

**ESCUELA DE DOCTORADO DE CIENCIAS DE LA SALUD**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA**

**CLÍNICA Y SALUD PÚBLICA**



**UNIVERSIDAD  
DE GRANADA**

TESIS DOCTORAL

**EFFECTO BIOESTIMULANTE DEL LÁSER DE DIODO Y SU  
APLICABILIDAD EN LA REGENERACIÓN DE TEJIDOS BLANDOS:  
ÚLCERAS POR PRESIÓN**

Rebeca Illescas Montes

Granada, 2018

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: Rebeca Illescas Montes  
ISBN: 978-84-9163-856-8  
URI: <http://hdl.handle.net/10481/51158>

La doctoranda / The doctoral candidate Rebeca Illescas Montes y los directores de la tesis  
/ and the thesis supervisors: Concepción Ruíz Rodríguez y Javier Ramos Torrecillas

Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

/

*Guarantee, by signing this doctoral thesis, that the work has been done by the doctoral candidate under the direction of the thesis supervisor/s and, as far as our knowledge reaches, in the performance of the work, the rights of other authors to be cited (when their results or publications have been used) have been respected.*

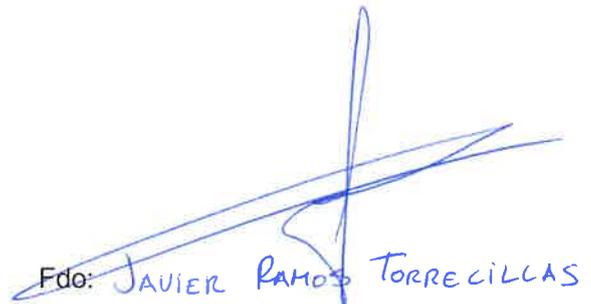
Lugar y fecha / Place and Date:

Granada, 21 de Marzo de 2018

Directores de la Tesis / Thesis supervisors:



Fdo: C. Ruíz Rodríguez



Fdo: JAVIER RAMOS TORRECILLAS

Doctorando / Doctoral candidate:



Fdo: Rebeca Illescas Montes

# ÍNDICE

RESUMEN .....	1
ABSTRACT.....	4
MARCO TEÓRICO.....	6
1. La piel.....	6
1.1 Funciones .....	8
1.2 Patología de la piel.....	8
2. Proceso de reparación tisular.....	9
2.1 Etapas en el proceso de reparación del tejido .....	10
2.2 Heridas crónicas en el proceso de reparación tisular .....	13
2.3 Ciclo celular en la proliferación celular .....	14
3. Úlceras por presión.....	15
3.1 Definición .....	15
3.2 Epidemiología .....	17
3.3 Etiología.....	18
3.4 Clasificación.....	21
3.5 Complicaciones.....	22
3.6 Prevención.....	23
3.7 Tratamiento.....	24
4. El láser .....	27
4.1 Historia del láser .....	27
4.2 Generalidades del láser.....	29
4.3 Tipos de láser.....	33
4.4 Efecto del láser sobre los tejidos .....	34
4.5 Terapia láser fotobiomoduladora .....	36
JUSTIFICACIÓN .....	39
HIPÓTESIS.....	40
OBJETIVOS.....	41

MATERIAL Y MÉTODOS.....	42
1. Línea celular de fibroblastos humanos .....	42
2. Cultivo de la línea celular CCD- 1064Sk.....	42
3. Características del láser de diodo de 940nm .....	43
4. Tratamiento láser aplicado.....	43
5. Estudio sobre la capacidad proliferativa de fibroblastos humanos tratados con láser de diodo de 940nm.....	44
6. Estudio sobre el ciclo celular de fibroblastos humanos tratados con láser de diodo de 940nm. ....	45
7. Estudio sobre el perfil antigénico de fibroblastos humanos tratados con láser de diodo de 940nm. ....	46
8. Estudio sobre la expresión génica de fibroblastos humanos tratados con láser de diodo de 940nm. ....	48
9. Análisis estadístico.....	50
RESULTADOS .....	52
1. Estudio del efecto del láser de diodo de 940nm sobre la capacidad proliferativa de fibroblastos humanos en cultivo. ....	52
2. Efecto del láser de diodo de 940nm sobre el ciclo celular de fibroblastos humanos en cultivo.....	59
3. Efecto del láser de diodo de 940nm sobre el perfil antigénico de fibroblastos humanos en cultivo.....	62
4. Efecto del láser de diodo de 940nm sobre la expresión génica de fibroblastos humanos en cultivo.....	63
4.1 Efecto del láser sobre la expresión de FGF, CTGF, VEGF, TGF- $\beta$ 1 y los receptores de TGF- $\beta$ 1 (R1, R2 y R3).....	63
4.2 Efecto de láser sobre la expresión de $\alpha$ -actina, fibronectina, decorina, elastina, DDR2 y MMP2. ....	67
DISCUSIÓN .....	71
CONCLUSIONES .....	77
CONCLUSIONS.....	78
BIBLIOGRAFÍA.....	79

## RESUMEN

Cuando un tejido es dañado tiende a repararse de manera natural. En ocasiones, este proceso es lento y tórpido, lo que implica la cronificación de la herida. Las heridas crónicas más prevalentes son las úlceras por presión (UPP). Estas lesiones son originadas por diversos factores mecánicos (presión, fuerza y cizallamiento) junto con otros factores pertenecientes al paciente (estado de salud, estilos de vida, nutrición y medicación, entre otros). El padecimiento de estas heridas origina graves consecuencias para el paciente, la familia y el sistema sanitario. Es por ello que existe una necesidad de abordar estas heridas con tratamientos adecuados a fin de reducir estas importantes consecuencias, y mejorar la calidad de vida de los individuos y la familia; al igual que mejorar la asistencia sanitaria.

La terapia fotobiomoduladora o fotobiomodulación (PBM) es uno de los tratamientos regenerativos más usados en áreas sanitarias como odontología, tratamientos estéticos o dermatología. Consiste en la aplicación de energía en forma de luz a fin de promover cambios bioquímicos, bioenergéticos y estructurales en el tejido receptor. Actualmente existe una gran variedad de dispositivos que promueven PBM, siendo los láseres de diodo pertenecientes a la región roja o infrarroja del espectro electromagnético, los que generalmente son empleados con este fin. En concreto, el láser de diodo de 940nm (láser infrarrojo) ha sido estudiado sobre poblaciones celulares como es el osteoblasto, comprobándose que promueve la proliferación y diferenciación de este. Sin embargo, aún no han sido demostrados los efectos de tal dispositivo sobre el tejido blando, así como los parámetros dosimétricos más adecuados para la reparación de este.

El objetivo de esa tesis doctoral fue estudiar el efecto del láser de diodo de 940nm sobre fibroblastos humanos en cultivo, mediante el estudio de crecimiento, perfil antigénico y expresión génica; dado que los fibroblastos son el componente celular mayoritario de los tejidos blandos y es esenciales en el proceso de reparación tisular.

La línea CCD-1064Sk de fibroblastos epiteliales humanos fue tratada con un láser de diodo de 940nm a distintas dosis de energía (potencia de energía de 0.2, 0.5 o 1W, y densidades de energía entre 1 y 7J/cm<sup>2</sup>) y modos de emisión (continuo y pulsado). Para

determinar el efecto sobre el crecimiento celular, el perfil antigénico y la expresión génica. El crecimiento celular se valoró analizando el efecto sobre la proliferación (mediante la técnica del MTT, técnica espectrofotométrica que mide respiración celular) y el ciclo celular (mediante una técnica de citometría de flujo). El perfil antigénico se evaluó mediante microscopía confocal. La expresión génica de los distintos marcadores analizados se realizó a través de la técnica cuantitativa de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

El tratamiento con láser incrementó la capacidad proliferativa a las 24 y 72h de los fibroblastos humanos; si bien, este efecto fue modulado en función de la dosis de energía aplicada. Cabe señalar que los parámetros energéticos más efectivos fueron a la potencia de 0.2 y 0.5 W y la densidad de energía entre 1 y 4 J/cm<sup>2</sup>, independientemente del modo de energía utilizado. No se encontró ningún efecto cuando el láser fue aplicado a potencia de 1W. Respecto al ciclo celular, no se detectaron cambios significativos como consecuencia del tratamiento respecto del grupo control. Mediante el estudio de la expresión antigénica se observa un incremento de la expresión de  $\alpha$ -actina de las células tratadas, lo que sugiere una posible diferenciación celular.

Por otro lado, los resultados obtenidos mostraron un aumento significativo en la expresión de FGF, TGF- $\beta$ 1, TGF $\beta$ R1, TGF $\beta$ R2,  $\alpha$ -actin, fibronectin, decorina y MMP2 tras la aplicación de dos pautas de tratamiento. El análisis de la expresión de DDR2 solo mostro un incremento de expresión cuando las células fueron sometidas a dos dosis de energía. Igualmente, al aplicar esta pauta de tratamiento se observó un descenso en la expresión de los marcadores CTGF y elastina. Tales cambios explican el efecto PBM del láser de diodo sobre el fibroblasto, el cual se traduce en un incremento de la proliferación a corto plazo y una diferenciación a miofibroblasto a largo plazo; además justificarían el potencial terapéutico del láser de diodo en la reparación de heridas, aunque se necesitan de más estudios en modelos animales que nos permitan extrapolar su uso en la práctica clínica en el tratamiento de heridas crónicas como las UPP.

Nuestros resultados indican que el láser de diodo de 940nm presenta propiedades fotobiomoduladoras sobre el fibroblasto, al estimular la capacidad proliferativa y la diferenciación celular, sin alterar el ciclo celular, además de modular la expresión génica. Estos datos justifican su posible utilidad clínica en la regeneración de heridas.

## ABSTRACT

A damaged tissue has the tendency to repair by itself naturally. Sometimes, this process is slow and torpid, which leads to the chronification of the wound. The most common chronic wounds are pressure ulcers (PU). These injuries are caused by various mechanical factors (pressure, force and shear) along with other factors related to the patient (health status, lifestyle, nutrition and medication, among others). Suffering these injuries has serious consequences for the patient, their families and the health system. Thus, it is necessary to treat PU in order to reduce these important adverse events and improve quality of life of the individuals and their families, as well as improving health cares.

Photobiomodulatory therapy or photobiomodulation (PBM) is one of the most used regenerative treatments in different areas such as dentistry, cosmetic therapies or dermatology. It consists of the application of energy in form of light in order to promote biochemical, bioenergetic and structural changes in the receptor tissue. Nowadays, there is a wide variety of devices that promote PBM, being the diode lasers belonging to the red or infrared region of the electromagnetic spectrum, which are generally used for this purpose. Specifically, the 940nm diode laser (infrared laser) has been studied on another cell population, such as osteoblast, where it promotes the proliferation and differentiation of these cells. However, the effects of this device on the soft tissue have not been demonstrated yet, as well as the most suitable dosimetry parameters for the repair of its.

The objective of this doctoral thesis was to study the effect of the 940nm diode laser on cultured human fibroblasts, through the study of growth, antigenic profile and gene expression; because of fibroblasts are the main cellular component of soft tissues and are essential in the tissue repair process.

The CCD-1064Sk line of human epithelial fibroblasts was treated with a 940nm diode laser at different energy doses (power of 0.2, 0.5 or 1W, and energy densities between 1 and 7J/cm<sup>2</sup>), and emission modes (continuous and pulsed). To determine the effect on: A) Cell growth, through a proliferation assay (using MTT technique, which is a

spectrophotometric technique that measures cellular respiration) and the cell cycle (using a flow cytometry technique); B) The antigenic profile (evaluated by confocal microscopy); and C) Gene expression of different tissue repair markers (through the quantitative technique of the polymerase chain reaction in real time).

The laser treatment increased the proliferative capacity at 24 and 72h of the cultured fibroblasts. Nevertheless, this effect was modulated according to the dose of energy applied. The most effective energy parameters were the power of 0.2 and 0.5 W and the energy density between 1 and 4 J / cm<sup>2</sup>, regardless of the energy mode used. No effect was found when the laser was applied at 1W power. No significant changes were detected, as a consequence of the treatment, with respect to the control group in the cell cycle test. The study of the antigenic expression showed an increase of the expression of  $\alpha$ -actin of the treated cells is observed, which suggests a possible cellular differentiation.

In addition, the results obtained showed a significant increase in the expression of FGF, TGF- $\beta$ 1, TGF $\beta$ R1, TGF $\beta$ R2,  $\alpha$ -actin, fibronectin, decorin and MMP2 was observed after the application of two treatment guidelines. The analysis of the expression of DDR2 only showed an increase in expression when the cells were subjected to two doses of energy. Likewise, when applying this treatment regimen, a decrease in the expression of the CTGF and elastin markers was observed. These results explain the PBM effect of the diode laser on the fibroblast, which demonstrate an increase in short-term proliferation and long-term myofibroblast differentiation. Besides, it would also justify the therapeutic potential of the diode laser in wound repair, although more studies are needed in animal models that allow us to extrapolate its use in clinical practice in the treatment of chronic wounds such as UPP.

These results reveal the 940nm diode laser has photobiomodulatory properties on the fibroblast; stimulating the proliferative capacity and cell differentiation, without altering the cell cycle, besides modulating the gene expression. These findings justify its possible clinical usefulness in the regeneration of wounds

## MARCO TEÓRICO

### 1. La piel

La piel es un órgano del sistema tegumentario junto con otros componentes como uñas, cabello, glándulas y nervios. Es considerado el órgano más largo del cuerpo, con una extensión de superficie de entre 1.6 y 2 m<sup>2</sup>. Además, supone aproximadamente el 15% del total del peso de cuerpo humano<sup>1</sup>. Histológicamente, se divide en 3 capas: epidermis, dermis e hipodermis o tejido subcutáneo.

#### Estructura

La **epidermis** es el epitelio más externo. Su grosor varía dependiendo de la zona del cuerpo, alcanzando su máximo espesor en la palma de las manos y en la planta de los pies. Está compuesto principalmente por *queratinocitos*, células encargadas de la producción de queratina, proteína filamentosa la cual proporciona la función de protección<sup>2</sup>. Aunque en menor proporción, también se encuentran *melanocitos*, cuya principal misión es la pigmentación de la piel<sup>3</sup>, *células de Langerhans*, las cuales juegan un papel de protección inmunológica<sup>4</sup>, y *células de Merkel*, células responsables fundamentalmente de la mecanorecepción<sup>5</sup>. Presenta cinco estratos diferenciados microscópicamente por su composición, que, desde el más externo al más interno son: estrato córneo, estrato lúcido, estrato granuloso, estrato espinoso y estrato basal<sup>1</sup>.

La **dermis** es el tejido intermedio, situado bajo la epidermis. Está compuesta por tejido conectivo en forma de colágeno mayoritariamente, elastina y fibronectina, en menor proporción<sup>6</sup>. Posee redes vasculares, terminaciones nerviosas, así como glándulas y folículos pilosos. La dermis está dividida principalmente en dos estratos: *estrato papilar* y *estrato reticular*<sup>1</sup>. Las principales células en esta capa son los fibroblastos<sup>7</sup>, aunque también se encuentran otros tipos celulares como, mastocitos e histocitos<sup>6</sup>.

La **hipodermis** es la capa más profunda de la piel, situada debajo de la dermis. Está formado por adipocitos, células encargadas de fabricar y almacenar grasas, en forma de lóbulos unidos entre sí por tejido conectivo. Su espesor varía según la región anatómica, peso corporal, sexo o edad. Debajo de esta capa se encuentra el tejido muscular. Su

principal función es la de reserva y depósito de energía, mantenimiento de la temperatura corporal y protección frente a traumatismos<sup>1</sup>.

### **El fibroblasto**

El fibroblasto es la célula que más predomina en la dermis, por lo que se localizan en este tejido conectivo por todo el cuerpo. Se caracteriza por tener un citoplasma muy ramificado<sup>7</sup>.

Su principal función es la de sintetizar la matriz extracelular (MEC) y el colágeno. Además, los fibroblastos juegan un papel importante como “arquitectos cutáneos” en la cicatrización de heridas. Están relacionados con la síntesis de sustancias esenciales en el proceso de reparación de tejidos como factores de crecimiento, citoquinas, quimiocinas y mediadores de inflamación<sup>8</sup>.

Son células muy heterogéneas y dinámicas, por lo que son capaces de cambiar su perfil celular en función de las necesidades externas<sup>9</sup>. Asimismo, se ha evidenciado que la matriz extracelular, componente tisular activo y complejo, es capaz de influenciar en la supervivencia, proliferación y función de esta población celular. La heterogeneidad de los fibroblastos está aún en estudio<sup>10</sup> y, aunque algunos autores la vinculan a su origen embrionario<sup>11</sup> o con el órgano o lugar del cuerpo<sup>12</sup>, se han hallado diferentes subpoblaciones de fibroblastos en la misma capa de la piel<sup>13</sup>. Por ejemplo, dependiendo de la profundidad de la dermis, los fibroblastos pueden expresar diferentes cantidades de colágeno; incluso, en capas más profundas de la dermis la expresión del RNAm (ácido ribonucleico mensajero) de la colagenasa es menor que en las capas superficiales<sup>14</sup>.

Debido a su gran actividad, estas células son capaces de alterar su función y fisiología, o incluso transformarse en un nuevo tipo celular, fenómeno conocido como diferenciación<sup>15</sup>. Así, tienen la habilidad de cambiar la expresión de  $\alpha$ -actina<sup>16</sup>, adquiriendo propiedades contráctiles propias de células del músculo liso, dando como resultado la aparición de una nueva población celular denominada miofibroblasto. La aparición de miofibroblastos ha sido asociada a la presencia del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ )<sup>17,18</sup>. Además, hay que señalar que la propiedad contráctil del miofibroblasto ayuda en el arrastre de los márgenes de la herida<sup>19</sup>.

Igualmente, durante el proceso de reparación de herida conocido como angiogénesis, el fibroblasto tiene un papel relevante a través de la síntesis del factor endotelial vascular (VEGF), el cual induce esta etapa y aumenta la permeabilidad celular endotelial<sup>20</sup>.

### 1.1 Funciones

La piel posee diferentes funciones gracias a sus propiedades tales como elasticidad, propiedades tensoras, extensibilidad y reparación y regeneración<sup>21</sup>. De entre estas funciones destacan<sup>1</sup>:

- Protección frente a agentes externos
- Mantenimiento del equilibrio electrolítico
- Regulación de la temperatura
- Regulación del pH
- Lubricación
- Identificación personal
- Inmunidad
- Síntesis de vitamina D
- Almacenaje

### 1.2 Patología de la piel

La patología de la piel es uno de los mayores problemas de salud, afectando a millones de personas a lo largo del mundo<sup>22,23</sup>. Edad, factores genéticos, factores medioambientales y traumatismos pueden contribuir a desarrollar diversas patologías de la piel<sup>24,25</sup>. En la literatura hay más de 3000 variedades de patologías descritas<sup>26,27</sup>. En la *International Classification of Diseases* se ordenan todas las enfermedades de la piel en 24 categorías; donde la número 20 corresponde a úlceras, acogiendo a cualquier tipo de úlcera cual sea su estadio o etiología<sup>22</sup>.

En el ámbito de la enfermería, la *American Nursing Association* define diferentes diagnósticos de enfermería en relación con pérdida de integridad de la piel, y de este

modo ayuda a garantizar una correcta detección precoz y fomentar el óptimo tratamiento del paciente. Así surge en 1975 el diagnóstico de enfermería *“Deterioro de la integridad cutánea”*<sup>28</sup> definido en la última edición de NANDA (North American Nursing Diagnosis Association) como *“Alteración de la epidermis y/o de la dermis”*<sup>29</sup>; y en 1986 el diagnóstico *“Deterioro de la integridad tisular”*<sup>28</sup> definido como *“lesión de la membrana mucosa, córnea, sistema integumentario, fascia muscular, músculo, tendón, hueso, cartílago, cápsula articular y/o ligamento”*<sup>29</sup>. En la práctica diaria el deterioro de la piel no siempre es un problema real; sino que se determina como riesgo potencial. Por este motivo se aprobaron los diagnósticos enfermeros *“Riesgo de deterioro de la integridad cutánea”*, *“Riesgo de deterioro de la integridad tisular”* y *“Riesgo de úlcera por presión”* definidos correlativamente como *“vulnerable a una alteración en la epidermis y/o la dermis, que puede comprometer la salud”*, *“vulnerable a una lesión de la membrana mucosa, córnea, sistema integumentario, fascia muscular, músculo, tendón, hueso, cartílago, cápsula articular y/o ligamento, que puede comprometer la salud”* y *“vulnerable a una lesión localizada de la piel y/o capas inferiores del tejido epitelial, generalmente sobre una prominencia ósea, como resultado de la presión o de la presión combinada con cizallamiento”*; siendo estos dos últimos mencionados, han sido recientemente incluidos como diagnósticos de riesgo o potenciales en la última edición de NANDA<sup>29</sup>.

## 2. Proceso de reparación tisular

La habilidad de los organismos de reparar y regenerar los tejidos ha sido una gran ventaja para su supervivencia<sup>30</sup>. Tras un traumatismo en el tejido se activan rápidamente una serie de acontecimientos. Este proceso puede derivar en regeneración o reparación del tejido. La **regeneración** consiste en la restitución completa del tejido perdido. En cambio, la **reparación** es una combinación entre regeneración y formación de cicatriz<sup>31</sup>. Generalmente ocurre cuando el grado de afectación no sucede solo a las células del tejido, sino a su estructura; es decir, a la matriz extracelular. La respuesta de ambos procesos es dependiente de la edad del organismo<sup>30</sup>.

El proceso biológico de cicatrización puede ser de dos tipos: por segunda intención, reparación del tejido perdido mediante la formación de tejido de granulación, o por primera intención, en el cual la reparación de la herida consiste en la aproximación de los bordes, generalmente mediante sutura, y donde los anexos de la piel (uña, folículos y glándulas) quedan intactos<sup>32</sup>.

## 2.1 Etapas en el proceso de reparación del tejido

El proceso de cicatrización del tejido viene clásicamente dividido por tres etapas solapadas entre sí, pero claramente diferenciadas: fase de hemostasia e inflamación, fase proliferativa y fase de maduración<sup>33</sup>.

### **Fase de hemostasia e inflamación**

Tras el daño del tejido tisular comienzan dos respuestas inmediatas y paralela del organismo; por un lado, se activa la hemostasia para frenar la pérdida de sangre<sup>34</sup>, y por otro lado se desencadena una respuesta inflamatoria, para dar comienzo a la reparación de la zona<sup>35</sup>.

La **hemostasia** se inicia gracias a la activación de los factores de la coagulación tanto por vía extrínseca (activación desde los extractos de tejido lesionado) como por vía intrínseca (activación del Factor de la Coagulación VII por la exposición del coágulo)<sup>30</sup>. Ambas vías activan la vía de la coagulación común que finaliza con la conversión del fibrinógeno en fibrina. De este modo se forma el coágulo hemostático, el cual contiene fibrina, fibronectina, vitronectina y trombocitos. Este coágulo de fibrina es considerado como una matriz provisional. Al mismo tiempo, se produce una vasoconstricción de la zona, para reducir la hemorragia, que es continuada por una vasodilatación beneficiando la llegada de trombocitos a la zona<sup>35</sup>. Esta vasodilatación es reconocida clínicamente como hiperemia local y edema perilesional. A causa de la señalización de citoquinas y factores de crecimiento (FC), este primer coágulo es desgranulado, comenzando con la adhesión de células como leucocitos, queratinocitos y células endoteliales<sup>30</sup>. Las plaquetas son las responsables de activar la señalización de Interleuquinas (IL) y del Factor de Necrosis Tumoral (TNF $\alpha$ ) que son los responsables de

producir la respuesta inflamatoria, así como la de otros factores que favorecen la síntesis de colágeno<sup>33</sup>.

La etapa **inflamatoria**, iniciada tras la lesión, está dividida en dos fases: un estadio temprano, donde se produce el reclutamiento de neutrófilos, y un estadio tardío, caracterizado por la aparición de monocitos<sup>36</sup>. Los neutrófilos son las primeras células en migrar al lecho de la herida<sup>37</sup>. Son los encargados de la fagocitosis de agentes patógenos y tejido necrótico. Además, estos leucocitos son responsables de la síntesis de citoquinas (IL1, IL6 y TNF $\alpha$ ), las cuales amplifican la secuencia inflamatoria, y estimula la síntesis de Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF) y IL8<sup>38</sup>. Más tarde, los monocitos alcanzan la herida conducidos por el sistema vascular al lugar<sup>39</sup>. Tras su llegada rápidamente son diferenciados a macrófagos<sup>38</sup>. Estas células, al igual que los neutrófilos, llevan a cabo la fagocitosis de patógenos y contribuyen a la desbridación de la zona<sup>40</sup>. Algunos de ellos son capaces de activar los procesos sucesivos<sup>41</sup>, mediante la liberación de FC como Factor de Crecimiento Transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ), Factor de crecimiento Transformante  $\alpha$  (TGF $\alpha$ ), Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF) y VEGF; los cuales promueven la proliferación de diferentes células y síntesis de moléculas de la regenerada matriz extracelular<sup>42,43</sup>. Al finalizar esta etapa, se produce la resolución de la inflamación, donde los neutrófilos decrecen bien por apoptosis o bien por ser fagocitados por los macrófagos, debido a la acción de la IL10, citoquina reguladora de la inflamación<sup>42</sup>.

### **Fase de proliferación**

Esta etapa se encuentra subdividida en dos procesos diferentes que ocurren paralelamente; reepitelización y angiogénesis<sup>30</sup>.

En la etapa de **reepitelización** el **fibroblasto** es la célula más relevante en este proceso. La migración del fibroblasto comienza tras la destrucción de tejido, durante la fase hemostática<sup>44</sup>. Es conducido a los bordes de la herida a lo largo de la red de fibrina<sup>45</sup>. Esta célula causa reemplaza el coágulo hemostático inicial por una matriz extracelular (MEC) rica en colágeno, fibronectina y otros elementos<sup>30</sup>. La proliferación mediante

mitosis celular de fibroblastos se produce por la señalización FGF y PDGF principalmente, mientras que la migración está señalizada fundamentalmente por la acción de  $TGF\beta^{46-48}$ . Los receptores de fibrina son expresados por el fibroblasto justo antes de la contracción de la herida (fase posterior)<sup>49</sup>.

Otro grupo celular implicado en la reepitelización, son los **queratinocitos**, los cuales también migran hacia el lecho de la herida y se dispone a lo largo del coágulo de fibrina<sup>50</sup>. La acción de los queratinocitos es regulada por distintos FC y/o citoquinas; mientras que la migración está controlada por el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) y Factor de Crecimiento Tisular  $\alpha$  ( $TGF\alpha$ ) principalmente<sup>51,52</sup>; la proliferación viene regulada por el Factor de Crecimiento del Queratinocito (KGF), el EGF, y la citoquina  $TNF\alpha$ <sup>53</sup>.

La **angiogénesis** y neovascularización, proceso esencial de la cicatrización<sup>54</sup>, ocurre perpendicularmente a la etapa descrita anteriormente. Consiste en la formación de nuevos vasos sanguíneos los cuales forman una red, mejorando la perfusión de la zona, aportando mayor número de nutrientes y mediadores implicados en el proceso de cicatrización<sup>55</sup>. La activación del ciclo celular de las células endoteliales está mediada por VEGF, PDGF y FGF<sup>56,57</sup>. Una vez las células endoteliales han madurado hacia vasos arteriales o venosos y estabilizada la pared vascular, se da paso a la neovascularización<sup>58</sup>.

Al término de la etapa proliferativa, se produce la formación de **tejido de granulación** altamente vascularizado gracias a la angiogénesis. La fibrina es reemplazada por fibronectina<sup>54</sup>. El fibroblasto aumenta en densidad. Es el encargado de la producción de glicoproteínas, proteoglicanos y ácido hialurónico (AH)<sup>50</sup>. De este modo, se forma el tejido de granulación por células como macrófagos, fibroblastos, células endoteliales y queratinocitos, además de MEC compuesta por colágeno tipo III, glicoproteínas, fibronectina y ácido hialurónico<sup>32</sup>, sirviendo de base para la adhesión de otras células y posterior maduración<sup>48</sup>.

Al final de esta etapa, el número de fibroblastos se ve reducido notablemente a causa de la diferenciación de estos a miofibroblasto.

## Fase de maduración

La fase de maduración corresponde a la **remodelación** de la cicatriz formada y **contracción** de la herida. El tejido de granulación finaliza con la apoptosis de las células implicadas. El proceso angiogénico declina, disminuyendo el riego sanguíneo. Una herida madura se caracteriza, por tanto, por ser avascular y acelular. Durante la maduración de la herida suceden varios cambios en la MEC. Entre ellos, el colágeno tipo III es sustituido por colágeno tipo I, el cual se dispone de forma paralela y presenta la característica de poseer mayor capacidad contráctil<sup>59</sup>. La actividad contráctil es regulada por Metaloproteinasas (MMPs) y citoquinas secretadas por los fibroblastos. FC como PDGF, Factor de Crecimiento Insulínico (IGF) o TGF $\beta$  regulan esta etapa<sup>60,61</sup>. A continuación, en el tejido de granulación, el fibroblasto se diferencia a miofibroblasto, célula con mayor capacidad contráctil debido a su comportamiento similar a la célula  $\alpha$  del musculo liso<sup>62,63</sup>. Esta diferenciación está señalizada por el TGF $\beta$ <sup>64,65</sup>. El miofibroblasto se une a las fibras de colágeno, tratando así de producir la contracción de la herida y con ello reduciendo su superficie<sup>66</sup>.

### 2.2 Heridas crónicas en el proceso de reparación tisular

Como se ha descrito anteriormente, la cicatrización de heridas es un proceso complejo estrechamente regulado por numerosos factores de crecimiento, citoquinas y metaloproteinasas. Alteraciones en alguna de las moléculas reguladoras provocan un fallo en la cicatrización, pudiendo causar un retraso de esta, lo que conlleva a una cicatrización tórpida y crónica. En general, en ausencia de infección, la cronicidad de las heridas es causa de una excesiva prolongación de la respuesta inflamatoria en el lugar de la herida<sup>67</sup>. Se ha observado un incremento en la incidencia de heridas crónicas a medida que aumenta la edad y en pacientes con diabetes<sup>68</sup>. En concreto, esta situación está caracterizada por una infiltración excesiva de neutrófilos y macrófagos; los cuales proporcionan citoquinas proinflamatorias, ROS (especies de oxígeno reactivas) y metaloproteinasas al lugar de la herida, y una reducción de la actividad de los fibroblastos y queratinocitos<sup>69</sup>. Una actividad elevada de MMPs conduce a la

degradación de la MEC y FC, lo que inhibe aún más el proceso de cicatrización de la herida<sup>70</sup>. Una herida crónica se asocia con un retraso en la expresión de PDGF, obteniéndose bajos niveles de este FC<sup>71</sup>.

### 2.3 Ciclo celular en la proliferación celular

La proliferación de las múltiples células que intervienen en el proceso de reparación tisular es esencial. Para el correcto desarrollo de esta etapa proliferativa es necesario un normal ciclo mitótico de la célula, en el que intervienen diversos mecanismos y moléculas<sup>72</sup>. Durante todo este proceso la célula está constantemente relacionada con la MEC; de modo que recibe todas las señalizaciones referentes a la activación de los diferentes periodos, así como todos los nutrientes necesarios para el correcto curso. El ciclo celular está caracterizado por la replicación del ADN y la división en dos nuevas células, con el mismo material genético. Las fases del ciclo celular son cuatro: G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> y M. Las fases S y M son las consideradas "*fases de trabajo*", debido a que en ellas ocurren los procesos de replicación y división mitótica, mientras que las fases G (G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>) se conocen como "*fases de intervalo*", ya que en ellas sucede la fase de preparación de la célula a etapa sucesiva. La fase de quiescencia o fase G<sub>0</sub> se produce cuando la célula no se encuentra en ninguna de las etapas del ciclo celular mencionadas anteriormente y se caracteriza por la ausencia de señalización mediante factores de crecimiento<sup>73</sup>.

La **fase G<sub>1</sub>** puede estar precedida bien por una etapa de quiescencia celular<sup>73</sup> o tras la finalización del ciclo celular, y por tanto tras la fase M. En ambos casos, la activación de un nuevo ciclo celular es independiente a los anteriormente concluidos; por tanto, se considera otro periodo completamente autónomo. En esta fase, acaece la preparación de la célula para su posterior replicación, siendo así el momento en el que se sintetizan las proteínas necesarias para esta replicación del material genético<sup>74</sup>.

Posteriormente, en la **fase S**, también llamada fase de síntesis, sucede la replicación del ADN celular<sup>75</sup>. Esta etapa está estrechamente controlada por los mecanismos de control también conocidos como '*checkpoints*'. Su misión es la de asegurar la integridad y correcto proceso de replicación durante el ciclo celular, especialmente en este

periodo<sup>76</sup>. En el caso de que en algún punto se detectara alguna anomalía, los 'checkpoints' son los encargados de ralentizar el ciclo celular e iniciar la reparación del ADN. Si el daño fuera muy severo, la célula sería eliminada mediante apoptosis<sup>77</sup>.

A continuación, la **fase G<sub>2</sub>** o fase de intervalo 2, corresponde a la preparación celular para la mitosis.

Es en la **fase M** o fase mitótica cuando la célula es dividida en dos nuevas células, tras la correcta separación del ADN. De modo que, cada una de las dos células resultantes contiene el mismo material genético. Esta fase está diferenciada microscópicamente por una serie de subetapas conocidas como profase, metafase, anafase y telofase<sup>78</sup>.

La progresión del ciclo celular está regulada y controlada por diversas moléculas activadoras e inhibidoras de las diferentes etapas evolutivas del ciclo celular<sup>79</sup>. Una de las moléculas más relevantes de esta señalización son las denominadas quinasas ciclo-dependientes o CDKs, por su nombre en inglés 'cyclin-dependent kinase'; siendo los grupos CDK1 y CDK2 los más implicados en este proceso<sup>80</sup>.

Del mismo modo, la proliferación celular es inducida por diversos polipéptidos llamados **factores de crecimiento**, como por ejemplo el *Factor de Crecimiento Endotelial-Vascular*<sup>81</sup>, *Factor de Crecimiento del Fibroblasto*<sup>82</sup> o *Factor de Crecimiento Transformante  $\beta$* <sup>83</sup>. Estos factores contienen un ligando el cual se une a su receptor en la membrana celular. Esta unión desencadena una respuesta celular en la célula de destino, la cual activa la proliferación y el ciclo de la célula<sup>83</sup>.

### 3. Úlceras por presión

#### 3.1 Definición

La definición de úlcera por presión (UPP) ha ido variando acompañada de los avances sobre la comprensión de su etiología, así como de los cambios y modificaciones del concepto de herida crónica.

El término *úlceras por decúbito* ha sido empleado durante décadas para referirse a estas heridas y, aunque ha sido una denominación tradicional, ya ha sido reemplazada por inexacta, puesto que la posición de decúbito no es la única situación ni la potencialmente más peligrosa en el desarrollo de estas lesiones<sup>84</sup>. Es por ello que el término *úlceras por presión* indica el mecanismo principal y responsable de esta afección, que es la presión<sup>85</sup>.

No se estableció una definición clara de UPP hasta 1975, donde se le define como *“cualquier lesión provocada por una presión ininterrumpida que provoca lesión del tejido subyacente”*<sup>86</sup>.

A principios de los 90, el Panel Nacional de Expertos en Úlceras por Presión (NPUAP) definió las UPP como *“áreas localizadas de tejido necrosado que tienden a aparecer cuando el tejido blando está comprimido entre dos prominencias óseas y una superficie externa durante un período prolongado”*<sup>87</sup>.

Gracias a los avances llevados a cabo en este tipo de heridas, el concepto de UPP fue modificado en 1999 por el Panel de Expertos Europeos en Úlceras por Presión (EPUAP) como *“áreas de daño localizado en la piel y tejidos subyacentes causado por la presión, la fricción, la cizalla o la combinación de las mismas”*<sup>88</sup>.

Estas dos sociedades internacionalmente reconocidas en el ámbito de las UPP (NPUAP y EPUAP), a finales del año 2009 formularon una nueva definición de UPP, concretando como una *“lesión localizada en la piel y/o el tejido subyacente por lo general sobre una prominencia ósea, como resultado de la presión, o la presión en combinación con la cizalla”*<sup>89</sup>.

Actualmente, estas definiciones son consideradas incompletas<sup>90</sup>, por lo que algunos autores aceptan la definición de las UPP como *“lesiones de la piel cuyo origen isquémico afecta a la integridad cutánea y tejidos subyacentes, existiendo en ocasiones pérdida de sustancia, que es producida por la presión prolongada o fricción entre dos planos duros, uno perteneciente al paciente y otro externo a él”*<sup>91</sup>.

### 3.2 Epidemiología

Son pocos los estudios de prevalencia en España. El primer trabajo que estimó la prevalencia en España, se llevó a cabo en la comunidad de La Rioja, e indicaba que la prevalencia en mayores de 65 años atendidos en centros de atención primaria fue del 0,26%, un 12,26% en atención hospitalaria y un 12,84% en pacientes ingresados en instituciones sociosanitarias<sup>92</sup>.

El **1º Estudio Nacional de Prevalencia de UPP** realizado por el Grupo Nacional para el Estudio y el Asesoramiento en Úlceras Por Presión y Heridas Crónicas (GNEAUPP) publicado en 2003 calculó que la prevalencia de UPP en pacientes de atención domiciliaria fue del 8,34%, 8,81% en atención hospitalaria y 7,6% en pacientes ingresados en centros sociosanitarios<sup>93</sup>.

El **2º Estudio Nacional de Prevalencia de UPP** afirmó que la prevalencia de UPP entre 2005 y 2006 era del 9,11% en atención primaria, 8,91% en hospitales y 10,9% en centros sociosanitarios<sup>94</sup>.

En 2009, el **3º Estudio Nacional de Prevalencia de UPP** mostró que la prevalencia de estas lesiones en atención primaria era del 5,89%, 10,05% en atención hospitalaria y 7,35% en centros sociosanitarios<sup>95</sup>.

El último y **4º Estudio Nacional de Prevalencia de UPP** estimó en 2013 que el 7,87% de los pacientes fueron atendidos en entornos hospitalarios, un 8,51% en centros de Atención Primaria y un 13,41% en ingresados en centros sociosanitarios<sup>96</sup>.

Un análisis de estas cifras permite observar una tendencia ascendente de estas heridas en la población española durante los últimos años, especialmente preocupante en instituciones sociosanitarias<sup>96</sup>.

La magnitud del problema no solo ocurre en el estado español, sino que las UPP son altamente prevalentes y suponen un problema para la salud pública en la gran mayoría de países; por ejemplo, en estados vecinos de la Unión Europea la prevalencia estimada a nivel hospitalario en los últimos años ha sido del 7,9% en Portugal<sup>97</sup>, 16,6% en Suecia<sup>98</sup>, 15,1% en Italia<sup>99</sup>, 8,9% en Francia<sup>100</sup> y entorno al 11% en Alemania<sup>101</sup>. Además, en otros países no miembros las cifras de prevalencia de UPP fueron de 18,2% en Noruega<sup>102</sup>, 7,8% en India<sup>103</sup>, 9,6% en Japón<sup>104</sup> y 9,3% en Estados Unidos<sup>105</sup>. Cabe mencionar que, aunque la prevalencia en Reino Unido fue de 0,031%, la UPP es la herida crónica más frecuente y la que más carga ocasionó en el sistema sanitario<sup>106</sup>; constatándose lo que Hibbs afirmó en los años 80 como *“la gran epidemia bajo las sábanas”*<sup>107</sup>, refiriéndose al impacto de las UPP.

El estudio español más reciente en estimar la carga económica de las UPP sobre el Sistema Nacional de Salud fue en el año 2007, a raíz del 2º Estudio Nacional de Prevalencia de UPP y utilizando los costes del año 2005. De este se calculó que el coste que ocasionaron las UPP fue de 461 millones de euros, de los cuales el 15% fue referido a gastos de apósitos y otros materiales, el 19% a horas de trabajo de enfermería y el 45% del coste de estancias extras en el hospital<sup>108</sup>. No obstante, pese a la gran repercusión económica que esto supone a cada país, no hay suficientes estudios que aclaren la dimensión global que esto implica.

### 3.3 Etiología

El origen de las UPP viene describiéndose desde el año 1593, cuando Fabricius Hildanus asoció dos factores causales al origen de la UPP; factores externos naturales y factores internos sobrenaturales<sup>109</sup>. Posteriormente en 1722, fueron destacadas las fuerzas mecánicas de presión e incontinencia urinaria en el desarrollo de esta lesión cutánea<sup>110</sup>. Sin embargo, no es hasta la primera mitad de siglo XX cuando se comienza a detallar su origen con carácter científico<sup>111</sup>, siendo los trabajos de Kosiak, los que demostraron la importancia de la presión en la génesis de las UPP<sup>112,113</sup>.

La **presión** es definida como la *“fuerza que actúa perpendicular a la piel como consecuencia de la gravedad, que provoca un aplastamiento tisular entre dos planos, uno perteneciente al paciente y otro externo a él”*<sup>91</sup>.

En individuos sanos la presión capilar en los tejidos oscila entre 12 y 32 mmHg<sup>114</sup>. Si se aplica una presión superior a 32 mmHg durante un periodo continuado, se producirá una oclusión del flujo sanguíneo en los capilares de los tejidos blandos causando hipoxia, y con ello daño endotelial a nivel de las arteriolas y de la microcirculación, pudiendo provocar necrosis vascular<sup>115</sup>. Sin embargo, en la formación de la UPP también interviene el tiempo durante el que se ejerce la presión, de modo que sólo se necesita una presión de 70 mmHg mantenida durante 2 horas para producir necrosis del tejido<sup>112,116</sup>. La presión y el tiempo son inversamente proporcionales, de modo que presiones inferiores a la presión sistólica, requieren un tiempo de más de 12 horas para producir una lesión similar a aquella que podría producirse en 1 hora por la aplicación de una fuerza de 4 a 6 veces a dicha presión sistólica<sup>117</sup>.

Además de la presión, los factores mecánicos asociados más importantes son, entre otros, la fricción y el cizallamiento<sup>116</sup>.

La **fricción** es una fuerza que actúa paralelamente a la piel, produciendo roces, por movimientos o arrastres, lo que provoca la pérdida del estrato córneo. En el paciente, encamado o sentado, el roce con las sábanas o superficies rugosas produce fuerzas de fricción, sobre todo en las movilizaciones, al arrastrar al paciente, provocando que la piel pierda capas de barrera y aumentando el riesgo de infección<sup>118</sup>.

El **cizallamiento** combina los efectos de presión y fricción. Las fuerzas de cizallamiento son fuerzas paralelas que se producen cuando dos superficies adyacentes se deslizan una sobre otra; esto puede ocurrir cuando el paciente se encuentra sentado en una cama o sillón en posición de Fowler. En esta situación, los tejidos externos permanecen fijos contra las sábanas de la cama (presión), mientras que los tejidos profundos se deslizan hacia los pies de la cama o sillón (fricción)<sup>115</sup>. A causa de este efecto, la presión

que se necesita para disminuir la aportación sanguínea es menor, por lo que la isquemia del músculo se produce más rápidamente<sup>119</sup>.

Además de estos factores mecánicos actualmente se conoce que existen otros causantes de estas heridas; los cuales se clasifican en factores extrínsecos e intrínsecos al paciente<sup>120</sup>.

Los **factores intrínsecos** son causa de los problemas de salud y de la situación física del paciente. Entre estos se encuentran<sup>121-123</sup>:

- Deficiencias motoras (inmovilidad, paresia, parálisis).
- Deterioros sensitivos (pérdida de la sensación del dolor).
- Edad avanzada.
- Alteraciones nutricionales, tanto por defecto como por exceso.
- Incontinencia (fecal y urinaria).
- Higiene.
- Deterioro cognitivo o alteración del estado de conciencia (coma, estupor, confusión).
- Adhesión a tratamientos que aumentan la vulnerabilidad de los tejidos a la formación de UPP (fármacos inmunosupresores, sondajes, drenajes)
- Hábito tabáquico.

Los **factores** de riesgo **extrínsecos** incluyen las fuerzas descritas anteriormente, además de factores físicos externos al paciente, que pueden ejercer una presión lesiva en la piel y el tejido subyacente, como pueden ser los equipos ortoprotésicos, la ropa del paciente, los cuerpos extraños, los aparatos médicos o el propio absorbente.

A causa de los factores extrínsecos, algunas zonas anatómicas poseen mayor susceptibilidad de producirse una lesión. Por ejemplo, en la posición decúbite, las áreas reportadas con mayor frecuencia (desde la más reiterada a la menos) son el sacro, trocantes, talón, escápula, coxis y parte posterior del muslo<sup>124</sup>.

El marco conceptual adoptado recientemente propone que las UPP, desde una visión clínica, están causadas por factores directos (inmovilidad, estado de la piel o UPP y mala perfusión de los tejidos), indirectos (humedad, pérdida de percepción sensorial, diabetes, mala nutrición y niveles bajos de albúmina en sangre) y otros factores potencialmente indirectos (edad, medicación, edema, hipertermia, presencia de heridas crónicas, infección y enfermedad aguda). Estos factores causales son divididos en dos grandes grupos: condiciones mecánicas y tolerancia y susceptibilidad individual, representando este último el de mayor riesgo de padecer UPP<sup>125-127</sup>.

### 3.4 Clasificación

A lo largo de la historia se han sucedido diferentes sistemas de clasificación a fin de utilizar un método de organización de la evolución de las UPP<sup>128</sup>.

El primer sistema de clasificación de las úlceras se estableció en 1975 por Shea, donde se describen cuatro niveles de lesión del tejido<sup>86</sup>. Es a partir de este momento cuando se desarrollaron numerosos sistemas de clasificación para las UPP<sup>84,129</sup>.

En 1989 surgió un sistema de clasificación desarrollado por el NPUAP que ha sido el más difundido y aceptado en América, encontrándose en permanente revisión. Este sistema, fue reconocido por la EPUAP en 1999, tras realizar algunos cambios menores<sup>130</sup>, y es actualmente recomendado por el GNEAUPP desde 1997. Según este sistema las UPP pueden clasificarse en 4 grados o estadios diferentes<sup>131</sup>:

- Grado I: Alteración observable en la piel íntegra, relacionada con la presión, que se manifiesta por un eritema cutáneo no blanqueable al presionar; en pieles oscuras, puede presentar tonos rojos, azules o morados y puede ser difícil de detectar. El área puede ser dolorosa, firme, suave, más caliente o más fría en comparación con los tejidos adyacentes. Puede indicar personas en riesgo.
- Grado II: Pérdida parcial del grosor de la piel que afecta a la epidermis, dermis o ambas. Se presenta como una úlcera abierta superficial poco profunda con un lecho de la herida rojo o rosado. También puede presentarse como una flictena

o ampolla intacta llena de suero o suero sanguinolento, abierta o rota. Se presenta como una úlcera superficial brillante o seca sin esfacelos o hematomas (el hematoma indica lesión de los tejidos profundos). Esta categoría no debería ser usada para describir laceraciones, lesiones de esparadrapo, dermatitis asociada a incontinencia, maceración o excoriación.

- Grado III: Pérdida completa del tejido. La grasa subcutánea puede ser visible, pero los huesos, tendones o músculos no están expuestos. Los esfacelos pueden estar presentes, sin llegar a ocultar la profundidad de la pérdida de tejido. Puede incluir cavitaciones y tunelizaciones. La profundidad de la UPP en este grado varía según la localización anatómica. La nariz, la oreja, el occipital y el maléolo no tienen tejido adiposo y las úlceras de grado III pueden ser poco profundas. En contraste, las zonas de importante adiposidad pueden desarrollar UPP de grado III extremadamente profundas.
- Grado IV: Pérdida total del grosor de la piel con destrucción extensa, necrosis del tejido o lesión en músculo, hueso o estructuras de sostén (tendón, cápsula articular, etc.). En este grado como en el III, pueden presentarse lesiones con cavernas, tunelizaciones o trayectos sinuosos. Existe pérdida total del espesor del tejido con hueso expuesto (pudiendo ocasionar osteomielitis u osteítis), tendón o músculo con presencia de esfacelos. La profundidad de la úlcera por presión de grado IV varía según la localización anatómica. Como en el grado III, tanto la nariz, la oreja, el occipital, como el maléolo, no tienen tejido adiposo y las úlceras de grado IV pueden ser poco profundas.

### 3.5 Complicaciones

La importancia de las UPP no sólo reside en las cifras epidemiológicas, sino en las posibles complicaciones que se pueden presentar. Es muy frecuente que estas heridas presenten una evolución crónica<sup>132</sup>, afectando a otros parámetros de la salud del paciente y a su calidad de vida. Además, el coste sanitario se ve incrementado a medida que se suman más efectos no deseados<sup>133</sup>.

Las complicaciones de las UPP derivan de su evolución, y se podrían agrupar en directas o indirectas.

Las **complicaciones directas** son las que se producen en el propio paciente y comprenderían el dolor en la zona de la UPP, infección local de la herida o sistémica (sepsis) si la evolución es desfavorable; necrosis de los tejidos del lecho de la herida y/o perilesionales, osteomielitis, anemia, depresión, disminución del estado de vida del paciente e incluso la muerte<sup>134-139</sup>.

Las **complicaciones indirectas** son las que derivan de la hospitalización ya que los pacientes con UPP frecuentemente requieren mucho tiempo de hospitalización o frecuentes reingresos hospitalarios. La presencia o desarrollo de una úlcera puede aumentar la duración de la estancia hospitalaria de un paciente en un promedio de 10 días y aumentar los costes económicos<sup>140-142</sup>.

### 3.6 Prevención

Conociendo los factores etiológicos, las UPP son lesiones potencialmente prevenibles, pero no siempre es fácil de lograr. La finalidad de las medidas preventivas es tratar que las lesiones por presión no aparezcan y, en el caso de que ya existan, cuidar al paciente para que no se dañen otras zonas. Estas medidas consisten en acciones tales como la valoración del riesgo de UPP, cuidado de la piel y manejo de la presión<sup>126</sup>. En cambio, no es necesario un abordaje nutricional en la prevención de UPP, sino los cuidados nutricionales estándares aplicados a cualquier individuo<sup>143</sup>.

Para la prevención se aconseja el empleo de escalas de **valoración del riesgo**, las cuales se consideran herramientas terapéuticas para valorar y determinar el riesgo de un individuo de padecer UPP<sup>144</sup>. Una de las más extendidas es la conocida como *Escala de Braden*, que está basada en los factores etiológicos, y posee una sensibilidad del 83% y especificidad del 64% en la predicción del riesgo de sufrir UPP<sup>145,146</sup>.

Los **cuidados preventivos de la piel** consisten en valorar el estado de la piel diariamente, incidiendo en la inspección de las zonas de prominencias óseas e identificando signos

de riesgo de la piel como sequedad, grietas, eritema, maceración, calor e induración<sup>147</sup>. Hay que examinar especialmente las zonas potencialmente húmedas, ya bien sea a causa de insuficiencia como de sudoración profusa<sup>148</sup>. Además, la piel se debe de mantener limpia y seca en todo momento. Está indicado el uso tópico de ácidos grasos hiperoxigenados<sup>149</sup>, así como la aplicación de aceite de oliva<sup>150,151</sup>. No se recomienda la realización de masajes, ya que no existe evidencia suficiente sobre sus ventajas terapéuticas y puede ocasionar la lesión o debilitación de la piel, sobre todo en zonas de prominencias óseas<sup>152,153</sup>. Tampoco se aconseja el uso de alcohol sobre la piel, como es el caso de la aplicación de colonia sobre el individuo.

El **manejo de la presión** se basa en cuatro elementos: movilizaciones, cambios posturales, empleo de superficies especiales de manejo de la presión y protección local. Las movilizaciones tienen como objetivo el mantenimiento de la masa muscular y mejora de la circulación y con ello la perfusión de los tejidos. Se recomienda el cambio de posición al menos cada seis horas para los individuos con riesgo moderado de UPP y cada 4 horas para aquellas personas de alto riesgo<sup>154</sup>. Existen diferentes mecanismos de superficies especiales encargadas del manejo de presiones, construidas con diferentes materiales como espuma o silicona, además de estructuras dinámicas que distribuyen temporalmente la presión de ciertas zonas<sup>155</sup>. Asimismo, en zonas susceptibles de aparición de lesión se aconseja el uso de apósitos o dispositivos para aliviar la presión existente<sup>156</sup>.

### 3.7 Tratamiento

El tratamiento de la UPP debe tener un enfoque multidisciplinar. Depende de características como el grado de la úlcera, exudado, tejido existente en el lecho de la herida, existencia signos de infección, existencia de dolor o estado de la piel perilesional. Es por ello que el tratamiento debe ser individualizado a cada paciente, ajustándolo a cada paciente<sup>157</sup>.

El protocolo a seguir según las directrices generales del GNEAUPP, cuando se presenta una UPP, están basadas en: valoración para el tratamiento, cuidados generales, cuidados propios de la úlcera y seguimiento de la lesión<sup>158</sup>.

La **valoración** de la UPP se lleva a cabo teniendo en cuenta diferentes aspectos: una valoración inicial del paciente, una valoración nutricional, una valoración psicosocial, una valoración del entorno de cuidados y una valoración de la lesión.

Los **cuidados generales** al paciente se fundamentan en la prevención de nuevas lesiones por presión, un soporte nutricional y un soporte psicosocial. La terapia sobre la nutrición del paciente es eficaz en relación a mantener o modificar en normopeso, hidratación correcta, promocionar la independencia de la alimentación, nutrición equilibrada y aumento de proteínas en la dieta<sup>159</sup>.

Los **cuidados específicos** de la UPP, son modificables en cada situación, en función de las características de la lesión <sup>158</sup>. En el caso de una UPP de grado I se aconseja aliviar la presión de la zona afectada y utilizar ácidos grasos hiperoxigenados<sup>149</sup>. En UPP de grado II, III y IV, el tratamiento consistirá en el desbridamiento del tejido necrótico, limpieza de la herida<sup>160</sup>, prevención y abordaje de la infección bacteriana y elección del producto que mejor mantenga el lecho de la herida húmedo y a temperatura corporal<sup>161,162</sup>. Está demostrado que la cura en ambiente húmedo tiene una gran ventaja costo-efectiva, ya que además de reducir el número de curas y por ende la manipulación, es beneficiosa para la cicatrización<sup>163</sup>. Aunque hay evidencia de que los apósitos colaboran en la cicatrización de la úlcera, aún se desconoce cuál es el apósito más efectivo<sup>159,162</sup>.

Además del uso de apósitos, existen otras terapias de reciente implantación como es el tratamiento con Plasma Rico en plaquetas (PRP), la cual consiste en la extracción y activación de las plaquetas de sangre autóloga y su posterior utilización como gel rico en factores de crecimiento<sup>164</sup>.

Igualmente han surgido terapias alternativas, declaradas como tratamientos complementarios, tales como la terapia de presión negativa, de ultrasonidos, estimulación eléctrica o terapia láser<sup>165</sup>.

La terapia de presión negativa consiste en la aplicación de un apósito con un dispositivo que aplica la presión negativa o succión de fluidos de la herida. Este apósito también es conocido como “vacum”<sup>166</sup>. Aunque la evidencia actual sobre esta terapia no está demostrada<sup>159,165</sup>, este tratamiento se aplica tanto para heridas quirúrgicas<sup>167</sup> como para úlceras venosas<sup>168</sup> o UPP<sup>169</sup>; pero en especial en aquellas heridas en las que hay una gran cantidad de exudado<sup>170</sup>.

La terapia con ultrasonido se aplica en baja (entre 22,5 y 40 Kilohercios) y alta frecuencia (entre 1 y 3 megahercios)<sup>171-173</sup>. Además de su acción cicatrizante, se ha descrito como terapia antibacteriana<sup>174</sup> y como desbridante de tejido necrótico<sup>175</sup>. Está especialmente estudiada en úlceras de estadio III y IV<sup>176</sup>. Aun así, no existe suficiente evidencia sobre la indicación de la terapia de ultrasonido en UPP<sup>165,177</sup>.

La electroterapia se basa en el empleo de energía electromagnética sobre diferentes superficies. Se ha estudiado en la reparación de hueso<sup>178</sup>, en la cicatrización de heridas<sup>179</sup> y en el alivio del dolor<sup>180</sup>. Su mecanismo se basa en la teoría de que esta intervención favorece la migración y proliferación de las células cargadas con esta energía, de modo que repara el tejido dañado<sup>179</sup>. A pesar de que existe una baja evidencia de sus propiedades cicatrizantes, es la terapia no farmacológica y alternativa que más efectos adversos presenta<sup>165</sup>.

La terapia láser es un tratamiento no farmacológico y no invasivo basado en el efecto fotobiomodulador de la laserterapia de baja potencia o conocida en sus siglas en inglés por LLLT (*Low Level Laser Therapy*). Este tratamiento consiste en la aplicación de luz láser para producir la cicatrización de heridas<sup>181</sup>.

Además de estas terapias, estudios *in vivo*, tratan de evidenciar nuevos procedimientos para mejorar la cicatrización de las UPP, como la aplicación de insulina tópica<sup>182</sup>, tratamiento con inhibidores de la ciclooxygenasa-2<sup>183</sup> o con esteroides anabólicos<sup>184</sup>.

El **seguimiento de la UPP** debe de fundamentarse en la recogida de todos los datos y características del individuo, así como de la lesión; desde la valoración, hasta el tratamiento e incluyendo la evolución de la UPP<sup>185</sup>. Uno de los instrumentos para el seguimiento más utilizados en UPP es el '*Pressure Ulcer Scale for Healing*', validado por el NPUAP en 1996<sup>186,187</sup>.

## 4. El láser

### 4.1 Historia del láser

Las propiedades de la luz con efecto terapéutico vienen siendo empleadas desde civilizaciones antiguas. En la Antigua Grecia, ya se usaba la helioterapia (exposición del cuerpo humano al sol para restablecer la salud)<sup>188</sup>. Del mismo modo, en el mundo romano se recomendaban baños de sol a diario. Incluso mucho después, en la Europa Medieval se continuó empleando la radiación solar para tratar enfermedades como raquitismo, psoriasis o eccema cutáneo, entre otras afecciones<sup>189</sup>. Las antiguas poblaciones de la India fueron pioneras en el uso de la fotoquimioterapia a través del empleo de *psoralens* (drogas obtenidas a través de las plantas) junto con la exposición solar, para tratar el vitíligo<sup>190</sup>. En el siglo IV a.C. Epicuro modificó la "teoría anatomista del universo", tratando de aportar un enfoque especial sobre la naturaleza de la luz<sup>191</sup>. Por ende, ya desde la antigüedad observamos un desarrollo de la terapia lumínica.

Es en el siglo XX con el desarrollo del científicismo, es cuando se describe el comportamiento y composición de la luz gracias al planteamiento de la teoría cuántica<sup>192</sup>. El físico Max Planck desarrolló esta teoría especificando que la luz estaba formada por paquetes indivisibles de energía radiante, denominados *cuantos*<sup>193</sup>. Tras este, Rutherford colaboró en el progreso planteando un modelo atómico donde el átomo estaba formado por una carga central y otras que orbitan alrededor de éstas dentro de una esfera<sup>194</sup>.

Más tarde, sería Niel Bohr quien, en 1913, a raíz de las teorías planteadas anteriormente, planteó la “teoría del movimiento de electrones”. En ella se describe que los electrones pueden desplazarse dentro del átomo; bien a orbitales superiores o inferiores en función de la ganancia o cesión de energía<sup>195</sup>.

A quien se le otorga el punto de partida de la tecnología láser es al físico alemán Albert Einstein, por su publicación sobre la “teoría de la emisión de radiación espontánea o estimulada” en 1916 <sup>196</sup>. La emisión estimulada se considera el proceso por el que un átomo puede ser excitado hasta un estado de energía inferior mediante el calentamiento, la interacción lumínica o de partículas. En cambio, la emisión espontánea se produce cuando un átomo decae a un nivel inferior sin la interacción con otra materia. Esta teoría fue científicamente revisada y confirmada posteriormente por el también físico alemán Rudolf Landberg en 1928<sup>197</sup>.

Durante los años 20 y 30 la emisión estimulada no fue de gran atrayente de estudio para los científicos. Fue en 1939 cuando Valentin A. Fabrikant sugirió trabajos de experimentación sobre la amplificación de la luz<sup>198</sup>.

Por cuestiones bélicas no fue hasta los años 50 cuando se continuaron los trabajos en este campo. Las nuevas aportaciones vinieron de la mano de Charles Townes, quien amplificó las frecuencias de las microondas mediante la emisión estimulada de la radiación. A esta creación se le conoció como MASER que sería el acrónimo de *Microwave Amplification by Stimulated Emission of Radiation* (amplificación de microondas mediante emisión estimulada de radiación)<sup>199</sup>.

Posteriormente, Townes junto con Shawlow aumentaron los principios del MASER a la porción óptica del espectro electromagnético, a través de la técnica de bombardeo óptico, de este modo el MASER se encuentra en la región del infrarrojo y es visible al espectro electromagnético. Así es como se crearon los MASERES en estado sólido, confeccionado con rubí para Bells Laboratories a fin de ampliar la red de comunicaciones de la compañía Bell <sup>200</sup>.

Gould en 1957 aplicó esta técnica de bombardeo óptico y elaboró su propio borrador, que finalmente patentó en 1968. Es en este momento cuando se originó el término LASER, acrónimo de “Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation” – Amplificación de la luz por emisión estimulada de radiación-<sup>201</sup>.

No fue hasta 1960, cuando Maiman creó el primer láser funcional; un láser pulsado de rubí que emitía a una longitud de onda de 694.3nm<sup>202</sup>. A raíz de esta creación se han desarrollado múltiples láseres. Concretamente, en 1961 Robert W. Hellwarth introdujo el elemento, conocido como *shuter u obturador*, el cual le otorga al laser la característica de emitir energía durante unos nanosegundos de forma alterna tras fases de reposo<sup>203,204</sup>.

Al láser se le atribuyen diferentes utilidades; siendo ampliamente usado en la industria, la química y la medicina<sup>202</sup>. En este último, el láser se ha empleado en la medicina prácticamente desde sus comienzos en campos como la dermatología o la oftalmología<sup>205</sup>. A lo largo del tiempo ha adquirido diferentes propiedades dependiendo de la especificidad de su uso.

## 4.2 Generalidades del láser

### **Conceptos básicos: radiación electromagnética y amplificación**

#### Radiación electromagnética

La radiación electromagnética es el transporte ondulado de los campos eléctrico y magnético dispuestos perpendicularmente entre sí y en la dirección de la propagación de esta energía<sup>206</sup>. La unidad básica es el fotón, definido como “partícula diferenciada que tiene una masa cero, sin carga eléctrica y un tiempo de vida indefinidamente largo”<sup>207</sup>. De este modo, las ondas electromagnéticas son fotones agrupados que viajan en el vacío a velocidad constante, conocida como velocidad de la luz ( $c$ ). La longitud de onda ( $\lambda$ ) es la distancia horizontal entre dos picos de la onda. Su unidad de medida es el metro, aunque debido a la medición del láser generalmente se encuentra expresado en nanómetros (nm). La frecuencia ( $f$ ) corresponde al número de ciclos o pulsos por

segundo, entendiendo como ciclo la rotación que hace la onda electromagnética alrededor del eje por el que se mueve y está medida en hercios (Hz). Por tanto, la frecuencia es inversamente proporcional a la longitud de onda; de tal modo que, a mayor frecuencia, menor longitud de onda, y viceversa. Los elementos descritos anteriormente están relacionados entre sí, de modo que  $\lambda = c / f$ <sup>208</sup>.

El espectro electromagnético es toda la correlación de ondas de energía comprendidas a lo largo de un amplio rango de longitudes de onda, abarcando desde los rayos gamma (1picómetro o  $10^{-12}$  metros), transcurriendo por los rayos X, ultravioleta, espectro visible, espectro infrarrojo, ondas de radiofrecuencia, hasta las ondas largas a los 10km. El espectro de luz visible corresponde a radiaciones electromagnéticas con longitudes de onda comprendidas entre 380 y 780 nm<sup>209</sup>.

### Amplificación

El fenómeno de amplificación ocurre en la cavidad de láser gracias al medio activo que contiene y al mecanismo de bombeo, el cual es el encargado de impulsar la energía al medio. Cuando así ocurre, la energía es absorbida por los electrones situados en los orbitales más externos de los átomos causando la excitación de reposo. En este momento se conoce como “*inverso de la población*”, donde existen un mayor número de electrones excitados que en reposo produciendo una *emisión estimulada* de energía en forma de fotón, como mecanismo de retorno a su estado anterior. Para que se produzca definitivamente el efecto de amplificación esta energía es conducida por el medio gracias a los dos espejos del resonador óptico<sup>210</sup>.

### **Componentes y funcionamiento del láser**

El láser está compuesto por un medio activo, el cual genera fotones y da nombre al láser. Este puede estar compuesto por diferentes materiales como sólidos, pudiendo estar compuestos por cristales de itrio, aluminio y granate (YAG), gaseosos (CO<sub>2</sub>), semiconductores (láser de diodo) o líquidos. El medio activo está situado habitualmente entre dos espejos; uno totalmente reflexivo y otro parcialmente transmisivo. A este conjunto se le conoce como resonador óptico. La emisión estimulada genera una onda electromagnética que se traslada a lo largo del eje del resonador y oscila entre los dos

espejos. Este fenómeno genera la amplificación de la energía por lo que resulta un cúmulo de intensidad. La liberación de la luz se produce por el espejo parcialmente transmisor. Además, el láser cuenta con un sistema de refrigeración para poder disipar la energía que se disipa en forma de calor<sup>211</sup>.

### **Principios físicos del láser**

Los procesos fundamentales del funcionamiento del láser se basan en procesos físicos tales como la emisión espontánea, la emisión estimulada y la absorción <sup>212</sup>:

- Absorción: proceso por el que un electrón puede desplazarse a un orbital superior.
- Emisión espontánea: proceso por el que un electrón puede desplazarse a un nivel inferior obteniendo por consiguiente la excitación de modo espontáneo.
- Emisión estimulada: proceso por el que un electrón puede desplazarse a un orbital inferior, resultado de la administración de una radiación externa, obteniendo por consiguiente la excitación del átomo.

Además de estos tres procesos, el bombeo juega un papel fundamental en la mecánica del láser y consiste en un proceso por el cual los átomos son elevados de un bajo a un alto nivel de energía. Generalmente, esto se consigue a través de distintas técnicas y las más usadas son el bombeo óptico y el bombeo eléctrico.

### **Propiedades de la luz láser**

La luz láser presenta una serie de propiedades específicas que la difiere de la luz visible<sup>213,214</sup>:

- Monocromaticidad: el haz de luz láser es de un solo color, que será o no visible en función de la franja del espectro electromagnético que emita la longitud de onda del aparato láser
- Coherencia: todas las ondas que componen el haz de luz láser son idénticas en cuanto a amplitud, frecuencia y sincronización.
- Colimación: está en relación con la dirección de la luz láser. Los rayos resultantes

del láser son paralelos y esta propiedad desaparece cuando la luz interacciona con los tejidos.

- Intensidad: es una medida de potencia por unidad de superficie. Gracias a esta intensidad se permite focalizar la radiación en un punto, aumentando la energía administrada en ese punto.

### **Modo de emisión**

La emisión de la energía láser puede atender a diferentes parámetros y modalidades, de modo que los parámetros que se pueden alterar en la aplicación láser pueden ser<sup>215</sup>:

- Potencia: potencia de salida perteneciente al propio láser. Su unidad de medida es en watios (W).
- Energía: nos indica la energía que se entrega por segundos y está relacionada con el tipo de emisión y la potencia de salida del equipo. Se expresa en Julios (J), o lo que es lo mismo, W por segundo.
- Densidad de energía (DE) o fluencia: es la relación existente entre la energía suministrada por un emisor láser y la superficie del spot primario de éste. Se expresa en Julios/cm<sup>2</sup> (J/cm<sup>2</sup>).

Todos estos parámetros están estrechamente relacionados con el modo de emisión, pues para calcular la dosis exacta de administración de energía será necesario conocer el tiempo en el que ésta es administrada. Las modalidades por las que se puede aplicar esta energía son <sup>215,216</sup>:

- Modo continuo: se produce una emisión continua con un nivel de energía determinado mientras el láser esté activo.
- Modo alterno: se trata de la emisión alterna de energía por lo que el láser se activa y desactiva gracias a la acción de un obturador.
- Modo pulsado: consiste en la emisión de energía a alta potencia durante un periodo extremadamente corto sucedido de un tiempo relativamente prolongado en el que el láser está desactivado.

La dosis de energía varía según la duración de la aplicación del láser, de acuerdo con la fórmula  $\text{Tiempo (s)} = (\text{J/cm}^2 \times \text{área del spot}) / \text{W}$ . Por ejemplo, para alcanzar una densidad de energía de  $1\text{J/cm}^2$  y una potencia de salida de  $0,2\text{W}$ , donde el área del spot es  $1.54\text{cm}^2$ ; el láser sería aplicado por un tiempo de  $7,7$  segundos en modo continuo<sup>217</sup>.

#### 4.3 Tipos de láser

La clasificación de los láseres más utilizada atiende al medio activo usado para realizar el fenómeno láser, de manera que se pueden dividir en cinco grupos <sup>218</sup>:

- Láseres de estado sólido, como por ejemplo los láseres de rubí, Nd: YAG, alejandrita, fibra óptica, titanio-zafiro, o uranio-cadmio, entre otros.
- Láseres de gas, entre los que se pueden encontrar el de helio-neón, helio-cadmio, argón-ion, o dióxido de carbono
- Láseres de colorante líquido, como la rodamina.
- Láseres de diodo semiconductor; siendo los más conocidos el arseniuro de Galio (GaAs), Arseniuro de Galio Aluminio (GaAlAs), Arseniuro de Galio e Indio (InGaAs) y Fosforo Arseniuro de Galio e Indio (InGaAsP)
- Láseres de electrones libres.

Otra clasificación más apropiada en el ámbito atiende a dos grandes grupos en función de su potencia y capacidad de interacción con los tejidos; los láseres de alta intensidad de energía o quirúrgicos (High Intensity Laser Therapy –HILT) y los láseres de baja intensidad de energía (Low- Level Laser Therapy- LLLT)<sup>219</sup>.

Los **láseres de baja intensidad de energía** son también llamados láseres terapéuticos. Entre sus características más importantes se encuentra el no aumento de temperatura, el calor sensible, los sonidos o las vibraciones. Por lo tanto, presentan características especiales como la fotobiomodulación; por lo que es idóneo en la aceleración y perfeccionamiento de la cicatrización<sup>220</sup>. Un láser es considerado de baja intensidad cuando libera una potencia de salida inferior a  $1\text{W}$ , densidad de energía por debajo de  $10\text{J/cm}^2$  <sup>221,222</sup>.

Los **láseres de alta intensidad de energía** son caracterizados por su efecto térmico, lo que significa que la energía absorbida es transformada en forma de calor, incrementando la temperatura. A pesar de que el láser de diodo se considera un láser de alta intensidad, se puede usar como láser de baja intensidad, ya que produce efectos terapéuticos siempre que se utilicen con una potencia de salida inferior a 1W<sup>222</sup>.

#### 4.4 Efecto del láser sobre los tejidos

La respuesta biológica del tejido irradiado está influenciada por diferentes parámetros del láser como es la longitud de onda, diámetro del spot, potencia de salida, modo de emisión, o tiempo de radiación, junto con el estado físico, químico y biológico del tejido<sup>223</sup>.

Teniendo en cuenta estos factores, los efectos del láser sobre los tejidos pueden ser fototérmico, fotomecánico o fotoquímico<sup>224</sup>.

El **efecto fototérmico** se produce cuando la energía en forma de fotón es absorbida por el tejido. A nivel molecular, esta absorción produce una vibración, a causa de la excitación de los electrones, alterando la energía cinética de estas moléculas. Como resultado, se libera energía en forma de calor. Este calor provoca el aumento de la temperatura de la zona, comenzando por la dispersión de las estructuras adyacentes<sup>225</sup>. Dependiendo de la temperatura alcanzada en la zona irradiada se desencadenan las diferentes respuestas tisulares. De este modo, el primer mecanismo que ocurre tras un efecto fototérmico es la desnaturalización molecular, entorno a los 43°C en el tejido. Entre los 43 y 45°C se produce retracción del tejido e hipertermia, comenzando el proceso de destrucción celular. A los 50°C, se ocasiona la reducción de la actividad enzimática. A los 60°C, se origina la desnaturalización de las proteínas. Entorno a los 80°C, se observa la desnaturalización del colágeno, aumento masivo de la permeabilización de las membranas. A los 100°C aproximadamente se desarrolla la carbonización celular. A partir de 300°C se produce la vaporización del tejido. Entre las acciones del efecto fototérmico sobre el tejido se encuentra la incisión, ablación y

hemostasia o coagulación. Por ello, la aplicación clínica más frecuente es en el campo quirúrgico<sup>223</sup>.

De otro modo, el **efecto fotomecánico** ocurre mediante ondas acústicas que aumentan la presión del tejido, desencadenando la destrucción de este<sup>223</sup>. Una característica es que no causa aumento de la temperatura tisular<sup>226</sup>. A causa de este efecto, la terapia laser se ha considerado útil en la destrucción de cálculos renales, a través de la aplicación de esta energía a modo pulsado<sup>227</sup>.

El **efecto fotoquímico** sucede tras la liberación de energía, la cual es absorbida por moléculas fotosensibles o fotoreceptoras, desencadenando reacciones bioquímicas en las células de los tejidos. Esta respuesta puede retrasar la muerte celular; así como, desarrollar el estímulo oportuno para activar el mecanismo de cicatrización. Este efecto no está relacionado con un aumento de la temperatura<sup>224</sup>. El efecto fotoquímico ha sido empleado en la terapia fotodinámica y la terapia fotobiomoduladora.

La **terapia fotodinámica**, también denominada fotobiomodulación, consiste en la excitación de cromóforo (molécula fotorreceptora de la mitocondria) exógeno. De este modo, el cromóforo introducido con fin terapéutico absorbe la energía láser y transfiere esta energía en forma de señal a otras moléculas adyacentes desencadenando cambios químicos en el tejido subyacente. Concretamente, estos cambios son conducidos hacia la producción de toxicidad para la célula, causando la muerte de esta<sup>228</sup>. La terapia fotodinámica es empleada en el tratamiento de tumores<sup>229</sup>.

En cambio, la **fotobiomodulación** se produce por la absorción de la energía láser por un gran número de cromóforos endógenos, desencadenando la activación celular. Esta terapia es utilizada en distintos campos clínicos como la dermatología u la odontología, entre otros<sup>230,231</sup>.

#### 4.5 Terapia láser fotobiomoduladora

La terapia láser bioestimulante, también conocida como 'Terapia láser de baja energía' o fotobiomodulación (PBM) láser, consiste en la aplicación de energía láser de baja intensidad transmitida en forma de luz con el propósito de promover una respuesta biológica en el tejido receptor<sup>232</sup>. A diferencia de otros efectos, también producidos por el láser, la PBM no induce aumento de la temperatura en el tejido. Por ello, aplicado a dosis adecuadas, puede emplearse como terapia regenerativa desencadenando una respuesta fotoquímica con fines analgésicos, antiinflamatorios o de reparación de tejido dañado<sup>233-235</sup>.

El uso de condiciones del láser y la irradiación de dosis de energía adecuadas determinan el éxito de la terapia fotobiomoduladora. Por ello, los parámetros descritos como óptimos para PBM láser son<sup>236-238</sup>:

- **Longitud de onda:** existe mayor efectividad en láseres con longitudes de onda comprendida entre 600 y 700nm, y 780 y 1100nm; siendo la franja de 700 a 780nm inefectiva en PBM. Estas longitudes de onda corresponden a la región roja e infrarroja del espectro visible.
- **Tipo de láser:** según el medio por el cual el láser opera, los láseres con mayores beneficios PBM son helio-neón, helio- cadmio, argón, láseres de diodo semiconductores y dióxido de carbono.
- **Modo de emisión:** la emisión de energía en tanto en modo pulsado como en continuo han resultado ser efectivos.
- **Potencia de salida:** se ha evidenciado mayor eficacia entre 1mW y 500mW. En cambio, la aplicación de energía superior a 500mW causa efecto térmico, el cual causa deterioro de la zona irradiada.
- **Densidad de energía:** energía aplicada de 0,04 a 50 J/cm<sup>2</sup> es la excelente para conseguir efecto PBM.

Son varias las teorías las cuales explican el mecanismo molecular mediante el cual la luz puede desencadenar la activación celular. Una de las hipótesis explica la activación del

complejo enzimático Citocromo C oxidasa (Cox) tras la absorción de energía, resultando en la producción de ATP<sup>239,240</sup>. Este complejo multienzimático también es conocido como complejo IV de la cadena de transporte de electrones de la mitocondria. Está compuesta por dos grupos *hemo* (también llamados citocromo a y citocromo a<sub>3</sub>) y dos centros de cobre (conocidos Cu<sub>A</sub> y Cu<sub>B</sub>)<sup>241</sup>. Estos átomos de metal son probablemente los que caracterizan al Cox como molécula fotoreceptores de la luz láser del espectro rojo o infrarrojo<sup>242</sup>. De otro modo, también se sugiere que cuando un fotón es absorbido por la Cox se produce un incremento de la disponibilidad de electrones, lo que causa la reducción de la molécula de oxígeno, así como el aumento de los niveles de ATP, AMPc (adenosín monofosfato cíclico), ROS, óxido nítrico (NO) y calcio intracelular (Ca<sup>2+</sup>)<sup>243</sup>.

Por otro lado, persiste la hipótesis de la fotodisociación del NO, revirtiendo la inhibición de la respiración mitocondrial a causa de la excesiva unión de NO<sup>244</sup>. De este modo, la absorción por el Cox de energía en forma de luz causa la disociación de dicha unión. Esto permite un aporte inmediato de oxígeno, por lo que se reanuda la respiración y la generación por consiguiente de ATP y ROS<sup>245</sup>.

La respuesta más evidente en la mitocondria tras la aplicación de energía lumínica es un aumento de ATP causado por una mayor actividad del Cox<sup>246</sup>. Por otra parte, el ATP es el sustrato de la adenil-ciclase por lo que la cantidad de ATP puede relacionarse con el nivel de AMPc. El ATP extracelular participa en una gran variedad de vías de señalización, pudiendo inducir a cambios funcionales significativos en una amplia variedad de tipos de células<sup>247</sup>. De hecho, este fue descrito por primera vez por Burnstock como un neurotransmisor no adrenérgico<sup>248</sup>. No obstante, hasta la fecha no hay estudios que muestren específicamente que la aplicación de energía láser pueda estimular el ATP extracelular o la adenosina<sup>237</sup>. Por otro lado, la unión del ATP intracelular a su receptor provoca la apertura de los canales de sodio y calcio, pudiendo originar un aumento de Ca<sup>2+</sup> en el interior de la célula<sup>249</sup>.

Varios estudios demuestran el aumento de AMPc tras la aplicación de energía lumínica de baja intensidad<sup>250,251</sup>. Aunque este incremento puede considerarse como

consecuencia del aumento de ATP a causa de la energía lumínica administrada, aún no hay evidencia que sustente esta afirmación. El AMPc estimula la formación de prostaglandina E2 que causaría la inhibición de síntesis de TNF $\alpha$ , por lo que podría regular el proceso inflamatorio. Se ha demostrado niveles reducidos de TNF $\alpha$  tras la aplicación de láser de baja energía, que probablemente pueda estar relacionado con el incremento de AMPc<sup>252</sup>.

El calcio intracelular regula todos los procesos importantes en el cuerpo humano, como son la contracción muscular, la coagulación sanguínea, regulando la liberación de neurotransmisores o modulando la expresión génica. Diversos estudios afirman el aumento de Ca<sup>2+</sup> tras la aplicación de energía lumínica<sup>253</sup>. En cambio, cuando los niveles de Ca<sup>2+</sup> se encuentran elevados, como ocurre en situación de excitotoxicidad, la terapia lumínica puede producir un descenso de estos niveles, protegiendo las neuronas de la muerte<sup>254</sup>.

La terapia láser también puede producir aumento de ROS mitocondrial<sup>253,255</sup>. Su efecto puede ser beneficioso en bajas concentraciones y durante breves exposiciones, y nocivo en altas concentraciones y en exposiciones crónicas a largo plazo<sup>256</sup>. En células normales, la absorción de la luz por el Cox conduce a una alteración de la membrana mitocondrial produciendo un aumento de ROS. No obstante, en situaciones donde el nivel de ROS es alto o se encuentra un estrés oxidativo durante un tiempo prolongado, la absorción de luz por el Cox causa la reducción de los niveles de estas moléculas<sup>257,258</sup>.

## JUSTIFICACIÓN

Cuando un tejido es dañado se produce la reparación de este, de modo natural. En ocasiones, este proceso se lleva a cabo de forma lenta, prolongando el tiempo de cicatrización y pudiendo ocasionar la cronicidad de la herida. Las UPP son las heridas crónicas más prevalentes en la mayoría de países, constituyendo un grave problema de salud para los pacientes; así como, ocasionando un alto impacto en el coste del sistema sanitario. Por ello, el abordaje de estas lesiones se ha convertido en objeto de diversas iniciativas por parte de las autoridades sanitarias en las últimas décadas.

Actualmente, la literatura acerca de la evidencia de terapias curativas es muy amplia, a fin de generar una temprana cicatrización de estas heridas y evitando la complicación de eventos adversos con la mayor eficiencia posible. Numerosos estudios demuestran el empleo de la energía láser como herramienta útil en muchas disciplinas sanitarias. En concreto, el láser de baja intensidad, como es el láser de diodo, tiene un efecto fotobiomodulador sobre los tejidos, adquiriendo propiedades analgésicas, antiinflamatorias y regenerativas.

Como paso previo a la utilización clínica de la terapia láser en el tratamiento de las UPP es obligado su estudio *in vitro*, utilizándose los fibroblastos como modelo de tejido blando (los fibroblastos son las principales células de los tejidos blandos y esenciales en el proceso de reparación tisular).

A pesar de que hay estudios que demuestran la capacidad de reparación de tejido blando mediante terapia láser, existen variaciones significativas en cuanto a dosimetría y efecto sobre los fibroblastos. De ahí la importancia de definir los parámetros dosimétricos y la pauta de tratamiento, ya que ello puede constituir una herramienta fundamental en la práctica clínica, especialmente en su aplicación bajo condiciones óptimas en el tratamiento de heridas crónicas, como las UPP.

## HIPÓTESIS

El láser de diodo de 940nm posee un efecto fotobiomodulador sobre el fibroblasto, el cual actúa sobre diferentes parámetros biológicos de esta población celular como el crecimiento, la modulación del perfil antigénico y la expresión génica. Estos efectos presentan al láser de diodo de 940nm como una posible herramienta terapéutica, de gran utilidad y fácil manejo, en el proceso de reparación de tejidos blandos; en especial en heridas crónicas, como UPP.

## OBJETIVOS

### **Objetivo general**

Determinar el efecto fotobiomodulador del láser de diodo de 940nm sobre los fibroblastos humanos en cultivo.

### **Objetivos específicos**

1. Identificar el efecto del láser de diodo de 940nm sobre el crecimiento de los fibroblastos humanos en cultivo.
  - 1.1. Determinar mediante *screening* las dosis óptimas de aplicación del láser de diodo de 940nm para determinar su efecto sobre la capacidad proliferativa de fibroblastos humanos.
  - 1.2. Analizar el efecto del láser de diodo de 940nm sobre el ciclo celular de los fibroblastos humanos en cultivo.
2. Determinar el efecto del láser de diodo de 940nm sobre la expresión de marcadores de diferenciación de los fibroblastos humanos en cultivo.
3. Conocer el mecanismo de actuación del láser de diodo de 940nm mediante el estudio de la expresión génica de distintos marcadores implicados en el crecimiento y diferenciación del fibroblasto.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. Línea celular de fibroblastos humanos

Para la realización de este estudio, se utilizó la línea de fibroblastos humanos **CCD-1064Sk**. Esta es una línea tipificada de fibroblastos procedentes de piel humana, proporcionada por la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) (ATCC: CRL-2076), a través del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

### 2. Cultivo de la línea celular CCD- 1064Sk.

La línea celular CCD-1064Sk fue cultivada en frascos de 25 cm<sup>2</sup> de superficie (Falcon, Labware, Oxford, UK) con 10 ml de medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Invitrogen Gibco, Cell Culture Products, Carlsbad, CA) suplementado con L-Glutamina al 1% (Sigma CHem. Comp., St Louis, Mo, USA), HEPES al 2% (Sigma CHem. Comp., St Louis, Mo, USA), 100 UI/ml de Penicilina (Laboratorios ERN S.A., Barcelona, España), 2,5 µg/ml de Anfotericina B (Sigma Chemical Co), 50 µg/ml de Gentamicina (Braun Medical S.A. Jaén, España) y suero bobino fetal (SBF) (Gibco, Paisley UK), previamente descomplementado en un baño a 56°C durante 30 minutos, a una concentración final del 10%.

Las células conservación fueron conservadas mediante cultivo en el medio anteriormente descrito a 37°C, en una atmósfera húmeda con un 95% de aire y un 5% de CO<sub>2</sub> hasta conseguir un crecimiento semiconfluyente.

Esta línea celular crece adherida a la superficie del frasco de cultivo, por lo que para su empleo o subcultivo fue necesario separarlas del mismo. Para ello, se retiró el medio de cultivo y se lavó con una solución de tampón fosfato salino a pH 7.4 (PBS) a fin de eliminar restos de medio o residuos celulares. A continuación, se añadieron 5 ml de una solución de Tripsina, a una concentración de 0.05% (Sigma-Aldrich Co) y ácido etilendiamino-tetraacético (EDTA) al 0.02% (Sigma-Aldrich Co), incubándose durante 10 min a 37°C. Transcurrido dicho periodo, la actividad enzimática se neutralizó con 7 ml de medio DMEM suplementado al 10% con SBF. La suspensión celular resultante fue

centrifugada a 1200 rpm durante 10 minutos a la 7°C. El sedimento celular obtenido se suspendió en medio de cultivo para su posterior uso.

### 3. Características del láser de diodo de 940nm

El láser utilizado (ezLase™, Biolase Technology, Inc., Irvine, CA) es un láser de diodo semi-conductor de InGaAsP, que opera a una longitud de onda de  $940 \pm 10\text{nm}$ . Este dispositivo está equipado con una pieza de mano específica para bioestimulación, que posee un área de spot de salida de  $1.54\text{cm}^2$ .

En relación a la capacidad operativa del láser, es posible su empleo en dos modos de emisión: continuo y pulsado. En el modo continuo (Modo CW), la energía láser se transfiere de manera constante. En el modo pulsado la energía láser es aplicada en forma de repetidos pulsos, combinando con intervalos de descanso. Dicho láser contiene diferentes modos pulsados: CP0, CP1, CP2 y CP3. El modo CP0 se corresponde a un ciclo de trabajo del 20% (intervalo de aplicación de energía de 10 microsegundos y 40 microsegundos apagado). El modo CP1 se corresponde a un ciclo de trabajo del 33% (intervalo de aplicación de energía de 100 microsegundos de aplicación de energía y 200 microsegundos de apagado). El modo CP2 se corresponde a un ciclo de trabajo del 50% (intervalo de aplicación de energía de 1 milisegundo y 1 milisegundo sin aplicación); y por último el modo CP3 que se corresponde a un ciclo de trabajo del 50% (pero en este caso el intervalo de aplicación es de 20 milisegundos de trabajo y 20 milisegundos apagado).

### 4. Tratamiento láser aplicado.

La línea celular objeto de nuestro estudio fue tratada con el láser de diodo de 940nm descrito anteriormente. Los fibroblastos humanos fueron irradiados con el láser a una distancia de 1 cm con respecto al cultivo celular. Antes de realizar el tratamiento, las células fueron cultivadas durante 24 horas en medio de cultivo, en cada uno de los ensayos.

El tratamiento aplicado correspondió a diferentes condiciones de potencia (0.2, 0.5 y 1 W) y de densidad de energía (1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 J/cm<sup>2</sup>). Los modos de emisión utilizados fueron el modo continuo y el modo pulsado en ciclos del 20% y del 50% (CP0 y CP3 respectivamente). En todos los ensayos, la placa de cultivo no se cubrió durante la irradiación, la cual se realizó a temperatura ambiente. Las células control fueron cultivadas en las mismas condiciones, pero no fueron irradiadas con el láser.

El tiempo de irradiación se determinó según la densidad de energía, la potencia y el área del spot de salida de la pieza de bioestimulación, según la siguiente fórmula:

$$Tiempo (s) = \frac{\left(\frac{Julios}{cm^2}\right) \times \text{área del spot}}{Wattios}$$

Todos los ensayos, con las distintas pautas de tratamiento, fueron realizados por triplicado.

5. Estudio sobre la capacidad proliferativa de fibroblastos humanos tratados con láser de diodo de 940nm.

El efecto del láser sobre la capacidad proliferativa de los fibroblastos humanos se realizó mediante la técnica de espectrofotometría de MTT (Thiazolyl blue Tetra-zolium Bromide 97.5% TLC, Sigma-Adrich. Co), a las 24 y 72 horas del tratamiento con el láser. Esta técnica mide respiración celular y está basada en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (producto de color amarillo), a cristales de Formazán (producto de color púrpura) por parte de las células viables. La concentración de Formazán es directamente proporcional al número de células viables en el cultivo estudiado.

Los cultivos realizados para el estudio de la proliferación celular se realizaron en placas de 24 pocillos (Falcon, Becton Dickinson Labware, Nueva Jersey, Estados Unidos), ajustados a una concentración celular final de  $2 \times 10^4$  células/ml, y suspendidas en medio de cultivo con SBF al 10%. Dichas placas fueron incubadas a 37°C en estufa al 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas.

Una vez transcurridas las 24 horas, se sustituyó el medio de cultivo por medio fresco. Las células fueron tratadas con el láser de diodo atendiendo a las diferentes condiciones de potencia (0.2, 0.5 y 1 W) y densidad de energía (1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 J/cm<sup>2</sup>), realizando la experiencia en cada uno de los 3 modos mencionados anteriormente (CW, CP0 y CP3). Las células control se conservaron en las mismas condiciones descritas anteriormente, pero sin el tratamiento con láser.

Pasado el tiempo de incubación (24 y 72 horas), se retiró el medio de cultivo de todos los pocillos y posteriormente las células se lavaron con medio DMEM sin rojo fenol. A continuación, se añadió 1ml por pocillo de medio DMEM sin rojo fenol que contenía 5 mg/ml de MTT, incubándose durante 4 horas a 37°C en estufa al 5% de CO<sub>2</sub>. Transcurrido este tiempo, se retiró el sobrenadante y se añadió 1ml por pocillo de Dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck Chemicals, Nottingham, Reino Unido), para disolver los cristales de Formazán, el cual se dejó actuar durante 30 minutos. Posteriormente se midió la viabilidad celular en un espectrofotómetro, a una longitud de onda de 570nm (SUNRISE TM-Basic, TECAN, Männedorf, Suiza).

Los resultados fueron expresados como tasa proliferativa, expresada en porcentaje en función del control. Esta tasa fue calculada mediante la siguiente fórmula:

$$PROLIFERACIÓN (\%) = \frac{\text{Grupo tratado } OD570}{\text{Grupo control } OD570} \times 100$$

#### 6. Estudio sobre el ciclo celular de fibroblastos humanos tratados con láser de diodo de 940nm.

El efecto del láser sobre el ciclo celular de los fibroblastos humanos se determinó mediante citometría de flujo.

Para el estudio del ciclo celular, los cultivos se realizaron en placas de 24 pocillos (Falcon), ajustados a una concentración celular final de 2x10<sup>4</sup> células/ml, y suspendidos

en medio de cultivo con SBF al 10%. Dichas placas fueron incubadas a 37°C en estufa al 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas.

Transcurrido este tiempo, se sustituyó el medio de cultivo por medio fresco. Las células fueron tratadas con el láser de diodo de 940nm en modo CW a diferentes condiciones de potencia (0.2 y 0.5 W) y densidad de energía (2, 3 y 4 J/cm<sup>2</sup>). Después, se dejaron incubar 24 horas en condiciones estándar de cultivo. Las células control se conservaron en las mismas condiciones descritas anteriormente, sin la aplicación de la intervención de láser.

Transcurridas las 24 horas, se retiró el medio de cultivo de cada pocillo y se lavó con PBS. Las células adheridas a la superficie de la placa de cultivo fueron despegadas con 1 ml de Tripsina-EDTA a 37°C durante 10 minutos. A la suspensión celular obtenida se le añadió un volumen de 1 ml de medio de cultivo al 20% de SBF y se centrifugó a 1200 rpm durante 10 minutos. El sedimento celular obtenido se suspendió en PBS (200µl) y se añadieron 2 ml de etanol frío al 70% para fijar las células, dejándolas incubadas durante 30 minutos en hielo. Tras este tiempo, las células fueron centrifugadas a 1500 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente, y se suspendieron en 400 µl de PBS. A continuación, se añadieron 50 µl de RNasa (1mg/ml) y 50 µl de Ioduro de Propidio (IP), dejándolas incubar durante 30 minutos a 37°C. Finalmente, las células fueron analizadas utilizando un citómetro con un láser de argón-ion de estado sólido a una longitud de onda de 488nm (FASC Canton II, SE Becton Dickinson, Palo Alto, California, USA). Los resultados fueron expresados en porcentaje de células en cada fase (G0 / G1, S y G2 / M), mostrándose dichos porcentajes como valores medios y desviaciones típicas correspondientes.

#### 7. Estudio sobre el perfil antigénico de fibroblastos humanos tratados con láser de diodo de 940nm.

El estudio del perfil antigénico de la línea de fibroblastos humanos tratada con láser de diodo fue determinado mediante el uso de anticuerpos monoclonales (Abmos): anti-

fibronectina humana y anti- $\alpha$ -actina, los cuales se especifican en la Tabla 1, y la técnica de microscopía confocal.

Los cultivos realizados para el estudio de la proliferación celular se realizaron en pocillos estériles específicos para microscopía (Nunc, Sigma Chemical Co., St. Louis, Misuri, Estados Unidos), ajustados a una concentración celular final de  $2 \times 10^4$  células/ml, y suspendidos en medio de cultivo con SBF al 10%. Dichas placas fueron incubadas a 37°C en estufa de CO<sub>2</sub> durante 24 horas.

Transcurrido este tiempo, las células fueron tratadas con el láser de diodo de 940nm en modo CW a diferentes condiciones de potencia (0.2 y 0.5 W) y densidad de energía (3 y 4 J/cm<sup>2</sup>), dejándolas incubar 72 horas en condiciones estándar de cultivo. Las células control se conservaron en las mismas condiciones descritas anteriormente, sin el tratamiento con el láser.

Después de 72 horas tras el tratamiento, las células fueron fijadas con una solución fría de metanol-acetona (v/v) durante un periodo de 10 minutos a temperatura ambiente. Una vez finalizado el tiempo de fijación, las células fueron lavadas 3 veces con PBS, bloqueándose las uniones inespecíficas con SBF al 10% en PBS, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las células fueron marcadas con los Abmos anti-fibronectina humana unida a isocianato de fluoresceína (FICT: fluorescencia verde) y anti- $\alpha$ -actina humana unida a ficoeritrina (PI: fluorescencia roja) a una concentración de 1:500 durante 2 horas a 37°C en oscuridad. Transcurridas las 2 horas, las células fueron lavadas 2 veces con PBS y sus núcleos fueron teñidos con DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, Sigma Chemical Co) a una concentración de 10  $\mu$ g/ml, para lo cual se dejó incubar durante 15 minutos. Pasado este tiempo se volvió a lavar con PBS y se visualizaron las células con un microscopio de láser confocal (Leica, DM IRB, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania).

**Tabla 1.-** Anticuerpos monoclonales utilizados en el estudio del efecto del láser de diodo de 940nm sobre el perfil antigénico de los fibroblastos humanos. FITC: isocianato de fluoresceína. PE: ficoeritrina.

<b>Abmo</b>	<b>Fluorocromo</b>	<b>Distribuidor</b>
<b>Anti-fibronectina humana</b>	FITC	R&D Systems (Minneapolis, Minnesota)
<b>Anti-<math>\alpha</math>-actina humana</b>	PE	R&D Systems (Minneapolis, Minnesota)

8. Estudio sobre la expresión génica de fibroblastos humanos tratados con láser de diodo de 940nm.

El estudio sobre la expresión génica de fibroblastos humanos tratados con láser de diodo se llevó a cabo mediante la técnica cuantitativa de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR).

Los cultivos realizados para el estudio de la expresión génica se realizaron en placas de cultivo de 24 pocillos, ajustados a una concentración celular final de  $2 \times 10^4$  células/ml, y suspendidas en medio de cultivo con SBF al 10%. Dichas placas fueron incubadas a 37°C en estufa de CO<sub>2</sub> durante 24 horas.

Transcurrido este tiempo, las células fueron tratadas con el láser de diodo de 940nm en modo CW a 0.5 W de potencia y a una densidad de energía de 4 J/cm<sup>2</sup>. Se atendió a dos pautas de tratamiento: T1 (una sola dosis de energía y análisis a las 72 horas del tratamiento) y T2 (dos dosis de energía; una al inicio del ensayo y otra a las 72 horas, procediéndose al análisis a las 72 horas del último tratamiento). En ambos casos se incluyó un grupo de células sin tratar (grupo control), las cuales se mantuvieron en las mismas condiciones que las células tratadas, con la diferencia de que no se le aplicó el tratamiento con el láser.

Tras las 72 horas del último tratamiento aplicado se llevó a cabo la extracción de ARNm mediante la técnica de gel de silicato, utilizándose el kit de extracción de ARN QiagenRNeasy (Qiagen Inc., Hilden, Alemania), según las instrucciones del fabricante. La

cantidad de ARNm extraído se midió por espectrofotometría ultravioleta a 260nm (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania), y la contaminación de proteínas se determinó de acuerdo con la ratio 260/280.

Para la síntesis de ADNc (ácido desoxirribonucleico complementario), mediante transcripción inversa, se utilizó una cantidad de igual de ARN en cada una de las muestras: 1 µg de ARN total en 40 µl de volumen total. La amplificación se llevó a cabo mediante PCR empleando el kit de síntesis de ADNc iScript™ (laboratorios Bio-Rad, Hercules, CA, Estados Unidos), según las instrucciones del fabricante.

Previamente, para poder llevar a cabo la RT-qPCR con los genes objeto de estudio, se diseñaron los distintos cebadores correspondientes (Tabla 2), utilizando la biblioteca NCBI-nucleotide y la herramienta Primer3-desing para revelar el ARNm del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF), el factor de crecimiento vascular-endotelial (VEGF), el factor de crecimiento transformante β1 (TGF-β1), los receptores del factor de crecimiento β (TGF-βR1, TGFβR2 y TGF-βR3), el receptor 2 de dominio de la discoidina (DDR2), la metaloproteinasa de la matriz-2 (MMP2), la α-actina, la fibronectina, la decorina y la elastina. Todos ellos fueron emparejados con las secuencias de los genes diana (software NCBI Blast). Los resultados finales se normalizaron usando Ubiquitina C (UBC), peptidilprolil isomerasa A (PPIA) y proteína ribosomal S13 (RPS13) como genes de mantenimiento estables<sup>259,260</sup>.

La RT-qPCR se realizó con el kit SsoFast™ EvaGreen® Supermix (laboratorios Bio-Rad, Hercules, CA, Estados Unidos), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras se amplificaron en microplacas de 96 pocillos en el dispositivo IQ5-Cycler (laboratorios Bio-Rad Hercules, CA, Estados Unidos). El ciclo térmico consistió en 95°C durante 3 minutos, para inactivar la ADN polimerasa, y 40 ciclos a una temperatura de recocido específica para cada gen, que oscilaba entre 60 y 65°C, y a una temperatura de elongación de 72°C. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 20 µL, con 5 µL de muestra de ADNc y 2 µL de cada cebador. Los valores de C<sub>T</sub> se representaron frente a la dilución de log ADNc para construir las curvas patrón para cada gen diana. Después de cada RT-qPCR, se creó un perfil de fusión y se realizó

electroforesis en gel de agarosa para cada muestra al objeto de descartar productos de PCR no específicos y dímeros de cebadores. El método  $C_T$  comparativo se empleó para la cuantificación relativa de la expresión génica. La concentración de ARNm para cada gen se expresó como ng de ARNm por ng promedio de ARNm de *housekeeping*.

**Tabla 2.-** Secuencias de Primers para la amplificación de ADNc para la realización de RT-qPCR

Gen	Sense Primer	Antisense Primer	Amplicon (bp)
FGF	5'-CCCATATTCCTGCACTTTG-3'	5'-ACCTTGACCTCTCAGCCTCA-3'	195
CTGF	5'-CCTGGTCCAGACCACAGAGT-3'	5'-TGGAGATTTGGGAGTACGG-3'	194
VEGF	5'-CCTTGCTGCTCTACCTCCAC-3'	5'-CACACAGGATGGCTTGAAGA-3'	197
TGF- $\beta$ 1	5'-TGAACCGGCCTTCTCTGCTTCTCATG-3'	5'-GCGGAAGTCAATGTACAGTGCCGC-3'	152
TGF $\beta$ R1	5'-ACTGGCAGCTGTCATTGCTGGACCAG-3'	5'-CTGAGCCAGAACCTGACGTTGTATATCA-3'	201
TGF $\beta$ R2	5'-GGCTCAACCACCAGGGCATCCAGATGCT-3'	5'-CTCCCCGAGAGCCTGTCCAGATGCT-3'	139
TGF $\beta$ R3	5'-ACCGTGATGGGCATTGCGTTTCCA-3'	5'-GTGCTCTGCGTGCTGCCGATGCTGT-3'	173
DDR2	5'-GAACCCAAACATCATCCATC-3'	5'-CTTCATGCCAGAGGCAATTT-3'	199
MMP2	5'-CCAAGAACTCCGTCTGTCC-3'	5'-TGAACCGGTCTTGAAGAAG-3'	195
$\alpha$ -actina	5'-TCCTGCTCCTCTGTCTCAT-3'	5'-AGTCAGAGCTTTGGCTAGGAA-3'	96
fibronectina	5'-GCCATGACAATGGTGTGAAC-3'	5'-GCAAATGGCACCGAGATATT-3'	200
decorina	5'-GGGCTGGCAGAGCATAAGTA-3'	5'-CAGAGCGCACGTAGACACAT-3'	196
elastina	5'-GGTGTAGGTGGAGCTTTTGC-3'	5'-CTGTTGGGTAACCAGCCTTG-3'	199

## 9. Análisis estadístico

Para el análisis de los datos se utilizó el software estadístico SPSS<sup>®</sup> Statistics, versión 22.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, Estados Unidos). Para cada variable se calcularon los valores de la media y la desviación estándar (media  $\pm$  DT). Las diferencias para examinar el efecto de la

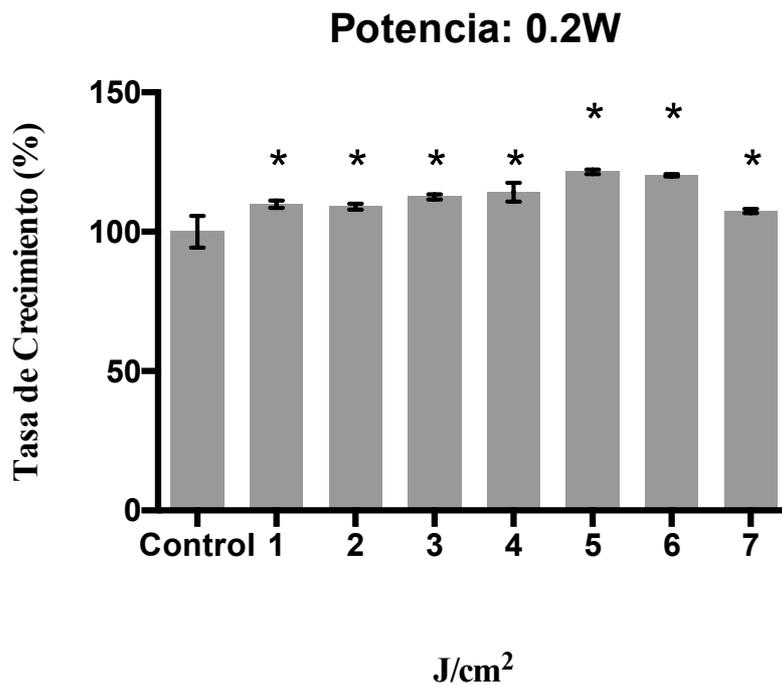
intervención sobre proliferación, ciclo celular y expresión génica, se determinó mediante comparaciones de medias aplicando el test de la t de Student, considerando un intervalo de confianza del 95%. En todas las pruebas, se consideró significación estadística cuando el valor  $p \leq 0.05$ .

## RESULTADOS

1. Estudio del efecto del láser de diodo de 940nm sobre la capacidad proliferativa de fibroblastos humanos en cultivo.

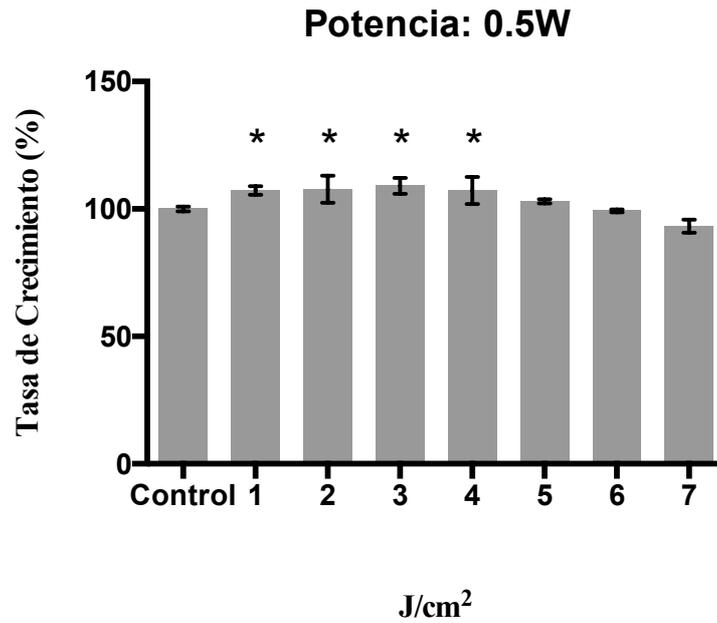
Inicialmente se llevó a cabo un estudio a modo de *screening*, en el que se determinó la dosis óptima del láser capaz de ejercer fotobioestimulación sobre los fibroblastos. Para ello, hemos estudiado su efecto sobre la capacidad proliferativa de la línea celular de fibroblastos epiteliales humanos, a las 24horas del tratamiento utilizando el modo CW con distintas dosis de energía; obtenidas al combinar distintos valores de potencia (0.2, 0.5 y 1 W) y distintos valores de densidad de energía (1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 J/cm<sup>2</sup>).

Como se puede observar en la Figura 1, las células tratadas con una potencia de 0.2 W, presentaban un incremento significativo de la proliferación en las diferentes densidades de energía administrada respecto a las células no tratadas (grupo control), siendo dicho incremento dosis-dependiente, excepto cuando se utilizó la densidad de energía más alta ensayada (7 J/cm<sup>2</sup>).



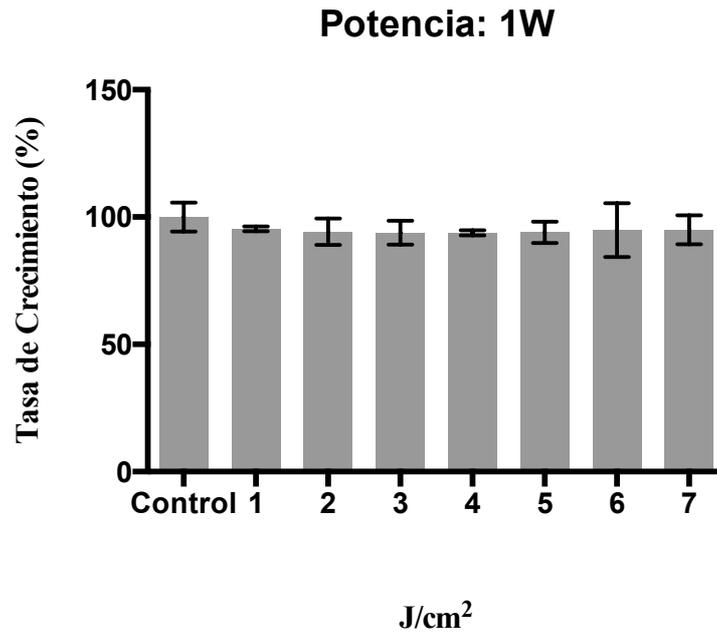
**Figura 1.-** Tasa de crecimiento (%) de los fibroblastos epiteliales humanos a las 24 horas de la irradiación con el láser de diodo de 940nm en modo continuo (CW), a distintas dosis de densidad de energía (1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 J/cm<sup>2</sup>) y 0.2 W de potencia. \*Diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ).

Como muestra la Figura 2, cuando el tratamiento se realizó con una potencia de 0.5 W, la capacidad proliferativa se vio incrementada significativamente a las densidades de 1, 2, 3 y 4 J/cm<sup>2</sup>, observándose a partir de 4 J/cm<sup>2</sup> un descenso de la capacidad proliferativa hasta igualarse con el grupo control, aunque este no fue significativo.



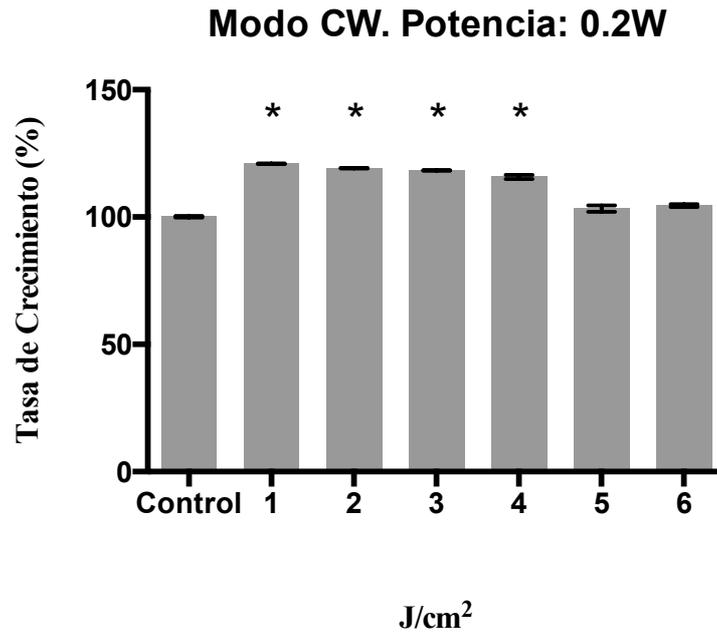
**Figura 2.-** Tasa de crecimiento (%) de los fibroblastos epiteliales humanos a las 24 horas de la irradiación con el láser de diodo de 940nm en modo continuo (CW), a distintas dosis de densidad de energía (1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 J/cm<sup>2</sup>) y 0.5 W de potencia. \*Diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ).

Cuando analizamos el tratamiento a la potencia de 1 W, se aprecia que la tasa de crecimiento no se fue modificada significativamente a las distintas densidades de energía estudiadas.

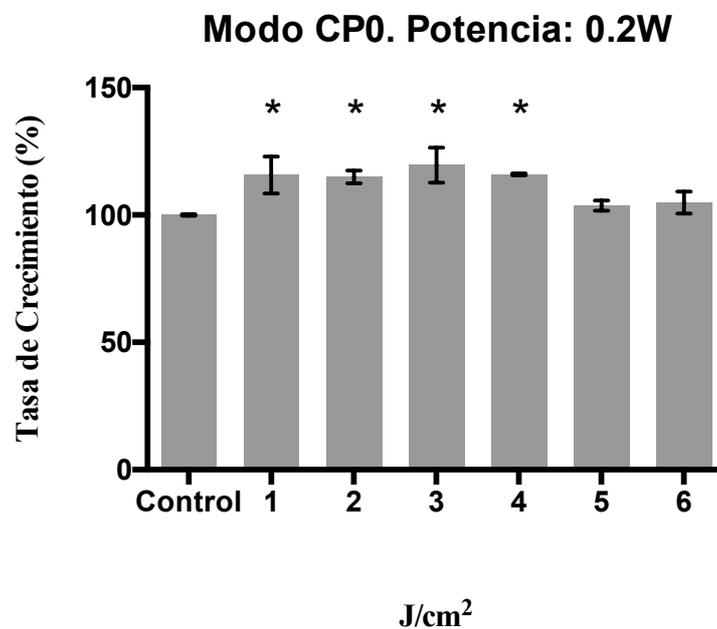


**Figura 3.-** Tasa de crecimiento (%) de los fibroblastos epiteliales humanos a las 24 horas de la irradiación con el láser de diodo de 940nm en modo continuo (CW), a distintas dosis de densidad de energía (1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 J/cm<sup>2</sup>) y 1 W de potencia. \*Diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ).

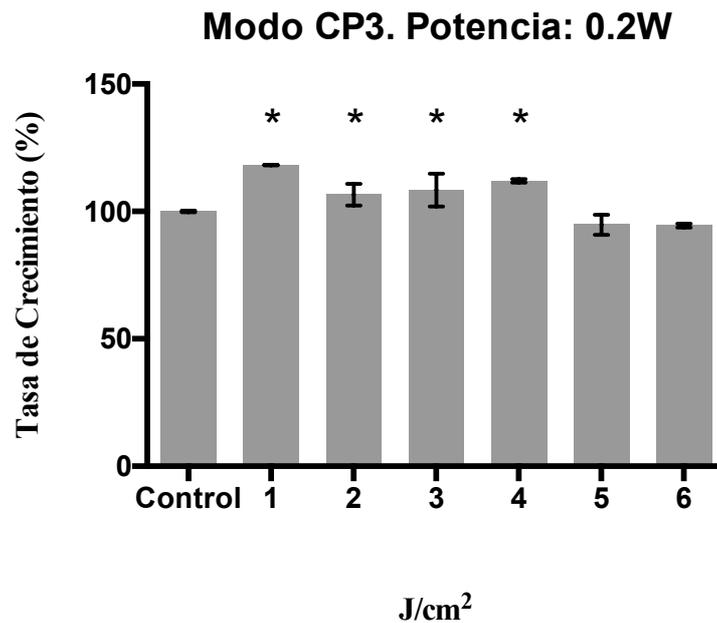
Una vez llevado a cabo el *screening*, y atendiendo a los datos obtenidos, se determinó la capacidad proliferativa a las 72 horas del tratamiento, con potencias inferiores a 1 W; es decir, se utilizó una potencia de 0.2 y 0.5 W, y las densidades de energía de 1, 2, 3, 4, 5 y 6 J/cm<sup>2</sup> respectivamente. Así mismo, dichas dosis de energía fueron aplicadas en tres modos distintos de emisión: modo CW, modo pulsado CP0 y modo pulsado CP3. Como se observa en las Figuras 4, 5 y 6, las células tratadas con el láser a una potencia de 0,2 W mostraron un aumento significativo del crecimiento respecto al control ( $p < 0.003$ ), independientemente del modo de transmisión utilizado (CW, CP0 o CP3), excepto cuando la densidad de energía aplicada fue 5 y 6 J/cm<sup>2</sup>, donde no se detectaron cambios significativos en la tasa de crecimiento.



**Figura 4.-** Tasa de crecimiento (%) de los fibroblastos epiteliales humanos a las 72 horas de la irradiación con el láser de diodo de 940nm en el modo de emisión CW, a distintas dosis de densidad de energía (1, 2, 3, 4, 5 y 6 J/cm<sup>2</sup>) a una potencia de 0.2 W. \*Diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ).

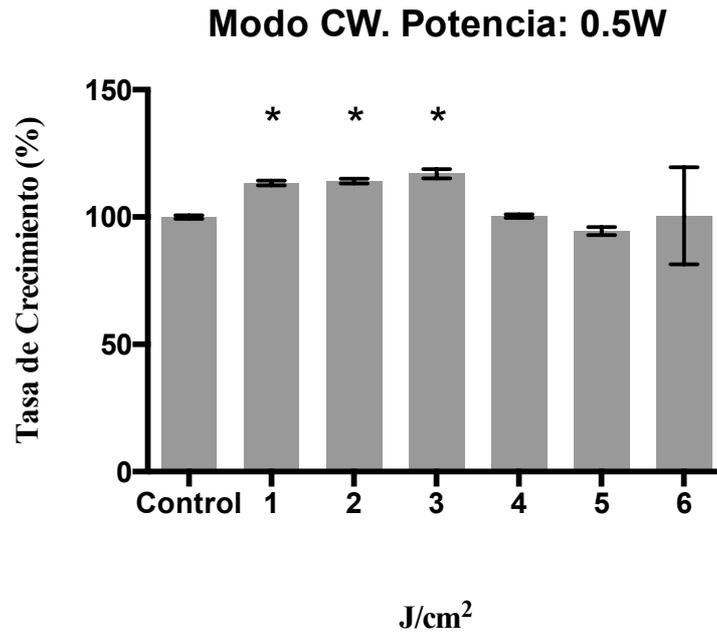


**Figura 5.-** Tasa de crecimiento (%) de los fibroblastos epiteliales humanos a las 72 horas de la irradiación con el láser de diodo de 940nm en el modo de emisión CP0, a distintas dosis de densidad de energía (1, 2, 3, 4, 5 y 6 J/cm<sup>2</sup>) a una potencia de 0.2 W. \*Diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ).

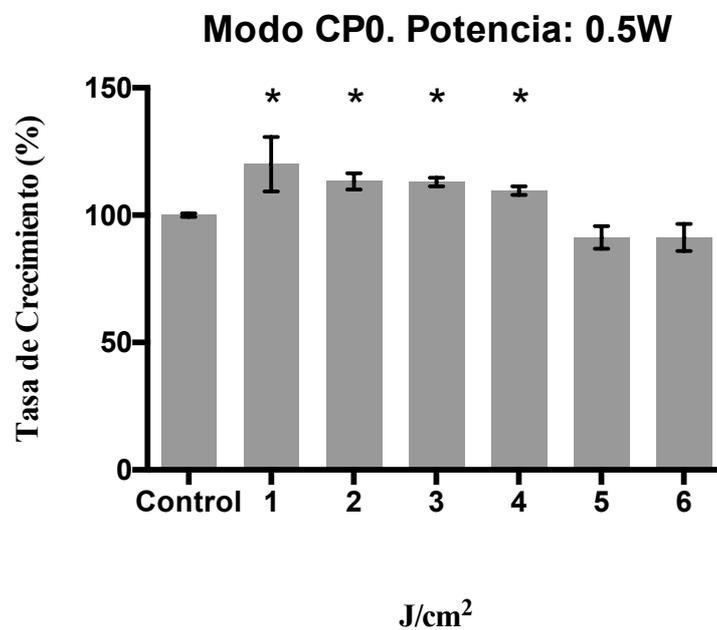


**Figura 6.-** Tasa de crecimiento (%) de los fibroblastos epiteliales humanos a las 72 horas de la irradiación con el láser de diodo de 940nm en el modo de emisión CP3, a distintas dosis de densidad de energía (1, 2, 3, 4, 5 y 6 J/cm<sup>2</sup>) a una potencia de 0.2 W. \*Diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ).

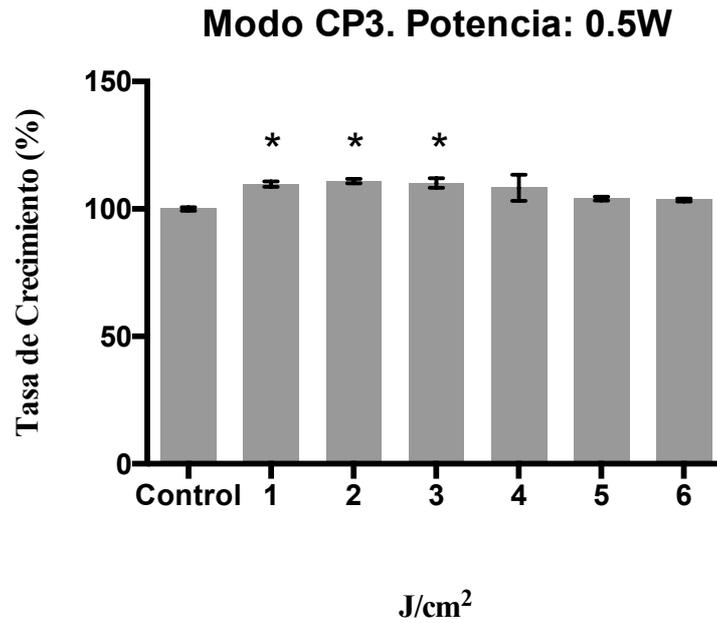
En las Figuras 7, 8 y 9, se muestra el crecimiento de los fibroblastos tratados con el láser de diodo de 940nm tras 72 horas del tratamiento a una potencia de 0.5 W utilizando los distintos modos de transmisión de energía (CW, CP0 y CP3) y a las densidades de energía de 1, 2, 3, 4, 5 y 6 J/cm<sup>2</sup>. En el modo CW se aprecia que se mantiene el aumento de la tasa de crecimiento de manera significativa respecto del control en los tratamientos con 1, 2 y 3 J/cm<sup>2</sup> ( $p < 0.001$ ). En los modos CP0 y CP3, el aumento de la tasa de crecimiento se extendió incluso, a la densidad de energía 4 J/cm<sup>2</sup> ( $p < 0.032$ ). No se encontraron cambios significativos en la proliferación de los fibroblastos a las densidades de energía de 5 y 6 J/cm<sup>2</sup>, independientemente del modo de emisión utilizado.



**Figura 7.-** Tasa de crecimiento (%) de los fibroblastos epiteliales humanos a las 72 horas de la irradiación con el láser de diodo de 940nm en el modo de emisión CW, a distintas dosis de densidad de energía (1, 2, 3, 4, 5 y 6  $J/cm^2$ ) a una potencia de 0.5 W. \*Diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ).



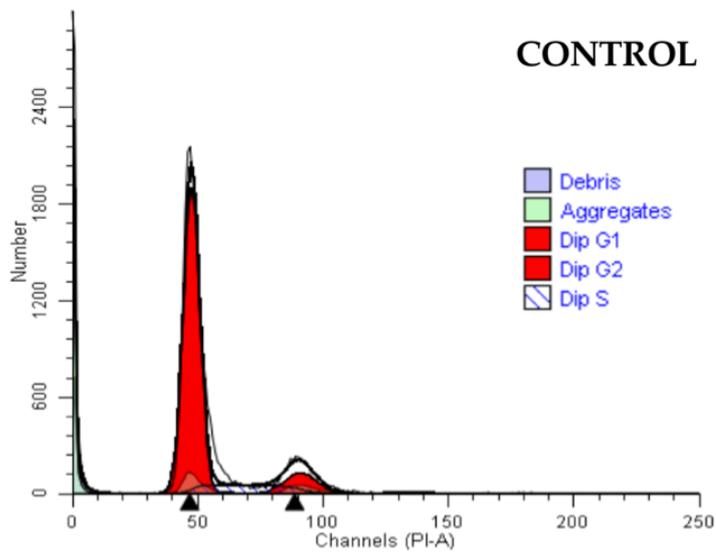
**Figura 8.-** Tasa de crecimiento (%) de los fibroblastos epiteliales humanos a las 72 horas de la irradiación con el láser de diodo de 940nm en el modo de emisión CP0, a distintas dosis de densidad de energía (1, 2, 3, 4, 5 y 6  $J/cm^2$ ) a una potencia de 0.5 W. \*Diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ).



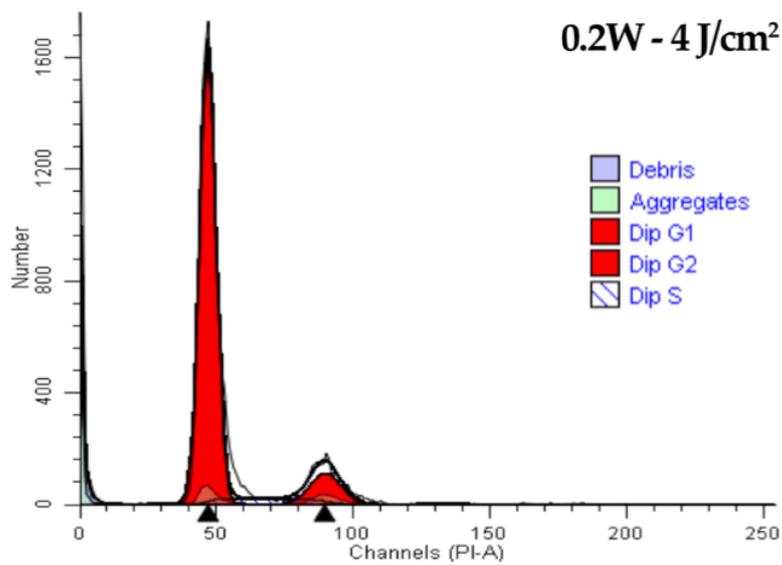
**Figura 9.-** Tasa de crecimiento (%) de los fibroblastos epiteliales humanos a las 72 horas de la irradiación con el láser de diodo de 940nm en el modo de emisión CP3, a distintas dosis de densidad de energía (1, 2, 3, 4, 5 y 6 J/cm<sup>2</sup>) a una potencia de 0.5 W. \*Diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ).

2. Efecto del láser de diodo de 940nm sobre el ciclo celular de fibroblastos humanos en cultivo.

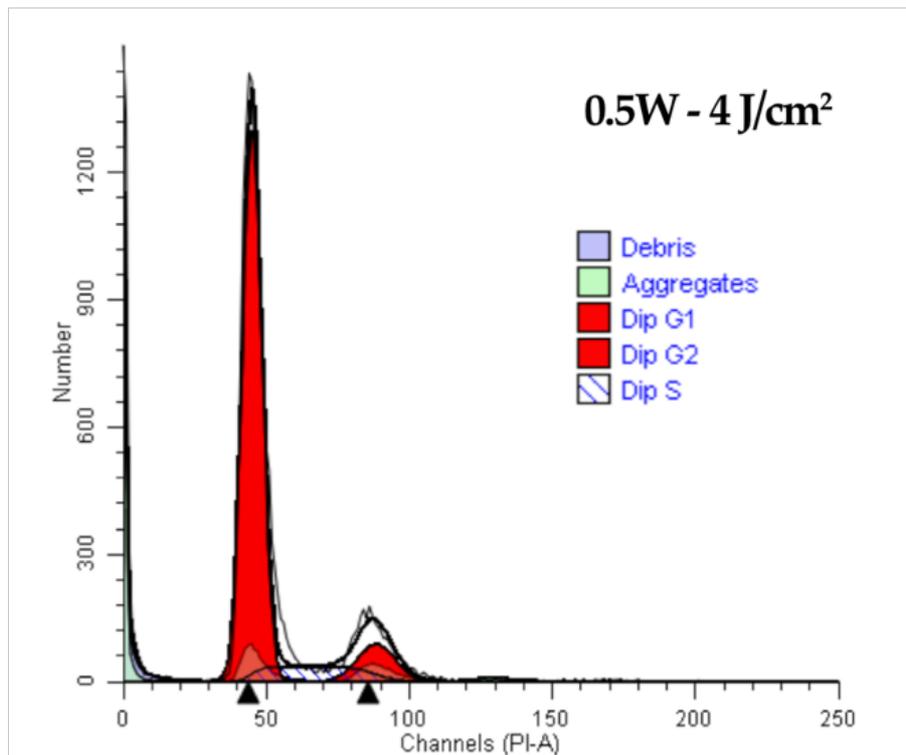
En las Figuras 10, 11 y 12 se representan los resultados del estudio del ciclo celular de la línea de fibroblastos humanos CCD-1064Sk, tras 24 horas de tratamiento con láser de diodo de 940nm en modo CW a la potencia de 0.2 y 0.5 W y la densidad de energía de 4 J/cm<sup>2</sup>; así como, el perfil mostrado por las células no tratadas o grupo control.



**Figura 10.-** Perfil de fluorescencia del ciclo celular en cada una de las fases ( $G_0/G_1$ ,  $G_2$ -M y S) de fibroblastos humanos en cultivo (grupo control).



**Figura 11.-** Perfil de fluorescencia del ciclo celular en cada una de las fases ( $G_0/G_1$ ,  $G_2$ -M y S) de fibroblastos humanos en cultivo a las 24 después de haber sido tratadas con láser de diodo de 940nm en modo CW a una potencia de 0.2W y una densidad de energía de 4 J/cm<sup>2</sup>.



**Figura 12.-** Perfil de fluorescencia del ciclo celular en cada una de las fases ( $G_0/G_1$ ,  $G_2$ -M y S) de fibroblastos humanos en cultivo a las 24 horas después de haber sido tratadas con láser de diodo de 940nm en modo CW a una potencia de 0.5W y una densidad de energía de 4 J/cm<sup>2</sup>.

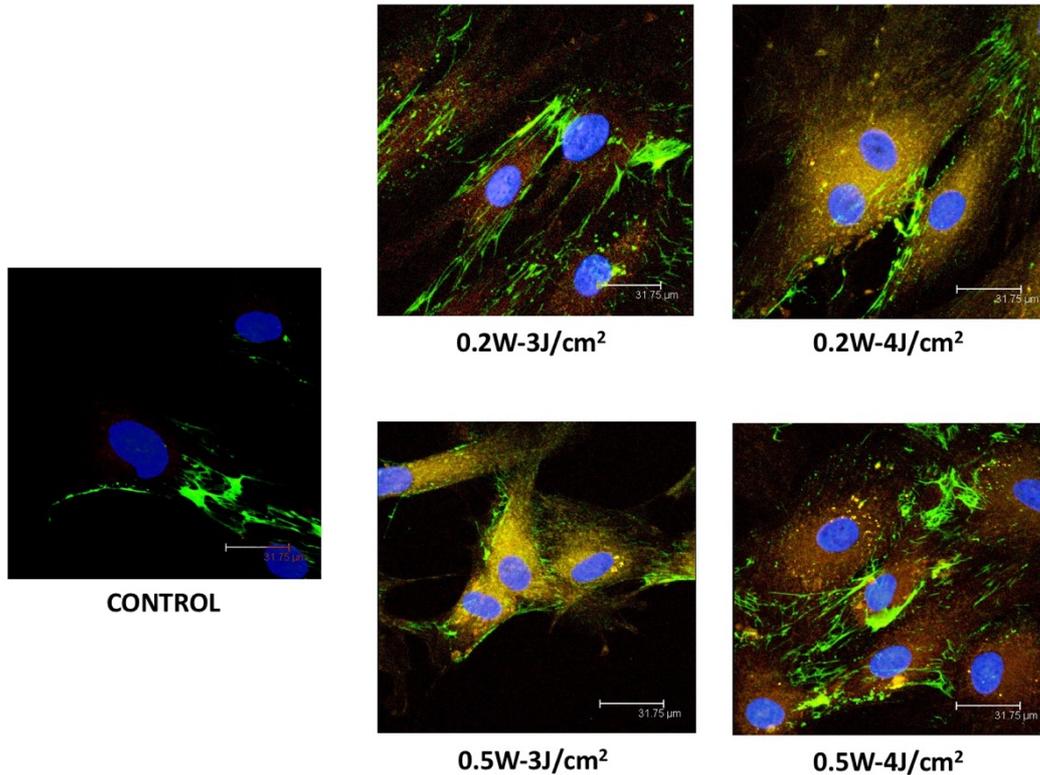
Como se aprecia en la Tabla 3, el análisis de los valores medios de células en cada una de las fases del ciclo celular ( $G_0/G_1$ ,  $G_2$ -M y S), no muestra ningún cambio significativo en el porcentaje de los fibroblastos tratados con respecto a las células no tratadas. En todos los casos, independientemente de la dosis de energía aplicada, el ciclo celular no mostró cambios respecto del grupo control, no observándose aneuploidias en el ADN ni signos de transformación neoplásica.

Tratamiento	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>			G <sub>2</sub> -M			S			
	Media	DT	P	Media	DT	P	Media	DT	P	
Control	79.79	1.24		10.73	1.62		9.33	1.87		
0.2W	2J/cm <sup>2</sup>	79.13	0.93	0.997	12.45	0.47	0.822	8.41	0.48	0.967
	3J/cm <sup>2</sup>	81.10	0.55	0.914	9.14	2.20	0.855	9.72	1.72	1.00
	4J/cm <sup>2</sup>	80.92	1.48	0.954	11.05	0.67	1.00	8.03	1.35	0.869
0.5W	2J/cm <sup>2</sup>	78.71	3.63	0.961	10.03	3.27	0.996	11.26	0.37	0.590
	3J/cm <sup>2</sup>	79.84	1.94	1.00	8.93	3.14	0.784	11.23	3.28	0.602
	4J/cm <sup>2</sup>	79.49	1.03	1.00	2.12	1.55	0.999	9.21	1.41	1.00

**Tabla 3.** - Porcentaje de células en fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>-M y S del ciclo celular de los fibroblastos humanos a las 24 horas del tratamiento con el láser de diodo de 940nm en modo CW a una potencia de 0.2 y 0.5 W y una densidad de energía de 2, 3 y 4 J/cm<sup>2</sup>.

3. Efecto del láser de diodo de 940nm sobre el perfil antigénico de fibroblastos humanos en cultivo.

Como se observa en la Figura 13 el análisis de la expresión de los marcadores analizados a las 72 h del tratamiento con un láser de diodo de 940nm en modo CW a la potencia de 0.2 y 0.5 W y a densidad de energía de 3 o 4 J/cm<sup>2</sup>, evidencia una intensa expresión de  $\alpha$ -actina (rojo), especialmente a la densidad de 4 J/cm<sup>2</sup>, independientemente de la potencia tratada, y en relación a las células control; las cuales muestran expresión positiva de fibronectina (verde), pero no así de  $\alpha$ -actina. En estas imágenes, los núcleos se aprecian en color azul.

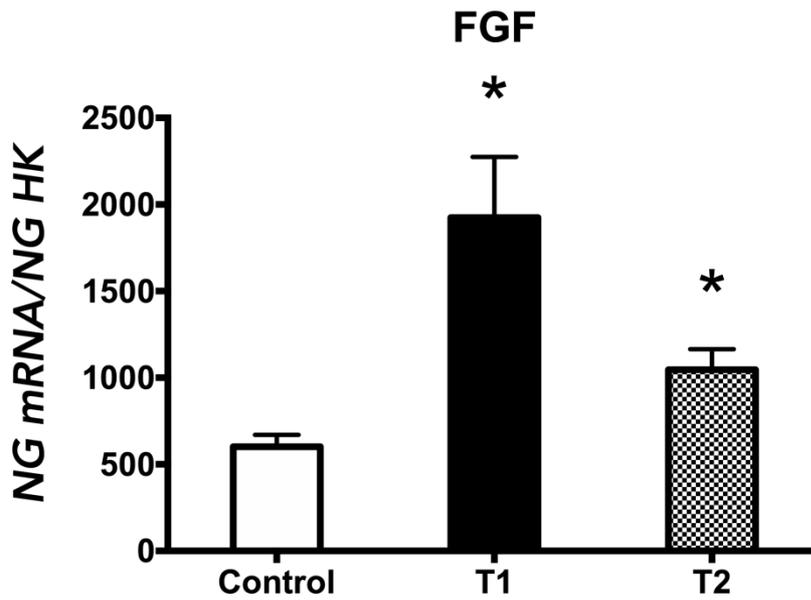


**Figura 13.-** Expresión de fibronectina (antifibronectina-FITC: verde) y  $\alpha$ -actina (anti- $\alpha$ -actina-PE: rojo) en los fibroblastos humanos, a las 72 horas del tratamiento con el láser de diodo de 940nm, en modo CW, a una potencia de 0.2 o 0.5 W y a una densidad de energía de 3 o 4 J/cm<sup>2</sup>. Análisis por inmunotinción mediante microscopía confocal.

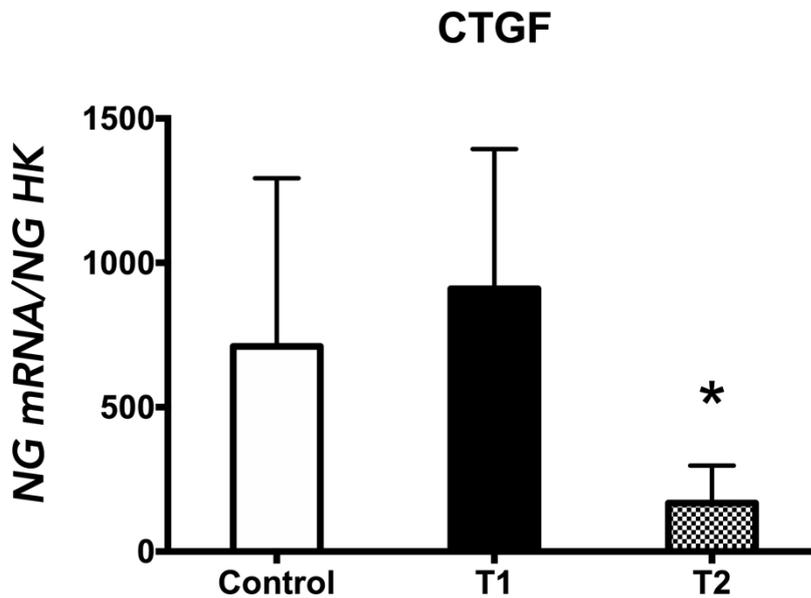
#### 4. Efecto del láser de diodo de 940nm sobre la expresión génica de fibroblastos humanos en cultivo.

##### 4.1 Efecto del láser sobre la expresión de FGF, CTGF, VEGF, TGF- $\beta$ 1 y los receptores de TGF- $\beta$ 1 (R1, R2 y R3).

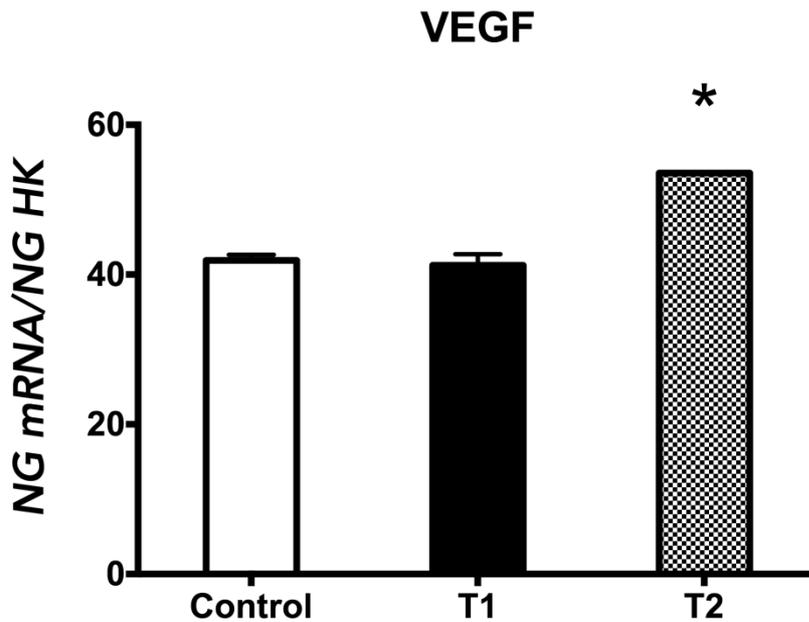
Como se aprecia en las Figuras 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20, las células sometidas a la pauta de tratamiento de una única dosis (T1) mostraron un incremento en la expresión génica de FGF, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1R1 y TGF- $\beta$ 1R2. En cambio, los fibroblastos sometidos a la pauta de tratamiento de dos dosis (T2), mostraron un incremento en la expresión de todos los marcadores, salvo TGF- $\beta$ 1R3, que no mostró cambios significativos (Figura 20), y CTGF que disminuyó significativamente respecto del control (Figura 15).



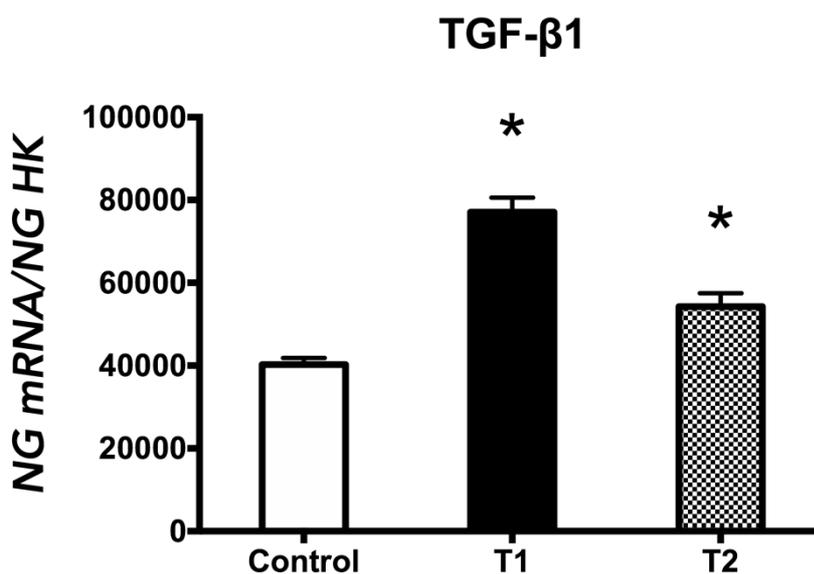
**Figura 14.-** Expresión génica de FGF en fibroblastos humanos tratados con láser de diodo de 940nm en modo CW a la potencia de 0.5W y la densidad de energía de 4 J/cm<sup>2</sup>, siguiendo dos pautas de tratamiento: una dosis (T1) y dos dosis (T2). Los datos están expresados como ng de RNAm por ng promedio de ARNm de *housekeeping* ± SD. \*p ≤ 0.05



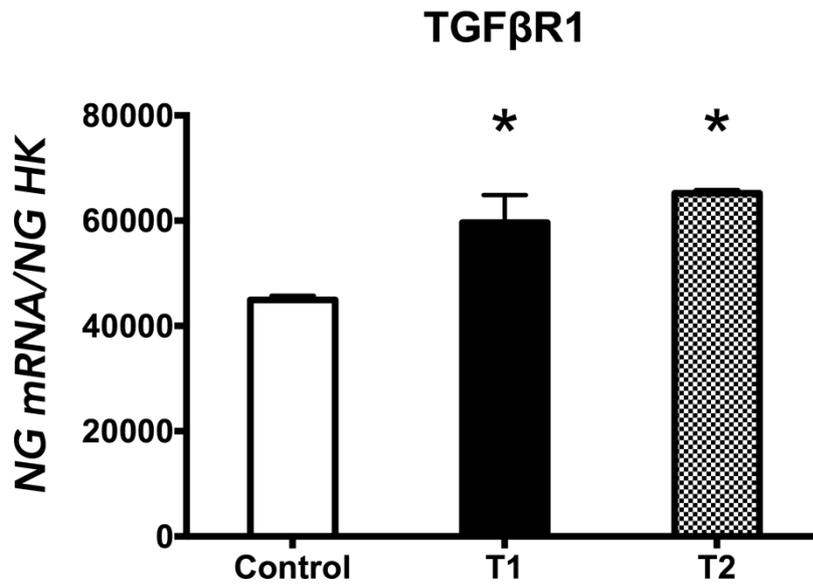
**Figura 15.-** Expresión génica de CTGF en fibroblastos humanos tratados con láser de diodo de 940nm en modo CW a la potencia de 0.5W y la densidad de energía de 4 J/cm<sup>2</sup>, siguiendo dos pautas de tratamiento: una dosis (T1) y dos dosis (T2). Los datos están expresados como ng de RNAm por ng promedio de ARNm de *housekeeping* ± SD. \*p ≤ 0.05



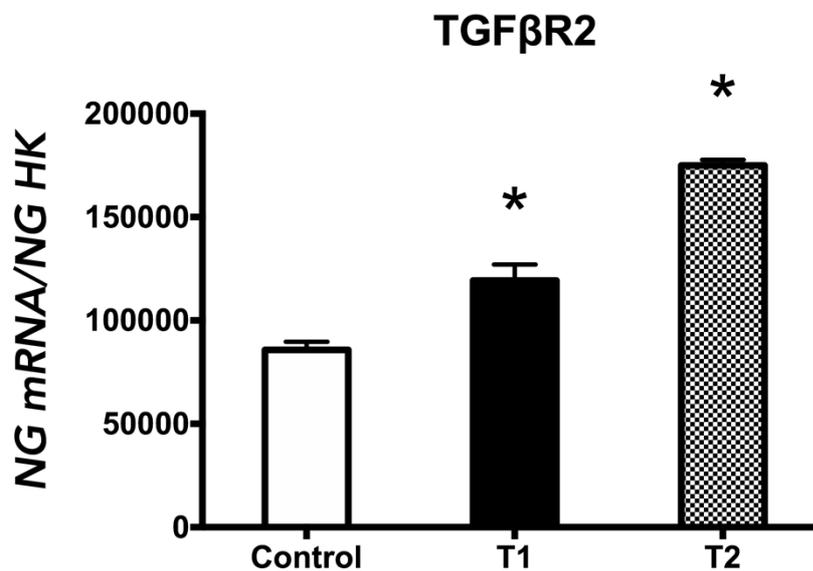
**Figura 16.-** Expresión génica de VEGF en fibroblastos humanos tratados con láser de diodo de 940nm en modo CW a la potencia de 0.5W y la densidad de energía de 4 J/cm<sup>2</sup>, siguiendo dos pautas de tratamiento: una dosis (T1) y dos dosis (T2). Los datos están expresados como ng de RNAm por ng promedio de ARNm de *housekeeping* ± SD. \*p ≤ 0.05



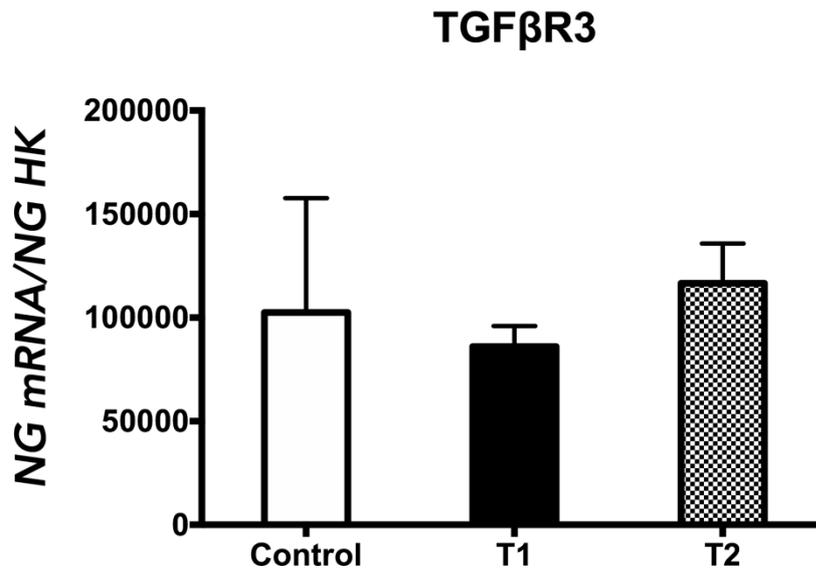
**Figura 17.-** Expresión génica de TGF-β1 en fibroblastos humanos tratados con láser de diodo de 940nm en modo CW a la potencia de 0.5W y la densidad de energía de 4 J/cm<sup>2</sup>, siguiendo dos pautas de tratamiento: una dosis (T1) y dos dosis (T2). Los datos están expresados como ng de RNAm por ng promedio de ARNm de *housekeeping* ± SD. \*p ≤ 0.05



**Figura 18.-** Expresión génica de TGF-βR1 en fibroblastos humanos tratados con láser de diodo de 940nm en modo CW a la potencia de 0.5W y la densidad de energía de 4 J/cm<sup>2</sup>, siguiendo dos pautas de tratamiento: una dosis (T1) y dos dosis (T2). Los datos están expresados como ng de RNAm por ng promedio de ARNm de *housekeeping* ± SD. \*p ≤ 0.05



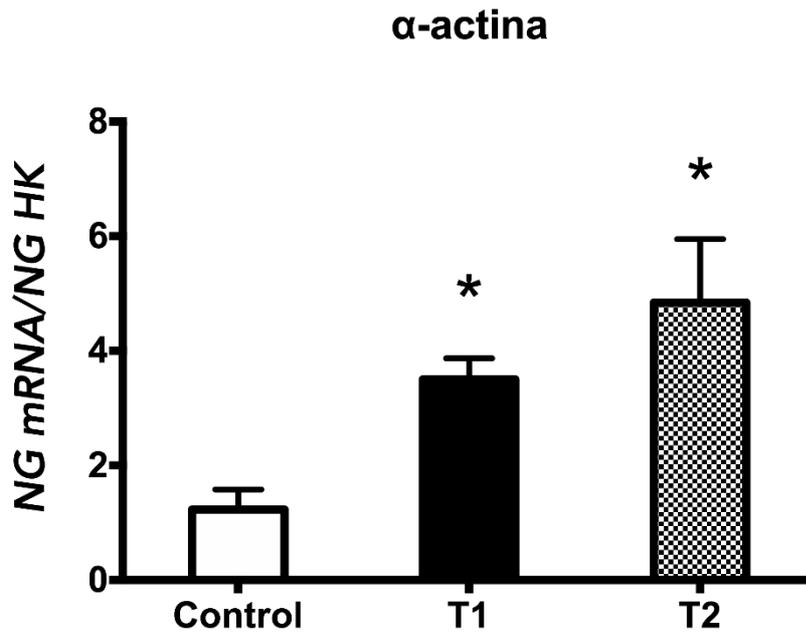
**Figura 19.-** Expresión génica de TGF-βR2 en fibroblastos humanos tratados con láser de diodo de 940nm en modo CW a la potencia de 0.5W y la densidad de energía de 4 J/cm<sup>2</sup>, siguiendo dos pautas de tratamiento: una dosis (T1) y dos dosis (T2). Los datos están expresados como ng de RNAm por ng promedio de ARNm de *housekeeping* ± SD. \*p ≤ 0.05



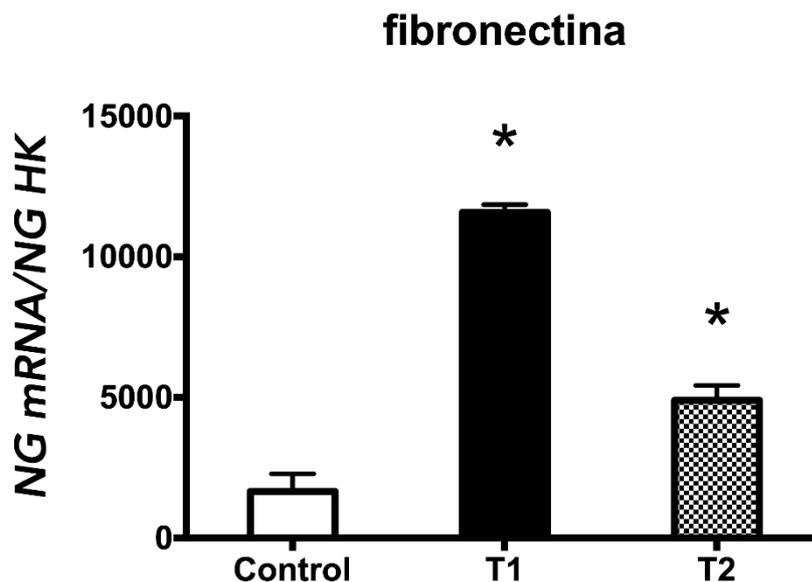
**Figura 20.-** Expresión génica de TGF-βR3 en fibroblastos humanos tratados con láser de diodo de 940nm en modo CW a la potencia de 0.5W y la densidad de energía de 4 J/cm<sup>2</sup>, siguiendo dos pautas de tratamiento: una dosis (T1) y dos dosis (T2). Los datos están expresados como ng de RNAm por ng promedio de ARNm de *housekeeping* ± SD. \*p ≤ 0.05

#### 4.2 Efecto de láser sobre la expresión de α-actina, fibronectina, decorina, elastina, DDR2 y MMP2.

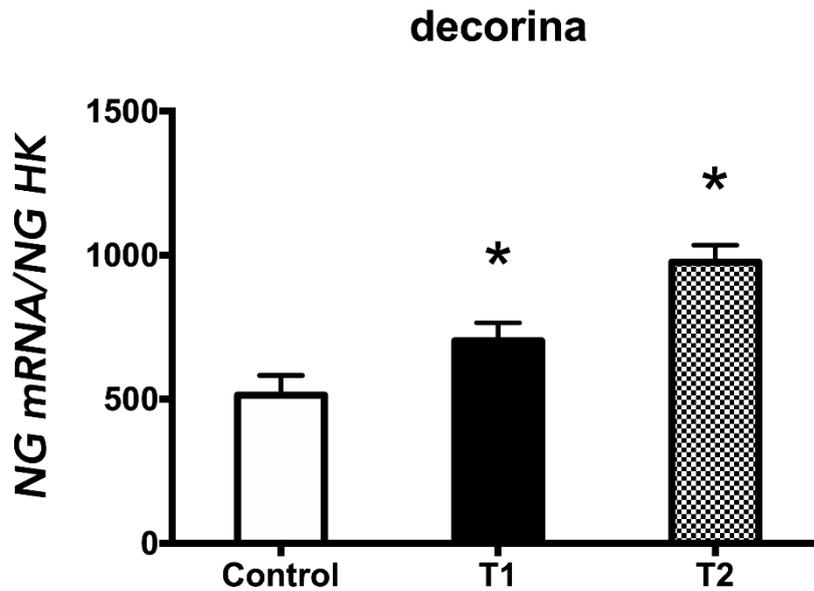
Como se muestra en las Figuras 21, 22, 23, 24, 25 y 26, la expresión de α-actina, fibronectina, decorina y MMP2, medida mediante RT-qPCR, aumenta tras la aplicación de ambos tratamientos (T1 y T2) en relación al grupo control. En cambio, los resultados muestran que la expresión de DDR2 incrementó únicamente tras la aplicación del tratamiento T2. Igualmente, solo este tratamiento ocasionó un descenso de la expresión de elastina.



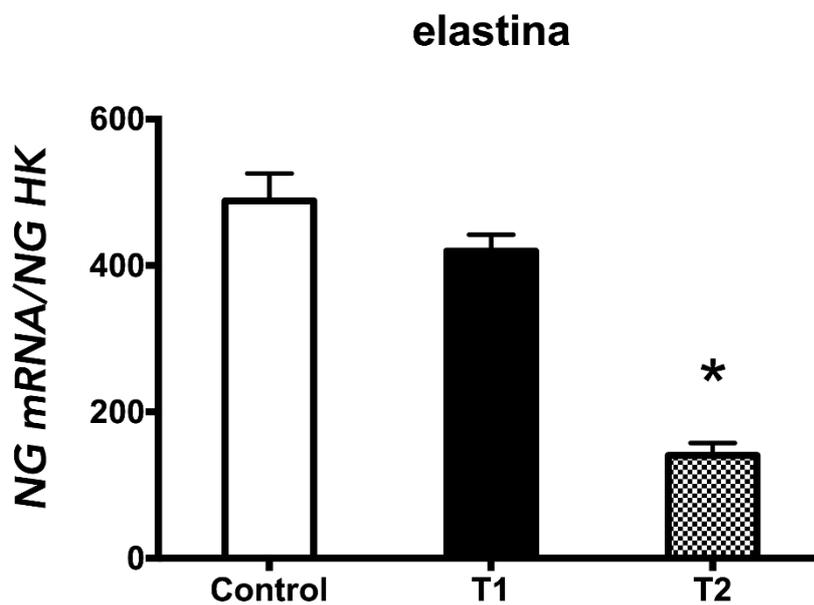
**Figura 21.-** Expresión génica de α-actina en fibroblastos humanos tratados con láser de diodo de 940nm en modo CW a la potencia de 0.5W y la densidad de energía de 4 J/cm<sup>2</sup>, siguiendo dos pautas de tratamiento: una dosis (T1) y dos dosis (T2). Los datos están expresados como ng de RNAm por ng promedio de ARNm de housekeeping ± SD. \*p ≤ 0.05



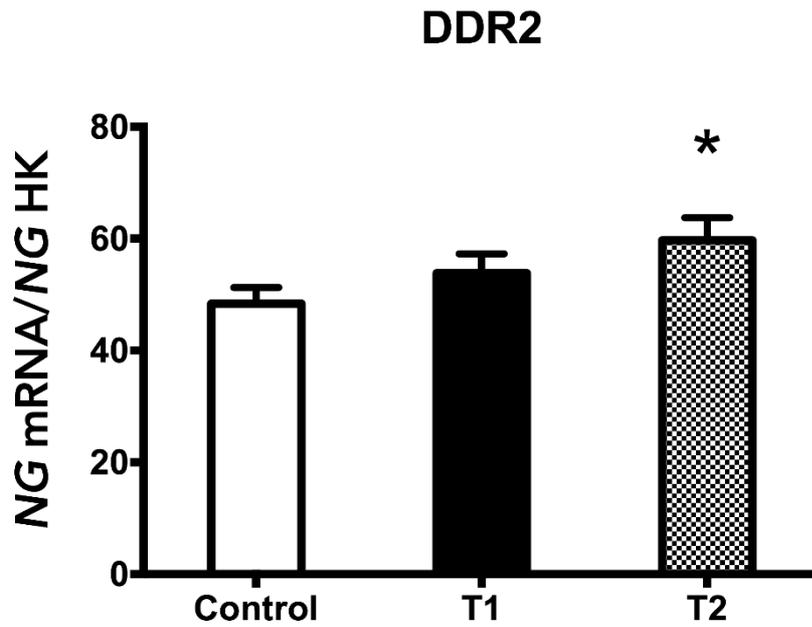
**Figura 22.-** Expresión génica de fibronectina en fibroblastos humanos tratados con láser de diodo de 940nm en modo CW a la potencia de 0.5W y la densidad de energía de 4 J/cm<sup>2</sup>, siguiendo dos pautas de tratamiento: una dosis (T1) y dos dosis (T2). Los datos están expresados como ng de RNAm por ng promedio de ARNm de housekeeping ± SD. \*p ≤ 0.05



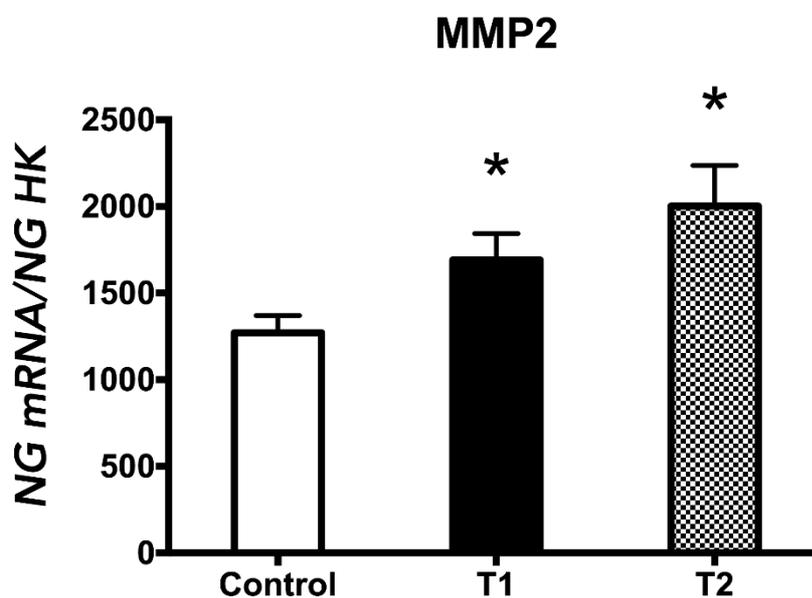
**Figura 23.-** Expresión génica de decorina en fibroblastos humanos tratados con láser de diodo de 940nm en modo CW a la potencia de 0.5W y la densidad de energía de 4 J/cm<sup>2</sup>, siguiendo dos pautas de tratamiento: una dosis (T1) y dos dosis (T2). Los datos están expresados como ng de RNAm por ng promedio de ARNm de housekeeping ± SD. \*p ≤ 0.05



**Figura 24.-** Expresión génica de elastina en fibroblastos humanos tratados con láser de diodo de 940nm en modo CW a la potencia de 0.5W y la densidad de energía de 4 J/cm<sup>2</sup>, siguiendo dos pautas de tratamiento: una dosis (T1) y dos dosis (T2). Los datos están expresados como ng de RNAm por ng promedio de ARNm de housekeeping ± SD. \*p ≤ 0.05



**Figura 25.-** Expresión génica de DDR2 en fibroblastos humanos tratados con láser de diodo de 940nm en modo CW a la potencia de 0.5W y la densidad de energía de 4 J/cm<sup>2</sup>, siguiendo dos pautas de tratamiento: una dosis (T1) y dos dosis (T2). Los datos están expresados como ng de RNAm por ng promedio de ARNm de housekeeping ± SD. \*p ≤ 0.05



**Figura 26.-** Expresión génica de MMP2 en fibroblastos humanos tratados con láser de diodo de 940nm en modo CW a la potencia de 0.5W y la densidad de energía de 4 J/cm<sup>2</sup>, siguiendo dos pautas de tratamiento: una dosis (T1) y dos dosis (T2). Los datos están expresados como ng de RNAm por ng promedio de ARNm de housekeeping ± SD. \*p ≤ 0.05

## DISCUSIÓN

Los láseres de baja potencia presentan propiedades fotobiomoduladoras sobre distintas poblaciones celulares, pero dicho efecto está en estrecha relación con el tipo de láser, la longitud de onda a la que emite, la energía aplicada, o el modo; de ahí la importancia de establecer, para cada uno de los tipos de láser existentes en el mercado, los parámetros óptimos de tratamiento en función de su potencial uso.

En concreto, el láser de diodo de 940nm, un láser de pequeño tamaño y de fácil manejo, presenta un efecto fotobiomodulador sobre diferentes parámetros del fibroblasto (crecimiento, perfil antigénico y expresión génica) bajo determinadas condiciones de aplicación (dosis de energía y modo de transmisión).

El tratamiento con este láser en modo continuo a la potencia de 0.2 y 0.5 W estimula la capacidad proliferativa de los fibroblastos humanos tras 24 horas del tratamiento; si bien este resultado fue dependiente en cada caso de la densidad de energía administrada. Sin embargo, el tratamiento a la potencia de 1 W no mostró efecto bioestimulante a nivel del crecimiento celular, independientemente de la densidad de energía estudiada.

Estos resultados están en consonancia con el efecto observado cuando la línea osteoblástica MG63 fue tratada con este mismo láser<sup>261</sup>. En dicho estudio los autores mostraron, que el efecto del láser de diodo sobre el crecimiento celular a las 24 horas guarda relación con la potencia y la densidad de energía. No obstante, este incremento celular se produjo hasta un valor energético límite, a partir del cual disminuye el crecimiento como consecuencia del tratamiento.

Por tanto, podríamos decir que 0.2 y 0.5 W son las potencias del láser de diodo de 940nm con posible potencial terapéutico en tejidos blandos, al poseer propiedades fotobioestimulantes sobre los fibroblastos epiteliales humanos.

Por otra parte, el análisis del crecimiento a las 72 horas del tratamiento, no reveló cambios significativos en la tasa de proliferación, independientemente del modo aplicado (CW, CP0 o CP3). Este hecho podría estar en relación con la diferenciación del fibroblasto; tal y como así lo sugiere el aumento en la expresión de  $\alpha$ -actina observado en las células tratadas, ya que la  $\alpha$ -actina es el marcador más característico de la diferenciación de los fibroblastos a miofibroblastos, población clave en los tejidos en cicatrización<sup>262</sup>. Además, en estudios *in vitro* se ha descrito que el cultivo de fibroblastos en presencia de PRP, como única fuente de FC, incrementa y acelera la tasa de proliferación de los fibroblastos obtenidos por cultivo primario, en relación con la tasa de crecimiento observada por esa misma población celular cuando es cultivada en presencia de SBF como fuente de FC. Sin embargo, transcurrido un tiempo del inicio del cultivo, el crecimiento celular se detiene e incluso disminuye respecto a las mismas células cultivadas en presencia de SBF. Además, este mismo estudio sugiere que la disminución de la tasa de proliferación celular va unida a otros cambios de tipo morfológico a nivel de la ultraestructura celular o de expresión de marcadores, como es la alta expresión de  $\alpha$ -actina, lo cual también podría relacionarse con una diferenciación del fibroblasto a miofibroblasto<sup>263</sup>. Todos estos datos y los obtenidos en el presente estudio nos sugieren que el láser podría actuar de forma parecida a como el PRP actúa sobre los fibroblastos, de tal modo que inicialmente actuaría estimulando el crecimiento celular y posteriormente actuaría induciendo la diferenciación del fibroblasto a miofibroblasto.

Por otra parte, en estudios realizados en la línea celular de osteoblastos humanos tipificados (MG63), se describe que el tratamiento, con este mismo láser, induce el crecimiento del osteoblasto<sup>261,264</sup>, y este efecto parece estar en relación con el incremento en la expresión génica del TGF- $\beta$ 1 y de sus receptores como consecuencia del tratamiento con el láser<sup>265</sup>.

En un estudio reciente realizado con fibroblastos gingivales se ha observado que el tratamiento *in vitro* de estas células con un láser de diodo que emite a longitud de onda de 780nm puede contrarrestar los efectos adversos que las citoquinas proinflamatorias, especialmente IL-6, IL-8 y TNF $\alpha$ . Por tanto, la terapia láser puede actuar sobre esta

población celular en heridas crónicas, al ejercer efecto sobre el crecimiento, la migración o de la expresión de FC; los cuales contribuyen a la regeneración tisular<sup>266</sup>. Este estudio concluye que la terapia con láser de diodo es capaz de estimular la función celular cuando hay heridas como las de la mucosa oral, incluso cuando hay altos niveles de mediadores inflamatorios. De igual modo, nuestros resultados ponen de manifiesto el potencial clínico de LLLT en la regeneración de heridas.

Asimismo, otros estudios han sugerido que la terapia láser influye positivamente sobre la proliferación de fibroblastos mediante una serie de cambios en la expresión génica y la liberación de FC<sup>267,268</sup>.

En el presente trabajo se estudia la modulación de la expresión de distintos marcadores (FGF, CTGF, VEGF, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ R1, TGF $\beta$ R2, TGF- $\beta$ R3, DDR2, MMP2,  $\alpha$ -actina, fibronectina, decorina y elastina) en fibroblastos humanos tratados con láser de diodo de 940nm. Nuestros resultados muestran que dicho efecto fue dependiente de la pauta de tratamiento seguida. Hemos de señalar que las proteínas que codifican los marcadores analizados poseen un papel relevante en el proceso de cicatrización de heridas, al actuar estimulando la proliferación, la migración y/o la maduración del fibroblasto<sup>41,269,270</sup>.

El FGF es un factor de crecimiento que promueve la mitogénesis en los fibroblastos, favoreciendo la formación de tejido de granulación, promoviendo la re-epitelización e igualmente interviene en la remodelación del tejido dañado<sup>271</sup>. Nuestros resultados muestran que el tratamiento con el láser de diodo de 940nm aumenta significativamente la expresión de FGF, independientemente de la pauta de tratamiento seguida (T1 y T2). Hay que señalar que este efecto, aunque significativo, es menor en el tratamiento T2. En el estudio previos se observó que, fibroblastos humanos tratados con este mismo láser y bajo las mismas condiciones de energía (0.5W, 4J/cm<sup>2</sup>), aumentó la tasa de crecimiento de manera significativa a las 24 horas de la aplicación láser; ahora bien, dicha tasa de crecimiento, no mostró cambios en el tratamiento a largo plazo. En esta misma línea, Khoo et al. (2014) mostraron que los fibroblastos obtenidos de ratones diabéticos, al ser irradiados con un láser de diodo a una única dosis de energía (810nm

,10mW, 1J/cm<sup>2</sup>), presentaron un incremento significativo en la expresión de FGF. Igualmente, Damante et al. (2009) observó que fibroblastos gingivales en cultivo, al ser tratados con un láser infrarrojo a distintas densidades de energía (780nm, 40mW, 3J/cm<sup>2</sup> y 5J/cm<sup>2</sup>), también aumentaron la expresión de FGF.

El TGF-β1 es un factor de crecimiento que tiene múltiples funciones entre las que se encuentra la estimulación de la proliferación, la migración y la adhesión de fibroblastos, además de promover la producción de elementos de la MEC<sup>274</sup>. Así mismo, el TGF-β1 favorece la maduración del fibroblasto induciendo su diferenciación a miofibroblasto, célula esta responsable de la contracción y aumento de elementos de la MEC<sup>275</sup>. No obstante, hemos de tener presente que la sobreexpresión de TGF-β1 ha sido considerada como la principal responsable de la formación de cicatrices hipertróficas y de queloides, debido a que se estimula la secreción del CTGF<sup>276</sup>. En este sentido, nuestros resultados muestran un incremento significativo de la expresión de TGF-β1, así como de sus receptores TGFβR1 y TGFβR2, cuando se aplican ambos tratamientos (T1, T2). El incremento de la expresión de TGF-β1 en el tratamiento T2 fue menor que la expresión en el tratamiento T1; lo cual podría explicar el proceso de maduración que está llevando a cabo el fibroblasto ya que, en el tratamiento T1, la expresión de TGF-β1 podría estar relacionado con un fenotipo de células fibroblásticas, decayendo dicha expresión en el tratamiento T2 por la presencia de células diferenciadas (miofibroblastos). Además, no observamos efecto sobre la expresión del CTGF en el tratamiento T1. Sin embargo, esta disminuyó de forma significativa en el tratamiento T2.

El proteoglicano decorina desempeña funciones clave en la MEC, inactivando el TGF-β y el CTGF. Por ello, se encuentran bajos niveles de decorina y un exceso de depósito de fibras de elastina en cicatrices hipertróficas, en comparación con los niveles expresados en piel normal<sup>277,278</sup>. Los fibroblastos tratados en nuestro ensayo *in vitro* mostraron un incremento significativo de decorina en ambos tratamientos con respecto a las células control; siendo mayor la expresión en los fibroblastos sometidos a dos tratamientos (T2), lo cual estaría a su vez relacionado con el patrón de expresión de TGF-β y CTGF. De

igual modo, observamos una disminución significativa en la expresión de elastina en el tratamiento T2. Estos resultados podrían contribuir a explicar el efecto favorable del láser en la regeneración del tejido blando sin el potencial riesgo de defectos (cicatrices hipertróficas o queloides) en la cicatrización.

La angiogénesis es un proceso fisiológico determinante en la cicatrización y/o regeneración tisular<sup>279</sup>. Este proceso complejo depende del VEGF, entre otros factores de crecimiento, y de elementos de la MEC. En nuestros resultados encontramos un incremento significativo de la expresión del VEGF en el tratamiento T2. En este sentido, distintos estudios en los que se utilizó el láser en tratamientos *in vivo* (modelos de herida en ratas: 660nm, 16mW, 10J/cm<sup>2</sup>; 660nm, 30mW 72J/cm<sup>2</sup>) e *in vitro* (fibroblastos humanos en cultivo: 660nm, 35mW, 1-5J/cm<sup>2</sup>) han reportado un aumento de la expresión del VEGF<sup>280-282</sup>. Este incremento de la expresión del VEGF contribuiría a la regeneración tisular.

Los receptores de colágeno DDR2 regulan los procesos de proliferación y migración del fibroblasto, así como la síntesis de la MEC, dos aspectos relevantes en la cicatrización de heridas. Además, hay una estrecha relación entre DDR2 y las MMP-2, proteasas predominantes en la MEC y responsables de la remodelación de la herida. De tal modo que una disminución de DDR2 produce una menor migración y menor expresión de MMP-2 en fibroblastos<sup>283</sup>. En este sentido, hemos observado que el tratamiento con láser de diodo de 940nm incrementa la expresión de DDR2 y de MMP-2 en los fibroblastos humanos, lo que estaría en relación con los resultados obtenidos por otros autores, los cuales observaron que fibroblastos humanos tratados con otro tipo de láser (erbium:YAG laser, 5 o 10J/cm<sup>2</sup>) aumentaron significativamente la expresión de MMP-2<sup>284</sup>.

El miofibroblasto es una población presente en el tejido de granulación con características intermedias entre el fibroblasto y la célula muscular lisa. Desempeña un papel muy importante durante la inflamación, la reparación y la remodelación en distintos tejidos. Esta célula se origina por diferenciación del fibroblasto, y se

caracteriza, como se ha reportado anteriormente, por la expresión de  $\alpha$ -actina<sup>285,286</sup>. Nuestros resultados muestran que los fibroblastos humanos en cultivo cuando son tratados con el láser de diodo de 940nm, indistintamente de la pauta de tratamiento seguida, incrementa significativamente la expresión  $\alpha$ -actina y de fibronectina, marcadores que son expresados por el miofibroblasto<sup>285</sup>. Además, el incremento de la expresión génica de  $\alpha$ -actina a largo plazo se asocia al incremento de TGF- $\beta$ 1, el cual se propone como factor desencadenante de la diferenciación del fibroblasto a miofibroblasto<sup>275</sup>.

Los distintos datos obtenidos sugieren que el láser contribuye a aumentar el crecimiento y la migración del fibroblasto e induce a su diferenciación, favoreciendo de este modo el proceso de cicatrización del tejido lesionado. Además, se ha descrito que el efecto de la terapia laser de baja energía es más efectivo en tejidos dañados que en tejidos en condiciones normales<sup>287</sup>.

No obstante, hemos de tener presente la limitación que supone cualquier estudio *in vitro*. Así bien, nuevos estudios *in vivo* sobre heridas crónicas, deben de realizarse a fin de contrastar estos resultados y, por tanto, consolidar el potencial terapéutico del láser de diodo de 940nm. De este modo, podrían aportarse pruebas sólidas acerca de la utilidad de esta herramienta en la práctica clínica para el tratamiento y/o manejo de las heridas; mejorando el estado clínico de las personas y la calidad asistencial.

## CONCLUSIONES

1. El láser de diodo de 940nm aplicado a la potencia de 0.2 y 0.5 W y a la densidad de energía entre 1 y 4J/cm<sup>2</sup>, en modo de emisión continuo o pulsados, estimula la capacidad proliferativa de los fibroblastos humanos en cultivo, y sin ejercer ningún cambio a nivel de su ciclo celular.
2. Los fibroblastos humanos en cultivo, tratados con un láser de diodo de 940nm a la dosis 0.2 y 0.5 W de potencia y, 3 y 4 J/cm<sup>2</sup> de densidad de energía en modo continuo, aumentan la expresión antigénica de  $\alpha$ -actina, un marcador típico de la diferenciación del fibroblasto a miofibroblasto
3. El láser de diodo de 940nm a la potencia de 0.5 W y la densidad de energía de 4 J/cm<sup>2</sup> en modo continuo, modula la expresión génica de diferentes marcadores de los fibroblastos humanos en cultivo, los cuales están directamente implicados en la reparación tisular.

## CONCLUSIONS

1. The application of the 940nm diode laser at power of 0.2 and 0.5 W and the energy density between 1 and 4J/cm<sup>2</sup>, in continuous or pulsed emission mode, stimulates the proliferative capacity of human fibroblasts in culture, without changes in the cell cycle.
2. The cultured human fibroblasts, treated with a diode laser of 940nm at the dose 0.2 and 0.5 W of power and, 3 and 4 J/cm<sup>2</sup> of energy density in continuous mode, increase the antigenic expression of  $\alpha$ -actin, a typical marker of fibroblast differentiation into myofibroblast.
3. The diode laser of 940nm at the power of 0.5 W and the energy density of 4 J/cm<sup>2</sup> in continuous mode, modulates the gene expression of different markers of cultured human fibroblasts, which are directly involved in tissue repair.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Paul W, Sharma CP. *The Anatomy and Functions of Skin*. Smithers Rapra, 2015.
2. Darmon M, Blumenberg M. *Molecular Biology of the Skin: The Keratinocyte*. Academic Press, 2012.
3. Rabbani P, Takeo M, Chou W, et al. Coordinated activation of Wnt in epithelial and melanocyte stem cells initiates pigmented hair regeneration. *Cell* 2011; 145: 941–955.
4. Chopin M, Nutt SL. Establishing and maintaining the Langerhans cell network. *Semin Cell Dev Biol* 2015; 41: 23–29.
5. Fradette J, Larouche D, Fugère C, et al. Normal Human Merkel Cells are Present in Epidermal Cell Populations Isolated and Cultured from Glabrous and Hairy Skin Sites. *J Invest Dermatol* 2003; 120: 313–317.
6. Wang Y, Xu R, He W, et al. Three-Dimensional Histological Structures of the Human Dermis. *Tissue Eng Part C Methods* 2015; 21: 932–944.
7. Driskell RR, Lichtenberger BM, Hoste E, et al. Distinct fibroblast lineages determine dermal architecture in skin development and repair. *Nature* 2013; 504: 277–281.
8. Bainbridge P. Wound healing and the role of fibroblasts. *J Wound Care* 2013; 22: 407–408, 410–412.
9. Sriram G, Bigliardi PL, Bigliardi-Qi M. Fibroblast heterogeneity and its implications for engineering organotypic skin models in vitro. *Eur J Cell Biol* 2015; 94: 483–512.
10. Driskell RR, Watt FM. Understanding fibroblast heterogeneity in the skin. *Trends Cell Biol* 2015; 25: 92–99.
11. Castor CW, Prince RK, Dorstewitz EL. Characteristics of human ‘fibroblasts’ cultivated in vitro from different anatomical sites. *Lab Investig J Tech Methods Pathol* 1962; 11: 703–713.
12. Rinn JL, Bondre C, Gladstone HB, et al. Anatomic Demarcation by Positional Variation in Fibroblast Gene Expression Programs. *PLOS Genet* 2006; 2: e119.
13. Nolte SV, Xu W, Rennekampff H-O, et al. Diversity of fibroblasts--a review on implications for skin tissue engineering. *Cells Tissues Organs* 2008; 187: 165–176.
14. Ali-Bahar M, Bauer B, Tredget EE, et al. Dermal fibroblasts from different layers of human skin are heterogeneous in expression of collagenase and types I and III procollagen mRNA. *Wound Repair Regen Off Publ Wound Heal Soc Eur Tissue Repair*

- Soc 2004; 12: 175–182.
15. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131: 861–872.
  16. Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, et al. Recent Developments in Myofibroblast Biology. *Am J Pathol* 2012; 180: 1340–1355.
  17. Pakyari M, Farrokhi A, Maharlooie MK, et al. Critical Role of Transforming Growth Factor Beta in Different Phases of Wound Healing. *Adv Wound Care* 2013; 2: 215–224.
  18. Yang X, Chen B, Liu T, et al. Reversal of myofibroblast differentiation: a review. *Eur J Pharmacol* 2014; 734: 83–90.
  19. Hinz B. Myofibroblasts. *Exp Eye Res* 2016; 142: 56–70.
  20. Barrientos S, Brem H, Stojadinovic O, et al. Clinical application of growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen Off Publ Wound Heal Soc Eur Tissue Repair Soc* 2014; 22: 569–578.
  21. Freinkel DRK, Woodley DT. *The Biology of the Skin*. CRC Press, 2001.
  22. Hay RJ, Johns NE, Williams HC, et al. The Global Burden of Skin Disease in 2010: An Analysis of the Prevalence and Impact of Skin Conditions. *J Invest Dermatol* 2014; 134: 1527–1534.
  23. Karimkhani C, Dellavalle RP, Coffeng LE, et al. Global Skin Disease Morbidity and Mortality: An Update From the Global Burden of Disease Study 2013. *JAMA Dermatol* 2017; 153: 406–412.
  24. Kozina LS, Borzova IV, Arutiunov VA, et al. [The role of oxidative stress in skin aging]. *Adv Gerontol Uspekhi Gerontol* 2012; 25: 217–222.
  25. Guerra-Segovia C, Ocampo-Candiani J. [Skin diseases and obesity]. *Rev Medica Inst Mex Seguro Soc* 2015; 53: 180–190.
  26. Lim HW, Collins SAB, Resneck JS, et al. The burden of skin disease in the United States. *J Am Acad Dermatol* 2017; 76: 958–972.e2.
  27. Hall BJ, Hall JC. *Sauer's Manual of Skin Diseases*. Lippincott Williams & Wilkins, 2012.
  28. Ribeiro MAS, Lages JSS, Lopes MHBM. Nursing diagnoses related to skin: operational definitions. *Rev Lat Am Enfermagem* 2012; 20: 863–872.
  29. International N. *Diagnósticos enfermeros. Definiciones y clasificación 2015-2017*. Elsevier España, 2015.
  30. Reinke JM, Sorg H. Wound repair and regeneration. *Eur Surg Res Eur Chir Forsch Rech*

- Chir Eur* 2012; 49: 35–43.
31. Fausto N, Campbell JS. The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mech Dev* 2003; 120: 117–130.
  32. Sorg H, Tilkorn DJ, Hager S, et al. Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts. *Eur Surg Res Eur Chir Forsch Rech Chir Eur* 2017; 58: 81–94.
  33. Lindley LE, Stojadinovic O, Pastar I, et al. Biology and Biomarkers for Wound Healing. *Plast Reconstr Surg* 2016; 138: 18S–28S.
  34. Gauglitz GG, Korting HC, Pavicic T, et al. Hypertrophic scarring and keloids: pathomechanisms and current and emerging treatment strategies. *Mol Med Camb Mass* 2011; 17: 113–125.
  35. Strbo N, Yin N, Stojadinovic O. Innate and Adaptive Immune Responses in Wound Epithelialization. *Adv Wound Care* 2014; 3: 492–501.
  36. Eming SA, Wynn TA, Martin P. Inflammation and metabolism in tissue repair and regeneration. *Science* 2017; 356: 1026–1030.
  37. Sinno H, Prakash S. Complements and the Wound Healing Cascade: An Updated Review. *Plast Surg Int*. Epub ahead of print 2013. DOI: 10.1155/2013/146764.
  38. Eming SA, Krieg T, Davidson JM. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol* 2007; 127: 514–525.
  39. Mori R, Shaw TJ, Martin P. Molecular mechanisms linking wound inflammation and fibrosis: knockdown of osteopontin leads to rapid repair and reduced scarring. *J Exp Med* 2008; 205: 43–51.
  40. Sindrilaru A, Scharffetter-Kochanek K. Disclosure of the Culprits: Macrophages—Versatile Regulators of Wound Healing. *Adv Wound Care* 2013; 2: 357.
  41. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, et al. Wound repair and regeneration. *Nature* 2008; 453: 314–321.
  42. Koh TJ, DiPietro LA. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. *Expert Rev Mol Med* 2011; 13: e23.
  43. Brancato SK, Albina JE. Wound macrophages as key regulators of repair: origin, phenotype, and function. *Am J Pathol* 2011; 178: 19–25.
  44. Strodbeck F. Physiology of wound healing. *Newborn Infant Nurs Rev* 2001; 1: 43–52.
  45. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 1999; 341: 738–746.
  46. Bradham DM, Igarashi A, Potter RL, et al. Connective tissue growth factor: a cysteine-

- rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRC-induced immediate early gene product CEF-10. *J Cell Biol* 1991; 114: 1285–1294.
47. Weiss A, Attisano L. The TGFbeta superfamily signaling pathway. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 2013; 2: 47–63.
  48. Eckes B, Nischt R, Krieg T. Cell-matrix interactions in dermal repair and scarring. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2010; 3: 4.
  49. Clark RA. Fibronectin matrix deposition and fibronectin receptor expression in healing and normal skin. *J Invest Dermatol* 1990; 94: 1285–1345.
  50. Jacinto A, Martinez-Arias A, Martin P. Mechanisms of epithelial fusion and repair. *Nat Cell Biol* 2001; 3: E117–E123.
  51. Li Y, Fan J, Chen M, et al. Transforming growth factor-alpha: a major human serum factor that promotes human keratinocyte migration. *J Invest Dermatol* 2006; 126: 2096–2105.
  52. Seeger MA, Paller AS. The Roles of Growth Factors in Keratinocyte Migration. *Adv Wound Care* 2015; 4: 213–224.
  53. Barrandon Y, Green H. Cell migration is essential for sustained growth of keratinocyte colonies: the roles of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor. *Cell* 1987; 50: 1131–1137.
  54. Demidova-Rice TN, Durham JT, Herman IM. Wound Healing Angiogenesis: Innovations and Challenges in Acute and Chronic Wound Healing. *Adv Wound Care* 2012; 1: 17–22.
  55. Adams RH, Alitalo K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 464–478.
  56. Liekens S, De Clercq E, Neyts J. Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochem Pharmacol* 2001; 61: 253–270.
  57. Muñoz-Chápuli R, Quesada AR, Angel Medina M. Angiogenesis and signal transduction in endothelial cells. *Cell Mol Life Sci CMLS* 2004; 61: 2224–2243.
  58. Sorg H, Krueger C, Vollmar B. Intravital insights in skin wound healing using the mouse dorsal skin fold chamber. *J Anat* 2007; 211: 810–818.
  59. Ali-Bahar M, Bauer B, Tredget EE, et al. Dermal fibroblasts from different layers of human skin are heterogeneous in expression of collagenase and types I and III procollagen mRNA. *Wound Repair Regen Off Publ Wound Heal Soc Eur Tissue Repair Soc* 2004; 12: 175–182.

60. Lee YR, Oshita Y, Tsuboi R, et al. Combination of insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding protein-1 promotes fibroblast-embedded collagen gel contraction. *Endocrinology* 1996; 137: 5278–5283.
61. Hinz B. Myofibroblasts. *Exp Eye Res* 2016; 142: 56–70.
62. Hinz B. Formation and Function of the Myofibroblast during Tissue Repair. *J Invest Dermatol* 2007; 127: 526–537.
63. Klingberg F, Hinz B, White ES. The myofibroblast matrix: implications for tissue repair and fibrosis. *J Pathol* 2013; 229: 298–309.
64. Pakyari M, Farrokhi A, Maharlooie MK, et al. Critical Role of Transforming Growth Factor Beta in Different Phases of Wound Healing. *Adv Wound Care* 2013; 2: 215–224.
65. Yang X, Chen B, Liu T, et al. Reversal of myofibroblast differentiation: a review. *Eur J Pharmacol* 2014; 734: 83–90.
66. Grinnell F. Fibroblasts, myofibroblasts, and wound contraction. *J Cell Biol* 1994; 124: 401–404.
67. Gould L, Abadir P, Brem H, et al. Chronic Wound Repair and Healing in Older Adults: Current Status and Future Research. *J Am Geriatr Soc* 2015; 63: 427–438.
68. Guo S, DiPietro LA. Factors Affecting Wound Healing. *J Dent Res* 2010; 89: 219–229.
69. Morasso MI, Tomic-Canic M. Epidermal stem cells: the cradle of epidermal determination, differentiation and wound healing. *Biol Cell* 2005; 97: 173–183.
70. Yager DR, Zhang LY, Liang HX, et al. Wound fluids from human pressure ulcers contain elevated matrix metalloproteinase levels and activity compared to surgical wound fluids. *J Invest Dermatol* 1996; 107: 743–748.
71. Agren MS, Steenfos HH, Dabelsteen S, et al. Proliferation and mitogenic response to PDGF-BB of fibroblasts isolated from chronic venous leg ulcers is ulcer-age dependent. *J Invest Dermatol* 1999; 112: 463–469.
72. Urrego D, Tomczak AP, Zahed F, et al. Potassium channels in cell cycle and cell proliferation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2014; 369: 20130094.
73. Sang L, Coller HA, Roberts JM. Control of the reversibility of cellular quiescence by the transcriptional repressor HES1. *Science* 2008; 321: 1095–1100.
74. Bertoli C, Skotheim JM, de Bruin RAM. Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013; 14: 518–528.
75. Girard F, Strausfeld U, Fernandez A, et al. Cyclin a is required for the onset of DNA

- replication in mammalian fibroblasts. *Cell* 1991; 67: 1169–1179.
76. Bartek J, Lukas J. DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. *Curr Opin Cell Biol* 2007; 19: 238–245.
  77. Ashwell S, Zabludoff S. DNA damage detection and repair pathways--recent advances with inhibitors of checkpoint kinases in cancer therapy. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2008; 14: 4032–4037.
  78. Cooper GM. The Events of M Phase <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9958/> (2000, accessed 6 December 2017).
  79. Bretones G, Delgado MD, León J. Myc and cell cycle control. *Biochim Biophys Acta BBA - Gene Regul Mech* 2015; 1849: 506–516.
  80. Malumbres M, Harlow E, Hunt T, et al. Cyclin-dependent kinases: a family portrait. *Nat Cell Biol* 2009; 11: 1275–1276.
  81. Nagy JA, Dvorak AM, Dvorak HF. VEGF-A and the Induction of Pathological Angiogenesis. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 2007; 2: 251–275.
  82. Katoh M, Nakagama H. FGF receptors: cancer biology and therapeutics. *Med Res Rev* 2014; 34: 280–300.
  83. Ornitz DM, Itoh N. The Fibroblast Growth Factor signaling pathway. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 2015; 4: 215–266.
  84. Witkowski JA, Parish LC. Histopathology of the decubitus ulcer. *J Am Acad Dermatol* 1982; 6: 1014–1021.
  85. Maklebust J, Margolis D. Pressure ulcers: definition and assessment parameters. *Adv Wound Care J Prev Heal* 1995; 8: suppl 6-7.
  86. Shea JD. Pressure sores: classification and management. *Clin Orthop* 1975; 89–100.
  87. National Pressure Ulcer Advisory Panel. *Statement on pressure ulcer prevention*. Buffalo: NPUAP, 1995.
  88. European Pressure Ulcer Advisory Panel. *Guidelines on treatment of pressure ulcers*. EPUAP, 1999.
  89. National Pressure Ulcer Advisory Panel European PUAP. *Prevention and Treatment of Pressure Ulcers: Clinical Practice Guideline*. Washington, DC: National Pressure Ulcer Advisory Panel, 2009.
  90. Edsberg LE, Black JM, Goldberg M, et al. Revised National Pressure Ulcer Advisory Panel Pressure Injury Staging System. *J Wound Ostomy Continence Nurs* 2016; 43: 585–597.

91. Defloor T, Schoonhoven L, Katrien V, et al. Reliability of the European Pressure Ulcer Advisory Panel classification system. *J Adv Nurs* 2006; 54: 189–198.
92. Soldevilla Agreda JJ, Torra Bou JE. Epidemiología de las úlceras por presión en España: estudio piloto en la Comunidad Autónoma de La Rioja. *Gerokomos* 1999; 10: HELCOS–75.
93. Torra i Bou JE, Rueda López J, Soldevilla Agreda JJ, et al. 1er Estudio Nacional de Prevalencia de úlceras por presión en España. Epidemiología y variables definitorias de las lesiones y pacientes. *Gerokomos Madr Ed Impr* 2003; 37–47.
94. Soldevilla Agreda JJ, Torra i Bou J-E, Verdú Soriano J, et al. 2º Estudio Nacional de Prevalencia de Úlceras por Presión en España, 2005: Epidemiología y variables definitorias de las lesiones y pacientes. *Gerokomos* 2006; 17: 154–172.
95. Agreda S, Javier J, Bou T i, et al. 3.er Estudio Nacional de Prevalencia de Úlceras por Presión en España, 2009. Epidemiología y variables definitorias de las lesiones y pacientes. *Gerokomos* 2011; 22: 77–90.
96. Pancorbo-Hidalgo PL, García-Fernández FP, Torra i Bou J-E, et al. Epidemiología de las úlceras por presión en España en 2013: 4.º Estudio Nacional de Prevalencia. *Gerokomos* 2014; 25: 162–170.
97. Garcez Sardo PM, Simões CSO, Alvarelhão JJM, et al. Analyses of pressure ulcer point prevalence at the first skin assessment in a Portuguese hospital. *J Tissue Viability* 2016; 25: 75–82.
98. Gunningberg L, Hommel A, Bååth C, et al. The first national pressure ulcer prevalence survey in county council and municipality settings in Sweden. *J Eval Clin Pract* 2013; 19: 862–867.
99. Rasero L, Simonetti M, Falciani F, et al. Pressure Ulcers in Older Adults: A Prevalence Study. *Adv Skin Wound Care* 2015; 28: 461–464.
100. Barrois B, Labalette C, Rousseau P, et al. A national prevalence study of pressure ulcers in French hospital inpatients. *J Wound Care* 2008; 17: 373–376, 378–379.
101. Lahmann N, Dassen T, Kottner J. [Frequency of pressure ulcers in German hospitals]. *Gesundheitswesen Bundesverb Ärzte Öffentlichen Gesundheitsdienstes Ger* 2012; 74: 793–797.
102. Bredesen IM, Bjørro K, Gunningberg L, et al. The prevalence, prevention and multilevel variance of pressure ulcers in Norwegian hospitals: a cross-sectional study. *Int J Nurs*

- Stud* 2015; 52: 149–156.
103. Mehta C, George JV, Mehta Y, et al. Pressure ulcer and patient characteristics--A point prevalence study in a tertiary hospital of India based on the European Pressure Ulcer Advisory Panel minimum data set. *J Tissue Viability* 2015; 24: 123–130.
  104. Igarashi A, Yamamoto-Mitani N, Gushiken Y, et al. Prevalence and incidence of pressure ulcers in Japanese long-term-care hospitals. *Arch Gerontol Geriatr* 2013; 56: 220–226.
  105. VanGilder C, Lachenbruch C, Algrim-Boyle C, et al. The International Pressure Ulcer Prevalence™ Survey: 2006-2015. *J Wound Ostomy Continence Nurs* 2017; 44: 20–28.
  106. Hall J, Buckley HL, Lamb KA, et al. Point prevalence of complex wounds in a defined United Kingdom population. *Wound Repair Regen Off Publ Wound Heal Soc Eur Tissue Repair Soc* 2014; 22: 694–700.
  107. Hibbs P. The economics of pressure ulcer prevention. *Adv Skin Wound Care* 1988; 1: 32.
  108. Jj SA, Je TIB, J P, et al. The Burden of Pressure Ulcers in Spain. *Wounds Compend Clin Res Pract* 2007; 19: 201–206.
  109. Kompanje EJO, van der Hoven B. 'Flatus profuse present in the muscles': subcutaneous emphysema of the lower abdominal wall and thighs, described in 1593 by fabricius hildanus. *Surg Infect* 2009; 10: 349–351.
  110. Defloor T. The risk of pressure sores: a conceptual scheme. *J Clin Nurs* 1999; 8: 206–216.
  111. Husain T. An experimental study of some pressure effects on tissues, with reference to the bed-sore problem. *J Pathol Bacteriol* 1953; 66: 347–358.
  112. Kosiak M. Etiology and pathology of ischemic ulcers. *Arch Phys Med Rehabil* 1959; 40: 62–69.
  113. Kosiak M. Etiology of decubitus ulcers. *Arch Phys Med Rehabil* 1961; 42: 19–29.
  114. Shore AC. Capillaroscopy and the measurement of capillary pressure. *Br J Clin Pharmacol* 2000; 50: 501–513.
  115. Salcido R, Lee A, Ahn C. Heel pressure ulcers: purple heel and deep tissue injury. *Adv Skin Wound Care* 2011; 24: 374–380; quiz 381-382.
  116. Dini V, Bertone M, Romanelli M. Prevention and management of pressure ulcers. *Dermatol Ther* 2006; 19: 356–364.

117. Bouten CV, Oomens CW, Baaijens FP, et al. The etiology of pressure ulcers: skin deep or muscle bound? *Arch Phys Med Rehabil* 2003; 84: 616–619.
118. Agrawal K, Chauhan N. Pressure ulcers: Back to the basics. *Indian J Plast Surg Off Publ Assoc Plast Surg India* 2012; 45: 244–254.
119. Dinsdale SM. Decubitus ulcers: role of pressure and friction in causation. *Arch Phys Med Rehabil* 1974; 55: 147–152.
120. Benoit R, Mion L. Risk factors for pressure ulcer development in critically ill patients: A conceptual model to guide research. *Res Nurs Health* 2012; 35: 340–362.
121. García-Fernández FP, Agreda JJS, Verdú J, et al. A new theoretical model for the development of pressure ulcers and other dependence-related lesions. *J Nurs Scholarsh Off Publ Sigma Theta Tau Int Honor Soc Nurs* 2014; 46: 28–38.
122. Lee T-T, Lin K-C, Mills ME, et al. Factors related to the prevention and management of pressure ulcers. *Comput Inform Nurs CIN* 2012; 30: 489–495.
123. Cox J. Predictors of pressure ulcers in adult critical care patients. *Am J Crit Care Off Publ Am Assoc Crit-Care Nurses* 2011; 20: 364–375.
124. Groah SL, Schladen M, Pineda CG, et al. Prevention of Pressure Ulcers Among People With Spinal Cord Injury: A Systematic Review. *PM&R* 2015; 7: 613–636.
125. Coleman S, Nixon J, Keen J, et al. A new pressure ulcer conceptual framework. *J Adv Nurs* 2014; 70: 2222–2234.
126. NPUAP/EPUAP. *Prevention and Treatment of Pressure Ulcers: Clinical Practice Guideline*. Washington, DC: National Pressure Ulcer Advisory Panel, 2009.
127. Coleman S, Nelson EA, Keen J, et al. Developing a pressure ulcer risk factor minimum data set and risk assessment framework. *J Adv Nurs* 2014; 70: 2339–2352.
128. Soldevilla Agreda JJ, Torra i Bou JE, Martínez Cuervo F, et al. *Etiopatogenia y clasificación de las úlceras por presión*. 1ª. Madrid: SPANISH PUBLISHERS ASSOCIATES, 2004.
129. Romanelli M, Clark M, Cherry G, et al. (eds). *Science and Practice of Pressure Ulcer Management*. London: Springer London, 2006.
130. Defloor T, Schoonhoven L. Inter-rater reliability of the EPUAP pressure ulcer classification system using photographs. *J Clin Nurs* 2004; 13: 952–959.
131. Beeckman D, Schoonhoven L, Fletcher J, et al. EPUAP classification system for pressure ulcers: European reliability study. *J Adv Nurs* 2007; 60: 682–691.

132. Skórkowska-Telichowska K, Czemplik M, Kulma A, et al. The local treatment and available dressings designed for chronic wounds. *J Am Acad Dermatol* 2013; 68: e117-126.
133. Dealey C, Posnett J, Walker A. The cost of pressure ulcers in the United Kingdom. *J Wound Care* 2012; 21: 261–262, 264, 266.
134. Redelings MD, Lee NE, Sorvillo F. Pressure ulcers: more lethal than we thought? *Adv Skin Wound Care* 2005; 18: 367–372.
135. Kučičec-Tepeš N. [CHARACTERISTIC FEATURES OF PRESSURE ULCER INFECTION]. *Acta Medica Croat Cas Hravatske Akad Med Znan* 2016; 70 Suppl 1: 45–51.
136. Souza DMST de, Veiga DF, Santos ID de AO, et al. Health-related Quality of Life in Elderly Patients With Pressure Ulcers in Different Care Settings. *J Wound Ostomy Continence Nurs* 2015; 42: 352–359.
137. Braga IA, Pirett CCNS, Ribas RM, et al. Bacterial colonization of pressure ulcers: assessment of risk for bloodstream infection and impact on patient outcomes. *J Hosp Infect* 2013; 83: 314–320.
138. Gorecki C, Closs SJ, Nixon J, et al. Patient-reported pressure ulcer pain: a mixed-methods systematic review. *J Pain Symptom Manage* 2011; 42: 443–459.
139. Khor HM, Tan J, Saedon NI, et al. Determinants of mortality among older adults with pressure ulcers. *Arch Gerontol Geriatr* 2014; 59: 536–541.
140. Brem H, Maggi J, Nierman D, et al. High cost of stage IV pressure ulcers. *Am J Surg* 2010; 200: 473–477.
141. Dealey C, Posnett J, Walker A. The cost of pressure ulcers in the United Kingdom. *J Wound Care* 2012; 21: 261–262, 264, 266.
142. Langer G, Fink A. Nutritional interventions for preventing and treating pressure ulcers. *Cochrane Database Syst Rev* 2014; CD003216.
143. Langer G, Fink A. Nutritional interventions for preventing and treating pressure ulcers. *Cochrane Database Syst Rev* 2014; CD003216.
144. Pancorbo-Hidalgo PL, Garcia-Fernandez FP, Lopez-Medina IM, et al. Risk assessment scales for pressure ulcer prevention: a systematic review. *J Adv Nurs* 2006; 54: 94–110.
145. Bergstrom N, Demuth PJ, Braden BJ. A clinical trial of the Braden Scale for Predicting Pressure Sore Risk. *Nurs Clin North Am* 1987; 22: 417–428.
146. Bergstrom N, Braden BJ, Laguzza A, et al. The Braden Scale for Predicting Pressure Sore

- Risk. *Nurs Res* 1987; 36: 205–210.
147. Royal College of Nursing (UK). *The Management of Pressure Ulcers in Primary and Secondary Care: A Clinical Practice Guideline*. London: Royal College of Nursing (UK) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK49010/> (2005, accessed 10 December 2017).
  148. Ersser SJ, Getliffe K, Voegeli D, et al. A critical review of the inter-relationship between skin vulnerability and urinary incontinence and related nursing intervention. *Int J Nurs Stud* 2005; 42: 823–835.
  149. Torra i Bou J-E, Rueda López J, Segovia Gómez T, et al. [Topical administration of an hyperoxygenated fatty acid compound. Preventive and curative effects on pressure ulcer]. *Rev Enfermeria Barc Spain* 2003; 26: 54–61.
  150. Lupiáñez-Perez I, Uttumchandani SK, Morilla-Herrera JC, et al. Topical olive oil is not inferior to hyperoxygenated fatty acids to prevent pressure ulcers in high-risk immobilised patients in home care. Results of a multicentre randomised triple-blind controlled non-inferiority trial. *PloS One* 2015; 10: e0122238.
  151. Lupiáñez-Pérez I, Morilla-Herrera JC, Ginel-Mendoza L, et al. Effectiveness of olive oil for the prevention of pressure ulcers caused in immobilized patients within the scope of primary health care: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* 2013; 14: 348.
  152. Ek AC, Gustavsson G, Lewis DH. The local skin blood flow in areas at risk for pressure sores treated with massage. *Scand J Rehabil Med* 1985; 17: 81–86.
  153. Zhang Q, Sun Z, Yue J. Massage therapy for preventing pressure ulcers. *Cochrane Database Syst Rev* 2015; CD010518.
  154. *Directrices generales sobre prevención de las úlceras por presión*. Logroño: Grupo Nacional para el Estudio y Asesoramiento en Úlceras Por Presión y heridas crónicas (GNEAUPP), 2003a.
  155. McInnes E, Jammali-Blasi A, Bell-Syer SE, et al. Support surfaces for pressure ulcer prevention. *Cochrane Database Syst Rev* 2011; CD001735.
  156. Moore ZEH, Webster J. Dressings and topical agents for preventing pressure ulcers. *Cochrane Database Syst Rev* 2013; CD009362.
  157. Brem H, Lyder C. Protocol for the successful treatment of pressure ulcers. *Am J Surg* 2004; 188: 9–17.

158. *Directrices generales sobre prevención de las úlceras por presión*. Logroño: Grupo Nacional para el Estudio y Asesoramiento en Úlceras Por Presión y heridas crónicas (GNEAUPP), 2003b.
159. National Pressure Ulcer Advisory Panel, European Pressure Ulcer Advisory Panel and Pan Pacific Pressure Injury Alliance. *Prevention and Treatment of Pressure Ulcers: Quick Reference Guide*. Western Australia: Cambridge Media: Osborne Park, 2014.
160. Moore ZEH, Cowman S. Wound cleansing for pressure ulcers. *Cochrane Database Syst Rev* 2013; CD004983.
161. Sibbald RG, Goodman L, Norton L, et al. Prevention and treatment of pressure ulcers. *Skin Ther Lett* 2012; 17: 4–7.
162. Westby MJ, Dumville JC, Soares MO, et al. Dressings and topical agents for treating pressure ulcers. *Cochrane Database Syst Rev* 2017; 6: CD011947.
163. Finnie A. Hydrocolloids in wound management: pros and cons. *Br J Community Nurs* 2002; 7: 338, 340, 342 passim.
164. Ramos-Torrecillas J, De Luna-Bertos E, García-Martínez O, et al. Clinical utility of growth factors and platelet-rich plasma in tissue regeneration: a review. *Wounds Compend Clin Res Pract* 2014; 26: 207–213.
165. Qaseem A, Humphrey LL, Forciea MA, et al. Treatment of pressure ulcers: a clinical practice guideline from the American College of Physicians. *Ann Intern Med* 2015; 162: 370–379.
166. Murphy P, Lee K, Dubois L, et al. Negative pressure wound therapy for high-risk wounds in lower extremity revascularization: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* 2015; 16: 504.
167. Arundel C, Buckley H, Clarke E, et al. Negative pressure wound therapy versus usual care for Surgical Wounds Healing by Secondary Intention (SWHSI trial): study protocol for a randomised controlled pilot trial. *Trials* 2016; 17: 535.
168. Seidel D, Mathes T, Lefering R, et al. Negative pressure wound therapy versus standard wound care in chronic diabetic foot wounds: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* 2014; 15: 334.
169. Dwivedi MK, Srivastava RN, Bhagat AK, et al. Pressure ulcer management in paraplegic patients with a novel negative pressure device: a randomised controlled trial. *J Wound Care* 2016; 25: 199–200, 202–204, 206–207.

170. Nie B, Yue B. Biological effects and clinical application of negative pressure wound therapy: a review. *J Wound Care* 2016; 25: 617–626.
171. Driver VR, Yao M, Miller CJ. Noncontact low-frequency ultrasound therapy in the treatment of chronic wounds: a meta-analysis. *Wound Repair Regen Off Publ Wound Heal Soc Eur Tissue Repair Soc* 2011; 19: 475–480.
172. Olyai M, Rad FS, Elahifar M-A, et al. High-frequency and noncontact low-frequency ultrasound therapy for venous leg ulcer treatment: a randomized, controlled study. *Ostomy Wound Manage* 2013; 59: 14–20.
173. Polak A, Taradaj J, Nawrat-Szoltysik A, et al. Reduction of pressure ulcer size with high-voltage pulsed current and high-frequency ultrasound: a randomised trial. *J Wound Care* 2016; 25: 742–754.
174. Conner-Kerr T, Alston G, Stovall A, et al. The effects of low-frequency ultrasound (35 kHz) on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in vitro. *Ostomy Wound Manage* 2010; 56: 32–43.
175. Ennis WJ, Valdes W, Gainer M, et al. Evaluation of clinical effectiveness of MIST ultrasound therapy for the healing of chronic wounds. *Adv Skin Wound Care* 2006; 19: 437–446.
176. Haesler E. *Prevention and Treatment of Pressure Ulcers: Quick Reference Guide*. Cambridge Media, 2014.
177. Vélez-Díaz-Pallarés M, Lozano-Montoya I, Abraha I, et al. Nonpharmacologic Interventions to Heal Pressure Ulcers in Older Patients: An Overview of Systematic Reviews (The SENATOR-ONTOP Series). *J Am Med Dir Assoc* 2015; 16: 448–469.
178. Chalidis B, Sachinis N, Assiotis A, et al. Stimulation of bone formation and fracture healing with pulsed electromagnetic fields: biologic responses and clinical implications. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2011; 24: 17–20.
179. Choi M-C, Cheung K-K, Li X, et al. Pulsed electromagnetic field (PEMF) promotes collagen fibre deposition associated with increased myofibroblast population in the early healing phase of diabetic wound. *Arch Dermatol Res* 2016; 308: 21–29.
180. Oke KI, Umebese PFA. Evaluation of the efficacy of pulsed electromagnetic therapy in the treatment of back pain: a randomized controlled trial in a tertiary hospital in Nigeria. *West Indian Med J* 2013; 62: 205–209.
181. Machado RS, Viana S, Sbruzzi G. Low-level laser therapy in the treatment of pressure

- ulcers: systematic review. *Lasers Med Sci* 2017; 32: 937–944.
182. Stephen S, Agnihotri M, Kaur S. A Randomized, Controlled Trial to Assess the Effect of Topical Insulin Versus Normal Saline in Pressure Ulcer Healing. *Ostomy Wound Manage* 2016; 62: 16–23.
  183. Romana-Souza B, Santos JSD, Bandeira LG, et al. Selective inhibition of COX-2 improves cutaneous wound healing of pressure ulcers in mice through reduction of iNOS expression. *Life Sci* 2016; 153: 82–92.
  184. Naing C, Whittaker MA. Anabolic steroids for treating pressure ulcers. *Cochrane Database Syst Rev* 2017; 6: CD011375.
  185. Thomason SS, Luther SL, Powell-Cope GM, et al. Validity and reliability of a pressure ulcer monitoring tool for persons with spinal cord impairment. *J Spinal Cord Med* 2014; 37: 317–327.
  186. Thomas DR, Rodeheaver GT, Bartolucci AA, et al. Pressure ulcer scale for healing: derivation and validation of the PUSH tool. The PUSH Task Force. *Adv Wound Care J Prev Heal* 1997; 10: 96–101.
  187. Stotts NA, Rodeheaver GT, Thomas DR, et al. An instrument to measure healing in pressure ulcers: development and validation of the pressure ulcer scale for healing (PUSH). *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2001; 56: M795-799.
  188. Jarrett P, Scragg R. A short history of phototherapy, vitamin D and skin disease. *Photochem Photobiol Sci Off J Eur Photochem Assoc Eur Soc Photobiol* 2017; 16: 283–290.
  189. Herodoto. *Historias*. Madrid: Editorial Gredos, 2001.
  190. Daniell MD, Hill JS. A history of photodynamic therapy. *Aust N Z J Surg* 1991; 61: 340–348.
  191. Lucrecio L, Gavilan FS. *La naturaleza*. Madrid: Gredos, 2010.
  192. Graudenz K, Raulin C. Von Einsteins Quantentheorie zur modernen Lasertherapie. *Hautarzt* 2003; 54: 575–582.
  193. Plank, M, Masius, M. *The theory of heat radiation*. Nueva York: Dover Publications Inc, 1914.
  194. F.R.S PER. LXXIX. The scattering of  $\alpha$  and  $\beta$  particles by matter and the structure of the atom. *Philos Mag Ser 6* 1911; 21: 669–688.
  195. Bohr N. Can Quantum-Mechanical Description of Physical Reality be Considered

- Complete? *Phys Rev* 1935; 48: 696–702.
196. Knudson SK. The Old Quantum Theory for H<sub>2</sub><sup>+</sup>: Some Chemical Implications. *J Chem Educ* 2006; 83: 464.
  197. Sulewski JG. Historical survey of laser dentistry. *Dent Clin North Am* 2000; 44: 717–752.
  198. Lukishova SG, Valentin A, Fabrikant: negative absorption, his 1951 patent application for amplification of electromagnetic radiation (ultraviolet, visible, infrared and radio spectral regions) and his experiments. *J Eur Opt Soc - Rapid Publ*; 5. Epub ahead of print 28 September 2010. DOI: 10.2971/jeos.2010.10045s.
  199. Gordon JP, Zeiger HJ, Townes CH. The Maser\char22{}New Type of Microwave Amplifier, Frequency Standard, and Spectrometer. *Phys Rev* 1955; 99: 1264–1274.
  200. Schawlow AL, Townes CH. Infrared and Optical Masers. *Phys Rev* 1958; 112: 1940–1949.
  201. H MJ. *Rotor balancer*. US3663795 A, 1972.
  202. Maiman TH. Stimulated Optical Radiation in Ruby. *Nature* 1960; 187: 493–494.
  203. Hellwarth RW. Theory of the pulsation of fluorescent light from ruby. *Phys Rev Lett* 1961; 6: 9– 11.
  204. Hellwarth RW, McClung FJ. Giant pulsations from ruby. *Appl Phys* 1962; 33: 838– 841.
  205. Götte, S. Low-level laser therapy. In: *Lasers in the Musculoskeletal System*. Berlin: Springer, 2001, pp. 199–204.
  206. Humans IWG on the E of CR to. *Non-Ionizing Radiation, Part 1: Static and Extremely Low-Frequency (ELF) Electric and Magnetic Fields*. International Agency for Research on Cancer, 2002.
  207. Dictionaries E of the AH. *American Heritage Dictionary of the English Language, Fifth Edition*. Indexed, Thumbed, Updated edition. Place of publication not identified: Houghton Mifflin Harcourt, 2015.
  208. humanos G de trabajo I sobre la evaluación del riesgo carcinogénico para los seres. *Radiación no ionizante , parte 2: campos electromagnéticos de radiofrecuencia*. Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer, 2013.
  209. *Láser en dermatología y dermocosmética 2Ed- Ed Tapa Dura*. Madrid, 2008.
  210. Coluzzi DJ. Fundamentals of dental lasers: science and instruments. *Dent Clin North Am* 2004; 48: 751–770, v.
  211. Coluzzi DJ. Fundamentals of lasers in dentistry: basic science, tissue interaction and

- instrumentation. *Coluzzi DJ* 2008; 16: 4–10.
212. Svelto O. *Principles of Lasers*. 5th ed. Springer US//www.springer.com/gp/book/9781441913012 (2010, accessed 21 March 2018).
  213. Mahesh K, Vij DR. Elements of Laser Emission Process. In: Vij DR, Mahesh K (eds) *Medical Applications of Lasers*. Springer US, 2002, pp. 1–20.
  214. Dahotre NB, Harimkar S. *Laser Fabrication and Machining of Materials*. Springer US//www.springer.com/gp/book/9780387723433 (2008, accessed 21 March 2018).
  215. Aoki A, Sasaki KM, Watanabe H, et al. Lasers in nonsurgical periodontal therapy. *Periodontol 2000* 2004; 36: 59–97.
  216. Karu TI, Ryabykh TP, Letokhov VS. Different sensitivity of cells from tumor-bearing organisms to continuous-wave and pulsed laser radiation (632,8nm) evaluated by chemiluminescence test. III. Effect of dark period between pulsed. 1997; 7: 141–156.
  217. Mathur RK, Sahu K, Saraf S, et al. Low-level laser therapy as an adjunct to conventional therapy in the treatment of diabetic foot ulcers. *Lasers Med Sci* 2017; 32: 275–282.
  218. Nambiar, K R. *Lasers Principles Types and Applications*. New Age International Publishers, 2009.
  219. Baxter, D. G. *Therapeutic Lasers: Theory and Practice*. 1<sup>o</sup>. Churchill Livingstone, 1994.
  220. Conlan MJ, Rapley JW, Cobb CM. Biostimulation of wound healing by low-energy laser irradiation. A review. *J Clin Periodontol* 1996; 23: 492–496.
  221. Basford JR. Low-energy laser therapy: controversies and new research findings. *Lasers Surg Med* 1989; 9: 1–5.
  222. Oltra-Arimon D, España-Tost AJ, Berini-Aytés L, et al. Aplicaciones del láser de baja potencia en Odontología. *RCOE* 2004; 9: 517–524.
  223. Thomsen S. Pathologic analysis of photothermal and photomechanical effects of laser-tissue interactions. *Photochem Photobiol* 1991; 53: 825–835.
  224. Jacques SL. Laser-tissue interactions. Photochemical, photothermal, and photomechanical. *Surg Clin North Am* 1992; 72: 531–558.
  225. Jacques SL, Prahl SA. Modeling optical and thermal distributions in tissue during laser irradiation. *Lasers Surg Med* 1987; 6: 494–503.
  226. Watanabe S, Flotte TJ, McAuliffe DJ, et al. Putative Photoacoustic Damage in Skin Induced by Pulsed ArF Excimer Laser. *J Invest Dermatol* 1988; 90: 761–766.
  227. Chan KF, Joshua Pfefer T, Teichman JMH, et al. A Perspective on Laser Lithotripsy: The

- Fragmentation Processes. *J Endourol* 2001; 15: 257–273.
228. MacCormack MA. Photodynamic Therapy. *Adv Dermatol* 2006; 22: 219–258.
229. Maduray K, Odhav B. The in vitro photodynamic effect of laser activated gallium, indium and iron phthalocyanine chlorides on human lung adenocarcinoma cells. *J Photochem Photobiol B* 2013; 128: 58–63.
230. Patil UA, Dhani LD. Overview of lasers. *Indian J Plast Surg Off Publ Assoc Plast Surg India* 2008; 41: S101–S113.
231. Carroll JD, Milward MR, Cooper PR, et al. Developments in low level light therapy (LLLT) for dentistry. *Dent Mater Off Publ Acad Dent Mater* 2014; 30: 465–475.
232. Chung H, Dai T, Sharma SK, et al. The nuts and bolts of low-level laser (light) therapy. *Ann Biomed Eng* 2012; 40: 516–533.
233. Hamblin MR. Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation. *AIMS Biophys* 2017; 4: 337–361.
234. Saito A, Morimoto Y, Yoshimatsu T, et al. [Present and future for LLLT in the area of orthopedics]. *Masui* 2012; 61: 706–717.
235. Capon A, Mordon S. Can thermal lasers promote skin wound healing? *Am J Clin Dermatol* 2003; 4: 1–12.
236. Farivar S, Malekshahabi T, Shiari R. Biological Effects of Low Level Laser Therapy. *J Lasers Med Sci* 2014; 5: 58–62.
237. de Freitas LF, Hamblin MR. Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. *IEEE J Sel Top Quantum Electron Publ IEEE Lasers Electro-Opt Soc*; 22. Epub ahead of print 2016. DOI: 10.1109/JSTQE.2016.2561201.
238. Karu TI, Kolyakov SF. Exact action spectra for cellular responses relevant to phototherapy. *Photomed Laser Surg* 2005; 23: 355–361.
239. Karu TI. Multiple roles of cytochrome c oxidase in mammalian cells under action of red and IR-A radiation. *IUBMB Life* 2010; 62: 607–610.
240. Masha RT, Houreld NN, Abrahamse H. Low-intensity laser irradiation at 660 nm stimulates transcription of genes involved in the electron transport chain. *Photomed Laser Surg* 2013; 31: 47–53.
241. Brunori M, Giuffrè A, Sarti P. Cytochrome c oxidase, ligands and electrons. *J Inorg Biochem* 2005; 99: 324–336.
242. Karu T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on

- cells. *J Photochem Photobiol B* 1999; 49: 1–17.
243. Karu TI. Mitochondrial Signaling in Mammalian Cells Activated by Red and Near-IR Radiation. *Photochem Photobiol* 2008; 84: 1091–1099.
244. Lane N. Cell biology: power games. *Nature* 2006; 443: 901–903.
245. Karu TI, Pyatibrat LV, Afanasyeva NI. Cellular effects of low power laser therapy can be mediated by nitric oxide. *Lasers Surg Med* 2005; 36: 307–314.
246. Farivar S, Malekshahi T, Shiari R. Biological effects of low level laser therapy. *J Lasers Med Sci* 2014; 5: 58–62.
247. Karu T. Mitochondrial mechanisms of photobiomodulation in context of new data about multiple roles of ATP. *Photomed Laser Surg* 2010; 28: 159–160.
248. Burnstock G. Purinergic nerves. *Pharmacol Rev* 1972; 24: 509–581.
249. Khakh BS, Burnstock G. THE DOUBLE LIFE OF ATP. *Sci Am* 2009; 301: 84–92.
250. de Lima FM, Moreira LM, Villaverde AB, et al. Low-level laser therapy (LLLT) acts as cAMP-elevating agent in acute respiratory distress syndrome. *Lasers Med Sci* 2011; 26: 389–400.
251. Wu J-Y, Chen C-H, Wang C-Z, et al. Low-power laser irradiation suppresses inflammatory response of human adipose-derived stem cells by modulating intracellular cyclic AMP level and NF- $\kappa$ B activity. *PloS One* 2013; 8: e54067.
252. de Lima FM, Moreira LM, Villaverde AB, et al. Low-level laser therapy (LLLT) acts as cAMP-elevating agent in acute respiratory distress syndrome. *Lasers Med Sci* 2011; 26: 389–400.
253. Sharma SK, Kharkwal GB, Sajo M, et al. Dose response effects of 810 nm laser light on mouse primary cortical neurons. *Lasers Surg Med* 2011; 43: 851–859.
254. Huang Y-Y, Nagata K, Tedford CE, et al. Low-level laser therapy (810 nm) protects primary cortical neurons against excitotoxicity in vitro. *J Biophotonics* 2014; 7: 656–664.
255. Chen AC-H, Arany PR, Huang Y-Y, et al. Low-level laser therapy activates NF- $\kappa$ B via generation of reactive oxygen species in mouse embryonic fibroblasts. *PloS One* 2011; 6: e22453.
256. Ristow M, Schmeisser S. Extending life span by increasing oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2011; 51: 327–336.
257. Huang Y-Y, Nagata K, Tedford CE, et al. Low-level laser therapy (LLLT) reduces oxidative

- stress in primary cortical neurons in vitro. *J Biophotonics* 2013; 6: 829–838.
258. Lavi R, Shainberg A, Friedmann H, et al. Low energy visible light induces reactive oxygen species generation and stimulates an increase of intracellular calcium concentration in cardiac cells. *J Biol Chem* 2003; 278: 40917–40922.
259. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002; 3: RESEARCH0034.
260. Ragni E, Viganò M, Rebullà P, et al. What is beyond a qRT-PCR study on mesenchymal stem cell differentiation properties: how to choose the most reliable housekeeping genes. *J Cell Mol Med* 2013; 17: 168–180.
261. Huertas RM, Luna-Bertos ED, Ramos-Torrecillas J, et al. Effect and clinical implications of the low-energy diode laser on bone cell proliferation. *Biol Res Nurs* 2014; 16: 191–196.
262. Darby IA, Laverdet B, Bonté F, et al. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clin Cosmet Investig Dermatol* 2014; 7: 301–311.
263. Ramos-Torrecillas J, Luna-Bertos E de, Manzano-Moreno FJ, et al. Human fibroblast-like cultures in the presence of platelet-rich plasma as a single growth factor source: clinical implications. *Adv Skin Wound Care* 2014; 27: 114–120.
264. Medina-Huertas R, Manzano-Moreno FJ, De Luna-Bertos E, et al. The effects of low-level diode laser irradiation on differentiation, antigenic profile, and phagocytic capacity of osteoblast-like cells (MG-63). *Lasers Med Sci* 2014; 29: 1479–1484.
265. Manzano-Moreno FJ, Medina-Huertas R, Ramos-Torrecillas J, et al. The effect of low-level diode laser therapy on early differentiation of osteoblast via BMP-2/TGF- $\beta$ 1 and its receptors. *J Cranio-Maxillo-fac Surg Off Publ Eur Assoc Cranio-Maxillo-fac Surg* 2015; 43: 1926–1932.
266. Basso FG, Soares DG, Pansani TN, et al. Proliferation, migration, and expression of oral-mucosal-healing-related genes by oral fibroblasts receiving low-level laser therapy after inflammatory cytokines challenge. *Lasers Surg Med* 2016; 48: 1006–1014.
267. Ren C, McGrath C, Jin L, et al. Effect of diode low-level lasers on fibroblasts derived from human periodontal tissue: a systematic review of in vitro studies. *Lasers Med Sci* 2016; 31: 1493–1510.
268. Hakki SS, Bozkurt SB. Effects of different setting of diode laser on the mRNA expression

- of growth factors and type I collagen of human gingival fibroblasts. *Lasers Med Sci* 2012; 27: 325–331.
269. Barrientos S, Brem H, Stojadinovic O, et al. Clinical application of growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen Off Publ Wound Heal Soc Eur Tissue Repair Soc* 2014; 22: 569–578.
270. Eckes B, Nischt R, Krieg T. Cell-matrix interactions in dermal repair and scarring. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2010; 3: 4.
271. Kinoda J, Ishihara M, Nakamura S, et al. Protective effect of FGF-2 and low-molecular-weight heparin/protamine nanoparticles on radiation-induced healing-impaired wound repair in rats. *J Radiat Res (Tokyo)* 2017; 1–8.
272. Khoo NK, Shokrgozar MA, Kashani IR, et al. In vitro Therapeutic Effects of Low Level Laser at mRNA Level on the Release of Skin Growth Factors from Fibroblasts in Diabetic Mice. *Avicenna J Med Biotechnol* 2014; 6: 113–118.
273. Damante CA, De Micheli G, Miyagi SPH, et al. Effect of laser phototherapy on the release of fibroblast growth factors by human gingival fibroblasts. *Lasers Med Sci* 2009; 24: 885–891.
274. Klass BR, Grobbelaar AO, Rolfe KJ. Transforming growth factor beta1 signalling, wound healing and repair: a multifunctional cytokine with clinical implications for wound repair, a delicate balance. *Postgrad Med J* 2009; 85: 9–14.
275. Ramos-Torrecillas J, Luna-Bertos E de, Manzano-Moreno FJ, et al. Human fibroblast-like cultures in the presence of platelet-rich plasma as a single growth factor source: clinical implications. *Adv Skin Wound Care* 2014; 27: 114–120.
276. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, et al. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen Off Publ Wound Heal Soc Eur Tissue Repair Soc* 2008; 16: 585–601.
277. Kwan P, Ding J, Tredget EE. MicroRNA 181b Regulates Decorin Production by Dermal Fibroblasts and May Be a Potential Therapy for Hypertrophic Scar. *PLOS ONE* 2015; 10: e0123054.
278. Nirodi CS, Devalaraja R, Nanney LB, et al. Chemokine and chemokine receptor expression in keloid and normal fibroblasts. *Wound Repair Regen Off Publ Wound Heal Soc Eur Tissue Repair Soc* 2000; 8: 371–382.
279. Eming SA, Martin P, Tomic-Canic M. Wound repair and regeneration: Mechanisms,

- signaling, and translation. *Sci Transl Med* 2014; 6: 265sr6.
280. Colombo F, Neto A de APV, Sousa APC de, et al. Effect of low-level laser therapy ( $\lambda$ 660 nm) on angiogenesis in wound healing: a immunohistochemical study in a rodent model. *Braz Dent J* 2013; 24: 308–312.
281. Fiorio FB, Dos Santos SA, de Melo Rambo CS, et al. Photobiomodulation therapy action in wound repair skin induced in aged rats old: time course of biomarkers inflammatory and repair. *Lasers Med Sci* 2017; 32: 1769–1782.
282. Szezerbaty SKF, de Oliveira RF, Pires-Oliveira DAA, et al. The effect of low-level laser therapy (660 nm) on the gene expression involved in tissue repair. *Lasers Med Sci*. Epub ahead of print 20 November 2017. DOI: 10.1007/s10103-017-2375-7.
283. Márquez J, Olaso E. Role of discoidin domain receptor 2 in wound healing. *Histol Histopathol* 2014; 29: 1355–1364.
284. Schmitt L, Amann PM, Marquardt Y, et al. Molecular effects of fractional ablative erbium:YAG laser treatment with multiple stacked pulses on standardized human three-dimensional organotypic skin models. *Lasers Med Sci* 2017; 32: 805–814.
285. Darby IA, Laverdet B, Bonté F, et al. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clin Cosmet Investig Dermatol* 2014; 7: 301–311.
286. Shu DY, Lovicu FJ. Myofibroblast transdifferentiation: The dark force in ocular wound healing and fibrosis. *Prog Retin Eye Res* 2017; 60: 44–65.
287. Hawkins D, Houreld N, Abrahamse H. Low level laser therapy (LLLT) as an effective therapeutic modality for delayed wound healing. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1056: 486–493.