenization) assessments. **Results:** Regarding safety, no adverse events or physiological changes related to the treatment were identified. The group treated with cells showed better results in wound healing through macro and microscopic assessments, followed by the platelet lysate gel group. **Conclusion:** The topical application of mesenchymal stromal cells was safe and showed favorable results.

KEYWORDS: Wound Healing. Mesenchymal Stromal Cell. Cell Therapy. Platelet Lysate. Stomatherapy.

Células estromais mesenquimais suspensas em gel de lisado de plaquetas melhoram a cicatrização de feridas em camundongos

RESUMO

Objetivo: Avaliar a segurança e a eficácia do tratamento tópico de feridas com células estromais mesenquimais derivadas da medula óssea cultivadas e suspensas em lisado plaquetário. **Método:** Estudo prospectivo intervencionista e controlado com 42 camundongos C57BL/6 com ferida excisional induzida. Eles foram divididos em quatro grupos de tratamento: hidrogel (tratamento padrão de feridas), gel salino (controle), gel de lisado de plaquetas e gel de lisado de plaquetas contendo as células estromais mesenquimais. As análises foram feitas no dia 7 (n=5) e no dia 13 (n=7) para imuno-histoquímica, e no dia 21 (n=30) para segurança. O acompanhamento ocorreu por meio de avaliação clínica (eventos adversos, peso, dor, comportamento, redução do tamanho da ferida) e histológica (cicatrização, vascularização, colagenização). **Resultados:** Em relação à segurança, não foram identificados eventos adversos ou alterações fisiológicas relacionados ao tratamento. O grupo tratado com células apresentou melhores resultados na cicatrização através das avaliações macro e microscópicas, seguido pelo grupo gel de lisado plaquetário. **Conclusão:** A aplicação tópica de células estromais mesenquimais foi segura e mostrou resultados favoráveis.

DESCRITORES: Cicatrização de feridas. Célula estromal mesenquimal. Terapia celular. Lisado plaquetário. Estomaterapia.

INTRODUCCIÓN

Las heridas se definen como la interrupción de cualquier tejido o de la integridad celular debido a lesiones mecánicas, físicas o metabólicas.¹ Diversas terapias buscan optimizar el tiempo de cicatrización; sin embargo, existen casos difíciles de curar o que no responden a ningún tratamiento disponible. En este contexto, las células estromales mesenquimales (CEMs) han demostrado ser candidatas potenciales para la cicatrización de heridas agudas y crónicas, independientemente de su etiología. Los estudios han demostrado la eficacia y la seguridad de las CEMs para el tratamiento de quemaduras,² úlceras del pie diabético³ y lesiones por presión, tanto en entornos preclínicos como clínicos,⁴ ayudando a restaurar el microambiente tisular.⁵ El efecto antiinflamatorio orquestado por las CEMs se debe a su capacidad para migrar hacia los sitios de inflamación y secretar moléculas bioactivas, como citocinas y factores de crecimiento, influyendo en otros tipos celulares y polarizando los macrófagos hacia un fenotipo proinflamatorio o antiinflamatorio⁶.

Las CEMs pueden aplicarse en heridas de diferentes maneras, como mediante inyecciones intramusculares o intradérmicas. Sin embargo, se han descrito complicaciones, ya que el entorno intra y perilesional ya se encuentra dañado.⁷ Las inyecciones sucesivas necesarias para una aplicación homogénea a lo largo del área de la herida pueden causar microlesiones importantes en pacientes con dificultades de cicatrización.⁸ La vía de administración más segura parece ser la tópica, idealmente en forma de gel, ya que el producto permanece en contacto con el lecho de la herida sin escurrirse.⁹

El lisado plaquetario es un producto biológico rico en factores de crecimiento, con un contenido proteico diverso y elevado, relacionado con procesos celulares esenciales como la proliferación, la morfogénesis, la diferenciación, la biosíntesis,

la adhesión y el metabolismo.¹⁰ Además de utilizarse como sustituto del suero fetal bovino, también puede aportar beneficios en la cicatrización, lo que requiere mayor investigación.¹¹ Generalmente preparado en forma líquida, cuando se gelatiniza puede servir como vehículo para las células, proporcionando una matriz que mantiene su viabilidad.¹² La asociación entre células madre y derivados plaquetarios, como el plasma rico en plaquetas o el gel de plasma en el cuidado de heridas, ha demostrado aumentar la capacidad regenerativa celular.¹³ Parece existir una modulación del metabolismo energético celular, que resulta en un mayor potencial proangiogénico¹⁴ y una mayor producción mitocondrial de trifosfato de adenosina, acelerando así el proceso de cierre de la herida y mejorando la elasticidad de la piel recién regenerada.

Este estudio preclínico tuvo como objetivo evaluar la seguridad y la eficacia de CEMs derivadas de médula ósea humana cultivadas en lisado plaquetario y producidas bajo condiciones de Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) para futuros ensayos clínicos sobre cicatrización de heridas.

OBJETIVOS

Evaluar la seguridad del tratamiento tópico de heridas con CEMs derivadas de médula ósea humana cultivadas y suspendidas en un gel de lisado plaquetario (mediante la evaluación de eventos adversos, aspectos conductuales, dolor y peso). De manera secundaria, se analizaron la viabilidad y la eficacia (aspecto de la cicatrización mediante la escala *Pressure Ulcer Scale for Healing* [PUSH], reducción del tamaño del área de la herida mediante medición, angiogénesis por inmunohistoquímica y fibras de colágeno).

MÉTODOS

Estudio *in vivo*, prospectivo y controlado realizado en la Unidad de Experimentación Animal del *Hospital de Clínicas de Porto Alegre* (HCPA), tras la aprobación del Comité de Ética en el Uso de Animales de la institución, bajo el número 2023-0051, y de la *Plataforma Brasil* bajo el Certificado de Presentación para Apreciación Ética 68762923.1.0000.5327. Todos los principios éticos de la experimentación animal fueron respetados durante todo el estudio, de acuerdo con la legislación local (Consejo Nacional para el Control de la Experimentación Animal). La directriz *Consolidated Standards of Reporting Trials* fue utilizada para la elaboración del proyecto de investigación.

Muestra

Cuarenta y dos ratones (*Mus musculus*) C57BL/6, machos, isogénicos, de 8 semanas de edad y con un peso corporal promedio de 21 gramos fueron estudiados. El tamaño de la muestra se calculó considerando un tamaño del efecto de $f=0,57$, con la tasa de cicatrización como desenlace, de acuerdo con un estudio similar, una significación (p) de 0,05 y una potencia estadística del 80% (G*Power software, v3.1.9.7)¹⁵.

Los animales fueron alojados individualmente en microaisladores con viruta de madera, bajo condiciones controladas de temperatura, humedad y ciclo luz-oscuridad. El alimento y el agua fueron ofrecidos *ad libitum*. Se realizó monitoreo del peso y de los aspectos conductuales.

Los animales fueron distribuidos aleatoriamente en los siguientes grupos:

Grupo 1 – Control: hidrogel (n=6);

Grupo 2 – Tratamiento: gel de lisado plaquetario (n=13);

Grupo 3 – Tratamiento: gel de lisado plaquetario que contenía CEM (n=15);

Grupo 4 – Control: gel salino (n=8).

El estudio se dividió en diferentes segmentos: hasta el día 7 (n=5) y el día 13 (n=7) para la evaluación inmunohistoquímica, y hasta el día 21 para la eventual aparición de eventos adversos y el análisis histológico (n=30, con 10 animales en cada grupo).

Anestesia, creación de heridas y analgesia

Los animales fueron sometidos a anestesia general inhalatoria utilizando isoflurano vaporizado en 500 mL de oxígeno (5% para inducción y 2–3% para mantenimiento), mediante una mascarilla facial. Bajo anestesia, se administró tramadol 20 mg·kg⁻¹ por vía intraperitoneal, seguido de la antisepsia de la región dorsal con una solución alcohólica de clorhexidina al 2%. Se indujo una herida excisional experimental delimitando el área de la lesión mediante una plantilla circular de 6 mm en la región dorsal entre ambas escápulas. La piel delimitada fue retirada, obteniéndose una herida de espesor total (epidermis, dermis e hipodermis) hasta la superficie externa de la fascia muscular. Durante el período posoperatorio, por tres días, los animales recibieron clorhidrato de tramadol (20 mg·kg⁻¹) por vía intraperitoneal cada 12 horas para el control del dolor. La evaluación del dolor se realizó utilizando la escala Grimace¹⁶.

Tratamiento

El hidrogel es un producto elaborado localmente por la farmacia industrial del HCPA, compuesto por 77,7% de agua, 20% de propilenglicol y 2,3% de carboximetilcelulosa. El gel salino está basado en cloruro de sodio al 0,9% y utiliza el mismo agente gelificante farmacéutico empleado en el gel de lisado plaquetario. La fórmula exacta de los productos (gel salino y gel de lisado plaquetario) es actualmente confidencial, según la recomendación del Centro de Innovación y Transferencia de Tecnología de la institución.

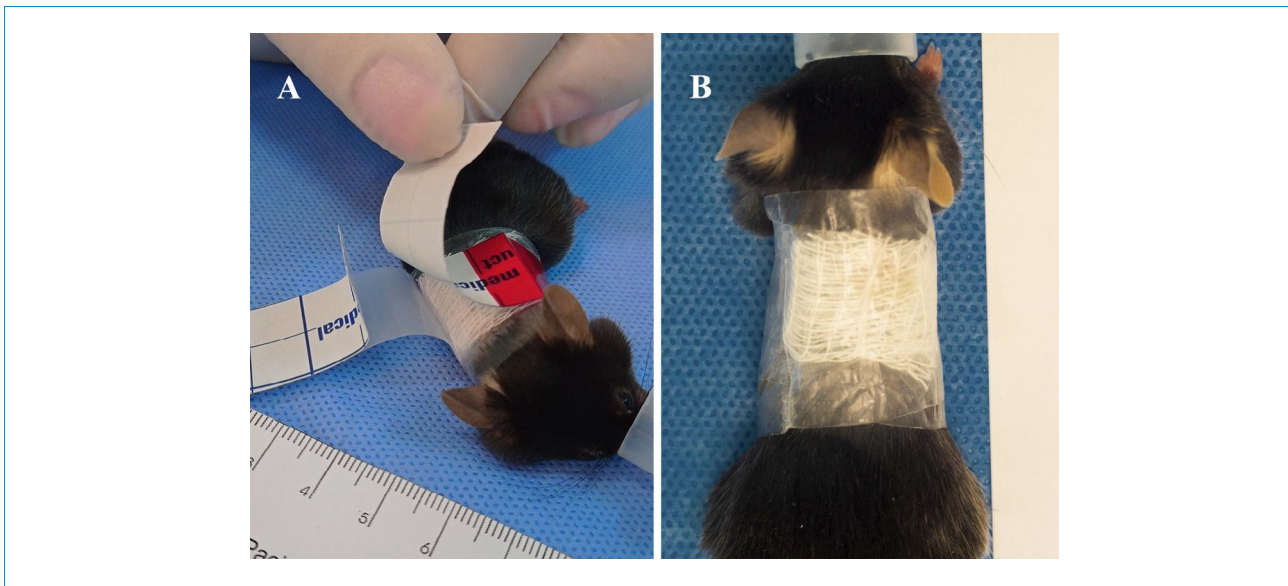
El lisado plaquetario se produjo a partir de un pool de bolsas de plaquetas humanas descartadas por el banco de sangre debido al vencimiento de su fecha de caducidad y tras resultados serológicos negativos para enfermedades infecciosas. El método de producción fue descrito previamente.¹⁷ En resumen, las plaquetas fueron sometidas a ciclos de congelación y descongelación para su activación, seguidos de centrifugación y filtración, adición de heparina y posterior transformación en gel mediante la incorporación de un agente gelificante.

Tras la obtención del consentimiento informado por escrito, las CEMs fueron obtenidas mediante el lavado de bolsas y filtros que serían descartados después del trasplante de médula ósea de donantes sanos. Las células fueron sembradas en medio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (Gibco) suplementado con lisado plaquetario hasta alcanzar un 80% de confluencia y fueron sometidas a tres pases mediante tripsinización (P0, P1 y P2).¹⁸ Fueron criopreservadas a -80 °C mientras se realizaban las pruebas de control de calidad (citometría de flujo, detección de micoplasma, análisis bacteriológico y endotoxinas). Se caracterizaron como >97% CD90+, CD75+, CD105+; ≤3% CD14+, CD34+, CD19+; y ≤3% CD45+, CD3+, HLA-DR+.¹⁹ En el momento de su utilización, fueron descongeladas y resuspendidas en gel de plaquetas a una concentración de 2 × 10⁶ células/cm² del área de la herida.²⁰ Para evaluar la viabilidad celular en el gel de lisado plaquetario se utilizaron dos métodos: Azul de Tripiano y el ensayo con colorante Tetrazolium (MTT).

Curación

Tras la aplicación tópica del tratamiento, las heridas fueron protegidas mediante una curación multicapa con el fin de respetar los principios de cicatrización, preservando la herida de contaminantes y traumatismos. La curación fue adaptada del modelo de Amorim.²¹ Como cobertura primaria, se utilizó una malla adhesiva de silicona (Cuticell® Contact) de 1,5 × 2 cm, seguida por una gasa estéril de algodón (Hérিকা®) del mismo tamaño y fijada mediante la aplicación de dos películas adhesivas transparentes de poliuretano (Hypafix®) de 3 × 8 cm. La primera película se fijó en dirección dorsoventral y la segunda en dirección opuesta, dando dos vueltas alrededor del cuerpo del animal (Figura 1).

La aplicación del tratamiento y los cambios de curación se realizaron los días 0, 3, 6 y 9 después de la cirugía, con los animales bajo sedación leve. El día 12, las curaciones fueron retiradas porque las heridas ya estaban prácticamente cicatrizadas. Durante los cambios de curación, las heridas fueron limpiadas con un hisopo estéril impregnado en solución salina al 0,9%. En caso de formación de costras, estas fueron retiradas cuidadosamente para permitir la reaplicación directa de los tratamientos sobre la lesión.



Fuente: Elaborada por los autores.

Figura 1. Curación multicapa. (A) Aplicación de la película transparente en dirección ventrodorsal, finalizando sobre las demás capas; (B) Resultado final de la curación fijada.

Evaluación clínica de las heridas

La evaluación macroscópica se realizó los días 0, 3, 6, 9, 12, 15 y 21 después de la escisión de la herida, con los animales bajo anestesia breve. Se observaron aspectos clínicos como dolor, prurito, excoriación, olor, infección, hiperemia, edema, costras, hematoma, cantidad y aspecto del exudado (seroso, serohemático, sanguinolento y purulento) y tipo de tejido (necrótico, esfacelo, granulación o epitelización). La evaluación de las heridas también se realizó mediante la *PUSH Tool* (U.S. *National Pressure Injury Advisory Panel*, Schaumburg, Illinois, Estados Unidos), validada para heridas humanas de diferentes etiologías. Las heridas fueron fotografiadas utilizando una cámara digital Sony® Alpha 7 con configuración ISO 400, un lente macro Sigma® de 50 mm con apertura f/8.0, únicamente con iluminación artificial ambiental y un soporte acrílico transparente, manteniendo la misma distancia en todas las fotografías. El área de la herida fue medida utilizando el *software ImageJ*® (U. S. *National Institutes of Health*, Bethesda, Maryland, USA).

Recolección de muestras y eutanasia

Con los animales bajo anestesia profunda con isoflurano, se retiraron fragmentos de piel que contenían el área de la herida y un margen de piel sana. La eutanasia se realizó mediante exanguinación bajo anestesia profunda y punción intracardiaca; posteriormente, se extrajeron el corazón, los pulmones, el bazo, los riñones y el hígado para análisis futuros. Las muestras recolectadas fueron inmediatamente colocadas en formaldehído tamponado al 10% y procesadas mediante la técnica rutinaria local de inclusión en parafina.

Evaluación microscópica de las heridas

Los aspectos microscópicos de la cicatrización analizados fueron infiltración inflamatoria, tipo de tejido, colagenización y vascularización. El patólogo desconocía los tratamientos administrados y utilizó un microscopio Nikon® Eclipse Si con aumento de 10×. Para la evaluación histológica, las secciones fueron teñidas con hematoxilina y eosina. La infiltración inflamatoria fue evaluada según su densidad y se asignó una puntuación de 0 a 3: 0 para ausencia de infiltración inflamatoria, 1 para infiltración leve, 2 para infiltración moderada y 3 para infiltración severa. En relación con el tipo de tejido, se consideró 0 cuando no fue posible identificar alteraciones respecto al resto de la lámina (indicando cicatrización completa) y 1 cuando se identificó tejido de granulación.

Las fibras de colágeno fueron evaluadas mediante la tinción Tricrómico de Masson. Se obtuvieron cinco imágenes de cada lámina y el área fue analizada con el *software* ImageJ®, utilizando el complemento “deconvolution of colors”. La colagenización fue cuantificada mediante el área promedio de los cinco campos. Para evaluar la angiogénesis, se utilizó la prueba inmunohistoquímica CD31, con un aumento de 20×. Se capturaron cinco imágenes y se contaron los vasos sanguíneos, totalizando los vasos presentes en cada muestra.

Estadística

El análisis estadístico se realizó utilizando el *software* SPSS (SPSS Inc. Released 2009. PASW Statistics for Windows, Version 18.0. Chicago: SPSS Inc.). La distribución de las variables con respecto a la normalidad fue evaluada mediante la prueba de Shapiro-Wilk y el gráfico Q-Q. Las variables categóricas, como células inflamatorias, tipo de tejido y edema, fueron comparadas entre los grupos utilizando la prueba exacta de Fisher.

Para comparar las características a lo largo del seguimiento entre los grupos, se utilizó el modelo de Ecuaciones de Estimación Generalizadas, con distribución binomial y función de enlace logit para variables categóricas dicotómicas, como la presencia de costras. Para variables continuas, como la medición del área de la herida, el grado de excoriación, la puntuación en la escala PUSH y el tipo de exudado, se utilizó el mismo análisis mediante Ecuaciones de Estimación Generalizadas, con distribución normal y función de enlace identidad.

Se consideró significativo un valor de p inferior a 0,05.

RESULTADOS

Dos animales se perdieron durante el período posoperatorio inmediato (uno debido a hemorragia y otro debido a una pérdida de peso superior al límite final establecido por la normativa ética para el uso de animales [$<10\%$]), por lo que fueron excluidos del estudio mediante sobredosis de isoflurano.

La viabilidad celular en el gel de lisado plaquetario fue verificada mediante el ensayo colorimétrico MTT y el método de Azul de Tripano, a través del cultivo en incubadora (37°C , 5% CO_2) durante diferentes períodos. Después de 24 horas, el 56% de las células permanecieron viables; después de 48 horas, el 26%; y después de 72 horas, el 11,5%. Los experimentos se realizaron por triplicado para cada método.

Los vendajes permanecieron cubriendo las heridas el 97,47% del tiempo; solamente cuatro animales los retiraron en una única ocasión cada uno. Los animales mostraron una atención constante a la presencia de los vendajes, intentando retirarlos persistentemente. Cuando se identificaron abrasiones, estas fueron tratadas con tintura de yodo al 2% únicamente en el sitio afectado.

Al comparar los grupos, no hubo diferencias en la pérdida de peso ($p=0,118$), sino únicamente variación del peso a lo largo del tiempo dentro de cada grupo ($p < 0,001$), ya que los animales recuperaron el peso en distintos momentos hasta alcanzar nuevamente su peso inicial (Tabla 1). Los animales del Grupo 3 recuperaron el peso mucho antes que los de los demás grupos.

Tabla 1. Peso de los animales. Comparación entre el peso promedio inicial de los animales por grupo antes del experimento (d-1) y el peso después del procedimiento (d+1), con los respectivos porcentajes de pérdida de peso y el tiempo necesario para recuperar el peso inicial.

Grupo	Peso promedio (d-1)	Peso promedio (d+1)	Pérdida de peso (%)	Tiempo para recuperar el peso inicial (días)
1. Hidrogel	22.45 (DE 2.57)	21.69 (DE 2.57)	3.39%	15
2. Gel de lisado plaquetario	20.83 (DE 2.30)	19.80 (DE 1.90)	4.4%	15
3. Gel de lisado plaquetario + CEMs	20.92 (DE 2.10)	20.40 (DE 1.86)	2.49%	3
4. Gel salino	19.83 (DE 1.54)	19.37 (DE 1.66)	2.32%	9

Peso en gramos.

d: días; DE: desviación estándar.

Fuente: Elaborada por los autores.

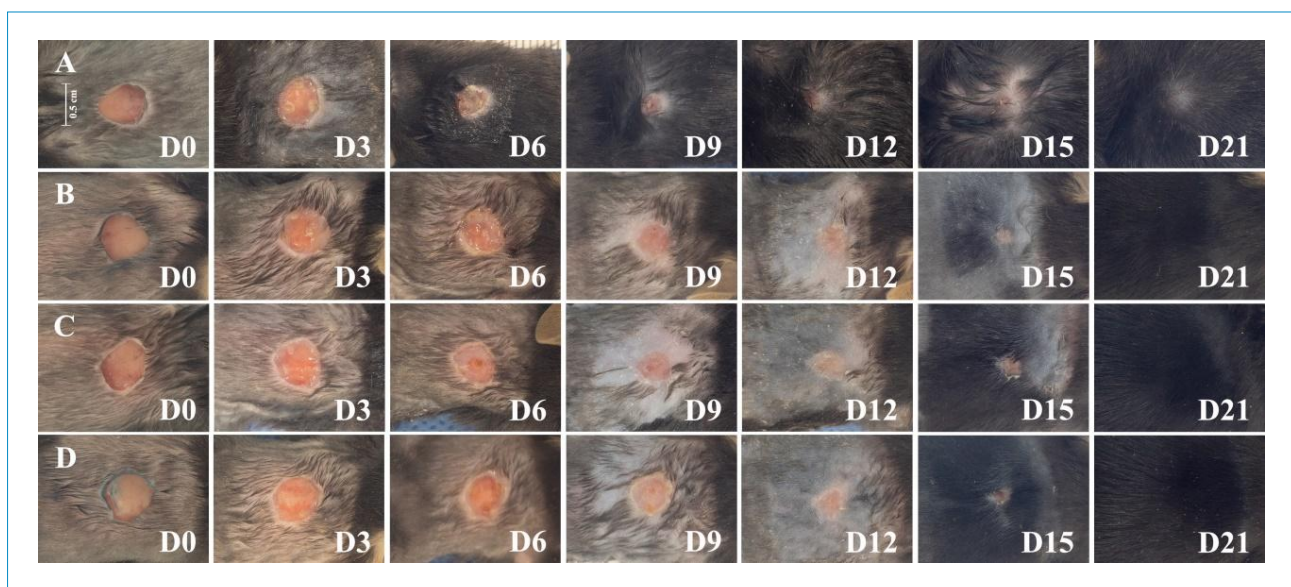
Los animales fueron evaluados en cuanto a aspectos conductuales y clínicos por el mismo evaluador no cegado. No se observaron alteraciones relacionadas con los tratamientos en términos de comportamiento o indicios de dolor. No se registraron eventos adversos graves, como deficiencia funcional o muerte. Los órganos no presentaron alteraciones macroscópicas durante la inspección *post mortem*. No se identificaron alteraciones en las heridas, tales como necrosis, dehiscencia, hematoma, hiperemia o signos de infección, incluida la presencia de contenido purulento, hiperemia o irritaciones como dermatitis perilesional, en ninguno de los grupos. Se identificó un edema leve en los bordes de las heridas el tercer día posoperatorio en todos los grupos, el cual desapareció en los días siguientes. El exudado drenado estuvo ausente durante la mayor parte del estudio (60,5%) y fue más frecuente durante los primeros días, disminuyendo hasta el día 12. El tipo de exudado más observado fue el seroso (26,3%), seguido del sanguinolento (10,5%) y del serohemático (2,6%). La ocurrencia de exudación fue similar entre los grupos. La formación de costras se observó desde el día 3 hasta el día 15 del experimento en el 30% de los animales de todos los grupos.

Inmediatamente después del procedimiento quirúrgico, las áreas escindidas no difirieron entre los grupos ($p=0,508$). En el día 3, se observó un aumento del 6,9% en el área (promedio de 0,31 mm) en los Grupos 1, 2 y 3; mientras que se observó una reducción en el Grupo 4. En los días posteriores, todos los grupos presentaron el mismo tamaño promedio de la herida hasta el cierre de la herida (día 12), la epitelización (día 15) y el crecimiento del pelo (día 21) (Figura 2). Hubo una diferencia entre los grupos en relación con el tamaño de la herida a lo largo del tiempo ($p=0,001$), debido a que el Grupo 3 presentó un cierre ligeramente más lento que los demás, mientras que el Grupo 4 alcanzó el cierre después de los otros grupos.

La escala PUSH se calcula mediante la suma de tres parámetros: área de la herida (puntuación de 0 a 10), cantidad de exudado (de 0 a 3) y apariencia del lecho de la herida (de 0 a 4). La puntuación máxima alcanzada fue de 6 puntos. Las puntuaciones disminuyeron con el tiempo en todos los grupos, indicando cicatrización. Los Grupos de tratamiento 2 y 3 presentaron puntuaciones ligeramente más bajas a lo largo del tiempo, indicando una tendencia hacia mejores parámetros de cicatrización ($p=0,027$).

Se observó una colagenización similar entre los grupos, con 196 fibras de colágeno en el Grupo 1 (promedio, DE 3,0), 191 en el Grupo 2 (DE 9,4), 186 en el Grupo 4 (DE 4,8) y 183 en el Grupo 3 (DE 4,8) (Figura 3).

Al evaluar la angiogénesis, el Grupo 3 presentó un mayor número de vasos (promedio de 51,6; DE 11,6), seguido por el Grupo 2 (46; DE 5,6), en comparación con el promedio de los Grupos control 1 y 4 (41,6; DE 0,7). Sin embargo, este resultado no alcanzó significación estadística ($p=0,493$) (Figura 3).



Fuente: Elaborada por los autores.

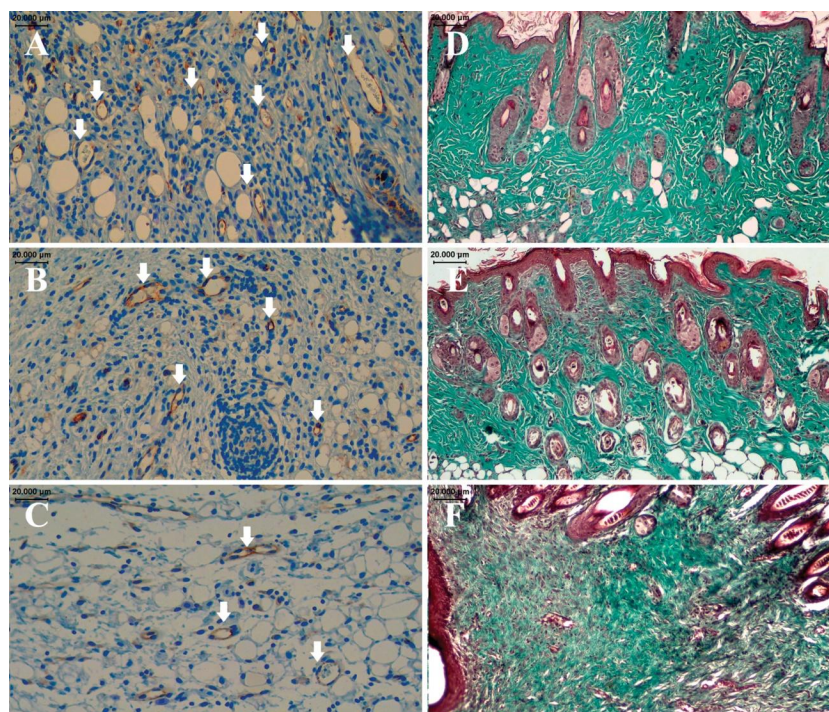
Figura 2. Cicatrización a lo largo del tiempo. Evolución de las heridas, representativa de cada grupo durante el período de seguimiento (D = días). (A) Grupo 1 – Hidrogel; (B) Grupo 2 – Gel de lisado plaquetario; (C) Grupo 3 – Células estromales mesenquimales + gel de lisado plaquetario; (D) Gel salino.

Los Grupos 2 y 3 mostraron un patrón similar de infiltrado inflamatorio leve, con puntuaciones promedio de 0,9 (DE 0,7) y 1,0 (DE 0,8), respectivamente. Los Grupos control 1 y 4 presentaron resultados opuestos: inflamación severa en el Grupo 1 (3 puntos; DE 0), la más elevada entre todos los grupos ($p < 0,001$), y el menor grado de inflamación en el Grupo 4 (promedio de 0,20; DE 0,4). El tejido de granulación estuvo presente en el 20,7% de los animales, siendo observado en el 100% de los animales del Grupo 1 y en el 20% de los del Grupo 3, a diferencia de los otros grupos ($p < 0,001$) (Figura 4).

DISCUSIÓN

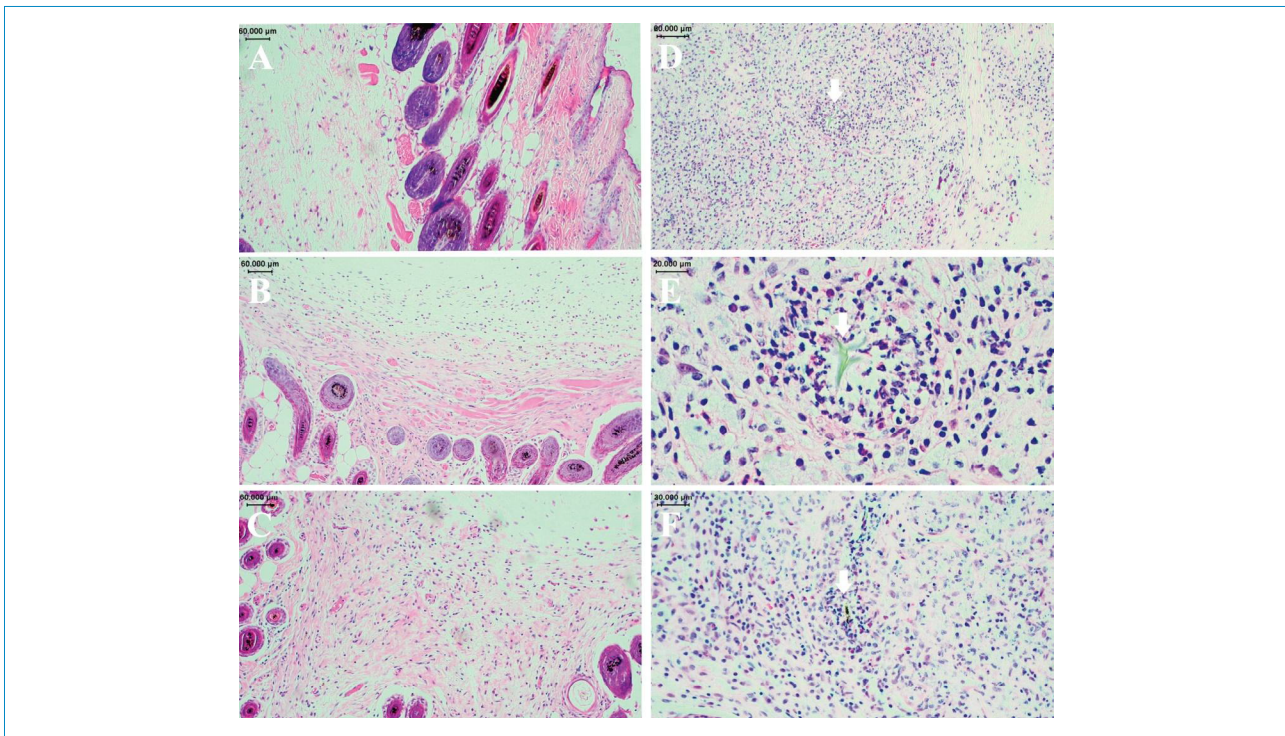
En este estudio se evaluó la seguridad del uso tópico de CEMs suspendidas en un gel de lisado plaquetario para el tratamiento de heridas en ratones. No se identificaron eventos adversos relacionados con el tratamiento. Las alteraciones fisiológicas, como la presencia de edema en los bordes de las heridas durante los primeros días posoperatorios, así como el drenaje de exudados y la formación de costras, ocurrieron de manera similar entre los grupos. Estos hallazgos son comunes durante la fase inflamatoria, en la cual el daño tisular actúa como estímulo inicial para la cicatrización, poniendo los componentes sanguíneos en contacto con el colágeno y otras sustancias de la matriz extracelular, lo que provoca la degranulación plaquetaria y la activación de la cascada de coagulación, con liberación de mediadores vasoactivos (como histamina, serotonina y bradicinina) y agentes quimiotácticos. Posteriormente, las células inflamatorias son atraídas hacia la herida, provocando calor, enrojecimiento y edema, este último debido al aumento de la permeabilidad capilar y al consecuente extravasamiento de líquidos hacia el espacio extracelular.

El modelo animal seleccionado para este estudio fue el ratón C57BL/6, el modelo más ampliamente utilizado en la investigación biomédica con células madre.²² Esta cepa también presenta uniformidad genética, lo que garantiza una respuesta fisiológica homogénea. En cuanto a la curación utilizada, esta permaneció fijada durante todo el estudio, lo que representa un desafío cuando se trabaja con roedores pequeños y activos. La curación aseguró la permanencia de los tratamientos y mantuvo protegida el área de la herida.



Fuente: Elaborada por los autores.

Figura 3. Evaluaciones microscópicas. En la primera columna, tinción CD31, con vasos sanguíneos identificados mediante flechas en el Grupo 3 (A), Grupo 2 (B) y Grupo 1 (C); en la segunda columna, colágeno teñido con Tricrómico de Masson en el Grupo 3 (D), Grupo 2 (E) y Grupo 1 (F).



Fuente: Elaborada por los autores.

Figura 4. Infiltrado inflamatorio. Tinción con hematoxilina y eosina, mostrando ausencia de infiltrado (A), infiltrado leve (B), infiltrado moderado (C), infiltrado severo (D) con tejido de granulación (flecha), y tejido de granulación (flecha) en (E) y (F).

El peso corporal es un importante predictor de la salud animal. Todos los ratones perdieron peso de manera similar durante el período posoperatorio ($p=0,118$), lo que era esperado. La cirugía para la creación de las heridas presentó un grado moderado de invasividad, ocasionando una extensa ulceración cutánea, manipulación constante, exposición a anestesia, dolor quirúrgico (a pesar de la analgesia administrada) y molestias derivadas de los cambios de curación. El tiempo necesario para recuperar el peso inicial fue diferente entre los grupos ($p < 0,001$), ya que el grupo tratado con células necesitó solamente tres días, probablemente porque las CEMs facilitaron la recuperación posoperatoria mediante una reducción del gasto energético, considerando que la cicatrización de heridas es un proceso con una elevada demanda metabólica⁵.

Todos los grupos alcanzaron la cicatrización completa de las heridas antes del final del período de observación (día 21). Las heridas tratadas con células presentaron un cierre ligeramente más lento, lo que puede explicarse por una mejora en el proceso de cicatrización. Este grupo mostró un menor tiempo de recuperación del peso corporal, tasas de cicatrización ligeramente mejores según la escala PUSH, un perfil inflamatorio leve y una tendencia hacia una mejor vascularización en comparación con los demás grupos. El lisado plaquetario presentó el mejor promedio en dicha escala a lo largo del tiempo y también mostró un perfil inflamatorio leve. El gel salino presentó el perfil inflamatorio más bajo y fue el único grupo que mostró reducción del tamaño de la herida el primer día posoperatorio; sin embargo, no cicatrizó antes que los demás grupos y presentó el tercer mejor promedio según la escala PUSH. El hidrogel mostró el perfil inflamatorio más elevado y los peores índices de cicatrización, con tendencia a presentar la menor vascularización y la mayor cantidad de tejido de granulación residual observado microscópicamente.

Aunque el grupo tratado con células, seguido por el grupo tratado con lisado plaquetario, presentó un mayor número de vasos sanguíneos en la herida, este resultado no pudo confirmarse estadísticamente debido al reducido tamaño de la muestra. Este estudio plantea la hipótesis de que estos grupos de tratamiento presentaron una mayor cantidad de vasos, en concordancia con la literatura, que atribuye este efecto a una mayor presencia de factor de crecimiento endotelial vascular, capaz de inducir la neoangiogénesis.²³ El análisis de seguridad fue priorizado sobre la evaluación de la eficacia del tratamiento para evitar el sacrificio de un mayor número de animales. Nuestros resultados preliminares concuerdan con la literatura disponible sobre el tema.

Microscópicamente, se identificó tejido de granulación en fragmentos de tejido de la herida de los animales del Grupo 1 (100%) y del Grupo 3 (20%) en el día 21. La persistencia del tejido de granulación en el Grupo 1 podría explicarse por su

peor desempeño en la cicatrización y su mayor perfil inflamatorio, lo que microscópicamente podría interpretarse como un retraso en el proceso de cicatrización en comparación con los demás grupos, ya que el tejido de granulación tiende a involucionar a medida que el infiltrado inflamatorio desaparece. El Grupo 3 también presentó tejido de granulación, probablemente porque su tasa de cicatrización fue ligeramente más lenta que la observada en los otros grupos, posiblemente reflejando un proceso de cicatrización más elaborado, que genera abundante tejido de granulación aún en proceso de degradación.

El número de fibras de colágeno fue considerado similar entre los grupos; sin embargo, podrían existir diferencias relacionadas con la calidad de las fibras que no fueron evaluadas. La dermis contiene aproximadamente un 80% de colágeno tipo I y un 20% de colágeno tipo III, mientras que el tejido de granulación puede contener hasta un 40% de colágeno tipo III, considerado inmaduro. Por lo tanto, se plantea la hipótesis de que los grupos con mejores resultados de cicatrización podrían haber desarrollado fibras de colágeno de mejor calidad.

En cuanto al infiltrado inflamatorio, el índice más elevado se observó en el grupo tratado con hidrogel, mientras que los grupos tratados con células y lisado plaquetario presentaron inflamación leve. El índice más bajo se observó en el grupo tratado con gel salino. La inflamación constituye una parte fundamental del proceso de cicatrización y puede conducir a una cicatrización inadecuada o retardada cuando es excesiva o insuficiente. El bajo perfil inflamatorio observado en el grupo tratado con gel salino no produjo beneficios, reforzando la idea de que cierto grado de inflamación es necesario para la cicatrización. Aunque las CEMs son reconocidas principalmente por sus propiedades antiinflamatorias,⁵ mantienen el microambiente con bajos niveles de interleucina-1 y factor de necrosis tumoral alfa, ambos mediadores proinflamatorios. Por lo tanto, poseen capacidad inmunomoduladora, aumentando la inflamación cuando es necesario y suprimiéndola cuando está excesivamente presente²⁴.

Las lesiones evaluadas en este estudio fueron agudas y carecían de una fisiopatología subyacente; por ello, se esperaba una respuesta inflamatoria controlada y el tratamiento consistió principalmente en el manejo del entorno local y la prevención de infecciones. En las heridas crónicas, que pueden presentar múltiples etiologías, siempre deben considerarse las condiciones clínicas subyacentes además de las medidas de manejo local. Las barreras para la recuperación asociadas a enfermedades de base y/o factores de riesgo incrementados pueden conducir a una evolución impredecible de la cicatrización, en la que la inflamación persistente debe ser controlada. Los tratamientos biológicos presentados en este estudio podrían investigarse con mayor profundidad en heridas de difícil cicatrización.

El gel de lisado plaquetario, además de mantener la viabilidad celular cuando se asocia con células mesenquimales, también confirmó sus propiedades biológicas en la cicatrización cuando se utilizó de forma aislada. Constituye una nueva posibilidad terapéutica porque proporciona vesículas, factores de crecimiento y otras moléculas reconocidas por su importancia en la quimiotaxis.¹⁰ Las CEMs confirmaron sus propiedades cicatrizantes, mostrando una tendencia hacia los mejores resultados del estudio. Todos los tratamientos fueron preparados de acuerdo con las directrices de BPM utilizadas para productos biológicos sometidos a manipulación, con trazabilidad del origen y material procedente de fuentes seguras, conforme exige la legislación nacional establecida por la Resolución de la Junta Colegiada 508 de la Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria²⁵.

El gel de lisado plaquetario, con o sin células, está en consonancia con las investigaciones recientes en bioingeniería, terapia celular y cuidado de heridas, que recomiendan el uso de biomateriales que actúan como andamios celulares, generando matrices tridimensionales. Es importante combinar las células mesenquimales con otras terapias regenerativas, proporcionando un medio para el transporte de factores solubles implicados en la cicatrización mediante una estructura similar a la matriz extracelular natural, con propiedades biocompatibles, bioactivas y biodegradables cuando liberan productos en sistemas biológicos. Por lo tanto, los tres productos desarrollados para este estudio mostraron resultados terapéuticos diferentes y alcanzaron el objetivo propuesto. Hasta donde sabemos, este es el primer estudio que evalúa la aplicación tópica en heridas de CEMs derivadas de médula ósea cultivadas y suspendidas en lisado plaquetario.

Limitaciones del estudio

Aunque el grupo tratado con células, seguido por el grupo tratado con lisado plaquetario, presentó un mayor número de vasos sanguíneos en la herida, este resultado no pudo confirmarse estadísticamente debido al reducido tamaño de la muestra. El número de muestras evaluadas mediante CD31 no se incrementó para evitar causar perjuicios adicionales a los animales en un aspecto cuya base científica ya se encuentra establecida. Se priorizó el análisis de seguridad, que se extendió hasta el

día 21. El número de fibras de colágeno fue considerado similar entre los grupos; sin embargo, pueden existir diferencias relacionadas con la calidad de las fibras que no pudieron ser verificadas.

Recomendaciones

Los resultados sugirieron que la combinación de células mesenquimales con gel de lisado plaquetario presentó mejores resultados de eficacia en la cicatrización de heridas, seguida por el gel de lisado plaquetario utilizado de forma aislada. Ambos tratamientos deben continuar siendo investigados como alternativas terapéuticas para ayudar a pacientes con heridas de difícil cicatrización.

CONCLUSIÓN

Las células madre mesenquimales derivadas de médula ósea humana producidas bajo condiciones de BPM fueron seguras cuando se aplicaron tópicamente sobre heridas en ratones, sin eventos adversos más allá de los efectos secundarios esperados del modelo de herida seleccionado. Los resultados sugirieron que la combinación de células mesenquimales con gel de lisado plaquetario presentó mejores resultados de eficacia en la cicatrización de heridas, seguida por el gel de lisado plaquetario utilizado de forma aislada. Ambos tratamientos deben continuar siendo investigados como alternativas terapéuticas para ayudar a pacientes con heridas de difícil cicatrización.

Agradecimientos: No aplica.

Contribuciones de los autores: LRZS: Administración del proyecto, Análisis formal, Conceptualización, Curación de datos, Redacción – borrador original, Redacción – revisión y edición, Investigación, Metodología. RMR: Conceptualización, Redacción – borrador original, Redacción – revisión y edición, Investigación, Metodología, Visualización. TNAG: Conceptualización, Metodología, Validación. VMP: Conceptualización, Investigación, Metodología, Visualización. AMPS: Conceptualización, Metodología. VSV: Metodología. AHRP: Conceptualización, Recursos. ABA: Recursos. AAP: Obtención de financiación, Recursos. LS: Conceptualización, Redacción – revisión y edición, Obtención de financiación, Recursos, Supervisión.

Disponibilidad de los datos de investigación: Todos los datos fueron generados o analizados en el presente estudio.

Financiación: *Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) del Hospital de Clínicas de Porto Alegre 2023-0051. Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) 01.08.0630.01.*

Conflicto de intereses: Vanessa de Souza Valim y Lucia Silla son las desarrolladoras del método de producción de lisado plaquetario utilizado en este estudio (*Instituto Nacional da Propriedade Industrial, BR1020130311693A8*).

REFERENCIAS

1. Lukomskyj AO, Rao N, Yan L, Pye JS, Li H, Wang B, et al. Stem cell-based tissue engineering for the treatment of burn wounds: a systematic review of preclinical studies. *Stem Cell Rev Rep*. 2022;18(6):1926-55. <https://doi.org/10.1007/s12015-022-10341-z>
2. Maranda E, Rodriguez-Menocal L, Badiavas E. Role of mesenchymal stem cells in dermal repair in burns and diabetic wounds. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2016;12(1):61-70. <https://doi.org/10.2174/1574888X11666160714115926>
3. Jin L, Wang X, Qiao Z, Deng Y. The safety and efficacy of mesenchymal stem cell therapy in diabetic lower extremity vascular disease: a meta-analysis and systematic review. *Cytotherapy*. 2022;24(3):225-34. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2021.08.001>
4. Torres-Guzman RA, Avila FR, Maita K, Garcia JP, De Sario GD, Borna S, et al. Mesenchymal stromal cell healing outcomes in clinical and pre-clinical models to treat pressure ulcers: a systematic review. *J Clin Med*. 2023;12(24):7545. <https://doi.org/10.3390/jcm12247545>
5. Oryan A, Alemzadeh E, Alemzadeh E, Barghi M, Zarei M, Salehiniya H. Effectiveness of the adipose stem cells in burn wound healing: literature review. *Cell Tissue Bank*. 2022;23(4):615-26. <https://doi.org/10.1007/s10561-021-09961-5>

6. Kyurkchiev D, Bochev I, Ivanova-Todorova E, Mourdjewa M, Oreshkova T, Belemezova K, et al. Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells*. 2014;6(5):552-70. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v6.i5.552>
7. Zhang C, Huang L, Wang X, Zhou X, Zhang X, Li L, et al. Topical and intravenous administration of human umbilical cord mesenchymal stem cells in patients with diabetic foot ulcer and peripheral arterial disease: a phase I pilot study with a 3-year follow-up. *Stem Cell Res Ther*. 2022;13(1):451. <https://doi.org/10.1186/s13287-022-03143-0>
8. Assis A, Camargo S, Margalit R, Mitrani E. Creation of a vascular inducing device using mesenchymal stem cells to induce angiogenesis. *J Biosci Bioeng*. 2021;132(4):408-16. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2021.06.012>
9. Sorrell JM, Caplan AI. Topical delivery of mesenchymal stem cells and their function in wounds. *Stem Cell Res Ther*. 2010;1(4):30. <https://doi.org/10.1186/scrt30>
10. Rodrigues RM, Valim VS, Berger M, Silva APM, Fachel FNS, Wilke II, et al. The proteomic and particle composition of human platelet lysate for cell therapy products. *J Cell Biochem*. 2022;123(9):1495-505. <https://doi.org/10.1002/jcb.30310>
11. Leon JM, Driver VR, Fylling CP, Carter MJ, Anderson C, Wilson J, et al. The clinical relevance of treating chronic wounds with an enhanced near-physiological concentration of platelet-rich plasma gel. *Adv Skin Wound Care*. 2011;24(8):357-68. <https://doi.org/10.1097/01.ASW.0000403249.85131.6f>
12. Alvarez-Viejo M, Romero-Rosal L, Perez-Basterrechea M, García-Gala JM, Hernando-Rodríguez P, Marana-Gonzalez J, et al. Plasma-based scaffold containing bone-marrow mononuclear cells promotes wound healing in a mouse model of pressure injury. *Cell Transplant*. 2024;33:9636897241251619. <https://doi.org/10.1177/09636897241251619>
13. Hersant B, Sid-Ahmed M, Braud L, Jourdan M, Baba-Amer Y, Meningaud JP, et al. Platelet-rich plasma improves the wound healing potential of mesenchymal stem cells through paracrine and metabolism alterations. *Stem Cells Int*. 2019;2019:1234263. <https://doi.org/10.1155/2019/1234263>
14. Levoux J, Prola A, Lafuste P, Gervais M, Chevallier N, Koumaiha Z, et al. Platelets facilitate the wound-healing capability of mesenchymal stem cells by mitochondrial transfer and metabolic reprogramming. *Cell Metab*. 2021;33(2):283-99.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.12.006>
15. Iacono E, Merlo B, Pirrone A, Antonelli C, Brunori L, Romagnoli N, et al. Effects of mesenchymal stem cells isolated from amniotic fluid and platelet-rich plasma gel on severe decubitus ulcers in a septic neonatal foal. *Res Vet Sci*. 2012;93(3):1439-40. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.04.008>
16. Langford DJ, Bailey AL, Chanda ML, Clarke SE, Drummond TE, Echols S, et al. Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nat Methods*. 2010;7(6):447-9. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1455>
17. Valim V, Amorin B, Pezzi A, Silva MAL, Alegretti AP, Silla L. Optimization of the cultivation of donor mesenchymal stromal cells for clinical use in cellular therapy. *CellBio*. 2014;3:25-33. <http://dx.doi.org/10.4236/cellbio.2014.31003>
18. Silla L, Valim V, Amorin B, Alegretti AP, Oliveira FS, Silva MAL, et al. A safety and feasibility study with platelet lysate expanded bone marrow mesenchymal stromal cells for the treatment of acute graft-versus-host disease in Brazil. *Leuk Lymphoma*. 2014;55(5):1203-5. <https://doi.org/10.3109/10428194.2013.823495>
19. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
20. Falanga V, Iwamoto S, Chartier M, Yufit T, Butmarc J, Kouttab N, et al. Autologous bone marrow-derived cultured mesenchymal stem cells delivered in a fibrin spray accelerate healing in murine and human cutaneous wounds. *Tissue Eng*. 2007;13(6):1299-312. <https://doi.org/10.1089/ten.2006.0278>
21. Amorim GL, Guillen MRS, Vieira PC, Barcelos LS, Borges EL. Contributions of nurses in basic research: dressing fixation model for excisional cutaneous wounds of mice. *ESTIMA Braz J Enterostomal Ther*. 2021;19:e1221. https://doi.org/10.30886/estima.v19.1038_IN
22. Galiano RD, Michaels Sth VJ, Dobryansky M, Levine JP, Gurtner GC. Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing. *Wound Repair Regen*. 2004;12(4):485-92. <https://doi.org/10.1111/j.1067-1927.2004.12404.x>
23. Sun Y, Zhao J, Zhang L, Li Z, Lei S. Effectiveness and safety of stem cell therapy for diabetic foot: a meta-analysis update. *Stem Cell Res Ther*. 2022;13(1):416. <https://doi.org/10.1186/s13287-022-03110-9>
24. Glenn JD, Whartenby KA. Mesenchymal stem cells: emerging mechanisms of immunomodulation and therapy. *World J Stem Cells*. 2014;6(5):526-39. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v6.i5.526>
25. Silva Junior JB, Silva AAR, Melo FCC, Kumoto MC, Parca RM. Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular Consensus on genetically modified cells. Special Article: Advanced therapy medicinal products in Brazil: regulatory panorama. *Hematol Transfus Cell Ther*. 2021;43(Suppl 2):S68-77. <https://doi.org/10.1016/j.htct.2021.09.010>