

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA

VALORACIÓN DE LA REGENERACIÓN ÓSEA EN UN
MODELO ANIMAL : UTILIZACIÓN DEL PLASMA RICO EN
PLAQUETAS EN LA CURACIÓN DE LOS DEFECTOS
ÓSEOS. ESTUDIO PRELIMINAR PARA UN DISEÑO
EXPERIMENTAL EN CONEJOS

DANIEL JOSÉ BONETE LLUCH

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2007

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 3 de Maig de 2007 davant un tribunal format per:

- D. Fernando López Prats
- D. Pedro Vera Luna
- D. Santiago Suso Vergara
- D. Antonio Martín Benlloch
- D. José Gascó Gómez de Membrillera

Va ser dirigida per:

D. Francisco Gomar Sancho

D. Ismael Escribá Roca

©Copyright: Servei de Publicacions

Daniel José Bonete Lluch

Depòsit legal:

I.S.B.N.:978-84-370-6823-7

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Artes Gráficas, 13 bajo

46010 València

Spain

Telèfon: 963864115

VNIVERSITAT
D VALÈNCIA

Facultat de Medicina i Odontologia
Departament de Cirurgia



TESIS DOCTORAL

VALORACIÓN DE LA REGENERACIÓN ÓSEA EN UN MODELO ANIMAL:

**UTILIZACIÓN DEL PLASMA RICO EN PLAQUETAS
EN LA CURACIÓN DE LOS DEFECTOS ÓSEOS.**

Estudio preliminar para un diseño experimental en conejos.

Trabajo presentado por

Daniel J. Bonete Lluch

Para optar al grado de Doctor en Medicina por la Universidad de Valencia

Valencia, Diciembre 2006

Director: Prof. Dr. D. Francisco GOMAR SANCHO

al Dr. Francisco Vidal Roig, “ in memoriam ”

***Gracias a Elena y Nieves,
Por ellas vale la pena esforzarse para conseguir las maravillosas metas futuras***

Con mucho cariño a mis padres; Daniel y Nieves

AGRADECIMIENTOS

Existe un gran número de gente sin la cual no hubiese podido realizar este trabajo, su dedicación, ánimo, consejos y colaboraciones han sido una ayuda incalculable.

En primer lugar me gustaría dar las gracias a mi director de tesis el Profesor Dr. D. Francisco Gomar Sancho, por ofrecerme la oportunidad de aprender y desarrollar habilidades en el campo de la investigación básica y por no escatimar recursos a la hora de realizar el proyecto. Su estímulo, clarividencia ánimo y pensamiento crítico me han motivado para seguir luchando, mejorar personal y profesionalmente y conseguir hacer del día a día un reto para buscar y desarrollar nuevas ideas. Al Dr. D. Ismael Escribá Roca, mi jefe de Servicio por su apoyo, comprensión y paciencia.

También me gustaría dar las gracias al equipo del laboratorio de cirugía experimental administrativos del departamento de Cirugía de la Universidad de Valencia por su esfuerzo y su inestimable colaboración y ofrecerme su amistad. Gracias a Amor García, Joaquín Carrasco, Raúl Sales, Inmaculada Noguera y Merche.

Gracias al equipo del Instituto de Biomecánica de Valencia por su orientación y consejos.

También me gustaría dar las gracias a auxiliares enfermeras y compañeros del servicio de RHB H. La Fe de Valencia su ayuda y ánimos han sido imprescindibles. También quiero expresar mi más profunda gratitud a todas aquellas personas que no he mencionado y seguro se lo merecen.

Gracias a Cristóbal Merino y la empresa Imagina SL. por su colaboración en la maquetación y edición del trabajo.

Especial reconocimiento y gratitud para Dr. D. Manuel Espino por haber iniciado mis primeros pasos en el mundo de la medicina. Consejos personales, espíritu de trabajo, superación y ánimo en los momentos más difíciles no me han faltado.

Al Dr D. José Pardo Montaner gratitud infinita por confiar en mi, ofrecerme la oportunidad de desarrollarme profesionalmente y ser como un padre en el mundo de la Ortopedia y Traumatología

A mis padres Daniel y Nieves por inculcarme el espíritu de sacrificio y esfuerzo para luchar en la vida, con su ejemplo aprendí el valor del trabajo serio, riguroso, meticulado y responsable.

Gracias a mis amigos por su ánimo

A mi familia y aquellos quienes de forma desinteresada, tanto directa como indirectamente, facilitaron el desarrollo y realización de esta tesis gracias por todo.

Valencia, Diciembre-2006

Daniel Bonete

....hice lo que pude, no lo suficiente, bien lo sé. Otros harán más

P. Laín Entralgo

ÍNDICE

Abreviaturas	XVII
Definiciones	XVIII
Resumen	XXI
1. Introducción	
1.1 Justificación del trabajo	002
1.2 Reseña histórica	004
1.3 Los injertos óseos	010
1.4 La Medicina Regenerativa - Ingeniería tisular	015
1.5 Biología ósea. Principios básicos de la formación y Reparación ósea. Ayuda a la curación ósea.	016
1.6 Factores de crecimiento	018
1.7 Conceptos generales de la consolidación de las fracturas. Reparación espontánea de los defectos óseos.	039
1.8 Proceso de reparación ósea.	043
1.9 Plasma Rico en Plaquetas. Antecedentes.	048
1.9.1 ¿Qué es el plasma rico en plaquetas (PRP)?	049
1.9.2 Plasma rico en plaquetas (PRP) o Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF)	055
1.9.3 Gel de Fibrina y Plasma Rico en Plaquetas (PRP)	057
1.9.4 Protocolo de obtención del Plasma Rico en Factores de Crecimiento (Dr. Anitua)	059
1.9.5 Sistemas de obtención PRP	060
1.9.6 Mecanismo de acción del PRP	062
1.9.7 Utilización experimental y clínica de los Factores de Crecimiento no BMPs y el PRP	063
1.9.8 ¿Es seguro utilizar el PRP?	065

2. Objetivos del estudio	068
3. Hipótesis de Trabajo	070
4. Material y Método	
4.1 Modelo experimental. Animal de experimentación	071
4.2 Material	072
4.2.1 Modelo Experimental	075
4.2.2 Animales de Experimentación	076
4.2.3 Manejo Ético de los Animales	077
4.2.4 Gel Plaquetario	078
4.2.5 Grupos de Trabajo	079
4.2.6 Identificación de los Animales	080
4.3 Método	081
4.3.1 Manejo preoperatorio	081
4.3.2 Estabulación de los animales	081
4.3.3 Anestesia	082
4.3.4 Preparación preoperatorio	081
4.3.5 Profilaxis antibiótica preoperatoria	083
4.3.6 Intervención quirúrgica	083
4.3.7 Manejo Postoperatorio	091
4.3.8 Analgesia	091
4.3.9 Profilaxis antibiótica postoperatoria	091
4.3.10 Controles	091
4.3.11 Estabulación Posquirúrgica	091
4.3.12 Protocolo de eutanasia	092
4.3.13 Recogida de las muestras	092
4.3.14 Evaluación	092
4.3.15 Estudio radiológico	092
4.3.16 Estudio histológico	101
4.3.17 Estudio estadístico	107

5. Resultados	
5.1 Medición resultados sanguíneos.	
Cinética del Gel	111
5.2 Medición resultados radiológicos	114
5.3 Medición resultados de la TAC	115
5.4 Resumen resultados de la TAC	137
5.5 Galería de Imágenes	153
5.5.1 Imágenes radiográficas y 3D por grupos	154
5.5.2 Imágenes radiográficas e histológicas por espécimen	161
5.6 Anexo Resultados	228
6. Discusión	232
7. Conclusiones	251
8. Bibliografía	254

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema general de la activación celular por moléculas	022
Figura 2.	Mecanismo de actuación del factor de crecimiento derivado de las plaquetas	031
Figura 3.	Receptores del factor de crecimiento derivado de las plaquetas	032
Figura 4.	Esquema de la estructura plaquetar	053
Figura 5.	Imagen de microscopia electrónica de las plaquetas inactivas y activadas	053
Figura 6.	Imagen de microscopia electrónica de plaquetas inactivas	054
Figura 7.	Imagen de microscopia electrónica de plaquetas activadas	054
Figura 8.	Imagen de los defectos óseos creados	076
Figura 9.	Conejo macho de raza albina Nueva Zelanda	077
Figura 10.	Detalle de las instalaciones con jaulas del estabulario. Administración de agua y comida	082
Figura 11.	Extracción de sangre y preparación de la zona para la cirugía	083
Figura 12.	Instrumental quirúrgico	085
Figura 13.	Detalle general del instrumental quirúrgico	085
Figura 14.	Brocas, fresas y escoplos para osteotomías	086

Figura 15. Preparación del campo quirúrgico y aseptización con povidona yodada	086
Figura 16. Preparación del campo quirúrgico con material desechable	087
Figura 17. Abordaje lateral de la tibia para acceder al peroné	087
Figura 18. Creación de un defecto de peroné	088
Figura 19. Administración y relleno del defecto de peroné con un gel de plaquetas	088
Figura 20. Abordaje medial de la tibia	089
Figura 21. Creación de un defecto proximal de tibia	089
Figura 22. Administración y relleno del defecto con un gel plaquetario	090
Figura 23. Cierre cutáneo de las heridas	090
Figura 24. Mamógrafo	093
Figura 25. Instalaciones y estación de trabajo de la TAC	094
Figura 26. Segmentación binarizada de las imágenes de un segmento de tibia. Interfase del programa Mimics	097
Figura 27. Imagen tridimensional reconstruida del regenerado en un defecto de peroné	098
Figura 28. Imagen de los especímenes obtenidos para realizar los estudios de imagen y posterior procesado histológico	104
Figura 29. Imagen de las muestras para procesado histológico	104
Figura 30. Estación de trabajo para el estudio microscópico	106
Figura 31. Imagen microscópica (10x) con luz polarizada de un fragmento óseo	148
Figura 32. Imagen microscópica con tinción tricrómico de Masson (10x) de un defecto óseo	149
Figura 33. Imagen microscópica con tinción tricrómico de Masson (10x) de un defecto óseo	150

Figura 34. Imagen microscópica con tinción Hematoxilina-Eosina (10x) **151**

Figura 35. Imagen microscópica con tinción Hematoxilina-Eosina (20x) **152**

INDICE DE TABLAS

Tabla I.	Efecto celular de los principales factores de crecimiento del PRP	038
Tabla II.	Niveles de los factores de crecimiento en concentración de plaquetas	057
Tabla III.	Valores leucocitarios y plaquetarios del gel de plaquetas comparación de dos sistemas de obtención del concentrado plaquetar	061
Tabla IV.	Característica del animal de experimentación	074
Tabla V.	Diseño experimental	081
Tabla VI.	Criterios para la valoración radiológica	095
Tabla VII.	Valor de la densidad mineral ósea de los regenerados	120
Tabla VIII.	Valores del regenerado en el defecto peroné	124
Tabla IX.	Valores del regenerado en el defecto tibial	127
Tabla X.	Estudio estadístico entre el grupo ppp y el grupo control	133
Tabla XI.	Estudio del grupo PRP y el grupo control	134

INDICE DE GRAFICAS

Gráfica 1. Concentración de plaquetas en sangre periférica, en el ppp y PRP	112
Gráfica 2. Volumen medio de Gel utilizado en los grupos experimentales	113
Gráfica 3. Cinética del Gel	113
Gráfica 4. Cinética del Gel. Concentración de activador constante.	114
Gráfica 5. Altura del defecto metafisario tibial en los distintos grupos y en los tres períodos experimentales	116
Gráfica 6. Anchura del defecto metafisario tibial en los distintos grupos y en los tres períodos experimentales	117
Gráfica 7. Altura del defecto de peroné en los distintos grupos y en los tres períodos experimentales	118
Gráfica 8. Volumen del defecto de peroné en los distintos grupos y en los tres períodos experimentales	119
Gráfica 9. Evolución de la densidad mineral ósea del peroné en los distintos grupos y en los tres períodos experimentales	122
Gráfica 10. Regeneración del defecto de peroné en los distintos grupos	124
Gráfica 11. Regeneración del defecto tibial en los distintos grupos	128
Gráfica 12. Porcentajes de regeneración de ambos defectos	129
Gráfica 13. Porcentajes de regeneración de ambos defectos en el grupo tratado con plasma pobre en plaquetas	130

Gráfica 14. Porcentajes de regeneración de ambos defectos en el grupo tratado con plasma Rico en Plaquetas	131
Gráfica 15. Diagrama de cajas de la evolución temporal de dos variables	137
Gráfica 16. Diagrama de cajas con la evolución de la altura del peroné	138
Gráfica 17. Diagrama de cajas de la densidad mineral ósea del peroné con el tiempo	139
Gráfica 18. Diagramas de caja de la evolución de las variables del defecto metafisario tibial	139
Gráfica 19. Diagramas de caja de la evolución de las variables del defecto de peroné	140
Gráfica 20. Diagrama de cajas de la evolución de las variables del defecto metafisario tibial en función del grupo experimental y tiempo de evolución	141
Gráfica 21. Diagrama de cajas de la evolución de las variables del defecto peroné en función del grupo experimental y tiempo de evolución	142
Gráfica 22. Diagramas de caja de la densidad mineral ósea del peroné	143
Gráfica 23. Diagrama de cajas de la anchura del defecto metafisario tibial	144
Gráfica 24. Diagramas de caja de la densidad mineral ósea del peroné por grupo experimental	145
Gráfica 25. Diagrama de cajas de la variable altura del peroné	146
Gráfica 26. Gráfica del porcentaje de regenerado del peroné	241
Gráfica 27. Gráfica del porcentaje de regenerado del defecto tibial	242

Abreviaturas

PRGF	Plasma rico en factores de crecimiento
PRP	Plasma Rico en Plaquetas
Ppp	Plasma pobre en Plaquetas
PDGF	Factor de crecimiento derivado de las plaquetas
BMP	Proteína morfogenética ósea
TGF	Factor de crecimiento transformante
IL	Interleuquinas
TNF	Factor de necrosis tumoral
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
IGF	Factor de crecimiento derivado de la insulina
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
HAP	Hidroxiapatita
PTH	Hormona paratiroidea
TCP	Fosfato tricálcico
FC	Factor de crecimiento

Definiciones

Injerto óseo	<i>Material óseo utilizado para reemplazar tejido óseo patológico</i>
Injerto óseo autólogo	<i>Tejido óseo del propio individuo</i>
Aloinjerto óseo	<i>Tejido óseo de un individuo de la misma especie</i>
Xenoinjerto óseo	<i>Tejido óseo de un individuo de otra especie</i>
Biodegradación	<i>Dstrucción de material en un tejido vivo</i>
Transportador-Carrier-Vehículo	<i>Material utilizado para la distribución de una sustancia en un organismo. El transportador inmoviliza la sustancia para facilitar su liberación gradual</i>
Quimiotaxis	<i>Proceso por el que algunos agentes atraen las células hacia un lugar</i>
Colágeno	<i>La proteína simple más abundante en los mamíferos</i>
Composite	<i>Material compuesto al menos por dos sustancias que actúan juntas como un implante</i>
Defecto óseo crítico	<i>Defecto óseo que no cura sin tratamiento</i>
Implante	<i>Dispositivo médico compuesto por uno o más biomateriales que se implanta en el organismo. Queda totalmente cubierto</i>
Célula Mesenquimal	<i>Célula indiferenciada con posibilidad de diferenciación</i>
Osteoblasto	<i>Célula formadora de hueso</i>

Osteoclasto	<i>Célula destructora de hueso</i>
Osteointegración	<i>Cuando no existe tejido fibroso entre un implante y el hueso</i>
Osteogénesis	<i>Desarrollo y formación de tejido óseo a partir de células osteoformadoras (osteoblastos)</i>
Osteoconducción	<i>Habilidad de guiar la formación de hueso en un ambiente óseo por medio de la invasión vascular y celular proveniente del tejido óseo vivo del receptor</i>
Factor de Crecimiento	<i>Sustancia proteica o peptídica que tiene efectos celulares específicos. Sustancias implicadas en los procesos de reparación tisular.</i>
Osteoinducción	<i>Proceso por el cual un producto es capaz de diferenciar hacia hueso un tejido indiferenciado, mediado por factores locales de crecimiento</i>
Bioensayo	<i>Evaluación del efecto de un agente en un organismo vivo</i>
Sustituto óseo	<i>Corresponden a los tejidos y materiales que se emplean para solucionar diferentes patologías óseas para la regeneración del hueso. Existen varios tipos fundamentales.</i>
Bioabsorbible	<i>Materiales que tras ser implantados en el organismo sufren fenómenos de disolución</i>

Bioactividad	<i>Capacidad de un material para inducir, estimular y provocar o modular una acción biológica definida en el tejido receptor</i>
Biomaterial	<i>Toda sustancia natural, sintética o combinación de sustancias que puede implantarse en el organismo para tratar, restituir, sustituir o aumentar un tejido órgano o función</i>
Biocompatibilidad	<i>Tolerancia biológica de cualquier biomaterial, que no provoca respuesta inflamatoria aguda o crónica y sin efectos nocivos sobre los tejidos. No existe ningún material totalmente biocompatible</i>
Biodegradación	<i>Descomposición, lisis o rotura de un material por en sistema biológico que lleva a su total desaparición</i>
Bioinercia	<i>Ausencia de reacción de un organismo frente a cualquier material biocompatible tras su implantación</i>
Citoquinas	<i>Sustancias proteicas sintetizadas por el sistema inmune y hematopoyético. Las más importantes son los interferones y las interleuquinas</i>
Receptor Celular	<i>Proteína de membrana celular que actúa como intermediario para desencadenar una respuesta celular</i>

**Valoración de la regeneración ósea en un modelo animal:
UTILIZACION DEL PLASMA RICO EN PLAQUETAS
EN LA CURACIÓN DE LOS DEFECTOS ÓSEOS.**

Estudio preliminar para un diseño experimental en conejos.

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: Los factores de crecimiento y otras moléculas con capacidad osteoinductora pueden considerarse biomateriales que poseen actividad importante en los procesos de reparación y regeneración de los seres vivos. Esta capacidad puede utilizarse para favorecer, asegurar y aumentar los procesos de reparación del tejido óseo. En esta tesis doctoral se realiza el estudio de la aplicación aislada en un defecto óseo, de un compuesto rico en plaquetas y factores de crecimiento, el plasma rico en plaquetas (PRP).

MATERIAL Y MÉTODO: Hemos realizado un estudio experimental prospectivo, comparativo bilateral y controlado, interviniendo quirúrgicamente 30 conejos raza Nueva Zelanda, a los que se practicó defectos cavitarios de 6mm de diámetro en la metáfisis proximal de tibia y defecto un diafisarios de 6mm en el peroné. Los animales fueron divididos en 2 grupos de 15 individuos que recibieron como tt^0 plasma rico en plaquetas (PRP) o plasma pobre en plaquetas (ppp) en sus tibias y peroné derechos. La tibia y peroné izquierdo se utilizó como grupo control sin recibir ningún tipo de tratamiento. Los resultados se obtuvieron por medio de estudios radiológicos, TAC e histológico a las 8, 12 y 16 semanas.

RESULTADOS: El estudio de las imágenes de reconstrucción de TAC, densidad mineral ósea y el análisis cualitativo de la histología reveló una mejoría del grupo tratado con plasma pobre en plaquetas (ppp) sin ser las diferencias estadísticamente significativas. Los procesos de reparación se realizaron fundamentalmente por una osificación membranosa sin observarse focos de osificación endocondral. El estudio estadístico de las diferentes variables en función del tiempo de evolución y tipo de tratamiento empleado no presentó ninguna diferencia significativa. ($P < 0.05$).

CONCLUSIÓN: El plasma rico en plaquetas, sustancia o compuesto autólogo, seguro y fácil de obtener, en nuestro modelo experimental de defectos óseos en el animal de experimentación no se comporta como un sustitutivo óseo con capacidad osteoinductora ni osteopromotora.

PALABRAS CLAVES: Plasma rico en plaquetas. Plasma rico en factores de crecimiento. Sustitutos óseos.

Study of bone regeneration in animal model
USE OF PLATELE-RICH PLASMA
IN BONE DEFECT HEALING PROCESS

Preliminary study to experimental design in rabbits

ABSTRACT

INTRODUCTION: Growth factors and others molecules with osteoinductive capacity could be considered biomaterials with an important role in the biological process of healing in the human body. These properties could be potentially employed to enhance bone healing. Platelet rich plasma and growth factors alone were studied in an experimental bone defect model in this PhD Thesis.

MATERIAL AND METHOD: A prospective, comparative bilateral and controlled experimental study was performed. A bone cavity defect of diameter 6 mm. in the proximal tibial metaphyses and a 6 mm diaphysal fibula defect was made on 30 New Zealand white rabbits. The animals were divided in two groups of 15 rabbits that received, as treatment of the defect, platelet rich plasma (PRP) or platelet poor plasma (ppp) in the right tibia and fibula. The left tibia and fibula were untreated as a control group. The results were evaluated with a radiological, CTScan and histological studies at 8, 12 and 16 weeks.

RESULTS: The 3D images from CTscan reconstruction, bone mineral density (BMD) and qualitative histological studies demonstrated an improvement in the platelet poor plasma group (ppp) without statistically significant differences. The bone regeneration was obtained from a membranous process without endochondral reaction. The statistical study of different variables in relation to time and type of treatment revealed no significant differences ($P < 0.05$).

CONCLUSION: Platelet rich plasma, easy to obtain, safe and autologous compound does not work as bone substitute with an osteoinduction capability in our bone defect experimental animal model.

KEYWORDS: Platelet-rich plasma, Plasma rich in growth factor, bone substitutes.

1. INTRODUCCIÓN

Durante los últimos 25-30 años se han realizado grandes avances tecnológicos en la medicina. La especialidad de Cirugía Ortopédica y Traumatología no ha quedado al margen de esta carrera por mejorar la calidad de vida de los humanos. A pesar de las mejoras, existen situaciones en las que la curación de las fracturas, la reconstrucción de defectos óseos o el establecimiento de una fusión (artrodesis) no se consiguen de una forma exitosa. Esta situación ha estimulado el desarrollo de nuevos materiales capaces de sustituir el hueso.

El autoinjerto continua siendo el “patrón oro” de reconstrucción, pero su cantidad es limitada y posee una morbilidad intrínseca por la forma de obtención. El desarrollo de los bancos de hueso, la fabricación de nuevos biomateriales, naturales o sintéticos, el desarrollo de las técnicas genéticas y la ingeniería tisular intentan resolver muchos de los problemas aún existentes.

En los últimos años se han identificado una serie de sustancias promotoras del crecimiento óseo que parecen tener un importante papel en la reparación ósea.

En nuestro trabajo hemos intentado analizar el tejido óseo sano, los diferentes tipos de defectos que se pueden producir y las posibilidades de reconstrucción. Tras estos análisis hemos desarrollado un modelo experimental centrado en el estudio de una sustancia favorecedora de los procesos de cicatrización y curación de los tejidos; el plasma rico en plaquetas (PRP). Un producto totalmente autólogo que intenta aportar de forma exógena, al lugar lesional, una concentración superior a la fisiológica de las moléculas proteicas implicadas en los procesos de reparación ósea; los Factores de Crecimiento. Se trata de factores locales reguladores del crecimiento con acciones predominantemente autocrinas y paracrinas. Para finalizar completamos el estudio analizando las perspectivas de futuro en

sustitutos óseos, terapia génica e ingeniería tisular en Cirugía Ortopédica y Traumatología.

1.1 JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

El desarrollo dinámico, tan característico de nuestras sociedades modernas, nos ha permitido aspirar a un aumento de nuestras expectativas de vida, hecho que nos expone a mayores posibilidades de padecer accidentes de alta energía. Así mismo, el envejecimiento progresivo de nuestra población se ha visto acompañado por un notable incremento de las afecciones articulares degenerativas que requieren de sustitución protésica y sus correspondientes recambios y además los traumatismos de alta energía nos enfrentan a complejas fracturas esqueléticas cuya resolución suele ser muy exigente con importantes déficits óseos. Ambos sucesos comprometen directamente al aparato locomotor, especialmente al tejido óseo, provocando de inmediato en el caso de las fracturas y, más tardíamente, en los recambios protésicos, importantes defectos óseos que suelen ser muy complejos de tratar.^{3,24,30,63,77,90} El material preferido para el tratamiento de las soluciones de continuidad del hueso es el mismo tejido óseo, ya sea proveniente del propio paciente o bien de un individuo donante. El empleo del autoinjerto óseo esponjoso es probadamente el mejor procedimiento, sin embargo, tiene como limitaciones la reducida cantidad de tejido óseo disponible y la potencial morbilidad de las zonas donantes.^{13,92,224} En los grandes defectos óseos diafisarios se puede practicar la técnica del transporte óseo que a través de la osteogénesis por distracción, es capaz de resolver exitosamente amplias soluciones de continuidad del hueso. También es posible utilizar injertos óseos vascularizados que consiguen el mismo fin aprovechando las técnicas

microquirúrgicas actuales. No obstante, ninguno de estos dos métodos es aplicable para tratar defectos cavitarios⁶³. Frente a lo anterior, podemos disponer como alternativa el aloinjerto óseo criopreservado; pero, para su obtención y utilización, se requiere contar con un banco de tejidos bien establecido y con un número apropiado de donantes. Por otra parte, su empleo siempre conlleva el riesgo potencial de transmisión de enfermedades al receptor.^{68,155} Teniendo presente las reconocidas limitaciones descritas para los injertos óseos, numerosos grupos de investigadores han trabajado durante estas dos últimas décadas en el desarrollo, formulación y síntesis de variados biomateriales que pueden tener utilidad como sustitutivos óseos, evaluándolos prolijamente mediante estudios *in vitro* e *in vivo* para definir sus potenciales aplicaciones clínicas.

Actualmente con el desarrollo de las nuevas tecnologías somos capaces de utilizar moléculas proteicas que consiguen aumentar o facilitar las fases de reparación. Estas moléculas son los factores de crecimiento. Los FC son proteínas que actúan como factores señalizadores para las células y funcionan como parte de una trama de comunicaciones celulares que actúan influyendo sobre funciones especiales como división celular, síntesis de la matriz y diferenciación tisular. Juegan un importante papel como se ha demostrado en estudios experimentales, tales como formación de hueso y cartílago, consolidación de fracturas y reparación de otros tejidos del aparato locomotor.²²⁴

Los factores de crecimiento plaquetarios, en concreto se han demostrado como un método eficaz en implantología maxilar favoreciendo o promoviendo la respuesta osteogénica.^{8, 9, 64} Los resultados obtenidos en el campo de la cirugía maxilofacial han despertado gran interés para realizar aplicaciones de este estímulo osteogénico en otras localizaciones. La cirugía Ortopédica y Traumatología está desarrollando distintos sistemas capaces de

obtener grandes volúmenes de plasma rico en plaquetas para utilizar de forma exógena y directa en las zonas lesionales.

Continuando con esta línea de trabajo, hemos decidido realizar un estudio experimental que nos permita profundizar en el conocimiento del comportamiento biológico de los factores de crecimiento plaquetarios en la reparación ósea. *7, 21, 32, 42, 143, 144, 242, 244*

1.2. RESEÑA HISTÓRICA

El hueso es el único tejido del organismo que al ser dañado es capaz de regenerarse por medio de la creación de un tejido exactamente igual al original. De esta manera, cuando el hueso presenta soluciones de continuidad, ya sea por fracturas u otros defectos, se ponen en marcha de inmediato los mecanismos osteoformadores con la finalidad de restaurar el tejido óseo en el lugar de la lesión. Habitualmente, la biología del hueso es suficiente para reconstruir los defectos menores, no obstante, en pérdidas mayores de masa ósea es imprescindible recurrir al aporte de sustitutivos óseos para obtener la reparación. *70, 173, 188*

La reconstrucción de defectos en el sistema músculo esquelético es uno de los mayores retos a los que se enfrenta un cirujano ortopédico. El estilo de vida actual, las resecciones tumorales, los defectos óseos por osteolisis protésicas, los traumatismos deportivos, laborales y los traumatismos de alta energía son una fuente frecuente de grandes lesiones óseas y partes blandas. La sociedad actualmente exige y nos demanda soluciones en consonancia con los retos actuales. Los avances tecnológicos y la experimentación básica han permitido un mejor conocimiento de los procesos fisiológicos y patológicos del organismo humano y han desarrollado nuevas técnicas quirúrgicas con nuevos diseños de implantes y materiales quirúrgicos. Este desarrollo vanguardista y positivo nos acerca a la solución

de los grandes problemas ortopédicos y traumatológicos pero en el tema de las grandes lesiones y defectos óseos tiene sus limitaciones.

Actualmente el mejor sustitutivo óseo es el hueso mismo, ya sea proveniente del propio paciente, como en el caso del autoinjerto óseo, o bien obtenido de un donante, como cuando se emplea un aloinjerto óseo. El autoinjerto o injerto autólogo continua siendo el único biomaterial que posee la capacidad osteogénica, osteoinductora y osteoconductora, pero este genera una gran morbilidad de la zona donante y su disponibilidad es limitada.

La posibilidad de sustituir un tejido u órgano dañado o no funcionando, siempre ha sido objeto de gran preocupación, de ahí que el primer caso de injerto conocido pertenezca a la tradición cristiana. Esta atribuye a los Santos Cosme y Damián, el milagro de reemplazar la pierna tumoral de un sacristán por la de un moro fallecido, hecho que habría acontecido en el siglo III y que fue una fuente de inspiración para varios pintores del renacimiento.

Más cerca de nuestro tiempo, pero siempre en el plano de lo anecdótico, en el año 1668, Van Meekeren ²²⁷ describe el relato de un misionero, del que podría ser el primer procedimiento de sustitución ósea. Este corresponde al implante de un aloinjerto óseo obtenido de la calota de un perro para reparar el defecto traumático craneal de un soldado ruso. Sin embargo, deben transcurrir muchos años antes que comiencen los verdaderos avances en el tratamiento de las soluciones de continuidad óseas.

En 1820, Von Walter ⁶² emplea por primera vez en clínica un autoinjerto óseo, al reponer los fragmentos de hueso extraídos en una trepanación quirúrgica craneana para resolver el defecto óseo creado, obteniendo su reparación.

En 1845 Goodsir reconoció el origen celular del hueso y Gegenbaur acuñó el término de osteoblasto a las células que eran protagonistas. ²²⁷ En 1867, Ollier publica el “Tratado experimental y clínico de la regeneración del hueso” en que demuestra que los autoinjertos óseos son

viables. El primer resultado parcialmente satisfactorio lo obtiene con un conejo de ocho meses en que trasplanta el radio derecho al lado izquierdo y viceversa, obteniendo la consolidación en el lado derecho y la infección y reabsorción del injerto en el lado izquierdo.²²⁷

En 1878, McEwen utiliza el primer aloinjerto óseo en clínica implantando cuñas óseas de tibias procedentes de pacientes con raquitismo para tratar un gran defecto diafisario humeral, secundario a una resección ósea por infección en un niño.⁶² Debido a que los resultados que obtiene son satisfactorios, postula las siguientes conclusiones:

- Los injertos óseos entre humanos viven y crecen.
- Todos los elementos óseos deben ser incluidos en el injerto.
- La división del hueso en fragmentos pequeños mejora la incorporación del injerto.
- El injerto debe ser implantado en condiciones de asepsia.

Todas estas condiciones, con excepción de la primera, son coincidentes con el conocimiento actual relativo a la incorporación de los injertos óseos.

A finales del siglo XIX apareció la cirugía experimental con Heine.²²⁷ En 1893, Barth en Alemania y Curtis en USA, trabajando independientemente, publican sus trabajos sobre injertos óseos. Barth es el primero en observar el proceso de necrosis de los injertos óseos en sus estudios histológicos, determinando el concepto de "schleichenden ersatz". Este corresponde a la necrosis del injerto, la reabsorción del hueso necrótico y la subsiguiente neoformación ósea. De esta forma, considera que los injertos no tienen propiedades osteogénicas.⁶² Por su lado, Curtis²²⁷ presenta sus experiencias con injertos óseos en cuatro pacientes. En tres casos utiliza hueso descalcificado para tratar defectos cavitarios y en el cuarto caso resuelve una pseudoartrosis de tibia con autoinjerto de peroné.

Postula que los injertos óseos proporcionan una estructura de soporte temporal que permite la neoformación ósea, definiendo, de esta manera, el concepto de osteoconducción.

Senn ⁶² cuando utilizó implantes óseos descalcificados para tratar una osteomielitis precisaba de una intervención en la matriz, comienza a proponerse alguna sustancia implicada en la reacción ósea.

En 1907, Huntington ²²⁷ publicó un método que permite solucionar defectos segmentarios tibiales transfiriendo localmente un segmento de peroné con su vascularización conservada, de esta manera soslaya las dificultades inherentes al empleo de los injertos óseos. Sin embargo, esta opción sólo tiene utilidad para resolver lesiones específicas, y la posibilidad de ampliar sus indicaciones, se presentaron seis décadas después con el desarrollo de la microcirugía.

En 1908, Buchmann presenta las primeras autoartroplastias biológicas en dos casos de anquilosis de codo. Para ello reseca la articulación cúbito humeral y la reemplaza por la primera articulación metatarsal-falángica logrando una recuperación parcial de la movilidad del codo comprometido. ⁶²

En 1914, Phemister describe en un trabajo sobre injertos óseos realizados en perros, el proceso de "*creeping substitution*" del hueso necrótico, confirmando el fenómeno que antes Barth había denominado "*schleichenden ersatz*", y que nosotros podríamos llamar "*sustitución por arrastre*". ⁶² Considera que una parte de las células del injerto óseo siguen vivas, a las que le otorga propiedades osteogénicas. Además, postula que la incorporación de los injertos está favorecida por la fragmentación de las piezas, pues así sobrevive un mayor número de células, dado que el aumento de superficie favorece su nutrición.

En 1915, Albee publica un libro sobre cirugía de los injertos óseos, recogiendo los conocimientos de la época y confirmando la utilidad de los autoinjertos. ²²⁷ En 1925, Lexer presenta la primera serie clínica de aloinjertos con un seguimiento de 20 años, encontrando resultados

satisfactorios en el 50% de los 23 casos en que realiza un trasplante osteoarticular.⁶² Para ello utiliza como injerto hueso fresco procedente de pacientes amputados o de cadáveres.

Los experimentos de Leriche y Policard, Orell y Levander entre 1920 y 1935 avalan la participación de la matriz ósea en los procesos de reparación y formación ósea.⁶²

El 1942, Inclán comunica su experiencia con la realización de un implante de huesos preservados, siendo reconocido como el fundador del primer banco de huesos. Presentó una serie de 52 casos, de los cuales en 43 pacientes utiliza autoinjertos conservados, en 8 casos aloinjertos y en 1 paciente emplea huesos de un feto de nueve meses, obteniendo resultados comparables con los del autoinjerto fresco.²²⁷

Lacroix en 1945 postula la existencia de una sustancia con capacidad osteogénica en el hueso, la osteogenina.⁶² En 1946, Wilson funda el banco de huesos del Hospital for Special Surgery de Nueva Cork.⁶²

Las piezas procedían de intervenciones quirúrgicas donde fue necesario resecar hueso, y las cuales eran almacenadas a - 27 °C en bolsas estériles. Es el primero que planteó la necesidad de organizar un banco de huesos con una metodología adecuada, selección rigurosa de los donantes y controles microbiológicos seriados.

En 1953, Sanchis Olmos publica la experiencia del primer banco de huesos creado en España, el que había sido fundado dos años antes en el Hospital Provincial de Madrid.²²⁵

En 1955, Bonfiglio define la inmunogenicidad de los aloinjertos realizando estudios en conejos, determinando que un segundo aloinjerto en el mismo animal genera una respuesta inflamatoria mayor.²²⁷

En 1963, Burweil demuestra que el hueso almacenado durante una semana a - 20 °C tiene menor inmunogenicidad. De esta forma, la

congelación se transforma en el método más utilizado para la conservación de los injertos óseos.⁶²

En 1965 y 1970, Ottolenghi y Volkov publican, respectivamente, sus experiencias en el reemplazo óseo y articular con alotransplantes óseos masivos.^{184, 267}

En 1965 comienza la era de los factores de crecimiento. Urist realizó el descubrimiento clave para el desarrollo de las moléculas osteoinductoras. Segmentos liofilizados desmineralizados de hueso de conejo inducían neoformación ósea en una bolsa intramuscular.²⁶³

Reddi y Huggins en 1972²⁰³ utilizaron polvo de matriz desmineralizada y aumentaron la superficie para inducir con rapidez el proceso de osificación endocondral sobre una base predecible en una localización ectópica. La ventaja de la localización heterotópica es que muestra de una manera irrefutable, la inducción ósea *de novo*.²⁰³ Con este modelo tan simple se aportó un conocimiento inesperado sobre el aislamiento de señales que inician la reparación de fracturas.

Las conocidas limitaciones de los injertos como sustitutivos óseos, permitieron que la microcirugía vascular y la osteogénesis por distracción realizaran aportaciones de gran valor y muy interesantes para la solución de defectos óseos específicos.

En 1975, Taylor efectuó el primer injerto de peroné libre vascularizado con anastomosis microvascular, para reconstruir un defecto traumático tibial contralateral. El injerto óseo vascularizado permite la reparación de amplios defectos secundarios a lesiones tumorales o traumáticas, pero tiene como desventaja la necesidad de sacrificar un hueso sano del esqueleto.²⁵²

En 1989, Ilizarov¹⁰⁹ publica su experiencia con el transporte óseo, técnica que venía desarrollando desde el año 1940 para resolver grandes defectos diafisarios por medio de la osteogénesis por distracción. Este procedimiento aprovecha la capacidad que tiene el hueso de generar nuevo

tejido óseo al ser corticotomizado y sometido a distracción continua, lo que representa una ventaja respecto al autoinjerto óseo vascularizado.¹⁰⁹

Ni las técnicas microquirúrgicas vasculares, ni los modernos materiales, ni los conceptos de banco de huesos y aloinjerto resolvieron los problemas de la reconstrucción en situaciones extremas, además algunos de estos materiales y técnicas añadían problemas y complicaciones como la posibilidad de rechazo o transmisión de enfermedades infecciosas VHC, VHI etc.^{68, 224}

1.3 LOS INJERTOS ÓSEOS

Los injertos óseos utilizados en cirugía ortopédica y traumatología pueden dividirse generalmente en autoinjertos, aloinjertos, xenoinjertos, materiales sintéticos y combinaciones de ellos. *Autoinjerto* (injerto autólogo) se refiere al tejido óseo tomado e implantado al mismo individuo. Las preparaciones de autoinjerto comprenden la médula ósea aspirada, el hueso esponjoso o cortical y los injertos vascularizados. Los *autoinjertos óseos vascularizados* y los injertos esponjosos introducidos en una zona sana de un receptor pueden ser al mismo tiempo osteogénicos (porque llevan células vivas), osteoinductores (por las proteínas de la matriz) y osteoconductores (por la matriz ósea). Aunque sólo una pequeña parte de las células transplantadas dentro de un segmento avascular del autoinjerto sobrevivan, pueden contribuir a una mejor respuesta curativa.

1.3.1 Injerto óseo autólogo

El punto de referencia que sirve para comparar cualquier sustituto de injerto óseo es el injerto óseo convencional autólogo con esponjosa y cortical tomado de la cresta ilíaca; sin embargo, tiene algunos inconvenientes. Así, la

disponibilidad de utilización del injerto óseo autólogo es limitada y muchos pacientes con problemas de reconstrucción complejos pueden tener que someterse a varias extracciones, dejando finalmente inservible la cresta ilíaca para este fin. Además, esto suele acompañarse de complicaciones mayores en el 8,6% y menores en el 20,6% de los casos.^{13, 224} Por estas razones se impone tener abiertas varias opciones para aumentar, agrandar o sustituir el injerto óseo autólogo.²²⁴ Las complicaciones por la toma de autoinjerto en la cresta ilíaca (zona donante por excelencia) pueden ser de este orden: hematoma, seroma, falso aneurisma, lesiones arteriales y nerviosas, alteraciones de la marcha, fracturas del ala ilíaca, lesión visceral y ureteral, perforación de peritoneo, infección, inestabilidad sacroilíaca, dolor y alteraciones del crecimiento en niños.^{226, 239}

1.3.2 Aloinjerto

Un *aloinjerto* se define como un tejido tomado a un sujeto e implantado a otro de la misma especie. En este sentido, el receptor se espera que haga una reacción inmune contra las células de un aloinjerto fresco, de manera que las preparaciones de aloinjerto óseo humano se limpien y procesen para retirar células y se disminuya la reacción inmune del receptor. La retirada de restos celulares también disminuye la posibilidad de transplantar partículas de virus que pueden ser intracelulares.

Los aloinjertos se pueden clasificar según su anatomía, métodos de procesado y esterilización, y propiedades de manejo. Al faltar células viables, los aloinjertos no aportan propiedades osteogénicas como el autoinjerto viable. La extensión de las propiedades osteoinductoras y osteoconductoras y la resistencia mecánica del aloinjerto varían en parte con los métodos de procesado del injerto. Los aloinjertos pueden transmitir enfermedades infecciosas y precisan de una infraestructura

sociosanitaria compleja; los bancos de hueso precisan de una gran inversión con un elevado coste económico.^{36, 63}

1.3.3 Xenoinjerto

El *xenoinjerto* es un tejido óseo tomado de una especie e implantado a una especie diferente. Una vigorosa respuesta inmunitaria impide el empleo de la mayor parte de las preparaciones de xenoinjertos. El injerto óseo desproteínizado y desgrasado (injerto de Kiel o hueso de Oswestry) muestra una respuesta inmunitaria reducida, pero este proceso destruye también las proteínas de la matriz osteoinductora. El colágeno de bóvido procesado, derivado de hueso o de piel, parece ser biocompatible y es un componente de varias preparaciones de injertos óseos actuales.

1.3.4 Materiales sintéticos

Los *materiales sintéticos* han permitido en parte una gran expansión de medios de injerto óseo disponible. Actualmente existe un gran desarrollo de las cerámicas y los compuestas de fosfatos. Están apareciendo varios materiales osteoconductores para aplicación en cirugía ortopédica que varían mucho en osteoconductividad, osteoinductividad, fuerza mecánica y propiedades de manejo y coste.^{208, 224} Algunos posibles inconvenientes o condicionantes son los siguientes: 1) variabilidad en las propiedades de un producto a otro, especialmente resistencia mecánica; 2) limitada cantidad de información cuantitativa disponible en algunos productos; 3) resistencia desconocida bajo condiciones de cizallamiento y fatiga para algunos recubrimientos; 4) detalles de cinética de disolución y estabilidad para todas las aplicaciones y datos limitados sobre lo que ocurriría si el revestimiento se reabsorbiera; problemas de reabsorción sustitución por tejido óseo 5) limitación de disponer de datos clínicos publicados a largo plazo.^{3, 224} 6) Poca capacidad osteogénica y osteoinductora.

1.3.5 Otras técnicas de reconstrucción

Otras técnicas utilizadas y desarrolladas que actualmente se aplican a la reconstrucción de los defectos óseos son:

- **Acortamiento Óseo**: Acortar el miembro colapsando los extremos óseos parece una opción razonable en situaciones de defectos poco importantes o en extremidades de no carga. Esta opción no requiere largos periodos de tiempo pero no está exenta de complicaciones. El acortamiento agudo del defecto permite que el proceso de reparación de una fractura comience de una forma inmediata, mejora la estabilidad y disminuye las tensiones a nivel de las partes blandas. Asimismo se produce una mejor vascularización de la zona, disminución del dolor neurógeno y permite un cierre y una cobertura primaria de la herida. Pero la redundancia y la tumefacción excesiva de las partes blandas pueden ser una de las complicaciones o efectos indeseados. El acortamiento está mejor tolerado en el húmero que en otros huesos, ya que en la extremidad superior las disimetrías no son importantes funcionalmente. También el acortamiento es mejor tolerado en los segmentos que poseen un solo hueso como el húmero o el fémur, acortar una tibia o un radio implica actuaciones en el peroné y el cúbito respectivamente. En algunas situaciones se puede acortar el miembro contralateral para disminuir la disimetría. Esta técnica debe utilizarse en defectos menores de tres cm.

- **Transporte óseo. Osteogénesis por distracción**: Esta técnica ha sido utilizada de forma efectiva en el tratamiento de los defectos óseos, la técnica fue descrita por Ilizarov.¹⁰⁹ La técnica consiste en estabilizar el miembro que posee el defecto con un fijador externo circular y crear un segmento óseo que se desplazará, este se separa de la zona metafisaria realizado una osteotomía. Tras un periodo de latencia de 5 días este

segmento comienza a desplazarse y transportarse aproximadamente 1 cm / día para eliminar la zona de defecto creando un nuevo gap a nivel de la zona metafisaria de la osteotomía. Este defecto se reconstruye o rellena con un neoformado óseo creado por el proceso de osteogénesis a distracción. El punto de unión distal cura por compresión creando un callo de fractura. Entre 2 / 3 días de consolidación se requieren por cada día de distracción. En distintas ocasiones se precisa del aporte de injerto o facilitadores óseos a nivel de la zona distal del defecto por el atraque del segmento transportado. Una modificación de esta técnica consiste en realizar un acortamiento para posteriormente comenzar un alargamiento del miembro. El antiguo dispositivo transfixiante de Ilizarov ha sido sustituido por los modernos sistemas de transporte unilaterales con menos agresión de las partes blandas. Defectos óseos superiores a 5 cm en huesos largos han sido reconstruidos con esta técnica, pero las complicaciones pueden ser muchas como, afectación de las partes blandas, intolerancia de las fichas, celulitis superficiales, deformidad del regenerado, fracturas del regenerado, pseudoartrosis de las zonas de unión y el tiempo requerido es muy prolongado. A pesar de todos los inconvenientes, esta técnica continua siendo de elección para defectos intermedios y largos.^{63, 76, 110}

En definitiva todos los injertos descritos, técnicas alternativas, los novedosos implantes, las cerámicas y materiales osteoconductivos por sí solos no logran alcanzar la excelencia de la osteoinducción y osteogénesis, con lo que no pueden hacer frente a la demanda fisiopatológica que supone una reconstrucción de un defecto músculo esquelético . La combinación de estos productos y compuestos no resuelve la necesidad ni el problema. Ante esta situación, gracias a los avances tecnológicos y el desarrollo de las terapias génicas, se están desarrollando en nuestros días, nuevos biomateriales y compuestos que pretenden solucionar los problemas. La gran marea de información y nuevos productos puede ensombrecer el buen uso o utilización correcta de esta tecnología.

1.4 MEDICINA REGENERATIVA-INGENIERÍA TISULAR

La Medicina Regenerativa es una especialidad multidisciplinar emergente, que busca el mantenimiento, la mejora o la restauración de la función de células, tejidos y órganos, mediante la aplicación de métodos relacionados principalmente con la Terapia Celular y la Ingeniería Tisular. ^{99, 173, 266}

Estas disciplinas requieren un adecuado nivel científico-tecnológico especialmente en las áreas relativas a los biomateriales, nanomateriales, funcionalización superficial, células y biomecánica.

La ingeniería tisular es uno de los campos de la medicina reconstructiva centrado en crear tejidos vivos capaces de reparar, reemplazar o curar tejidos patológicos. La ingeniería tisular ósea se encargará de la formación de células y tejidos capaces de formar hueso. Esta disciplina precisa de la conjunción de múltiples disciplinas para lograr sus objetivos. Las señales moleculares son un punto crucial en el desarrollo de la ingeniería tisular, objeto de estudio en nuestro trabajo.

1.4.1 Biomaterial ²⁷⁷

“Material diseñado para actuar interfacialmente con sistemas biológicos con el fin de evaluar, tratar, aumentar o reemplazar algún tejido, órgano o función del cuerpo.”

-Conferencia de consenso. Chester UK. 1991-

1.4.2 Injerto óseo. Sustituto óseo.

“Cualquier material implantado que de forma aislada o en combinación con otros materiales promueve la respuesta de consolidación ósea aportando

actividad osteogénica, osteoconductora y osteoinductora en una zona localizada.”¹⁷⁴

El objetivo principal de la ingeniería tisular es crear un biomaterial o sustituto óseo que posea moléculas bioactivas y células que presenten capacidad de transformación. Para cumplir estos objetivos la ingeniería tisular ósea precisa de tres componentes fundamentales: a) Producción. Células madres, células precursoras. (osteogénesis).b) Conducción. Matrices y andamios donde desarrollar el nuevo tejido. (osteoconducción).c) Inducción. Proteínas señalizadoras y factores de crecimiento (Osteoinducción). Conceptos que desarrollaremos en los apartados siguientes.

1. 5. BIOLOGÍA ÓSEA. PRINCIPIOS BÁSICOS DE LA FORMACIÓN Y REPARACIÓN ÓSEA. AYUDA A LA CURACIÓN ÓSEA.

Existen tres principios básicos para la curación y aumento de la reparación ósea. Estos principios son fundamentales para aplicar las posibilidades que poseemos para reconstruir situaciones patológicas y aplicar de forma correcta los principios de ingeniería tisular e injertos óseos. Estos principios o conceptos son fundamentales en experimentación para desarrollar nuevos materiales para regenerar o sustituir el hueso.²⁵⁸

Osteoconducción: Es la capacidad de un material o injerto para realizar la función de estructura, andamio o soporte para el crecimiento celular y vascular. Esta función no es arbitraria, tiene una secuencia temporo-espacial ordenada en función del tipo de material y el ambiente en el que se encuentra.

Materiales Osteoconductivos: Los materiales osteoconductivos fundamentalmente son las cerámicas, los polímeros y los aloinjertos. Pueden combinarse con autoinjertos para aumentar la cantidad y sirven como vehículos para administrar y dosificar células y estimuladores.

Osteogénesis: Es la formación de hueso o la capacidad de producir hueso.

Injertos Osteogénicos: El material osteogénico contiene todos los elementos necesarios para la formación directa de hueso. El éxito y el potencial de formación de este tipo de material está en la capacidad de las células vivas para la formación de hueso. Como ejemplos de este tipo de materiales están el injerto córtico-esponjoso autólogo, aspirado médula ósea, cultivos celulares.

Osteoinducción: Es la capacidad de una sustancia para intervenir en un tejido inmaduro y producir la diferenciación en un tejido maduro. En nuestro caso las sustancias osteoinductoras logran estimular las diferentes células para conseguir un tejido óseo maduro.

Estimuladores – Osteoinductores: Este tipo de material actúa fundamentalmente con señales que estimulan la acción celular. Actualmente se pueden subdividir en dos subgrupos:

- Osteoinductivos
- Osteopromotores

1. Injertos osteoinductivos: Son aquellos que son capaces de formar hueso donde normalmente no se produce hueso. Las señales son la característica principal de este tipo de injerto. Dentro de este grupo encontramos las Proteínas Morfogenéticas Humanas y la Matriz Ósea Desmineralizada.

2. Injertos Osteopromotores: Los injertos osteopromotores tienen la capacidad de aumentar la formación y curación de hueso activando diversos estadios mediante estímulos en las distintas etapas. No tienen la capacidad de producir hueso en localizaciones no esqueléticas. La situación ideal para utilizar este tipo de sustancias es en un lugar donde existan suficientes células diferenciadas para iniciar la proliferación ósea. En situaciones para aumentar la capacidad de materiales osteoinductivos como la medula ósea desmineralizada y mezclado con materiales osteogénicos. El ejemplo más claro de este tipo de material es el objeto de nuestro estudio; el Plasma Rico en Plaquetas (PRP).

Un punto fundamental para completar con éxito los objetivos de la reparación y reconstrucción ósea es la estimulación mecánica.⁵⁶ Las cargas y fuerzas producen un estímulo físico que se traduce en señales moleculares.¹⁶

1.6 FACTORES DE CRECIMIENTO

Los factores de crecimiento son proteínas producidas en las células y que actúan sobre la(s) célula(s) diana apropiada(s) para llevar a cabo una acción específica. Estas moléculas son sintetizadas por distintas células, algunas son sintetizadas por todas las células del cuerpo, por ejemplo: TGF- β_1 . Esto significa que afecta en cierto modo a casi todos los procesos fisiológicos. Cada factor de crecimiento tiene una o varias actividades concretas fundamentales y sus acciones específicas en una célula concreta dependerán de las circunstancias concretas del entorno celular. Para transmitir una señal concreta una vez secretados por la célula que los fabrica, deben interaccionar con el receptor correspondiente. Los receptores son proteínas de membrana celular. La unión de los FCs a sus receptores provoca una cascada de reacciones intracelulares que amplifican la señal

produciendo un efecto celular generalmente con la activación nuclear para secretar proteínas.

En 1965 Marshall Urist ²⁶³ fue el primero en demostrar la capacidad osteoinductiva de sustancias que eran capaces de formar hueso en localizaciones extraesqueléticas. Esta sustancia era un extracto de médula ósea desmineralizada que la introdujo en el músculo de la rata. Dos décadas posteriores Sampath y Reddi en 1983 ²¹⁷ con un bioensayo *in vivo* separaron una sustancia soluble de la matriz ósea la llamaron “*proteína morfogenética ósea*”. Siete años más tarde Wozney y cols. en 1988 ²⁷⁹ identificaron la secuencia genética de la proteína ayudando a descubrir diferentes isoformas. En 1990 la proteína osteogénica OP-1 fue clonada por Ozkaynak y cols. ¹⁸⁵

Desde estos descubrimientos se empezó a trabajar en las posibilidades que las proteínas o factores de crecimiento podrían tener para reparar o acelerar la curación ósea. Muchos trabajos en medicina molecular se han realizado para descubrir la capacidad osteoinductiva de estas proteínas que en sinergia con otras citoquinas pueden tener un papel fundamental en las respuestas celulares de reparación de tejidos.

Las acciones de estos factores van desde aumentar la proliferación celular, quimiotaxis, captación molecular, transmisión de señales y diferenciación.

La capacidad de los factores de crecimiento para regular la actividad celular ha permitido iniciar intensas investigaciones para utilizar sustancias que permitan aumentar los procesos de reparación, regeneración y curación de las fracturas. Gracias a la ingeniería genética diferentes factores de crecimiento han sido sintetizados y utilizados en aplicaciones terapéuticas con resultados inciertos. ^{70, 144, 212} El objetivo fundamental de la aplicación de los factores de crecimiento es asegurar y acelerar la curación de las fracturas. En nuestro trabajo hemos utilizado un gel que contiene gran número de

plaquetas que de forma indirecta proporcionan una gran concentración de factores de crecimiento.

Con el desarrollo de las nuevas tecnologías Reddi ²⁰³ afirmó que en un futuro podría existir la posibilidad de prefabricar *in vitro* partes del cuerpo para posterior implantación en la zona dañada. Esto podría ser real se existe una actuación conjunta de distintas disciplinas de la biotecnología, biomateriales, biología celular y la ingeniería de tejidos.

1.6.1 Conceptos generales

Los factores de crecimiento son proteínas secretadas por unas células que estimulan un receptor específico y afectan a la función celular como la migración, diferenciación y proliferación durante el crecimiento y desarrollo del tejido, así como en las agresiones o lesiones y en la reparación. Existen tres tipos de efectos:

- Efecto paracrino
- Efecto autocrino
- Efecto endocrino

Pueden efectuarse tres tipos de acciones: (1) *autocrina*, en la que el factor de crecimiento influye en la célula de origen o en otras células con un fenotipo idéntico al de dicha célula (por ejemplo un factor de crecimiento producido por un osteoblasto influye en la actividad de otro osteoblasto) el efecto autocrino supone un autoestimulación metabólica de la propia célula o de una célula de igual fenotipo, (2) *paracrina*, en la que el factor de crecimiento influye en una célula colindante o circundante con un fenotipo diferente a la célula de origen (por ejemplo, un factor de crecimiento producido por un osteoblasto estimula la diferenciación de una célula no diferenciada). En el efecto paracrino ocurre una estimulación de las células vecinas de distinto fenotipo, para producir proliferación e incremento de la

síntesis de la matriz extracelular proteica y (3) *endocrina*, en la que el factor de crecimiento influye en una célula que tiene un fenotipo distinto al de su célula de origen y que está ubicada en una zona anatómica lejana (por ejemplo, un factor de crecimiento producido por el tejido neuronal en el sistema nervioso central estimula la actividad de los osteoblastos). Por consiguiente, un factor de crecimiento puede tener efectos en muy diversos tipos de células y puede inducir una variedad de funciones celulares en distintos tejidos. ^{173, 224}

Cuando un factor de crecimiento se une al receptor de una célula diana induce un sistema de transducción de señales intracelulares que finalmente llega hasta el núcleo y produce una respuesta biológica. La unión de un factor de crecimiento a su receptor se conoce como interacción ligando-receptor. Estas interacciones son muy específicas y pueden oscilar de simples, con un factor de crecimiento específico (ligando) unido a un único receptor celular, a complejas, con uno o varios ligandos unidos a uno o varios receptores con el fin de producir un efecto ligando-receptor. Asimismo, en este sistema biológico existe una redundancia tal que varias isoformas del mismo factor de crecimiento pueden unirse a un único receptor, o a distintos receptores. Diferentes receptores celulares pueden ser activados por un mismo factor de crecimiento con la puesta en marcha de diferentes acciones por una misma molécula. Acción pleitrópica. ^{138, 285}

Una vez establecida la interacción ligando-receptor, el receptor se activa al producirse un cambio en su configuración. Los receptores poseen dominios extracelulares que se unen al ligando y dominios intracelulares que se unen al sistema de transducción de señales y lo activan. En este sistema de transducción de señales interviene en parte el denominado factor de transcripción, una proteína intracelular que se activa como parte de las vías de señalización iniciadas por el dominio intracelular de un receptor. El factor de transcripción activado viaja al núcleo, se une al ADN nuclear e induce la expresión de un gen o un grupo de genes nuevos. (Fig. 1). La expresión de

estos genes nuevos por parte de una célula es la que, en última instancia, modifica las características de dicha célula. Esta secuencia de acontecimientos es similar a la que se produce con otros agentes, como las hormonas esteroideas, que se unen a los receptores intracelulares e inducen diversos tipos de vías de señalización intracelular.

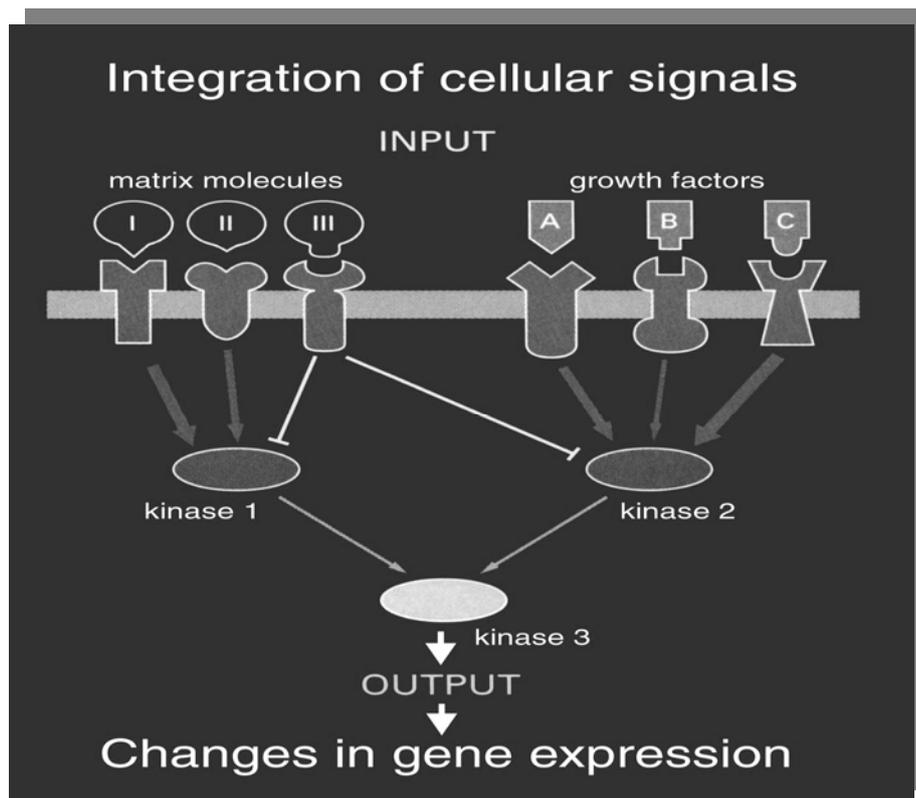


Fig. 1. Esquema general de la activación celular por moléculas externas. Tomado de *Orthopaedic Basic Science. CD-Supplement AAOS.2000.*

El tipo de activación y el factor de transcripción específico varían con la célula diana, la combinación de receptor-factor de crecimiento y la competencia biológica de la célula. Por ejemplo, en los factores de crecimiento de la superfamilia de factores transformadores de crecimiento beta (TGF- β), la señalización tiene lugar a través de la activación de un complejo de receptores transmembranales formado por receptores de serina treonina / cinasa de tipo I y 2. ^{142, 86} Seguidamente se produce la activación

“*downstream*” de un grupo de factores de transcripción o efectores de la señalización intracelular, denominados proteínas SMAD. Las SMAD son una clase de proteínas intracelulares que intervienen en la señalización de los TGF- β .¹¹⁶ Algunos grupos de investigadores utilizaron un modelo de inyección subperióstica en ratas y demostraron que las inyecciones de TGF- β podían estimular las células periósticas para llevar a cabo la osificación endocondral.¹⁴⁵ Estos analizaron en 30 conejos la influencia de la infusión continua de TGF β mediante mini-bomba en fracturas de tibia unilaterales mediales-diafisarias con placa. Las fracturas se trataron con 1 ó 10 μ g de TGF- β al día durante 6 semanas. El grupo de control recibió inyecciones de excipiente sin factor de crecimiento. Se evaluó asimismo el contenido de minerales óseos, la cantidad de callo formado y el esfuerzo de flexión. No hubo diferencias en los tres grupos en cuanto al contenido de minerales óseos y el grosor cortical. En ambos grupos experimentales se produjo un incremento significativo de la formación de callos en comparación con el grupo de control ($p=0,01$).

La unión al receptor de la proteína morfogénica ósea (BMP) y la transducción de señales intracelulares siguen la ruta descrita para los TGF- β , ya que las BMP son miembros de la superfamilia de los TGF- β . En un principio, las BMP se unen al receptor transmembrana de tipo 11, y posteriormente se produce la fosforilación y activación del receptor de tipo 1. Se han identificado 2 receptores de tipo I de BMP (BMPR-1A Y 2B) y un receptor de tipo 11 de BMP. No obstante, a diferencia de la unión de los TGF- β , el receptor de tipo I de BMP activa diferentes SMAD dentro de la célula, provocando así una respuesta celular distinta.^{86, 152, 202}

La actividad biológica de otros factores de crecimiento está regulada por distintas vías de receptores. El factor de crecimiento fibroblástica (FGF) y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) transfieren señales al citoplasma a través de receptores que poseen actividad de tirosina / cinasa.

Aunque los mecanismos de la transducción de señales por medio de los factores de crecimiento y sus receptores han sido esbozados, no se conocen con profundidad los modos de interacción de estos factores para regular la reparación ósea. Existe la opinión generalizada de que debe existir lo que denominamos una "intercomunicación" (*cross-talk*) entre las diversas vías de señalización, pero todavía no se ha averiguado cuáles son células y los factores de crecimiento que resultan esenciales en este proceso. Indudablemente, es necesaria una mayor comprensión de la actividad y la función de los receptores a fin de optimizar el uso clínico de estas moléculas.⁸⁶

Todos los factores de crecimiento que afectan a la proliferación, diferenciación, y secreción de la función de las células óseas no está completamente aclarado. El avance de las nuevas técnicas en biología molecular está permitiendo descubrir nuevos factores de crecimiento y su importancia en los procesos de reparación. Los factores de crecimiento óseo realizan sus efectos a nivel de local de forma autocrina o paracrina. El número exacto de factores de crecimiento, sus acciones e interacciones no lo conocemos con exactitud.

Todos los tejidos musculoesqueléticos producen y responden a los factores de crecimiento para iniciar todos los procesos celulares de reparación que llevan a la curación de las fracturas. Algunos de los factores más importantes que están asociados con los procesos de reparación de las fracturas los podemos ver en la tabla I. Aunque la línea celular osteoblástica produce muchos otros factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidermoide (EGF), o el factor de crecimiento derivado del hepatocito (HGF). Otro grupo de citoquinas que no debemos olvidar son las moléculas producidas por las células del sistema inmunitario, con gran importancia en las primeras fases de la cascada de la reparación. Estas moléculas son las interleuquinas IL-1, IL-3, IL-6, y los factores estimuladores de colonias (M-CSF, GM-CSF); en nuestro trabajo nos centramos concretamente en los

factores de crecimiento que regulan la formación ósea y han sido examinados de forma extensa *in vivo*.

Existen otros tipos de moléculas muy implicadas en la reparación ósea que son moléculas intracelulares con actividad exclusivamente en el interior de la célula. Son las moléculas conocidas como Proteínas de mineralización LIM. Estas han demostrado, en diferentes estudios ser importante para la diferenciación del osteoblasto en el momento y lugar de transición de cartílago hipertrófico a trabéculas óseas primarias durante la osificación endocondral. Estas moléculas se encuentran bajo experimentación básica actualmente y por su papel puramente intracelular son objetivo de la terapia génica.²²⁴

Actualmente existe un gran interés por estudiar y determinar cuales son los factores solubles proteicos relacionados con el hueso por su gran capacidad terapéutica y su importancia en la fisiología y homeostasis del hueso. Estas proteínas solubles son las proteínas morfogenéticas (BMPs)^{27, 204} y los factores de crecimiento (FCs). Estos compuestos ocupan un volumen muy insignificante en el hueso pero activamente poseen grandes funciones en la fisiología ósea.

En la actualidad los factores de crecimiento (FCs) más estudiados en la proliferación y reparación de los tejidos incluyen: BMPs 1, 2 y 3, PDGF, IGF-I, IGF-II, TGF- β , FGFs ácido y básico y factor estimulador de granulocitos. Las Interleukinas, producidas por las células blancas sanguíneas, IL-1, -3, y -6 también tienen su papel en los procesos de reparación, concretamente en las fases de inflamación.

Los factores de crecimiento más importantes que se encuentran en el tejido óseo, y en aquellos tejidos implicados en la reparación y regeneración son:^{7, 233}

1. **PDGF**: factor de crecimiento derivado de las plaquetas (platelet derived growth factor)

2. **TGF- β** : factor de crecimiento transformante tipo β . (transformed growth factor)
3. **VEGF**: factor de crecimiento vascular endotelial (vascular endotelial growth factor)
4. **aFGF y bFGF**: factores de crecimiento fibroblástico ácido y básico (acidic and basic fibroblastic growth factor)
5. **IGF-I y IGF – II**: factores de crecimiento insulínico tipo I y II (insulin like growth factors)
6. **EGF**: factor de crecimiento epidérmico (epidermal growth factor).
7. **BMP**: Proteína morfogenética ósea.

Para evaluar la eficacia o las acciones de los distintos factores de crecimiento se ha realizado investigación básica en distintos modelos animales, principalmente perros y monos considerando que la respuesta fuera predictiva del resultado en humanos. El primer estudio piloto se realizó en perros Beagle en 1989, en distintos modelos el tratamiento con una combinación de PDGF e IGF mejoraba la regeneración comparando con zonas control.²³⁴ Los avances en biología molecular han permitido identificar las secuencias de ADN que codifican las distintas proteínas, en nuestro caso BMPs, FCs y sus receptores, se sabe la localización exacta en qué cromosoma y en qué segmento de éste se encuentran los genes que codifican los PDGF, TGF- β , etc., o sus receptores.

El producto utilizado en nuestro modelo experimental ha sido un concentrado de plaquetas que aporta concentraciones elevadas de factores de crecimiento. Los dos FC más abundantes en los concentrados de plaquetas son el TGF- β y el PDGF. Desarrollamos a continuación los dos FC más abundantes en el plasma rico en plaquetas.

1.6.2 Factor de Crecimiento Transformante. TGF- β

El factor TGF – β se encuentra en muchos tejidos pero su localización más importante y abundante son las plaquetas, en las células mesenquimales pluripotenciales, osteoblastos, condrocitos y en callo de fractura. Este factor se encuentra en el hematoma fracturario en las primeras 24 horas tras el traumatismo. El efecto de estimular la síntesis proteica en condrocitos y osteoblastos *in vitro*, su elevada concentración en la matriz ósea extracelular y la liberación por parte de las plaquetas en el hematoma de la fractura hacen pensar que el TGF – β es el mayor factor de crecimiento implicado en la regulación de la formación ósea y cartilaginosa tras una lesión y tras el crecimiento normal y remodelación.¹³⁸ Este factor de crecimiento se aisló al observar que se trataba de un factor que promovía la transformación de los fibroblastos en cultivo celular, la acción sobre estas células produjo mutaciones en su fenotipo y las transformaba en células tumorales. Resultó ser una mezcla de dos proteínas TGF- α y TGF- β . Estas moléculas pertenecen a la superfamilia de proteínas que incluyen TGF- β 1 hasta el TGF- β 5, proteínas óseas morfogenéticas, actinas e inhibinas.¹²⁹ Las isoformas existentes del TGF – β son cinco (1-5), diméricas y disulfídicas¹³⁸. Estos factores son secretados de forma latente y precisan de activación enzimática, pH ácido o calor. La superfamilia de TGF- β s consta actualmente de 40 proteínas diferentes. Existen 4 subfamilias en mamíferos que por su importancia deben mencionarse. Activitas. Sustancia inhibitoria Mulleriana, Factor de crecimiento de diferenciación (GDF's) y las proteínas morfogenéticas humanas (BMP's).^{52, 86}

TGF- β 1: es homodímero no glicosilado de 25 Kda de peso.¹⁰³ El 100% de la secuencia de esta proteína se conserva de una especie a otra. Esto significa que esta proteína tiene funciones básicas para el mantenimiento de la especie.

El TGF- β 1 se secreta de forma inactiva o latente. Puede formar dos tipos de complejos latentes, uno de ellos denominado LAP (latency associated peptide), se forma al asociarse el TGF- β 1 a una proteína. Este complejo se denomina LTBP (latent TGF- β binding protein). Estas proteínas parecen que faciliten la secreción y también contribuyen a su estabilización. TGF- β libre tiene una vida media de 2 minutos mientras que la forma latente tiene una vida media de 90 minutos. La forma libre es la que es activa. Para que este factor de crecimiento ejerza su acción deberá interactuar con los receptores. Los receptores implicados son dos proteínas TGFRI y TGFRII.

Tres receptores para el TGF – β han sido identificados I, II, III. El receptor tipo III no es un receptor verdadero porque no implica respuesta intracelular. Los tipos I y II tienen efecto celular mediante segundo mensajero del tipo serina / treonina quinasa. La fosforilación del receptor produce la activación intracelular de las moléculas SMADS que activan el núcleo celular para activar la transcripción genética. Las SMADS son selectivas para el tipo de TGF. El TGF- β estimula las SMADS 2 y 3, las BMP estimulan las 1, 5 y 8. Un segundo nivel de complejidad y regulación es el equilibrio TGF- β /BMP mediante ligasas tipo SMURF1 y SMURF2. El receptor tipo I tiene mayor afinidad que el tipo II por el factor de crecimiento.^{86, 138}

Prácticamente todas las células sintetizan TGF- β 1 y todas las células expresan receptores para los TGF, este hecho indica que el TGF- β 1 afecta de alguna manera a todos los procesos biológicos. Tres son los papeles fundamentales de los TGF:

- Modula la proliferación celular, generalmente como supresor.
- Mejora la deposición de matriz extracelular aumentando la síntesis e inhibiendo la degradación.
- Tiene efecto inmunosupresor a través de varios mecanismos¹³⁸

La acción específica de TGF- β 1 en una célula depende de las circunstancias exactas del entorno celular. Los TGF – β tienen diferentes

efectos dependiendo del tejido y el receptor que estimulen. El TGF – β s estimulan la producción de proteoglicanos cartilagosos y colágeno tipo II en las células mesenquimales. Sin embargo la propiedad de estimular o inhibir los osteoblastos *in vitro* depende del estadio de diferenciación celular y las condiciones de crecimiento. El efecto más importante en los osteoblastos es producir matriz extracelular y proliferación.^{138,258} Multitud estudios en modelos animales han demostrado la capacidad de estos factores de crecimiento para aumentar la formación ósea, pero el potencial osteoinductivo puede ser limitado.^{28,70} Por todo lo descrito se puede decir que estos factores pueden tener un potencial terapéutico y ser utilizado como agente clínico pero se precisan de más estudios.

En la Actualidad se estudia el efecto de distintas combinaciones de FCs ya que actúan de forma sinérgica. En los procesos de reparación están implicados multitud de factores en perfecto equilibrio para conseguir una reparación fisiológica.

1.6.3 Factor de Crecimiento Derivado de las plaquetas. PDGF

El factor de crecimiento derivado de las plaquetas se encuentra en elevadas concentraciones en las plaquetas, en los macrófagos y en las células endoteliales vasculares aunque están presentes en otros tipos de células. La síntesis de PDGF está aumentada en respuesta a estímulos externos, tensión de oxígeno baja, trombina o la estimulación por otros factores de crecimiento.

Esta proteína se almacena en los gránulos alfa de las plaquetas y se libera cuando las plaquetas se agregan y se inicia la cascada de la coagulación. Las células del tejido conectivo responden iniciando un proceso de replicación. Antoniades purificó la molécula mediante electroforesis en 1981, y se definió más tarde se definió su estructura.¹¹

La función principal de PDGF es promover la quimiotaxis. Este factor está secretado por las plaquetas y los monocitos en el callo de fractura y en lugar de la lesión, este factor puede producir el reclutamiento de células mesenquimales y otras células reparativas.²¹⁴ El efecto mitogénico sobre los osteoblastos *in vitro* es el reflejo de su acción primaria en el hueso.

El factor de crecimiento derivado de las plaquetas está compuesto por varias cadenas que se unen para formar diferentes dímeros. En el tumor de Wilms está muy expresada el PDGF-A.⁵³ Los dímeros AA y AB tienen el mismo efecto en las células osteoblásticas. El PDGF-BB es el dímero más potente. El PDGF estimula la replicación celular en cultivos *in vitro* y aumentan la síntesis de colágeno tipo I.

El PDGF es segregado por las plaquetas durante las fases iniciales de la consolidación de fracturas y se ha identificado en puntos de fractura tanto en experimentación animal como en humanos.^{38, 139} Los estudios *in vitro* han demostrado que el PDGF es mitógeno para los osteoblastos.^{41,118} No obstante, el papel del PDGF en la consolidación de fracturas y la reparación ósea no se ha definido con claridad. El efecto replicativo está claramente demostrado pero no su efecto diferenciador.¹⁰⁴

Nash y cols. en 1994¹⁷⁸ evaluaron la eficacia del PDGF en la consolidación de osteotomías tibiales unilaterales en siete conejos. Cada punto de osteotomía se trató con 80 μg de PDGF en una esponja de colágeno, o bien con una esponja de colágeno sola. Los animales se sacrificaron a los 28 días. Los análisis radiológicos a las dos y las cuatro semanas demostraron un aumento de la densidad y el volumen de los callos en los animales tratados con PDGF, en comparación con los controles. Los análisis histológicos demostraron un estado más avanzado de la diferenciación osteógena, tanto endóstica como perióticamente, en los animales tratados con PDGF que en los controles. Una prueba de flexión en tres puntos no reveló diferencias de resistencia entre las tibias tratadas con PDGF y las tibias contralaterales intactas. Aunque las determinaciones histológicas sugirieron que el PDGF ejerce un efecto beneficioso sobre la

consolidación de las fracturas, sólo se analizó un número reducido de animales y los datos de las pruebas mecánicas fueron equívocos. Además, el reducido tamaño del estudio no permitió aplicar criterios estadísticos sólidos. En la actualidad, el papel terapéutico del PDGF en la consolidación de fracturas continúa siendo poco claro.

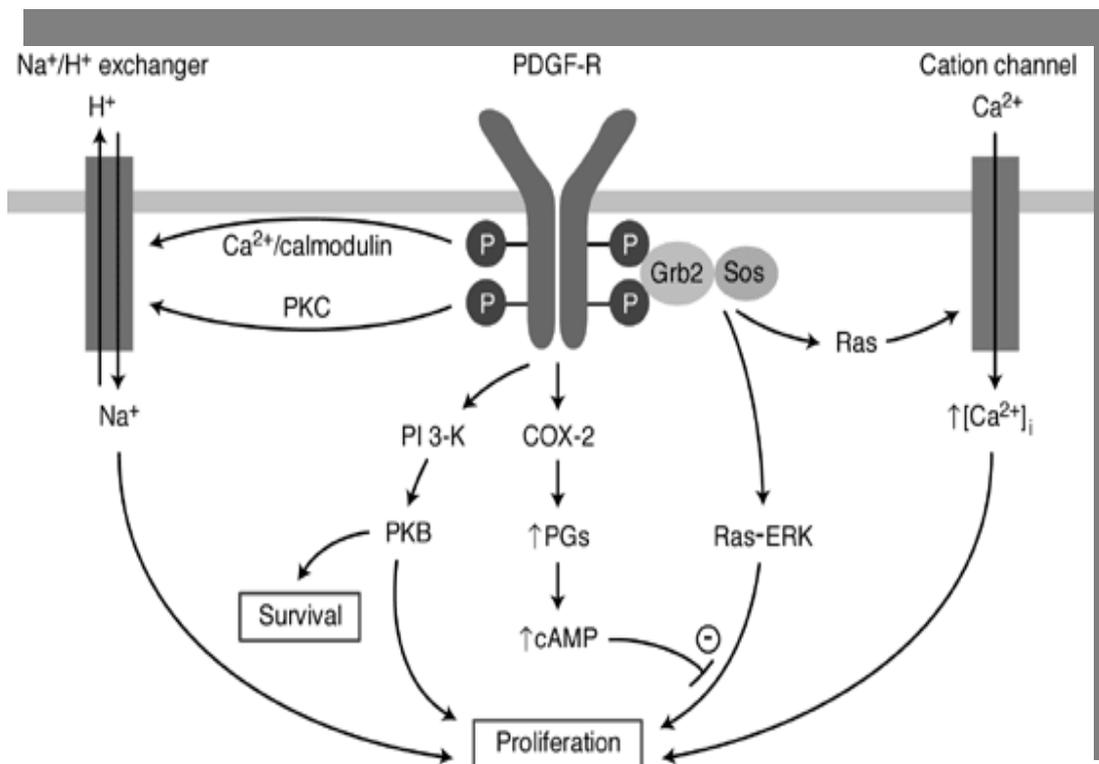


Fig. 2. Mecanismo de actuación del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF). Published in *Reviews in Molecular Medicine*. Cambridge University Press. 2003.

El PDGF es una proteína compuesta por dos cadenas polipeptídicas cuyo peso molecular es 30 Kda. El factor de crecimiento derivado de las plaquetas fue descubierto hace más de dos décadas. Hoy conocemos 5 dímeros disulfídicos por la combinación de 4 cadenas polipeptídicas

codificadas por 4 genes diferentes. Las isoformas son PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB, PDGF-CC y PDGF-DD que actúan vía un receptor tirosina / quinasa con dos cadenas α y β . (Fig. 2). Las cadenas clásicas A y B se activan intracelular pero las nuevas cadenas C y D requieren de una activación extracelular por proteasas. El descubrimiento de las nuevas cadenas sugiere que las señales celulares son mucho más complejas.

El PDGF es el mayor factor mitogénico que existe para células mesenquimales y osteoblastos. Este factor y sus receptores son los más estudiados. ¹⁰⁴

Los genes que codifican las cadenas son para la A el cromosoma 7, la B en el 22, la C y la D en los cromosomas 4 y 11 respectivamente. Las isoformas AA, AB, BB, y CC activan receptor PDGF α , mientras que las isoforma BB y DD pueden activar el PDGF β . Las isoformas AB, BB y CC pueden activar receptores PDGF α β . ⁷⁹ (Fig. 3)

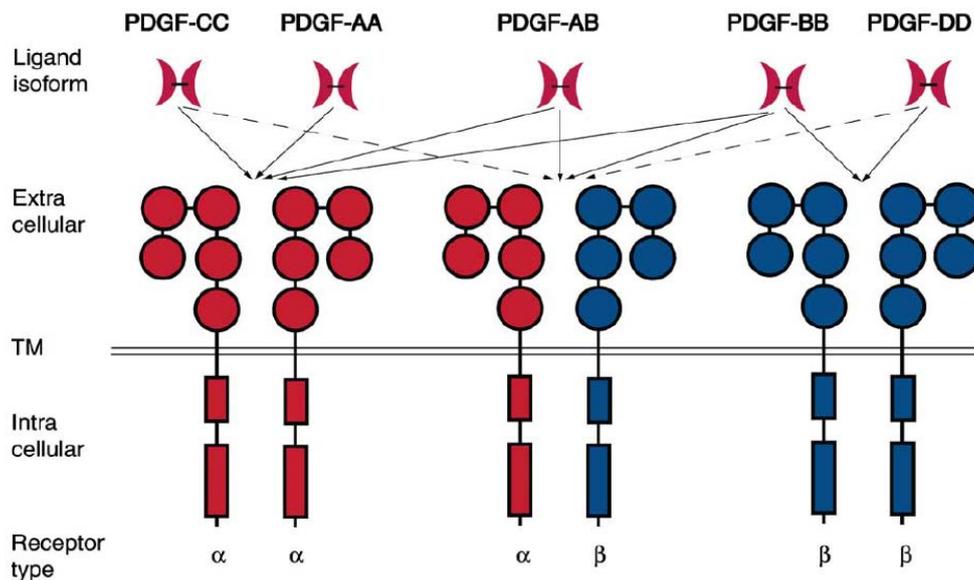


Fig. 3. Posibilidades de activación de los distintos receptores para el factor de crecimiento derivado de las plaquetas.
Xuri Li y cols .2003 ¹⁴¹

Dado su efecto mitogénico, la administración sistémica de este factor produce mitosis celulares de fibroblastos y fibrosis en lugares extracelulares.⁵³ La aplicación local de PDGF ha mostrado resultados esperanzadores en la formación ósea dado su efecto mitogénico en los osteoblastos. Esta acción ha sido demostrada en algunos estudios en animales.

La administración sistémica de PDGF en ratas ovariectomizadas ha demostrado prevenir la pérdida de masa ósea.¹⁶⁹ Nash en 1994¹⁷⁸ realizó un estudio en osteotomías tibiales en ratas demostrando la estimulación de la curación con la administración de PDGF-BB, pero no demostró un aumento de la resistencia mecánica en comparación con el grupo control. Aunque este factor puede tener una utilidad potencial en la curación de la fractura actualmente su verdadera utilidad permanece desconocida.

Efectos del PDGF en las células musculoesqueléticas:

- Aumento de la replicación celular
- Disminución de la síntesis de colágeno por los osteoblastos
- Disminución de la tasa de aposición de matriz ósea
- Aumento de la reabsorción ósea
- Aumento de la degradación de colágeno
- Quimiotaxis para células musculares lisas y fibroblastos, neutrófilos y mononucleares.
- Estimulan la fagocitosis
- Aumentan la degranulación de neutrófilos y macrófagos

El papel de PDGF es muy complejo.²⁸⁸ La importancia se puede comprobar cuando se realizan distintas deleciones de los genes que codifican los dos tipos de receptores. La deleción del gen que codifica el

receptor alfa en ratones, produce que estos no sobreviven al nacimiento y durante la gestación desarrollan deformidades graves.²⁹ Esto nos indica que los receptores tanto el alfa como el beta son esenciales en el desarrollo embrionario y por tanto tendrán un papel fundamental en los procesos de regeneración.

Para que las distintas isoformas de PDGF ejerzan su función deben estimular los receptores correspondientes. Los receptores son proteínas que se encuentran en la membrana celular. Existen dos tipos de receptores, el alfa proteína de 170 KDa y el beta una proteína de 190 KDa. La porción intracelular de estos receptores es del dominio tirosina / cinasa.¹⁰² Existen receptores para estas moléculas en infinidad de tejidos, lo que sugiere su participación en los procesos de maduración y regeneración.⁶⁵

Las acciones e interacciones de estos factores de crecimiento varían dependiendo del tipo de célula y el grado de su madurez. El PDGF estimula síntesis de ADN y la quimiotaxis. Favorecen la síntesis de proteínas colágenas y no colágenas. Inducen la reparación y formación de hueso. Promueven la proliferación de fibroblastos. El IGF-I por ejemplo puede estimular la proliferación y diferenciación de los osteoblastos con más potencia al combinarse con otros factores

1.6.4 Otros factores de Crecimiento

1.6.4.1 Factor de Crecimiento Epidérmico. EGF

La molécula precursora de este factor es una glucoproteína de membrana de gran tamaño con un fragmento activo de 53 aminoácidos su estructura es similar al factor de crecimiento transformante alfa TGF- α . Ambos factores estimulan la mitosis de fibroblastos y queratinocitos y aceleran el cierre de las heridas. El EGF se sintetiza en diversos tejidos: riñones, glándula submandibular, glándula lacrimal, glándula de Brunner y magacariocitos, y se encuentra en la saliva, lágrimas y orina. Favorece la

reparación de las heridas estimulando la migración y división de las células epiteliales y aumentando la síntesis de proteínas como la fibronectina. Aunque el EGF no aumenta la síntesis de RNA mensajero para proteínas de matriz extracelular como el colágeno, los trabajos recientes apuntan a que lo hace por un mecanismo indirecto, atrayendo fibroblastos por quimiotaxis, éstos a su vez sintetizan colágeno produciéndose un aumento del colágeno total. ⁵³

1.6.4.2 Factor de Crecimiento Insulínico IGF-I y IGF-II

El tejido óseo posee grandes cantidades de estos factores. El IGF-I es el factor de crecimiento más abundante en la matriz ósea. El IGF-I lo producen los osteoblastos y estimula la formación de hueso induciendo la proliferación celular, la diferenciación y la biosíntesis de colágeno tipo I. En el hueso se sintetizan altos niveles de IGF-I y es secretado por los osteoblastos, IGF-I regula por tanto la formación de hueso de forma autocrina. ^{10, 40} El IGF-I también aumenta el número de células multinucleadas osteoclasticas. ^{53, 165}

Howes y cols, en 1988 ¹⁰⁷ utilizan por primera vez la combinación de PDGF-BB y IGF-I en un estudio clínico en pacientes con enfermedad periodontal, con el fin de valorar si la combinación de estos FCs estimulaba la formación de ligamento periodontal.

Existen dos tipos de IGFs identificados: IGF-I e IGF-II. EL IGF-I es mucho más potente que el IGF-II aunque éste último es mucho más abundante. ⁵³ La IGF-I es un polipéptido de bajo peso molecular producido por el hígado en respuesta a la hormona del crecimiento.

El IGF-I y el IGF-II estimulan la proliferación celular osteoblástica y la síntesis de colágeno tipo I. Las IGFs son muy abundantes en el hueso y de una forma autocrina y paracrina para regular la formación ósea. Junto con la

hormona del crecimiento estas activamente están muy relacionadas con el desarrollo esquelético, reparación y remodelación. La expresión de IGFs está aumentada en el periostio, fisis de crecimiento, callo de fractura y tejido óseo ectópico. La vida media de una IGF es muy corta. *In vivo* las IGFs están ligadas a proteínas complejas (IGFBPs). Se han descrito seis IGFBPs (tipo I-tipo VI). Desde el tipo II al Tipo VI están producidas por los osteoblastos.

En estudios animales se ha demostrado que la administración sistémica de IGF produce aumento de la reparación ósea. Thaller y cols en 1993²⁵³ evaluaron el efecto del IGF-I en la reparación de defecto óseos craneales en ratas diabéticas que demostró ser muy útil. Capenter en sus estudios de 1992⁴⁴ no encontró mejoría en la curación de osteotomías en conejos aumentando los niveles sistémicos de IGF.

Los IGFs tienen un importante papel en la remodelación ósea pero su efecto depende de las interacciones con IGFBP. El potencial terapéutico de estos factores debe ser definido en futuros estudios.

1.6.4.3 Factor de Crecimiento Fibroblástico Ácido y Básico aFGF y bFGF

Los FGF son una familia de factores de crecimiento que incluyen 23 miembros. El ácido y básico son los más abundantes de la familia, el FGF-2 o básico es el más potente de los dos. Estos factores los encontramos en la matriz cartilaginosa y ósea. Su principal función es ser mitogénico *in vivo* para las células endoteliales, fibroblastos, condroblastos, y osteoblastos.¹⁴² Estas moléculas presentan su principal papel en las primeras fases de la curación.

Cuatro receptores han sido identificados que actúan activando una tirosin / quinasa intracelular. Se ha publicado que algunas mutaciones en los receptores están relacionados con síndromes con déficits de osificación

endocondral y membranosa, síndrome de Apert.⁵³ Mutaciones del FGFR-3 está relacionada con la acondroplasia e hipocondroplasia. La aplicación local de FGF-2 intraósea aumenta la formación y densidad mineral ósea.¹⁷⁶ En la formación del callo óseo se observa un aumento de los niveles FGF 1.¹¹⁶

Como en el TGF- β el efecto de FGFs en relación con la inducción y la formación ósea es muy modesta en comparación con el efecto que demuestran las BMPs.

Son proteínas de cadena sencilla que se originan a partir de precursores diferentes. Tienen un papel importante en los mecanismos de regeneración tisular. Estimulan la proliferación de la mayoría de las células implicadas en la reparación: Células capilares endoteliales, células vasculares endoteliales, fibroblastos, keranocitos y ciertas células especializadas como condrocitos y mioblastos.

El FGF básico induce la migración celular. Los experimentos en cultivos celulares indican que gran variedad de células sintetizan FGF, incluidos fibroblastos y osteoblastos. Además se han identificado cuatro tipos diferentes de receptores para los FGF cuya función continúa investigándose.¹⁹⁸

1.6.4.4 Factor de Crecimiento Vascular Endotelial VEGF

Se aisló originalmente a partir de cultivos celulares de hipófisis. Se trata de una proteína homodimérica con una secuencia de aminoácidos con un 24% de similitud con el PDGF- β , pero con afinidad a distintos receptores que el PDGF con inducción de distintos efectos celulares y biológicos. Se trata de un mitógeno potente y muy selectivo para las células endoteliales. No se conoce con detalle su papel en la reparación. Su importancia esta determinada por su acción angiogénica *in vivo*.⁶⁷

1.6.4.5 Factor de Crecimiento derivado del Hepatocito HGF

Se ha demostrado que este factor de crecimiento, puede actuar mejorando la curación de las lesiones tendinosas al actuar de forma conjunta con VEGF. ⁶

Tabla. I. Efectos celulares de los principales factores de crecimiento del plasma rico en plaquetas.

	Proliferación Pre/Osteoblasto	Proliferación Fibroblastos	Quimiotaxis	Síntesis matriz extracelular	Vascularización
PDGF	++	++	+	+	*
TGF	+ / -	+ / -	+	++	*
EGF	-	++	+	*	-
IGF	++	+	++	++	-
VEGF	*		-	-	++

++ *Aumenta mucho*
 + *Aumenta*
 - *Sin efecto o negativo*
 * *Efecto indirecto*

1.7 CONCEPTOS GENERALES DE LA CONSOLIDACIÓN DE LAS FRACTURAS. REPARACIÓN ESPONTÁNEA DE LOS DEFECTOS ÓSEOS

Existen multitud de factores implicados en la consolidación de las fracturas óseas, pero no existe un conocimiento exacto de los procesos que suceden y están implicados. Hemos avanzado en el conocimiento de las vías celulares y moleculares pero no tenemos el conocimiento completo. Una fractura inicia una secuencia de reparación según los procesos de cicatrización generales: Inflamación, reparación y remodelación.⁷⁰ Einhorn describió cuatro respuestas de consolidación diferentes según la localización:⁷⁰

- Médula ósea
- Cortical
- Periostio
- Tejidos Blandos

La respuesta más importante para la consolidación de una fractura es el periostio donde células osteoprogenitoras y células mesenquimales indiferenciadas contribuyen al proceso mediante una osificación membranosa y osificación endocondral. El periostio posee una respuesta rápida y es capaz de tender un puente sobre un hueco o déficit óseo hasta la mitad del diámetro del hueso.¹⁶⁶ La tendencia natural de la evolución de un defecto óseo es hacia la pseudoartrosis. La reparación espontánea de un defecto óseo está en función de multitud de variables, el intento de curación es por parte del periostio de forma desorganizada. Desde los extremos de los

defectos existe un intento de consolidación endocondral sin lograr ni conseguir un puente óseo efectivo.

Durante el complejo proceso de reparación de una fractura se producen cuatro tipos básicos de formación de hueso:

- Osificación osteocondral
- Osificación membranosa
- Formación por aposición
- Migración osteonal (arrastre)

El tipo de reparación, cantidad y localización del hueso neoformado pueden estar influidos por el estado del hueco de fractura, tipo de fractura, rigidez de fijación, carga y ambiente biológico. Los estudios de Carter en 1998 ⁴⁷ mostraron que en función de la carga sometida tendremos una diferenciación tisular diferente.

Sarmiento en 1984 ²³⁰ describió la secuencia temporal del callo de fractura propia de cada zona del callo. Según Sarmiento el callo posee una zona adyacente, una periférica y zona central que en función del tiempo pasarán por callo blando, tejido duro y remodelación.

Existen multitud de factores implicados en la consolidación ósea tanto biomecánicos como moleculares. Nuestros conocimientos de los procesos han mejorado pero distan de ser completos. La consolidación de la fractura puede considerarse desde diferentes puntos de vista: biológico, bioquímico, biomecánico y clínico.

Se ha demostrado que existen diversos factores de crecimiento que se expresan durante fases distintas de la consolidación experimental de fracturas.¹⁸ Sobre la base de estos hallazgos, se considera que estos factores de crecimiento pueden servir de agentes terapéuticos para potenciar la reparación ósea. Entre estos factores se encuentran el TGF- β , la BMP, el FGF, el PDGF y el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF).

La consolidación de una fractura es un proceso complejo que requiere células apropiadas y la expresión consiguiente de los genes y secreción de las proteínas adecuadas. La consolidación clínica de la fractura se consigue con el aumento progresivo de la rigidez y resistencia por el proceso de mineralización.

Einhorn en 1998 ⁷⁰ describió cuatro respuestas de consolidación diferentes caracterizándolas según su localización. Medula ósea, cortical, periostio, tejidos blandos externos. La respuesta más importante para la consolidación de una fractura es la consolidación perióstica. La capacidad de regeneración ósea puede rellenar un hueco de hasta la mitad del diámetro de hueso. Durante el complejo proceso de reparación de una fractura se producen cuatro tipos básicos de formación de hueso nuevo: Osificación endocondral, osificación membranosa, formación por aposición, migración osteonal. En función del tipo de fractura hueco óseo, ambiente mecánico y ambiente molecular se producirá un tipo de reparación u otro.

Cuando existen problemas en la consolidación de una fractura esta puede estar retrasada cuando su resolución no se ha obtenido en el tiempo esperado, generalmente entre 3 – 6 meses. Se define una pseudoartrosis como una fractura de más de 9 meses de evolución sin ninguna progresión en las tres meses seguidos. Existen distintos tipos de pseudoartrosis. Las pseudoartrosis hipertróficas o vasculares y las atróficas o avasculares. Dentro de estas últimas se encuentra un tipo especial que son los defectos óseos. Son pseudoartrosis atróficas con pérdida de sustancia con especiales formas de reconstrucción. En nuestro trabajo hemos utilizado un modelo creando unos defectos óseos.

El modelo utilizado consiste en la creación de defectos segmentarios en peroné de conejo y en la cortical metafisaria proximal de tibia de conejo. Los defectos son aproximadamente el doble del diámetro de la diáfisis. ^{55, 166}

Los procesos de reparación de las lesiones óseas dependerán de diversos factores. En nuestro estudio tenemos un defecto óseo en el que no

existe contacto entre los extremos óseos, si se produce la reparación será una reparación de tipo secundaria. Este tipo de reparación es un reparación no osteonal que incluye todos los patrones posibles de reparación excepto el patrón directo. La respuesta del periostio es una de las más importantes para el proceso de consolidación, este reacciona con el movimiento y se inhibe con la fijación rígida.¹⁶⁶ Se ha descrito que esta reacción es capaz de unir huecos de hasta la mitad del diámetro del hueso independientemente de las partes blandas.¹⁶⁶

Muchos son los factores que pueden influir en la consolidación de una fractura:⁵⁶

- Factores Sistémicos: Edad. Nivel de actividad. Estado nutricional,
- Factores Hormonales: Enfermedades. Medicamentos. Temperatura etc.
- Factores Locales: Tipo de hueso, tipo fractura, lesión de partes blandas, tratamiento realizado.

En definitiva los procesos de reparación y remodelación ósea son el resultado de toda una secuencia de eventos moleculares causados por las tensiones mecánicas generadas en el hueso pero no las conocemos con exactitud.¹⁸ Según lo publicado por Bloomfield en el 2001²² parece existir una red osteocítica de mecanotransducción donde las señales mecánicas se traducen en señales bioquímicas.

1.8 PROCESO DE REPARACIÓN ÓSEA

La agresión al hueso, la fractura, la lesión produce la secreción local de múltiples factores de crecimiento, uno de los primeros factores activados son los mediados por las plaquetas que determinarán la respuesta cicatrizante. Estos factores actúan como un gradiente de atracción y migración para las células blancas, células osteoprogenitoras. Este estadio se conoce como fase de **Quimiotaxis**, donde las células blancas como los macrófagos, realizan una limpieza de la herida, retiran los tejidos necróticos y comienza la secreción de nuevos factores (linfocinas) para la atracción de nuevas células indiferenciadas.

Tras la llegada de las células mesenquimales y las células osteoprogenitoras comienza la multiplicación y la formación de una masa necesaria para el proceso de reparación. Esta fase se conoce con el nombre de fase **Proliferativa**. Tras la proliferación las células, maduran hacia osteoblastos, o condrocitos para comenzar posteriormente el proceso de formación ósea mediante una osificación membranosa u osificación endocondral. La función diferencial del osteoblasto es la secreción de la matriz extracelular que será la formación de osteoide, que tras su calcificación se transformará en hueso maduro. El proceso termina con **Diferenciación** óptima para realizar la función adecuada. Molecularmente uno de los compuestos orgánicos del tejido óseo más abundante son las proteínas de colágeno (90%), el 10% restante son las no-colágenas. Estas proteínas tienen el papel fundamental de regular la fisiología ósea y las distintas fases que posteriormente desarrollaremos. Estas proteínas se encargan de regular la mineralización, control de la multiplicación, diferenciación, interacción entre la matriz y las distintas células. Los factores de crecimiento óseo y otras moléculas osteoinductoras,

osteomoduladoras y osteopromotoras constituyen menos del 1% de las proteínas no colágenas del hueso.

1.8.1 Reparación o Consolidación Ósea

El tejido óseo es el único capaz de repararse a sí mismo de manera completa por medio de la reactivación de los procesos que tienen lugar durante su embriogénesis. Cuando un hueso es sometido a fuerzas que superan su resistencia mecánica se origina su fractura, desencadenándose el proceso de consolidación o reparación ósea, que tiene como objetivo restablecer la estructura tisular y las propiedades mecánicas originales.

Para comprender los diferentes procesos que contribuyen a la consolidación y reparación de las fracturas debemos tomar en consideración cuatro respuestas distintas que se producen en: la médula ósea, la cortical ósea, el periostio y las partes blandas circundantes. En función del tipo de lesión, fractura, localización predominarán o podrán producirse simultáneamente una o varias de estas respuestas.

La consolidación comienza con la estabilización otorgada por los callos periósticos y endósticos, proceso que restablece la continuidad de los extremos fracturarios. Cuando la fractura es manejada en condiciones de estabilidad óptima por medio de la reducción anatómica y compresión interfragmentaria no se forma el callo perióstico, denominándose a este proceso consolidación primaria. La consolidación secundaria consiste en respuestas del periostio y las partes blandas circundantes con formación posterior de un callo. La respuesta más importante en la consolidación de las fracturas es el periostio, aquí células indiferenciadas osteoprogenitoras contribuyen al proceso de reparación mediante una formación ósea membranosa y formación de hueso endocondral embrionario. La siguiente fase corresponde al establecimiento de una unión ósea entre los fragmentos fracturarios. Si durante este periodo la fractura carece de condiciones de estabilidad, se puede generar una pseudoartrosis hipertrófica,

debido a la persistencia de tejido fibroso. Sin embargo, el proceso tolera un pequeño margen de movimiento, que es capaz de estimular la consolidación ósea. En la fase final del proceso de reparación, el tejido óseo neoformado experimenta fenómenos de remodelación que se mantienen hasta conseguir la resistencia inicial del hueso lesionado.

Según términos histológicos clásicos la consolidación de las fracturas las podemos dividir en primaria y secundaria. En nuestro trabajo la consolidación secundaria es la más importante. El hueso formado por este proceso es un hueso perióstico formado por osificación membranosa lejos del sitio de fractura. La respuesta de las partes blandas a la formación del callo de fractura consiste en la formación de tejido endocondral para posterior osificación. Esto implica el reclutamiento de células condrógenas a partir de células mesenquimales indiferenciadas.

Los factores que favorecen la consolidación son la presencia de fracturas en áreas de hueso esponjoso, la estabilización correcta, el procedimiento de transporte óseo, los injertos óseos, los biomateriales sustitutivos del tejido óseo, la matriz ósea desmineralizada, los factores de crecimiento, las células de la medula ósea, el traumatismo craneoencefálico concomitante, los campos eléctricos, el oxígeno hiperbárico, el ejercicio físico, la hormona somatotrófica, las hormonas tiroideas, la calcitonina, la insulina, las vitaminas A y D, los esteroides anabolizantes, el condroitinsulfato y la hialuronidasa, entre muchos.⁷⁰

Los factores que dificultan la consolidación son la ocurrencia de fracturas en hueso de tipo cortical, el compromiso de los tejidos blandos en las fracturas expuestas o por alta energía, las lesiones articulares, las fracturas en hueso patológico, la interposición de tejidos blandos, la desvascularización extensa o el aporte sanguíneo precario, la manipulación tardía, la edad avanzada, la infección, la malnutrición, el tratamiento con corticoides, la diabetes mellitus, la anemia, el uso de cera ósea, la denervación y los anticoagulantes, entre otros. La consolidación

ósea se desarrolla en tres etapas secuenciales que se superponen en el tiempo, que corresponden a las fases de inflamación, reparación y remodelación. ^{33, 34, 51, 57, 168, 189}

1.8.2 Fase de Inflamación.

Los traumatismos causantes de las fracturas lesionan las células, vasos sanguíneos y matriz del tejido óseo y también comprometen los tejidos adyacentes como periostio y músculos. De esta forma, se establece un hematoma fracturario que es la base del proceso de consolidación. La lesión vascular interrumpe el aporte sanguíneo a los osteocitos y por ello en los extremos fracturarios no se encuentran células vivas. Los mediadores de la inflamación liberados por las plaquetas y demás células lesionadas provocan vasodilatación y la aparición de un exudado plasmático que lleva al edema agudo.

Entre las células inflamatorias que migran al foco de fractura se encuentran leucocitos polimorfonucleares, macrófagos y linfocitos. En la medida que disminuye la reacción inflamatoria, el tejido necrótico y el exudado plasmático son reabsorbidos, y los osteoblastos se encargan de producir una nueva matriz ósea.

1.8.3 Fase de Reparación

El proceso de consolidación es estimulado por factores quimiotácticos liberados en la fase previa, las proteínas de la matriz expuestas por la desorganización tisular y los factores eléctricos. La organización del hematoma de fractura proporciona un soporte de fibrina que facilita la migración celular, proliferación y síntesis de matriz ósea. En este estado evolutivo el microambiente a nivel del foco fracturario es ácido, pero en la medida que el proceso avanza el pH se

va alcalinizando progresivamente, de este modo, la fosfatasa alcalina alcanza su nivel de actividad óptimo, favoreciendo la mineralización del callo óseo.

Cuando los extremos fracturarios se necrosan son reabsorbidos por los osteoclastos, lo que permite que los vasos periósticos aporten los brotes vasculares que inician la reparación. Las células mesenquimatosas pluripotenciales del foco de fractura y del torrente sanguíneo son las responsables de la neoformación ósea. La composición del callo óseo se modifica a medida que progresa la consolidación, de tal forma que las células sustituyen el coágulo de fibrina por una matriz fibrosa que contiene colágeno tipo I y III, proteoglicanos y glucosaminoglicanos. Posteriormente el tejido fibroso se transforma en fibrocartílago que presenta un importante contenido de colágeno tipo II, proteoglicanos específicos y proteínas de unión.

Tras estos procesos, se produce la mineralización de la matriz ósea con un aumento de la concentración de colágeno tipo I, fosfatasa alcalina y proteínas no colágenas, proceso que concluye con la osificación de la masa fusiforme del callo que envuelve los extremos fracturarios, el que contiene cantidades crecientes de hueso inmaduro.⁷⁰

1.8.4 Fase de Remodelación

Corresponde a la última fase del proceso de reparación o consolidación en que se sustituye el hueso inmaduro del callo óseo por hueso laminar. Una vez que se ha reemplazado todo el hueso neoformado, el proceso de remodelación continúa con la reabsorción de las trabéculas mal orientadas por parte de los osteoclastos y su sustitución por otras nuevas adaptadas a las líneas de fuerza. Cuando la remodelación del callo óseo concluye completamente, se recuperan las propiedades mecánicas originales del hueso comprometido.⁸⁶

1.9 PLASMA RICO EN PLAQUETAS. ANTECEDENTES.

La liberación de factores de crecimiento desde las plaquetas junto con las proteínas plasmáticas constituyen las órdenes iniciales que desencadenan la reparación tisular. El potencial de estos factores como estimuladores de la curación de las lesiones y heridas ha inquietado a la comunidad científica desde que Knighton y cols. los descubrieran en 1982¹³². Singh y cols. en 1982²⁴⁰, Antonaides y Williams en 1983¹¹, Bowen-Pope y cols. en 1984²⁹ y Ross y cols en 1986²¹⁴ han aportado mucha luz sobre el tema. Estos autores identificaron el factor de crecimiento derivado de las plaquetas y propusieron su importancia en la curación ósea. Las plaquetas contienen un número de factores de crecimiento. Este potencial, gracias a las nuevas tecnologías, ha sido desarrollado por la creación y diseños para lograr concentrar estos factores para utilizarlos en determinadas situaciones clínicas. El Plasma Rico en Plaquetas (PRP) se introdujo por primera vez en cirugía maxilofacial por los autores Whitman y Berry en 1997.²⁷⁵ Posteriormente autores como Landersberg y cols en 1998¹³⁶ y Marx y cols en 1998¹⁶² generalizaron la técnica. El PRP obtuvo una gran popularidad en cirugía maxilofacial con un artículo clave.¹⁶² En este estudio demostraron que la combinación de PRP con autoinjerto aumentaba la respuesta tanto radiográfica como densitométrica. Ciertamente comenzó un nuevo camino en el planteamiento de los injertos óseos. La teoría que sustenta la capacidad de regeneración del plasma rico en plaquetas es convincente. “Si un poco es bueno mucho será mejor” esta frase puede resumir la filosofía de concentrar las plaquetas. Si somos capaces de concentrar las plaquetas en un injerto óseo y aumentar la concentración de factores de crecimiento en forma activa puede que consigamos más rápidamente el regenerado óseo.¹⁸¹

El proceso lesivo que acontece tras un traumatismo o la agresión tisular que supone una intervención quirúrgica pone en marcha los mecanismos necesarios para su curación. Esta curación se puede llevar a cabo mediante un proceso de reparación o de regeneración. La reparación es la curación de una herida mediante un tejido que no restaura totalmente la arquitectura o función del tejido afecto, mientras que la regeneración consiste en la reconstitución de una parte perdida o lesionada. El estudio de la curación de las heridas es un proceso complejo que involucra muchos tipos celulares y factores de crecimiento.¹⁴ En condiciones normales, tras la lesión tisular, las plaquetas forman un coágulo estable desde el que se liberan una variedad de FC que promueven la curación tisular. Sin embargo, diversos estudios experimentales demuestran una alteración en la actividad de los FC durante la curación de las heridas debido a su reducida síntesis, incrementada degradación e inactivación. En la curación de estas heridas las plaquetas desempeñan un papel esencial, ya que son ricas en FC almacenados en sus gránulos alfa. El uso tópico de los geles formados tras la agregación plaquetaria promueve el aporte exógeno e *in situ* de estos FC, contrarrestando con ello las alteraciones anteriormente reseñadas.²⁴³

1.9.1 ¿Qué es el plasma rico en plaquetas (PRP)?

El plasma rico en plaquetas es un volumen de plasma autólogo que posee una concentración de plaquetas superior a los valores basales. El valor medio de las plaquetas plasmáticas es de 200.000 / μ l aproximadamente. Se ha demostrado que la concentración de 1.000.000 plaquetas por μ l es la concentración ideal para asegurar un aporte de factores de crecimiento óptimo para potenciar la consolidación de huesos y tejidos blandos. Se demostró que concentraciones superiores tienen un efecto negativo.²⁶⁹ El plasma rico en plaquetas (PRP) ha supuesto un avance decisivo en la estimulación y la aceleración de la consolidación de

huesos y partes blandas. Es una biotecnología relativamente nueva que representa el interés cada vez mayor que despierta actualmente la ingeniería de tejidos y terapia celular. Dado lo novedoso de la tecnología, puede que exista el riesgo de que no se comprenda con exactitud y se realice un uso incorrecto.²²¹

Esta sustancia es totalmente autóloga pues se desarrolla a partir de la sangre del propio paciente, es inherentemente segura y no se ve afectada por enfermedades transmisibles como HIV y la hepatitis. En el PRP, el aumento de plaquetas posiblemente aumente el aporte de factores de crecimiento. Los siete factores de crecimiento conocidos en el PRP son:

1. El factor de crecimiento derivado de las plaquetas PDGF, AA, BB, AB
2. El factor de crecimiento transformante beta TGF- β 1, TGF- β 2
3. El factor de crecimiento endotelial vascular VEGF
4. El factor de crecimiento epitelial EGF
5. El factor de crecimiento insulínico IGF-I y II
6. El factor de crecimiento epidermoide EGF
7. El factor de crecimiento hepatocitario HGF

Se trata de factores de crecimiento naturales que guardan una relación determinada biológicamente y ello es lo que le distingue de los factores de crecimiento recombinantes. Estos últimos son factores de crecimiento puros, pero no son naturales. Los factores de crecimiento recombinantes son factores de crecimiento aislados y se administran a dosis elevadas mediante un portador sintético. El PRP autólogo es la combinación de siete factores de crecimiento naturales dentro de un coágulo normal que actúa de portador. El coágulo se compone de fibrina, fibronectina, y vitronectina, que son moléculas de adhesión celular requeridas para la migración celular como la que se aprecia en la osteoconducción, la epitelización de lesiones y la osteointegración. El plasma rico en proteínas no es osteoinductivo, no puede

inducir la formación de hueso de nuevo ex novo. Sólo las proteínas morfogénicas óseas (BMP) inducen hueso ex novo. El PRP actúa sobre las células con capacidad de consolidación con el objeto de incrementar su número (mitogénicas) y estimular el crecimiento vascular interno (angiogénico). Por lo tanto, es poco probable que estimule la formación de sustitutos óseos y otros materiales para injerto que no sean de tipo celular. Se ha demostrado que estimulan los autoinjertos medulares, pero existe poca probabilidad de que favorezcan la formación ósea al aplicarlo en combinaciones de sustitutos óseos no celulares y hueso alogénico. Estas moléculas producto de la degranulación de las plaquetas no son las únicas sustancias que existen en el gel plaquetario. Existen proteínas plasmáticas, proteínas reguladoras negativas PF4 y sustancias vasoactivas del contenido de los gránulos densos de las plaquetas. ⁶ (Fig.4)

1.9.1.2 Plaquetas

Las plaquetas llamadas también trombocitos son porciones citoplasmáticas de los megacariocitos de la médula ósea. Tras una serie de etapas las prolongaciones de los megacariocitos se separan dando lugar a las plaquetas, por lo tanto son células anucleadas, de tamaño discoide de entre 1 y 3 μm de diámetro. La concentración normal en la sangre humana oscila entre 150000 y 400000 plaquetas por centímetro cúbico de sangre periférica. Estas células inician el proceso hemostático formando tapones en los vasos dañados. Fisiológicamente la plaqueta puede realizar las siguientes funciones:

- Adhesión: las plaquetas poseen un sistema de receptores glucoproteicos específicos que interaccionan con las fibras de colágeno y el subendotelio dañado. Los receptores implicados en esta función son el complejo GP-Ib-IX y la integrina GPIIb-IIIa.

- Activación: la plaqueta cambia de forma, se vuelve esférica con pseudópodos. Las plaquetas tienden a pegarse entre sí mediante redistribución de receptores. ⁸ (Fig. 5,6, y 7)

- Agregación: Tras el proceso de adhesión comienza la agregación por la unión entre sí formando un trombo al que se adhiere el fibrinógeno

Tras la agregación de las plaquetas se produce una degranulación con expulsión del contenido en sus gránulos alfa. ¹⁵⁶ El interés del concentrado de plaquetas se debe justamente a la posibilidad de utilizar la gran cantidad de factores de crecimiento que pueden conseguirse y administrarse de forma in situ en el lugar de la lesión. ¹⁶² En los estudios descritos por el Dr. Anitua se explica las características del gel de plaquetas, como funcionalmente estas, se agrupan y degranulan en aproximadamente 30 minutos tras su activación. Entre los 3 y 10 minutos se produce el momento crítico donde se activan y se agregan, a los 30 minutos tenemos un coagulo compacto de plaquetas con fibras gruesas de fibrina. ²⁰⁷

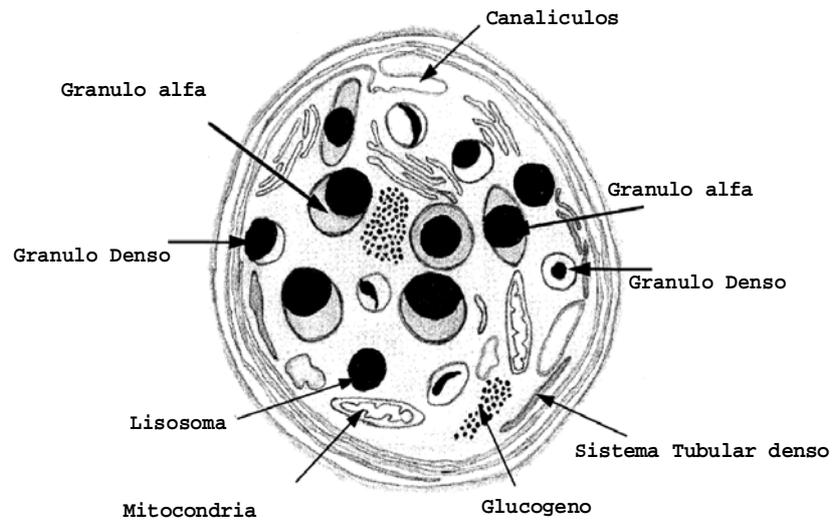


Fig. 4. Esquema de los distintos gránulos que contiene una plaqueta.

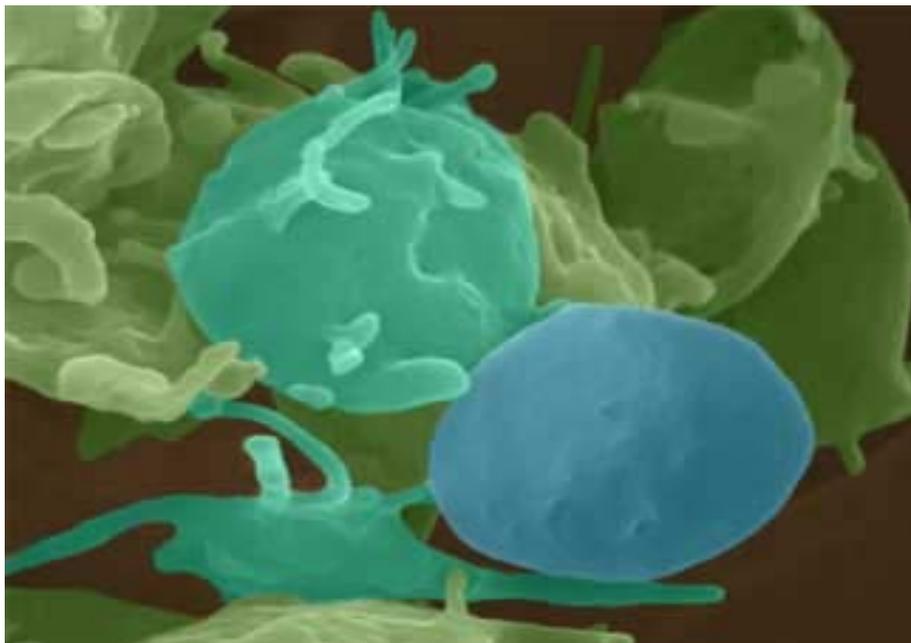


Fig. 5. Plaqueta inactiva (color azul). Plaquetas activas con pseudópodos e irregulares superficies (verde). Imagen de microscopio electrónico de barrido.

http://www.med.monash.edu.au/medicine/box_hill/research/



Fig. 6. Imagen de microscopía electrónica donde se observan plaquetas en plasma no activadas.
<http://www.med.monash.edu.au/medicine/box_hill/research/>

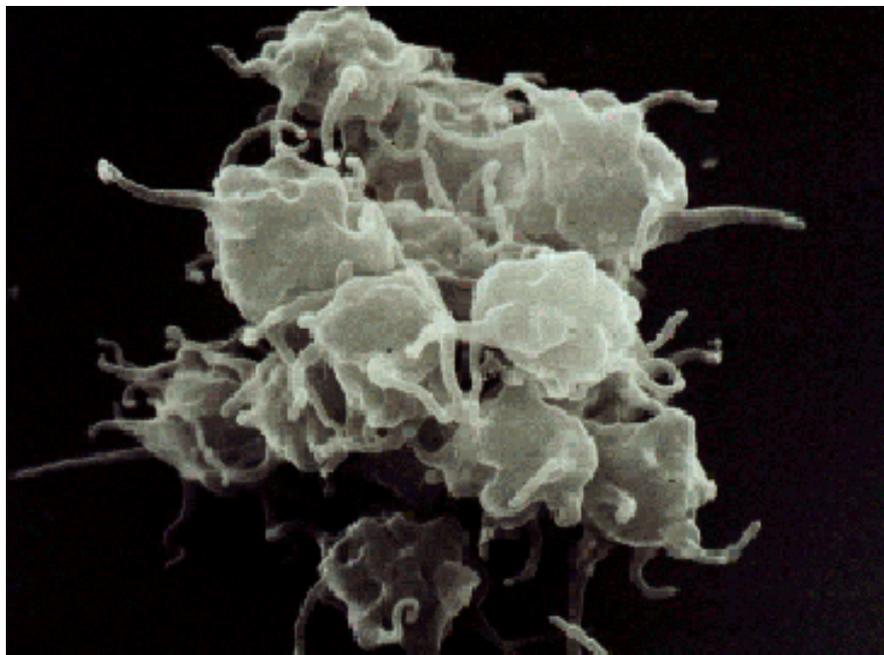


Fig. 7. Imagen de microscopía electrónica donde se observan plaquetas en plasma activadas.
<http://www.med.monash.edu.au/medicine/box_hill/research/>

1.9.3 Plasma rico en plaquetas (PRP) o Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF)

Las plaquetas tan estudiadas por su papel en la hemostasia tienen una función fisiológica muy importante, recientemente descubierta y valorada: son portadoras de proteínas con un papel muy importante en la reparación y regeneración tisular. Las plaquetas independientemente de poseer unos gránulos rellenos de proteínas tras su formación durante el viaje por el torrente sanguíneo realizan la captación de proteínas plasmáticas que también se almacenan en su interior. En resumen la plaqueta presenta una mezcla muy compleja de proteínas.⁷

Los concentrados de plaquetas se han hecho muy populares en los últimos años como una herramienta auxiliar en muchos actos quirúrgicos por su capacidad en permitir la regeneración de tejidos con mayor rapidez y eficacia. Las primeras publicaciones sobre la utilización de proteínas plaquetarias autólogas aparecieron a finales de los años 90 en el área de cirugía maxilofacial y oral.^{10, 162}

Muchos han sido los sistemas desarrollados en el mercado para la obtención y preparación de concentrados plaquetarios. Las concentraciones de factores de crecimiento y otras proteínas difieren de unos sistemas a otros. En la tabla Tabla II y III observamos los valores en diferentes sistemas.

En nuestro estudio hemos utilizado una modificación de los protocolos descritos por el Dr. Anitua. El objetivo final es obtener una fracción de plasma autólogo que contenga la mayor cantidad posible de proteínas plasmáticas y un número elevado de plaquetas pensamos, que el método descrito por Dr. Anitua cumple los objetivos perseguidos. Las fracciones aisladas tras la centrifugación poseen en función de la situación en el gradiente, una concentración de proteínas plasmáticas

algunas de ellas no consideradas como factores de crecimiento, por ejemplo el fibrinógeno, fibrina, fibronectina, vitronectina. Por otra parte al aislar la fracción rica en plaquetas estas no deben estar activadas ni agregadas por lo que se deduce que los gránulos alfa no se han liberado, tras la activación teóricamente se producirá la degranulación y pasaremos a tener hipotéticamente una concentración elevada de factores de crecimiento. Hemos decidido utilizar el término de PRP porque es el volumen que hemos medido y cuantificado en nuestro estudio, posteriormente tras la activación teóricamente este PRP se convertirá en un Plasma rico en factores de crecimiento más algunas proteínas plasmáticas PRGF. Pensamos que no debemos utilizar el término “concentrado plaquetar o de plaquetas “ ya que no hace referencia al plasma, y si no existe plasma no coagularía. Se debe evitar utilizar términos como “plasma muy rico en plaquetas” o “plasma muy rico en plaquetas”.

Según los hematólogos un plasma rico en plaquetas (PRP) es un plasma que contiene por encima de 350000 plaquetas / μ L. El aislamiento de las fracciones según el método Dr Anitua es una técnica que prepara un plasma rico en plaquetas que no contiene leucocitos. El PRP o PRGF utiliza siempre y exclusivamente las proteínas autólogas del propio paciente, preparadas en el mismo momento de su utilización. El PRGF contiene factores de crecimiento plaquetarios y plasmáticos implicados en los procesos de reparación, también contiene proteínas plasmáticas. Tabla III.

Tabla.II. Niveles Típicos de factores de crecimiento en distintos concentrados de plaquetas.⁷¹

	TGF-β1 (ng/mL)	PDGF-AB (ng/mL)
Plaquetas (1000/μL) (195)		
Sangre Periférica	42	18
Ppp (31)	8	4
PRP (976)	344	130
Plaquetas (1000/μL) (256)		
Sangre periférica	44	21
Ppp (45)	6	3
PRP (2592)	929	315

1.9.3 Gel de Fibrina y Plasma Rico en Plaquetas (PRP)

La fibrina adhesiva es un material biológico que se desarrolló para mejorar la hemostasia en los actos quirúrgicos de órganos que presentan sangrado abundante como hígado, cerebro y riñones o en tejidos complejos como infecciones o quemados. La eficacia del adhesivo de fibrina ha sido demostrada en numerosas situaciones: sellar superficies, sellar anastómosis y mejorar la reconstrucción de injertos. El primero en utilizar este gel de fibrina fue Matras en los años 80.¹⁶⁴ Propuso utilizar sus propiedades selladoras hemostáticas que promovía la curación de las heridas y reparación de los tejidos. Este producto se comercializó en Europa con el nombre de Tisucol®. El principal inconveniente es que esta sustancia contiene fibrinógeno extraído de plasma humano con la posibilidad de

transmitir enfermedades infecciosas. Para mejorar los inconvenientes del fibrinógeno alogénico se han desarrollado sistemas para obtener un fibrinógeno autólogo del propio paciente pero que precisa de activaciones con trombina generalmente bovina no sin posibles riesgos de transmisión de encefalopatías. La alternativa actual a estos productos es obtener un plasma rico en plaquetas PRP mediante plasmaféresis del propio paciente minutos antes de la cirugía.⁸

Tras la extracción de sangre esta se anticoagula con citrato sódico y por centrifugaciones sucesivas se puede separar la fracción rica en plaquetas. Tras la centrifugación podemos separar claramente tres fracciones según su densidad:

- Plasma pobre en plaquetas (ppp)
- Plasma rico en plaquetas (PRP)
- Elementos formes

Las dos primeras fracciones pueden centrifugarse de nuevo y separar las fracciones de ppp y PRP. Cuando se administra cloruro cálcico a las fracciones se obtiene la coagulación del gel, las plaquetas se agregan y se degranulan. Este gel posee todas las proteínas plaquetarias y una concentración de fibrinógeno disminuida pero las propiedades son similares al gel de fibrina.¹⁹⁷

En 1995 el Dr. Anitua describe la técnica de extracción y uso del plasma rico en factores de crecimiento. La estrategia se basa en la utilización de las plaquetas por:

- Ser un vehículo portador de numerosos factores de crecimiento y proteínas
- Las plaquetas controlan las fases iniciales de los procesos de cicatrización
- Los productos que producen tienen un importante papel en la biología ósea

- Las plaquetas controlan la liberación de sus propios gránulos, favoreciendo el proceso de regeneración.

1.9.4 Protocolo de obtención del Plasma Rico en Factores de Crecimiento (Dr. Anitua ⁹)

El objetivo del Dr. Anitua es la obtención de un gel o coágulo rico en factores de crecimiento de fácil utilización, sencillo de obtener que puede ser utilizado por todos los profesionales usando pequeños volúmenes de sangre del propio paciente. Es un producto autólogo, no tóxico y seguro.

Los factores de crecimiento han demostrado que pueden aumentar la proliferación y diferenciación de osteoblastos e incrementar la síntesis de matriz extracelular *in vitro* ²⁴³ De esta forma se decidió utilizar los teóricos beneficios de aportar una concentración elevada de factores de crecimiento a una zona lesionada. Los pasos para la obtención de un plasma rico en factores de crecimiento según el protocolo del Dr. Anitua:

1. Extracción de sangre del paciente momentos antes de comenzar la cirugía
2. Aislar sangre en tubos estériles con citrato sódico al 3.8% como anticoagulante
3. Centrifugación con unos parámetros de 280 G durante 7 minutos a una temperatura ambiente
4. El plasma se separa mediante el pipeteado de las fracciones según su densidad
5. Aislamos la fracción más cercana a los elementos formes que es la que contiene la concentración más elevada de plaquetas.

6. Para formar el gel o coágulo se revierte el efecto del anticoagulante mediante cloruro cálcico al 10% (0.05 cc por cada cc de plasma rico)

1.9.5 Sistemas de obtención PRP

Existen en el mercado infinidad de sistemas desarrollados, con la característica común de ser muy simples en su manejo, rapidez de preparación, coste asequible y utilizar sangre autóloga en pequeñas cantidades. En el momento de escribir este trabajo conozco más de 12 sistemas de comercializados y probablemente existan más con modificaciones y mejoras. El sistema PRP-PRGF, utilizado en este trabajo con modificaciones, el AGF, PCCI, el GPS son los sistemas más utilizados en nuestro país. Los distintos sistemas de obtención del concentrado plaquetar poseen diferencias en las concentraciones de factores que consiguen obtener. Tabla II y III. En el mercado existen otros sistemas como el de Depuy©, Synfoni© etc. El matiz más importante que debe dar credibilidad a un sistema es la cantidad total de factores de crecimiento útiles, activos y con potencial de acción, que aporta a la zona lesionada. Matiz complejo de valorar. Existen diversos sistemas comercializados para la obtención de FC a partir de plasma rico en plaquetas (PRP). En un artículo publicado por López-Oliva y cols.¹⁴⁶ revisan los 4 sistemas conocidos en ese momento y concluyen que las diferencias entre ellos estriban en pequeños matices, pero que todos ellos comparten la eficacia a la hora de obtener estos FC. Anitua en el año 2001⁸ publica una descripción detallada de uno de los métodos. Someramente, se recoge la sangre en tubos con citrato sódico al 3,8% como anticoagulante. Tras centrifugar la sangre, se procede a separar las fracciones plasmáticas pipeteando 500 micras cada vez hasta un total de 3 o 4, dependiendo del hematocrito del paciente. Las últimos 500 micras, inmediatamente por encima de las series blanca y roja, es la fracción más rica en

plaquetas. Las plaquetas de la fracción plasmática de interés son luego activadas añadiendo cloruro cálcico al 10%, procediéndose seguidamente a aplicar en el tejido.

Tabla.III. Valores leucocitarios y plaquetarios del gel de plaquetas. Concentración de los factores más importantes. Comparación de dos sistemas de obtención del concentrado plaquetar.²⁷⁰

	Mínimo	Máximo	Media
Leucocitos (1000/μL)			
Sangre Periférica	4.36	8.95	6.42
PRP (sistema PCCS)	3.48	33.9	15.30
PRP (sistema Curasan)	5	55	33.15
Plaquetas (1000/μL)			
Sangre Periférica	173	709	269.0
PRP (sistema PCCS)	500	4424	2232.5
PRP (sistema Curasan)	64	2510	1140.5
TGF-β1 (ng/mL)			
PCCS	151	4523	467.1
Curasan	36	149	79.7
PDGF-AB (ng/mL)			
PCCS	64	747	251.8
Curasan	188	610	314.1
IGF-I (ng/mL)			
PCCS	45	146	91.0
Curasan	45	105	69.5

1.9.6 Mecanismo de acción del PRP

Los pegamentos de fibrina se vienen utilizando desde hace décadas en los campos de la Cirugía General, de la Traumatología y de la Cirugía Oral y Maxilofacial con el fin de promover una función osteoconductora, sellante y hemostático. Posteriormente, varios autores utilizaron los concentrados a base de PRP en injertos orales y maxilofaciales, con el fin de obtener la fibrina de manera autóloga, activando el PRP con trombina bovina. Observaron que además del beneficioso efecto osteoconductor que aportaba la fibrina, existía un aporte de FC beneficioso para la curación ósea Marx 1988.¹⁶¹

Los FC contenidos en diferentes tipos celulares y en la matriz extracelular (MEC), regulan diversos procesos celulares, como son la mitogénesis, quimiotaxis, diferenciación y el metabolismo celular.^{75, 87, 246} Numerosos estudios han mostrado que el PDGF (factor de crecimiento derivado de las plaquetas), VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular), TGF- β (factor de crecimiento transformante beta), bFGF (factor de crecimiento fibroblástico básico) e IGF-I (factor de crecimiento insulínico 1) se hallan en el PRP y, la aplicación local de FC es usada para promover la curación de los tejidos.^{10, 236} Los FC liberados de las plaquetas activadas inician y modulan la curación de lesiones tanto óseas como de partes blandas⁷¹, induciendo una diferenciación celular acelerada y produciendo un tejido bien organizado, incluso en lesiones que previamente eran consideradas como intratables.⁴⁶

Los FC de las plaquetas están en concentraciones y proporciones normales, lo cual resulta en una mayor y más efectiva interrelación. Esto distingue al PRP de los FC recombinantes, los cuales se aplican en solitario en dosis habitualmente suprafisiológicas. En este sentido en heridas cutáneas se ha observado que es más efectiva la combinación de FC que la acción independiente de cada una ellas sobre la curación de las mismas. Así, la combinación PDGF-2 e IGF-I o bien la de PDGF-2 y TGF- α es más

efectiva que la de cada uno de ellos.¹⁵⁰ Es sabido que en la regeneración ósea, PDGF y TGF- β tienen un fuerte efecto sinérgico quimiotáctico sobre los osteoblastos humanos.⁴⁸

1.9.7 Utilización experimental^{1,2} y clínica de los Factores de Crecimiento no BMPs y el PRP

Los FC pueden estimular la formación y la curación ósea, y estos resultados los hacen candidatos para su uso en cirugía ortopédica. En la regeneración ósea, PDGF y TGF- β son los factores más importantes. PDGF induce la proliferación de células mesenquimales indiferenciadas, angiogénesis y activación de macrófagos.^{96, 200, 220} También incrementa la regeneración ósea en conjunción con otros FC, tales como IGF-I y TGF- β . La TGF- β puede incrementar la quimiotaxis y mitogénesis de los precursores de los osteoblastos, e inhibe la reabsorción ósea. Marx y cols.^{161, 162} publicaron que el PRP acelera la reparación ósea debido a las altas concentraciones de PDGF, TGF- β . Slater y cols en 1995²⁴³ demostraron, usando PRP la actividad proliferativa y funcional de células similares a osteoblastos fetales humanos.^{119, 282}

Actualmente la utilización clínica de estas sustancias se realiza en los siguientes campos de la cirugía:

1. Odontología y Cirugía maxilofacial. Tal vez es en este campo donde mayor utilización y repercusión ha causado la utilización de este producto. Numerosas publicaciones han demostrado la capacidad de estimulación periodontal en modelos animales combinando distintos factores de crecimiento.^{150, 151, 215, 216, 223} Marx publica unos resultados excelentes para regenerar hueso en autoinjertos con PRP 1998.¹⁶² Existen numerosos trabajos en cirugía maxilofacial con resultados muy positivos.^{111, 112, 167, 187, 245, 249} En Las últimas series publicadas de utilización no han demostrado de

forma fehaciente su utilidad, ^{58, 54, 72, 73, 127, 201} tampoco demuestra que el PRP ayude al autoinjerto en la regeneración. Sanchez y cols. ²¹⁹ afirmaron que la adición de PRP a un aloinjerto en mandíbulas de perro no aumentaba de forma significativa el grado de maduración.

2. Cirugía Plástica y Dermatología ¹⁴⁹. En este campo es donde los resultados son más convincentes. Knighton en 1988 ¹³⁰ desarrolló un ensayo clínico en humanos en el que demostró la capacidad para la curación de heridas. Muchas publicaciones existen sobre la efectividad en la curación de heridas y úlceras en pacientes diabéticos. En heridas de extremidades inferiores se demostró una correlación directa entre la cicatrización de las mismas y el inicio de la terapia con estos. ^{131, 133}

3. Cirugía Ortopédica y traumatología. No existe ninguna publicación con suficiente nivel de evidencia para aportar conclusiones. Existen numerosas comunicaciones, resúmenes a congresos, ponencias y carteles científicos. En la literatura encontramos estudios en animales utilizando el factor de crecimiento derivado de las plaquetas de forma aislada. Nash en 1990 ¹⁷⁸ no demostró en osteotomías tibiales de conejo que aumentara la resistencia mecánica. Existen otras publicaciones en animales pero sin resultados positivos. Sin embargo existe un auge espectacular en la utilización de la combinación de factores de crecimiento

Se han descrito diversos efectos beneficiosos tras la administración de factores de crecimiento plaquetario. Así, se ha visto un descenso en la necesidad de drenajes e incidencia de complicaciones (reducción en la tasa de infecciones) y en el número de días de hospitalización en pacientes de cirugía plástica. Se han descrito también ciertas propiedades antiinflamatorias con reducción del edema y equimosis, y hemostáticas, siendo efectivo para parar el sangrado difuso capilar en las heridas y disminuir sangrados en cirugías mayores.

En cirugía de rodilla la inyección de PRP autólogo puede facilitar la reconstrucción del ligamento cruzado anterior (LCA).²²³ También es útil en el anclaje del cartílago articular humano. Así, los autores describen un caso de reanclaje de un fragmento condral mayor de 2 cm mediante técnica artroscópica con la ayuda del PRP. Los autores encuentran una curación completa y acelerada, a pesar del pobre pronóstico inicial. El resultado funcional fue igualmente excelente.²²⁰ Se han publicado resultados recientes con mejoría de fracturas en pie y tobillo en pacientes diabéticos.^{84, 85, 95, 158}

Recientemente Anitua y cols.⁹ estudiando el efecto del PRP sobre células de tendón cultivado, encuentran un incremento en la proliferación de estas células, las cuales, además, sintetizan VEGF, y éste en un sistema *in vivo*, presumiblemente promoverá la neoangiogénesis.⁶

En cirugía de columna los resultados son contradictorios.^{25, 45, 60, 101, 113, 147, 274} Esta técnica está siendo usada en pacientes que van sufrir una fusión espinal lumbar. Tras observar regeneración ósea alrededor de los implantes de titanio, se hipotetiza que las plaquetas liberan múltiples FC, los cuales poseen efectos quimiotácticos y mitogénicos sobre las células madre mesenquimales y sobre los osteoblastos, acelerando con ello la curación ósea.

Actualmente existe aplicación prácticamente en todos los campos de la cirugía, ya que puede utilizarse como sellante o cicatrizante. Por ejemplo ya existen artículos publicados sobre su utilidad en oftalmología.^{128, 186}

1.9.8 ¿Es Seguro utilizar el PRP?

No se han descrito problemas de salud tras la aplicación de esta técnica. Algunos factores limitantes han sido descritos, tales como elevados hematocritos o plaquetopenia. Es por ello que se necesitan nuevas

investigaciones que precisen el número óptimo de plaquetas necesarias. La concentración de plaquetas aumenta hasta 8 veces en la fracción plasmática rica en plaquetas respecto del recuento en sangre total, incrementándose consecuentemente la concentración de FC con el número de plaquetas. Existen autores que consideran que el número de plaquetas no está relacionado con la acción terapéutica, es más importante la calidad, como llega esa plaqueta al foco lesional tras el procesado.^{7, 31, 268, 270, 289} Existen artículos de revisión de protocolos que obtienen valores de plaquetas y concentraciones de factores de crecimiento muy dispares.¹⁶¹ Sin embargo, las concentraciones de estos FC puede variar de un paciente a otro. Además, algunos autores demuestran que el contenido de FC en los diferentes métodos para obtener PRP varía tremendamente, sugiriendo determinar si estos resultados conllevan un efecto biológico diferente.²⁷¹

Los factores de crecimiento se hallan sobre expresados en los tumores. En la literatura no existe ningún caso publicado que relacione al PRP o FC recombinantes aislados con tumores o degeneraciones displásicas. Recordemos que la acción fundamental de los factores de crecimiento es la mitogénesis no la diferenciación celular.^{104,160} Un estímulo de factores de crecimiento continuado puede obtener un resultado contrario al deseado^{50,108} Martínez-González en el año 2002²⁴⁰ demostró como la aplicación de PDGF-BB y IGF-I sobre la mucosa bucal displásica, no aumentaba el riesgo de degenerar en carcinoma.

2. OBJETIVOS DEL ESTUDIO

Los estudios experimentales diseñados para la realización de este estudio han intentado evaluar la actividad biológica y la capacidad inductora *in vivo* del plasma rico en plaquetas (PRP) en la reparación de un defecto óseo crítico. Se realizó el estudio en un modelo experimental animal fácilmente reproducible con validez de resultados ya demostrados en la literatura.

Los distintos métodos de obtención, la cantidad y la composición cualitativa del PRP, así como la forma de utilización y administración continúa siendo un tema de debate con publicaciones muy contradictorias. Pretendemos con nuestro estudio colaborar en el esclarecimiento sobre las posibilidades reales de acción del PRP.

Podemos decir que un resultado positivo podría reforzar el actual auge con gran demanda y no sin presión comercial que existe alrededor de una sustancia; segura, no tóxica, autóloga, fácil de producir y económica, abriendo la puerta a múltiples aplicaciones clínicas, algunas de ellas teóricas en estos momentos.

Los propósitos específicos de este estudio fueron:

- Valorar la capacidad osteoinductora del PRP en un defecto óseo crítico en un modelo animal.
- Evaluar la importancia de la concentración de plaquetas en la capacidad osteoinductora y actividad biológica del PRP.
- Utilización de los resultados obtenidos para el diseño de nuevos modelos experimentales continuando la línea de investigación iniciada.

3. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Para conseguir y alcanzar los objetivos definidos en este trabajo, hemos intentado demostrar las siguientes **hipótesis de trabajo**:

“La reparación de los defectos óseos críticos corticales y esponjosos metafisarios mediante la estimulación osteoinductora del PRP es cualitativa y cuantitativamente mayor que la reparación fisiológica. “

“La capacidad osteoinductora u osteopromotora del PRP es capaz de estimular de forma cuantitativa y cualitativa la reparación tisular en defectos óseos críticos corticales y esponjosos metafisarios. “

HIPÓTESIS (H_0) - hipótesis nula -

“La reparación de los defectos óseos críticos corticales y metafisarios mediante la estimulación osteoinductora del PRP aislado no es cualitativa ni cuantitativamente mayor que la reparación fisiológica. “

4. MATERIAL Y MÉTODO

Dado que en investigación básica para la reparación de defectos óseos no es posible realizar estudios en humanos, en nuestro trabajo empleamos un modelo experimental animal. En Cirugía, la experimentación animal se emplea fundamentalmente con tres fines:

1. Estudiar fenómenos fisiológicos o fisiopatológicos en el ámbito quirúrgico.
2. Desarrollar nuevas técnicas quirúrgicas
3. Adquirir y perfeccionar habilidades quirúrgicas

4.1 Modelo experimental. Animal de experimentación

Cualquiera de los tres elementos del modelo experimental debe estar **estandarizado** y ser **reproducibile**. Por ello, los animales a utilizar, los procedimientos quirúrgicos y los métodos de recogida de resultados deben estar perfectamente protocolizados.

Se entiende por modelo experimental al conjunto de:

- .- animal de experimentación
- .- maniobras realizadas en el animal
- .- métodos de recogida de datos y evaluación de resultados

Lagomorfos. Conejo¹⁹⁴

En nuestro trabajo experimental decidimos utilizar el conejo como animal de experimentación. Los conejos se incluyen dentro de la clase *mamifera*, orden *lagomorpha*, familia *leporidae*, género *oryctolagus*; **Oryctolagus cuniculis**. La American Rabbit Breeders Association recoge en su catálogo hasta 28 razas y alrededor de 70 variedades. Las razas de conejos más utilizadas son *New Zealand White (NZ)*, *American Dutch* (de menor tamaño que los NZ) y *California*, semejante a la NZ pero con las orejas, el hocico y las patas negras.

El cuerpo del conejo es redondeado, la cabeza alargada, provista de largas orejas, y su cola corta. Las patas posteriores son sensiblemente más largas que las anteriores. Las crías nacen ciegas, sordas y con escasa vitalidad. El esqueleto de los conejos es muy ligero (menos del 7% del peso total) en comparación con otros mamíferos (más del 13%). El corazón se encuentra situado en el centro de la cavidad torácica, ligeramente desviado a la izquierda, con la punta a nivel del tercer espacio intercostal a 1,5 cm de la línea media. No existe aorta anterior. El íleon de los conejos termina en una dilatación esférica, con su interior tapizado por glándulas de Peyer. El conejo produce gran cantidad de orina de color amarillo intenso, maloliente y es coprófago por ser incapaz de sintetizar algunas vitaminas que se encuentran en las heces. Otro dato anatómico característico es la presencia del llamado "tercer párpado" o "párpado cartilaginoso", que se encuentra en el ángulo interior de la órbita, por debajo de los dos normales.

Se decidió utilizar el conejo en nuestro estudio por tener este animal un modelo documentado; elevada disponibilidad; fácil acceso quirúrgico a la tibia y peroné, buena tolerancia a los medicamentos empleados y escasos riesgos anestésicos.

Tabla IV. Características generales del animal de experimentación. *Oryctolagus cuniculis*.²⁹⁰

Requisitos Ambientales	
Temperatura (°C)	15-21
Humedad relativa (%)	50-60
Ventilación	5-15
Dimensiones mínimas	
Adulto alojado (m2)	0.14-0.36
Animal reproductor con crías (m2)	0.30-0.50
Grupo (m2 adulto)	
Altura mínima (cm)	30-40
Parámetros Fisiológicos	
Peso adulto (kg) macho	1-15
hembra	1-15
Esperanza de vida (años)	5-6
Frecuencia cardiaca (lpm)	130-320
Frecuencia respiratoria (rpm)	30-60
Temperatura corporal (°C)	38.5-39.5
Consumo de comida (g/100g/día)	5
Consumo de agua (mL/100/día)	10
Parámetros sanguíneos	
Hemoglobina (g/100 mL)	12
VSG (mm)	
1h / 2h / 24h	1-3 / 2.5-4 / 25-50
Tiempo de sangría (minutos)	1
Tiempo de coagulación (minutos)	5-8
Eritrocitos ($\times 10^6 / \text{mm}^3$)	5.5 – 6.5
Leucocitos ($\times 100 / \text{mm}^3$)	80-150
Neutrófilos (%)	45
Eosinófilos (%)	1

Basófilos (%)	2
Linfocitos (%)	50
Monolitos (%)	3
PLAQUETAS (miles / mL)	240
Parámetros Bioquímicos	
Glucosa (mg/100 mL)	78-155
Colesterol total (mg/100mL)	20-83
Albúmina (g/100 mL)	2.5 – 4
Cloruros (mEq/L de suero)	92 – 112
Fósforo inorgánico (mEq/L de suero)	2.3 – 6.9

4.2 MATERIAL

4.2.1 Modelo Experimental ¹⁷⁹

En el presente trabajo hemos seleccionado como modelo de experimentación animal al conejo por: (Fig. 9)

- Un modelo experimental ampliamente utilizado y documentado en la literatura. ^{81, 250}
- Elevada disponibilidad.
- Fácil acceso quirúrgico al peroné y la tibia
- Un manejo postoperatorio no complicado con muy buena tolerancia a los medicamentos escasos riesgos anestésicos.

En la presente Tesis Doctoral se realizó la prueba creando dos defectos óseos uno cortical en peroné y uno metáfiso-diafisario proximal de tibia de conejo descrita por An en 1990 ⁴, modelo en el que se crea un

defecto óseo cavitario de 6 mm. de diámetro centrado en la metáfisis proximal de tibia animal de experimentación y un defecto óseo de 6 mm en diáfisis de peroné. ¹²¹

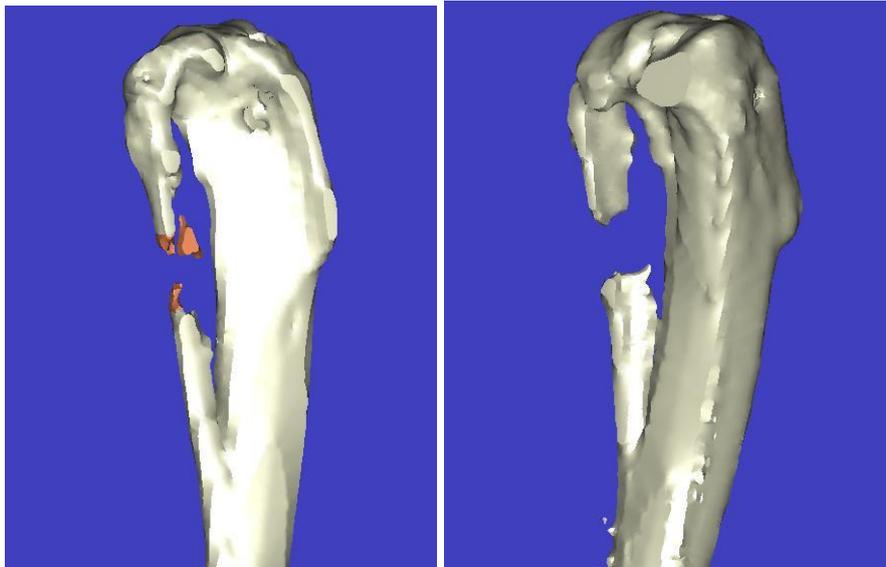


Fig. 8. Imagen de los defectos creados

4.2.2 Animales de Experimentación

Se emplearon 30 conejos machos albinos de la raza Nueva Zelanda (*Oryctolagus Cuniculi*), con un peso comprendido entre 3.500 y 4.000 gramos y una edad entre 4 y 6 meses, para contar con individuos adultos con sus cartílagos de crecimiento cerrados. De estos especímenes debemos restar dos por eliminación; uno por fallecimiento en el postoperatorio inmediato y otro que presentó una infección. La intervención quirúrgica de los animales se realizó en el Laboratorio de Cirugía Experimental de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia.

4.2.3 Manejo Ético de los Animales

Este estudio de investigación experimental se ha llevado a cabo según la ética experimental animal y cumpliendo toda la legislación vigente actual. La manipulación de los animales con fines experimentales viene regulada por normativas europeas, nacionales y autonómicas:

- Europeas:

Directiva 609/1986 del Consejo de las Comunidades Europeas

Directiva 2003/65 del Parlamento Europeo que modifica la anterior

Convenio Europeo sobre protección de animales vertebrados usados con fines experimentales

- Nacionales:

Real Decreto 223/1988 sobre Protección de Animales de Experimentación

- Locales:

Ley 4/1994 de la Comunidad Autónoma Valenciana de Protección de los animales domésticos.



Fig. 9. Conejo macho de raza albina Nueva Zelanda

4.2.4 Gel Plaquetario

En este trabajo de tesis se utilizaron dos tipos de implantes o geles con factores de crecimiento que corresponden a:

- 1.- Plasma pobre en plaquetas (ppp)
- 2.- Plasma rico en plaquetas (PRP)

4.2.4.1 Preparación de los Geles

Se realizó la extracción de 10 cc de sangre venosa del pabellón auricular vena marginal de la oreja (Fig. 11) mediante una aguja de 21G. Los 10 cc de sangre se almacenaban en tubos estériles anticoagulantes con citrato sódico al 3.8% de 2 ml. Cuatro tubos 8 cc pasaron al proceso de centrifugado para preparar los plasmas de plaquetas, 2 cc se utilizaron para medir el número de plaquetas en sangre periférica.

1º Plasma pobre en plaquetas (ppp)

Para obtener un plasma pobre en plaquetas se realizó el centrifugado de cuatro tubos (8 cc) durante 8 minutos a 280 G.⁹ El plasma se separaba de los elementos formes. Este plasma lo podíamos dividir en tres fracciones siendo las dos primeras pobres en plaquetas. Estas fracciones las separábamos mediante pipeteado meticuloso y se aislaban en un tubo de ensayo para utilizar en la cirugía. Se tomaba una pequeña muestra para realizar recuento de plaquetas. Una vez preparada la cantidad de plasma se procedía a la activación mediante cloruro cálcico al 10% para obtener el gel y depositarlo en los defectos óseos de peroné y tibia derecha.

2º Plasma Rico en plaquetas (PRP)

Para obtener un plasma rico en plaquetas se realizó el centrifugado de cuatro tubos (8 cc) durante 8 minutos a 280 G.⁹ El plasma se separaba de los elementos formes. Este plasma lo podíamos dividir en dos fracciones

siendo la primera pobre en plaquetas. Estas fracciones las separábamos mediante pipeteado meticolosa se aislaba y se desechaba. La segunda fracción de plasma se sometía a un doble centrifugado de las mismas características. Dividíamos el nuevo plasma obtenido aislando esta vez la fracción más profunda para obtener un PRP. Se tomaba una pequeña muestra para realizar recuento de plaquetas. Una vez preparado la cantidad de plasma, se procedía a la activación mediante cloruro cálcico al 10% para obtener el gel y depositarlo en los defectos óseos de peroné y tibia derecha.

La extracción de sangre se realizó antes de administrar cualquier fármaco anestésico y antibiótico profiláctico al animal. La preparación del gel se realizó al unísono con la cirugía.

4.2.5 Grupos de Trabajo

Se intervinieron quirúrgicamente 30 conejos, con un total de 60 tibias y 60 peronés distribuidos en 3 grupos. Fueron útiles para el estudio 28 conejos. Estos se distribuyeron en dos grupos de 14 tibias cada uno, y un grupo de 28 tibias (controles), los que a su vez se han dividido en 3 subgrupos de 4, 6, 4 ejemplares, conformando un total de 9 subgrupos, en función del implante recibido y el tiempo de estabulación previo a la eutanasia.

4.2.5.1 Grupo ppp

Este grupo lo conformaron las 14 tibias y peronés (derechos) en las que se implantaron, en los defectos óseos, un plasma pobre en plaquetas. De ellos, a 4 animales se les realizó la eutanasia a las 8 semanas (subgrupo ppp - 08), a 6 a las 12 semanas (subgrupo ppp -12) y 4 a las 16 semanas (subgrupo ppp- 16).

4.2.5.2. Grupo PRP

Estuvo formado por 14 ejemplares (derechos) que han recibido como implante en los defectos óseos un plasma rico en plaquetas. También se dividió en 3 subgrupos de 4, 6 y 4 ejemplares, uno al que se realizó eutanasia a las 8 semanas (subgrupo PRP - 08), el otro a las 12 semanas (subgrupo PRP - 12) y otro a las 16 semanas (subgrupo PRP - 16).

4.2.5.2. Grupo Control C

Este grupo estuvo representado por las tibias y peronés izquierdos de los especímenes. Estos defectos óseos no recibieron ninguna sustancia que pudiese actuar como tratamiento, lo que nos configuró un grupo control positivo, por cuanto se considera que este defecto crítico, no ofrecía la capacidad de curación fisiológica.

Este grupo estuvo formado por las 28 tibias que no han recibido ningún tratamiento en los defectos óseos. Este grupo lo subdividimos en tres subgrupos de 8, 12, 8 ejemplares. Al primero se realizó la eutanasia a las 8 semanas (subgrupo C-08), otro a las 12 semanas (subgrupo C-12) y el último a las 16 semanas (subgrupo C-16).

4.2.6 Identificación de los Animales

Los animales se identificaron con un número y las siglas ppp o PRP . De esta manera, se denominaron como ppp las tibias y peronés que han recibido ppp y PRP las otras. Además se añadía Derecha o izquierda para diferenciar las tibias experimentales y controles.

A lo anterior, se agregaron dos cifras numéricas que señalan el tiempo de estabulación y el número correlativo del ejemplar. Esta denominación se mantuvo posteriormente en las piezas recogidas para el estudio radiológico, axial tomográfico e histológico.

Tabla V. Diseño experimental. Número de animales utilizados en cada grupo experimental.

	Semanas		
	8	12	16
Control	8	12	8
Concentrado plasmático pobre en plaquetas (PPP)	4	6	4
Concentrado plasmático rico en plaquetas (PRP)			

4.3 MÉTODO

4.3.1 Manejo Preoperatorio

Todos los animales admitidos para cirugía experimental se evaluaron rigurosamente, para corroborar que se encontraban en buenas condiciones generales, seleccionándose los ejemplares con un peso comprendido entre 3.500 y 4.000 gramos y una edad entre 4 y 6 meses. Peso medio (3.800± 150 gramos)

4.3.2 Estabulación de los animales

Los animales fueron cuidados y mantenidos en el Estabulario de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia, bajo condiciones ambientales de temperatura entre 18 y 25 °C y una humedad entre 50.0 y 70.0 %. El régimen alimentario estándar fue liofilizado, con un contenido de 16.5 % de proteína pura, 13.5 % de fibra, 1.2 % de calcio, 0.65 % de fósforo,

enriquecido con 10.000 UI de vitamina A y 2.000 UI de vitamina D3 por cada kg. de comida. Se administró agua a demanda. Los animales ingresaron al estabulario una semana antes de la intervención quirúrgica, período en que permanecen en cuarentena, para su adaptación.



Fig. 10. Detalle de las instalaciones con las jaulas del estabulario. Administración de agua y comida.

4.3.3 Anestesia

Se llevó a cabo con la combinación de tres fármacos que se administran por vía subcutánea.¹⁹⁴

- Hidrocloruro de Ketamina (Ketostop ®), en dosis de 35 mg/kg de peso.
- Acepromazina Maleato 1.0 % (Pacifor ®), en dosis de 1 mg/kg de peso.

Con estas dos drogas se consiguió una excelente anestesia y relajación del animal, cuyo efecto tuvo una duración entre 45 y 60 minutos.

4.3.4 Preparación Preoperatoria

Antes de comenzar la administración de fármacos para conseguir la anestesia se realizó la extracción de 10 mm de sangre venosa del espécimen. Se abordaba la vena dorsal auricular. Se rellenaban cuatro tubos de 2 ml sangre para el procesado expuesto anteriormente.

Se rasuró con máquina eléctrica la zona a intervenir, cara interna y externa de la zona distal del fémur y tibia proximal, luego se pinceló toda el área con una solución al 10.0 % de povidona yodada y se procedía a la cirugía con las máximas condiciones de esterilidad.



Fig 11. *Extracción de sangre previa a la cirugía. Rasurado de la zona de la cirugía.*

4.3.5 Profilaxis Antibiótica Preoperatoria

Se efectuó con Amoxicilina + Ácido clavulánico (Augmentine 500®) en dosis de 5 mg/kg de peso, por vía intramuscular al inicio del procedimiento de anestesia del animal.

4.3.6 Intervención Quirúrgica

Antes de comenzar la administración de fármacos para conseguir la anestesia se realizó la extracción de 8 mm de sangre venosa del espécimen. Se abordaba la vena dorsal auricular. Se rellenaron cuatro tubos de 2 ml

sangre para realizar el procesado expuesto anteriormente. Tras la administración de los fármacos descritos para la anestesia procedíamos a realizar la intervención quirúrgica.

Se procedió con el animal en decúbito supino sobre una tabla quirúrgica, con el campo quirúrgico delimitado por toallas estériles, perforadas y material desechable. Todo el instrumental y el material que se utilizó en la intervención quirúrgica fueron esterilizados previamente con horno de alta temperatura. (Fig. 12).

La intervención comenzaba con una incisión cutánea longitudinal de aproximadamente 2 cm. sobre la cara lateral de la tibia. Tras la incisión, se abrió la fascia muscular y se identificó el nervio ciático poplíteo externo y la musculatura extensora para acceder a la región diafisaria del peroné.

Posteriormente se desperiostizó la cara anterior y posterior del peroné. El punto central de la osteotomía se marcaba con un punzón y se realizaba un corte óseo con cizalla. Se realizó una medición de la osteotomía distal con el instrumento de calibración y la segunda osteotomía para crear el defecto diafisario en el peroné. (Fig. 18).

Una vez que se completaba el defecto cortical diafisario, se lavó con abundante suero fisiológico para eliminar *dehritus*, se limpió el área con una gasa para posteriormente colocar el gel plaquetario correspondiente, es decir, plasma rico en plaquetas o plasma pobre en plaquetas si se trataba de un peroné derecho. Los izquierdos se dejaban evolucionar sin tratamiento. (Fig. 19).

Posteriormente se suturó la fascia muscular con puntos separados de Dexon 3/0 y la piel con Vicril 3/0, sin dejar drenajes ni apósitos. Tras realizar la cirugía sobre la cara externa tibial y tomando como referencia la zona proximal de la cresta tibial y la rótula realizabamos una incisión de 1 cm en la piel de la región medial, posteriormente se escindía la fascia y periostio de la

tibia medial proximal. Con una fresa circular y de forma manual se creaba un defecto óseo en la cara medial de la tibia, se procedía a la limpieza abundante y relleno del defecto con PRP o ppp si se trataba de la tibia derecha. Las tibias izquierdas se dejaban evolucionar sin tratamiento. Se realizaba una sutura directa de la piel con puntos sueltos de Vikril 3/0.(Fig. 23).



Fig. 12. Instrumental quirúrgico completo utilizado en la realización de la cirugía.



Fig. 13. Detalle general de las brocas, fresas y escoplos utilizados para realizar las osteotomías y defectos óseos.

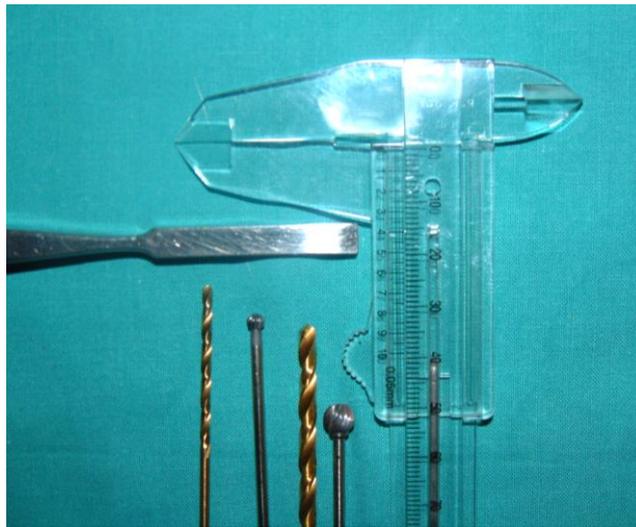


Fig. 14. Brocas, fresas y escoplos utilizados para realizar las osteotomías y defectos óseos.



Fig. 15. Preparación del campo quirúrgico y aseptización con povidona yodada.



Fig. 16. Preparación del campo quirúrgico con material desechable.

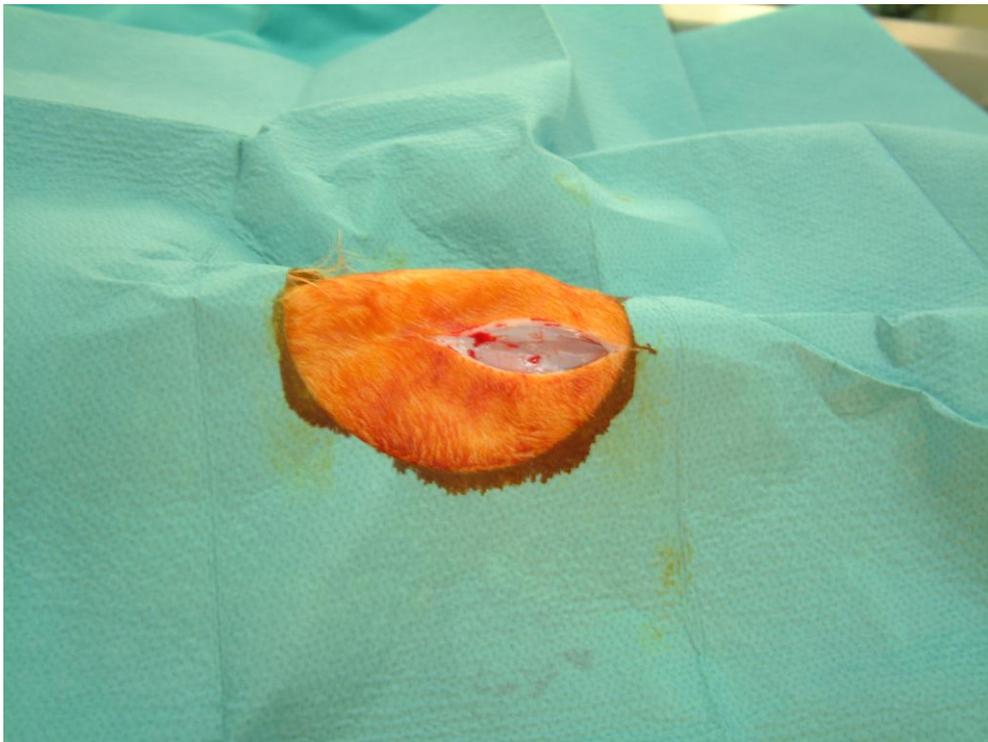


Fig. 17. Abordaje lateral de la tibia para acceder al peroné.

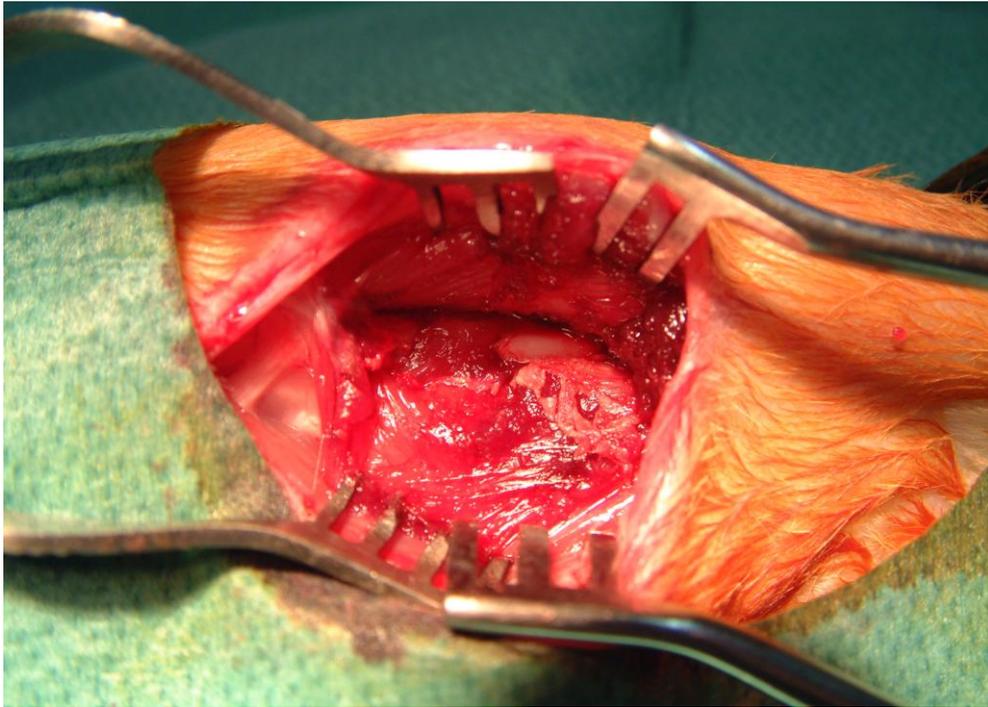


Fig. 18. Creación de un defecto de peroné.



Fig. 19. Administración y relleno del defecto de peroné con un gel de plaquetas.



Fig. 20. Abordaje medial de la tibia.

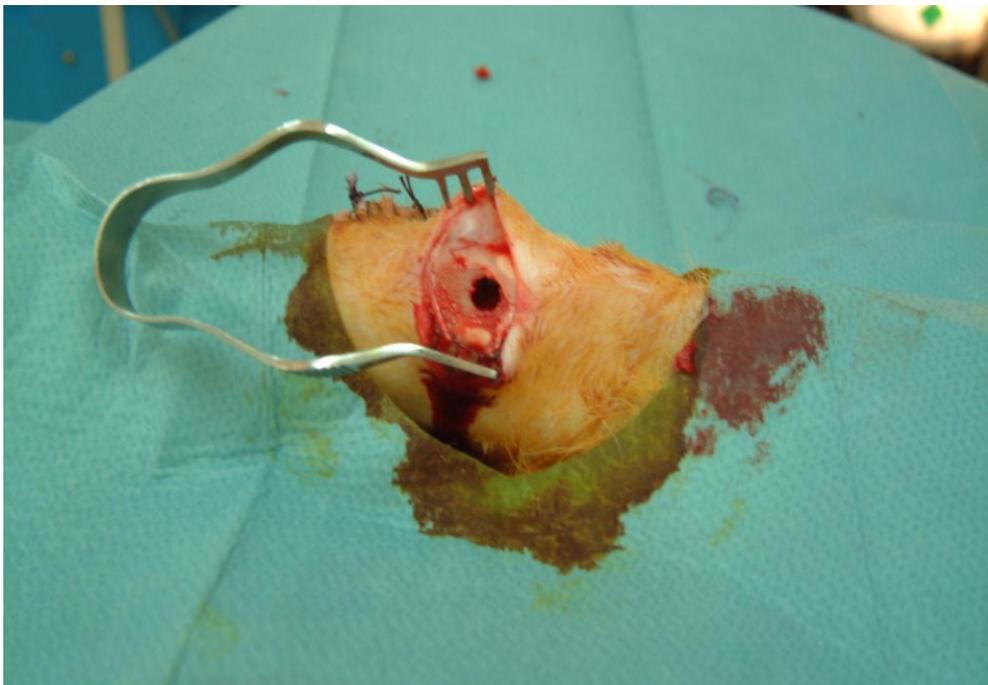


Fig. 21. Creación de un defecto metafisario proximal de tibia.

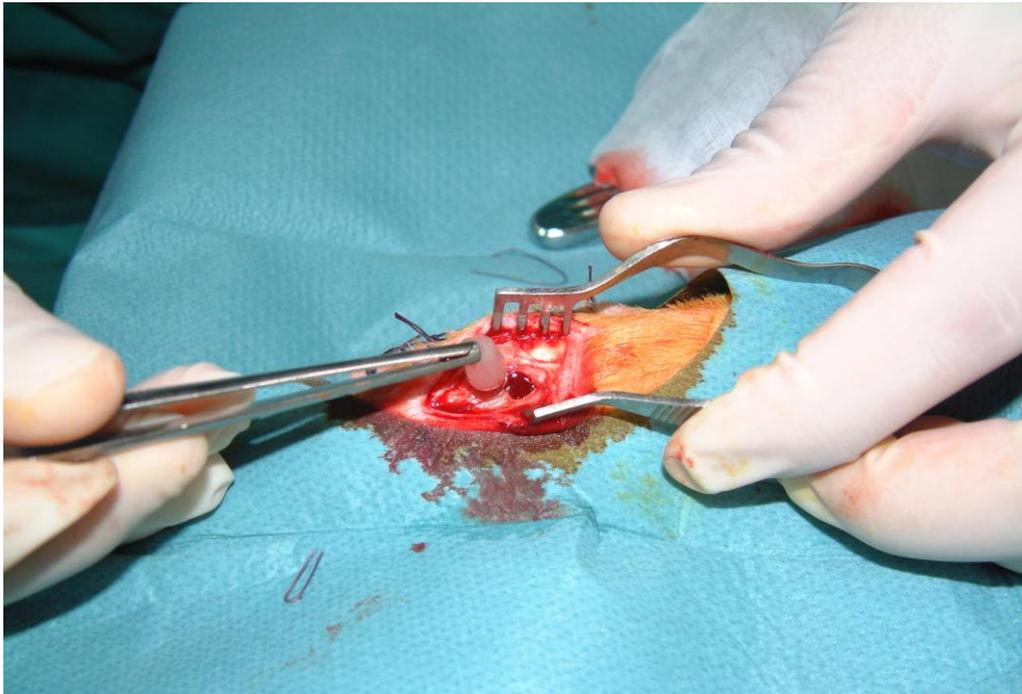


Fig. 22. Administración y relleno del defecto con un gel plaquetario

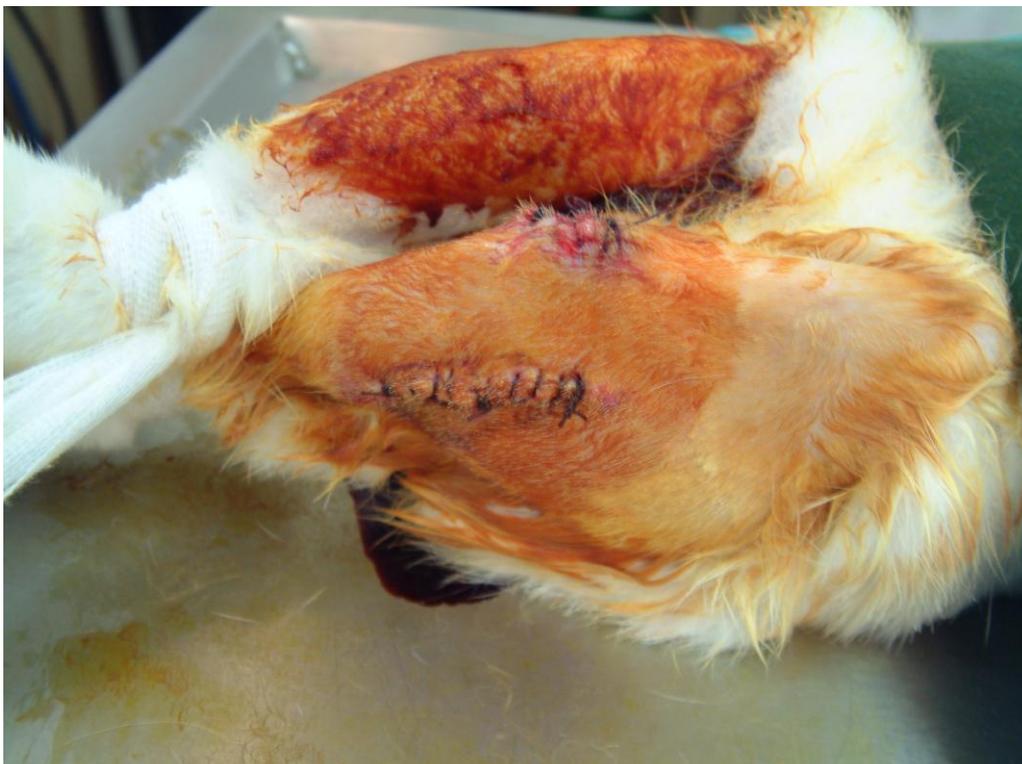


Fig. 23. Cierre cutáneo con puntos sueltos y aspecto final de las heridas

4.3.7 Manejo Postoperatorio

El conejo se situaba en su jaula individual inmediatamente después de la intervención, sin inmovilizar la extremidad. Cada jaula se identificó con la denominación del animal, la fecha de la intervención quirúrgica y la fecha de la futura eutanasia.

4.3.8 Analgesia

Se efectuaba con Metimazol (Nolotil 1.0 % ®) en dosis de 2 mg/kg de peso administrado por vía intramuscular, cuya primera dosis se colocaba al terminar la intervención quirúrgica y luego se administraba cada 24 horas hasta completar dos días.

4.3.9 Profilaxis Antibiótica Postoperatoria

Se utilizó Amoxicilina Clavulánico (Augmentine 1.0 % ®) en dosis de 2 mg/kg de peso administrado por vía intramuscular, cuya primera dosis se coloca al iniciar la intervención quirúrgica y luego se administra a las 24 horas.

4.3.10 Controles

Se evaluaba diariamente el consumo normal de agua y alimentos, el estado de la herida y la movilidad espontánea de la extremidad.

4.3.11 Estabulación Postquirúrgica

Los animales permanecieron en sus jaulas hasta completar su periodo de estabulación predeterminado, de acuerdo con el material con que han sido implantados o tratados y el grupo de estudio específico al que pertenecían.

4.3.12 Protocolo de Eutanasia

La eutanasia se realizó con el animal de experimentación previamente sedado con Clorhidrato de Xilazina 2.0 % (Xilazina ®), administrando una sobredosis endovenosa de Tiopental Sódico, solución al 2.0 %, 1 g. en 50 ml. de agua bidestilada (Pentothal ®) lo que provocaba el *exitus* por paro cardiorrespiratorio.

4.3.13 Recogida de las Muestras

Para la obtención de las muestras óseas se realizó un abordaje lateral longitudinal del muslo y pierna del conejo, extrayendo completamente la tibia por desarticulación a nivel de la rodilla y tobillo. Esta operación se realizaba de forma bilateral. Las piezas se almacenaban en frascos separados e independientes debidamente rotulados con formol al 2% durante 48 hrs.

4.3.14 Evaluación

Se realizó medición de la concentración plaquetaria en sangre periférica y en el gel según recuento en fresco en cámara Newbauer. Se expresa $10^5/\mu\text{l}$.

Cada espécimen era preparado para ser consecutivamente sometido a los estudios de imagen (radiológico, TAC) e histológico.

4.3.15 Estudio Radiológico

Una vez recogidas, las muestras óseas son llevadas a la Unidad de Radiología del Servicio de Radiodiagnóstico del Hospital Clínico y Hospital

Virgen del Consuelo, donde se realizaba el estudio radiológico y de TAC de la tibia y peroné.

4.3.15.1 Metodología

Cada tibia y peroné correspondiente a un animal de experimentación útil era sometida a un estudio radiológico frontal en un equipo Duo Diagnos de Philips ®. (Fig. 24).

Para mejorar la calidad de las imágenes, las radiografías se realizaban con una distancia focal de 100 cm., 42 KV, 36 mAs y empleando placas de mamografía de grano fino Min-R S de 18 x 24 cm. Kodak ®. Posteriormente, las radiografías eran digitalizadas y transformadas en negativo para facilitar la interpretación imagenológica.



Fig.24. Mamógrafo

En el presente estudio se analizaron las secuencias de imágenes en formato DICOM obtenidas por TAC de tibias de conejo en las que se había

provocado un doble defecto: a) resección segmentaria de 6 mm en peroné y b) defecto con broca de 6 mm en zona metafisaria.. Estas imágenes fueron obtenidas con el equipo de TAC del Hospital Virgen del Consuelo de Valencia (estación CTCC01, ProSpeed, General Electric), en modo helicoidal, con grosor de corte de 1 mm, resolución de imagen de 512 X 512 píxeles a 16 bits.(Fig. 25).

Las secuencias de imágenes fueron procesadas mediante un programa de tratamiento de imágenes de TAC y RMN (Mimics, versión 8.11, Materialise n.v.) que permite el análisis de este tipo de secuencias de imágenes, facilitando la reconstrucción tridimensional de las muestras y su posterior análisis tanto de variables geométricas como densitométricas.



Fig.25. Instalaciones y estación de trabajo de la TAC.

4.3.15.2 Escala de Valoración

Radiológica

La utilización de aumentadores óseos basados en factores de crecimiento no provocan un aumento de la densidad ósea radiográfica. Sólo se puede considerar que existe formación ósea cuando se observa la aparición de trabéculas. También se debe tomar en consideración que la mayoría de los estudios destacan la falta de correlación entre los resultados histomorfométricos.

En este trabajo de investigación experimental la valoración radiológica se efectuó empleando los criterios para la formación ósea descritos por Lane y Sandhu en 1987.¹³⁷

Tabla VI. Criterios de Lane y Sandhu para la valoración radiológica.

Formación ósea	Puntuación
<i>No hay formación ósea</i>	0
<i>Formación ósea en el 25 % del defecto</i>	1
<i>Formación ósea en el 50 % del defecto</i>	2
<i>Formación ósea en el 75 % del defecto</i>	3
<i>Formación ósea en todo el defecto</i>	4
Remodelación	Puntuación
<i>Sin Remodelacion</i>	0
<i>Remodelación aprecialble</i>	2
<i>Remodelación completa</i>	4

TAC

El estudio de TAC se realizó de la siguiente forma:

En el presente estudio se analizaron las 56 secuencias de imágenes en formato DICOM de tibias y peroné de conejo en las que se había provocado un doble defecto: a) resección segmentaria de 6 mm en peroné y b) defecto con broca de 6 mm en zona metafisaria. Estas imágenes fueron obtenidas con el equipo de TAC del Hospital Virgen del Consuelo de Valencia (estación CTCC01, ProSpeed, General Electric), en modo helicoidal, con grosor de corte de 1 mm, resolución de imagen de 512 X 512 píxeles a 16 bits.

Las secuencias de imágenes han sido procesadas mediante un programa de tratamiento de imágenes de TAC y RMN (Mimics, versión 8.11, Materialise n.v.) que permite el análisis de este tipo de secuencias de imágenes, facilitando la reconstrucción tridimensional de las muestras y su posterior análisis tanto de variables geométricas como densitométricas a partir del número de Hounsfield.

El procedimiento de trabajo con este programa fue el siguiente:

- Importar individualmente la secuencia de imágenes correspondiente a cada uno de los huesos analizados, manteniendo la compresión de imágenes de TAC.
- Segmentación y binarización de la secuencia de imágenes incluyendo los valores máximo y mínimo correspondientes al tejido óseo calcificado. Estos valores han estado comprendidos aproximadamente entre 225 y 3000 niveles del número de Hounsfield.

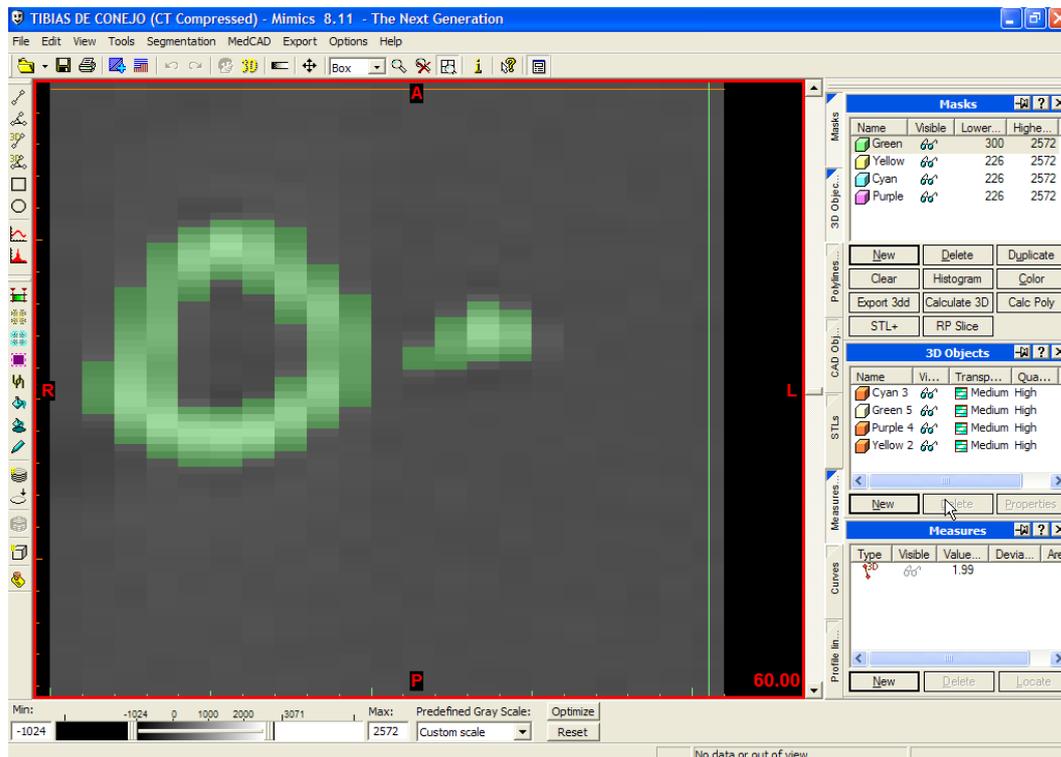


Fig. 26. Segmentación de una sección transversal de tibia en la que se ha binarizado (en verde) el tejido óseo calcificado. La imagen también muestra la interfase del programa Mimics.

- Utilización de algoritmos de morfología matemática (open, close, erode, dilate, etc.) para eliminar los artefactos no deseados de las imágenes.
- Reconstrucción tridimensional (modo de alta calidad) de la secuencia de imágenes binarizadas.
- Detección de las zonas de los defectos de peroné y metafisario.
- Análisis densitométrico del tipo de tejido que se encuentra en las zonas de ambos defectos para detectar la posible existencia de un tejido con densidad inferior a la del tejido óseo.
- Medida de las variables que se han analizado:
 - Altura y anchura del defecto metafisario.

- Densidad mineral del tejido regenerado en el defecto metafisario (expresado en número de Hounsfield)
 - Altura y volumen del defecto en peroné
 - Densidad mineral del tejido regenerado en el defecto de peroné (expresado en número de Hounsfield).
- En los casos en los que existió tejido regenerado en el defecto de peroné se reconstruyó tridimensionalmente dicho tejido y se vinculó a la imagen completa de la tibia. La totalidad de las imágenes reconstruidas se incluyen en la galería de imágenes del apartado resultados

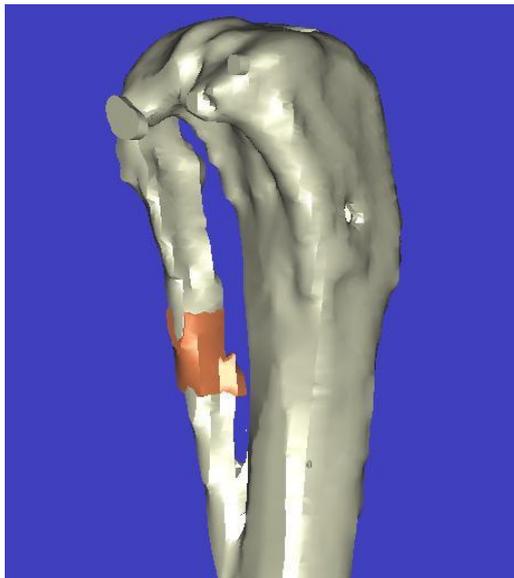


Fig. 27. Imagen tridimensional reconstruida en la que se aprecia el tejido regenerado en el defecto de peroné.

Los variables y los valores obtenidos de este estudio se agruparon de la siguiente manera:

- **A) Registros categóricos o discretos:** Se trata de las variables **tratamiento** con los valores; plasma pobre en plaquetas, plasma rico en plaquetas y control. La variable tiempo con los valores; 8 semanas, 12 semanas y 16 semanas
- **B) Registros cuantitativos:** Valores de las **variables geométricas** altura y anchura de los defectos generados en peroné y en metafisis tibial; y de la **densidad mineral** ósea del tejido regenerado en ambos tipos de defectos.

En este epígrafe se presentan los resultados cuantitativos de las siguientes variables analizadas:

- Recuento plaquetas en sangre periférica (miles / mL)
- Recuento plaquetas en concentrados plaquetarios (miles / mL)
- Altura del defecto metafisario tibial (en mm)
- Densidad mineral defecto metafisario tibial (mg/cm^3)
- Anchura del defecto metafisario (en mm)
- Altura del defecto de peroné (en mm)
- Volumen del defecto de peroné reparado (en mm^3)
- Densidad mineral defecto peroné (mg/cm^3)

La agrupación de resultados se ha realizado atendiendo por un lado al estudio de los distintos métodos de concentración plaquetaria (grupo control, concentrado plasmático pobre en plaquetas –ppp– y concentrado plasmático rico en plaquetas –PRP–) y, por otro, a la agrupación por período experimental (8, 12 y 16 semanas).

Se analizó la densidad mineral ósea (DMO, en mg/cm^3) en las zonas del defecto de peroné en las que apreciaba tejido regenerado. La DMO de dicho tejido regenerado se ha estimado a partir de los parámetros de calibración referidos por Homolka y cols. en su publicación de 2002 ¹⁰⁶ y se

asumió una correlación lineal entre el número de Hounsfield (NH) y la DMO, siguiendo la siguiente ecuación:

$$DMO \text{ (expresado en g/cm}^3\text{)} = a \times NH + b$$

Siendo $a = 0.760$ y $b = 2.8$

- **C) Nivel de regeneración:** Distribución de casos atendiendo al nivel de regeneración tisular (ausencia de regeneración, regeneración parcial y regeneración total) atendiendo a defecto en peroné y al defecto metafisario tibial. En todos los casos se presenta una agrupación de resultados por método de obtención del concentrado plaquetario (concentrado pobre en plaquetas y concentrado rico en plaquetas) y por período experimental (8, 12 y 16 semanas).

En el caso del **defecto de peroné**, el criterio de adscripción a los grupos fue el siguiente:

- Ausencia de regeneración: Defecto de tamaño superior a 6 mm.
- Regeneración parcial: Defecto de tamaño comprendido entre 6 y 1 mm.
- Regeneración total: Defecto de tamaño inferior a 1 mm.

En el caso del **defecto tibial**, el criterio fue:

- No regeneración: Cuando la distancia entre los extremos del defecto era ≥ 3 mm.
- Regeneración parcial: Cuando la distancia entre los extremos del defecto estaba comprendida entre 3 y 2 mm.
- Regeneración completa: Cuando la distancia entre los extremos del defecto era inferior a 2 mm.

- **D) Análisis de correlación bivariada** del recuento plaquetario entre sangre periférica y los dos tipos de concentrado plaquetario

4.3.16 Estudio Histológico

Tras completar el estudio radiológico (Rx y TAC) se procedió a cortar la tibia y el peroné, obteniendo un segmento óseo de aproximadamente 3 x 3 cm. de ancho que incluía las área de defectos óseos para proceder a la descalcificación y posterior procesado.

4.3.16.1 Descalcificación

La descalcificación se realizó sometiendo las muestras a inmersión en formol fórmico durante 15 días a un mes cambiando la solución a intervalos de 3-6 días. La descalcificación se comprobaba mediante estudios radiográficos periódicos. A continuación, las muestras eran procesadas para su estudio con técnica para hueso descalcificado realizando los pasos que siguen:

- Lavado de la pieza en agua destilada
- Deshidratación y preparación de la pieza para su inclusión en parafina siguiendo la siguiente metódica:

- | | |
|----------------------|---------|
| • Alcohol 50 grados | 2-3 hrs |
| • Alcohol 70 grados | 2-3 hrs |
| • Alcohol 90 grados | 2-3 hrs |
| • Alcohol absoluto 1 | 2-3 hrs |
| • Alcohol absoluto 2 | 2-3 hrs |
| • Alcohol absoluto 3 | 2-3 hrs |
| • Benceno 1 | 2-3 hrs |
| • Benceno 2 | 2-3 hrs |
| • Benceno 3 | 2-3 hrs |

- Parafina 1 (estufa a 60°) 6 hrs
- Parafina 2 6 hrs
- Parafina 3 6 hrs

- La pieza fue posteriormente incluida en bloques de parafina ("Paraplast") dejando en la superficie del bloque la zona con mayor interés histológico.

4.3.16.2 Cortes Histológicos

Los cortes histológicos de las muestras óseas útiles se realizaron con un micrótopo especial de deslizamiento de la casa LEITZ para obtener secciones de 5 µm. de espesor. Los cortes realizados fueron depositados en el portaobjetos, e introducidos en una estufa a 40° durante dos horas para posteriormente proceder a la tinción.

4.3.16.3 Tinciones

Cada uno de los cortes histológicos, correspondientes a un animal de experimentación, fueron teñidos con el método de hematoxilina-eosina y Tricrómico de Masson

4.3.16.3.1 Tinción de HEMATOXILINA-EOSINA

La hematoxilina es un colorante catiónico mientras que la eosina es un colorante aniónico perteneciente a los xantenos. Se teñirán los núcleos de azul, citoplasmas en rosa, músculo en tonos rojizos a rosados fucsia, glóbulos rojos en naranja o rojo y la fibrina en rosa intenso.

Esta técnica de tinción comprende el siguiente proceso:

- Hematoxilina de Harris durante 5 minutos.

- Lavado con agua corriente.
- Diferenciación con alcohol-ácido.
- Lavado con agua corriente.
- Inmersión en agua amoniacal.
- Lavado con agua corriente (10-20 minutos).
- Tinción con eosina a temperatura ambiente.
- Inmersión en alcohol al 95 % para eliminar el exceso de eosina.
- Deshidratación y montaje.

La tinción hematoxilina-eosina permitió observar el osteoide de color rosado pálido y el hueso mineralizado de color rosado oscuro.

4.3.16.3.2 Tinción TRICRÓMICO DE MASSON

El Tricrómico de Masson es una técnica para la coloración de fibras colágenas y elásticas. Se observan tres colores distintos; tejido conjuntivo de azul, tejido muscular de verde pardo, eritrocitos de rojizo, núcleos azul negro, citoplasma y fibras musculares rosa.

-Desparafinado. Estufa durante 30 min. a 60°. Sumergimos en xilol durante 10 o 15 min.

- Hidratación. Alcohol absoluto-5min. Alcohol 96°-5min. Alcohol 70°-5min.

- Lavar en H₂O destilada.
- Hematoxilina de Weigert 5 min.
- Lavar con agua corriente 10 min.
- Fucsina de Ponceau 5 min.
- Ácido fosfomolibdico 5 min.
- Ácido fosfomolibdico 5 min.

- Verde luz 5-7 min.
- Deshidratar. Alcohol de 70° Alcohol de 96°. Xilol.
- Montaje.



Fig. 28. *Imágenes de los especímenes obtenidos para realizar los estudios de imagen y posterior procesado histológico.*



Fig. 29. *Imagen de las muestras listas para iniciar el procesado histológico*

Análisis Histológico

Correspondió al análisis histológico cualitativo de los diferentes elementos que integran el tejido óseo, es decir, células y sustancia intercelular.

La fase de neoformación ósea es desarrollada por los osteoblastos que son los encargados de la síntesis de la fracción orgánica de la matriz ósea. La superficie que une el tejido óseo preexistente con el hueso neoformado se denomina superficie de inversión. La formación de hueso no es un proceso continuo, dado que experimenta interrupciones transitorias. El área que refleja este fenómeno recibe el nombre de superficie de interrupción y se identifica en los cortes histológicos como una línea basófila lisa.

El hueso neoformado se deposita en forma de matriz ósea no mineralizada y se denomina osteoide, la que posteriormente se calcifica transformándose en hueso maduro. La mineralización primaria comienza en la interfaz entre el osteoide y el hueso preexistente, mediante la formación de cristales de hidroxapatita a nivel de un plano que recibe el nombre de frente de mineralización.

La fase de reabsorción ósea es responsabilidad de los osteoclastos, que excavan el hueso formando las lagunas de Howship. La superficie de reabsorción que abarca cada osteoclasto recibe el nombre de dominio osteoclástico. La traducción histológica de todos los procesos que experimenta el hueso puede ser determinada estudiando las muestras óseas.

Medición Histológica

Dados los resultados observados en los estudios radiográficos simples, TAC y los datos aportados por la densitometría, de los especímenes antes de su procesado para estudio histológico, consideramos que un análisis cuantitativo mediante histomorfometría ósea no iba a aportar nuevos datos. Consideramos más interesante un análisis cualitativo, observando las

características del tejido neoformado, más fácil de analizar con el estudio histológico tras la descalcificación.

Para mejor interpretación de las imágenes histológicas se ha tomado como punto de referencia las imágenes radiográficas, buscando los puntos de regeneración para ver sus características y si el origen de la regeneración se localizaba fundamentalmente en los extremos óseos o en las partes circundantes y cuales eran las zonas de mayor osteogénesis.

En este sentido hemos realizado una interpretación individualizada de cada uno de los animales y sobre ello hemos sacado una valoración general y unas conclusiones.

4.3.16.4 Lectura Histológica

El estudio histológico se ha realizado en el Laboratorio de Microscopía del Departamento de Cirugía de la Universidad de Valencia, utilizando un microscopio óptico Zeiss ® Axioplan 2, conectado a una cámara digital Nikon ® DXM 1200 de 5.0 megapixels.

Este equipo permite la visualización y obtención directa de las imágenes



Figura 30. Imagen de la estación de trabajo y para el estudio microscópico de la histología.

4.3.17 Análisis Estadístico.

Para el análisis estadístico de los resultados radiológicos, y TAC obtenidos con la administración de los dos tipos de plasma plaquetario en comparación con el grupo control correspondiente al defecto óseo no tratado, se ha realizado un estudio con el programa estadístico preparado para el estudio de las ciencias sociales (SPSS 12.0). Los análisis que se han realizado son; descriptivos, análisis de regresión, pruebas U de Mann-Whitney, Kruskal-Wallis, Wilcoxon y Friedman y análisis de la varianza (ANOVA) para medidas repetidas, así como el análisis de correlación bivariada entre todas las variables densitométricas y geométricas analizadas y los parámetros de recuento plaquetario de la sangre periférica y del concentrado plaquetario obtenido con los dos métodos de extracción. El grado de significación utilizado fue del 95% ($p < 0,05$).

Los resultados recogidos del tratamiento de imágenes, son incorporados en una hoja de cálculo (Excel, Microsoft) donde se realizaron las gráficas descriptivas. Esta misma hoja de cálculo se exportó al programa de análisis estadístico (SPSS 12.0 Apache Software Foundation) y en el que se realizaron las gráficas de; diagrama de cajas, gráfica de barras e histogramas.

En el Anexo del capítulo resultados se incluyen las tablas completas de datos analizados.

4.3.17.1 Estadística descriptiva

Variables cualitativas

Las variables cualitativas, nominales y ordinales, se describen expresando el porcentaje de cada categoría. Hemos descrito las distintas escalas utilizadas según el grado de regeneración.

Variables cuantitativas

Las variables cuantitativas se describieron utilizando la media aritmética, mediana, la desviación estándar y los valores mínimo y máximo.

4.3.17.2 Estadística analítica

Pruebas de normalidad

Se efectúan las Pruebas de Kolmogorov-Smirnov y de Shapiro-Wilk y se rechazó el supuesto de normalidad con una $p \leq 0.05$. Cuando las variables fueron cuantitativas y siguieron una distribución normal, y no existieron evidencias significativas para rechazar la normalidad, se realizaron pruebas paramétricas.

Una vez no rechazada la normalidad se valoró y se observó el número de datos de la muestra. Si ésta fue menor de 30 ($n < 30$) no se utilizaron criterios de normalidad, pero si se observaron datos superiores a 30 ($n > 30$) pudimos aproximarnos a criterios de normalidad (con media y varianza, muestras independientes e idénticamente distribuidas – *Teorema central del límite* -)

Las distribuciones normales nos permitieron comparar variables utilizando la media y la varianza. En caso contrario se realizaron análisis con test no paramétricos.

Comparación de dos variables

Se han realizados análisis con test no paramétricos por no asumir normalidad y el pequeño número de datos. Se utilizó los test U- U de Mann-

Whitney (muestras independientes) y test de Wilcoxon (muestras dependientes)

Comparación de más de dos variables

Cuando la variable respuesta es cuantitativa y la variable estudio es categórica con más de dos medias o se realizó la comparación de más de dos variables o se utilizó la Prueba de Análisis de la Varianza (ANOVA), siempre que se asumía normalidad y en caso contrario se comprobó la dependencia o independencia de las variables y se utilizó la Prueba de Friedman (variables dependientes) y Kruskal-Wallis (variables independientes).

Estudios de correlación

Cuando las variables respuesta y estudio fueron cuantitativas se utilizó el coeficiente de Correlación de Pearson como medida de asociación lineal.

5. RESULTADOS

5.1 MEDICIÓN DE RESULTADOS SANGUÍNEOS. CINÉTICA DEL GEL

5.1.1 Plaquetas

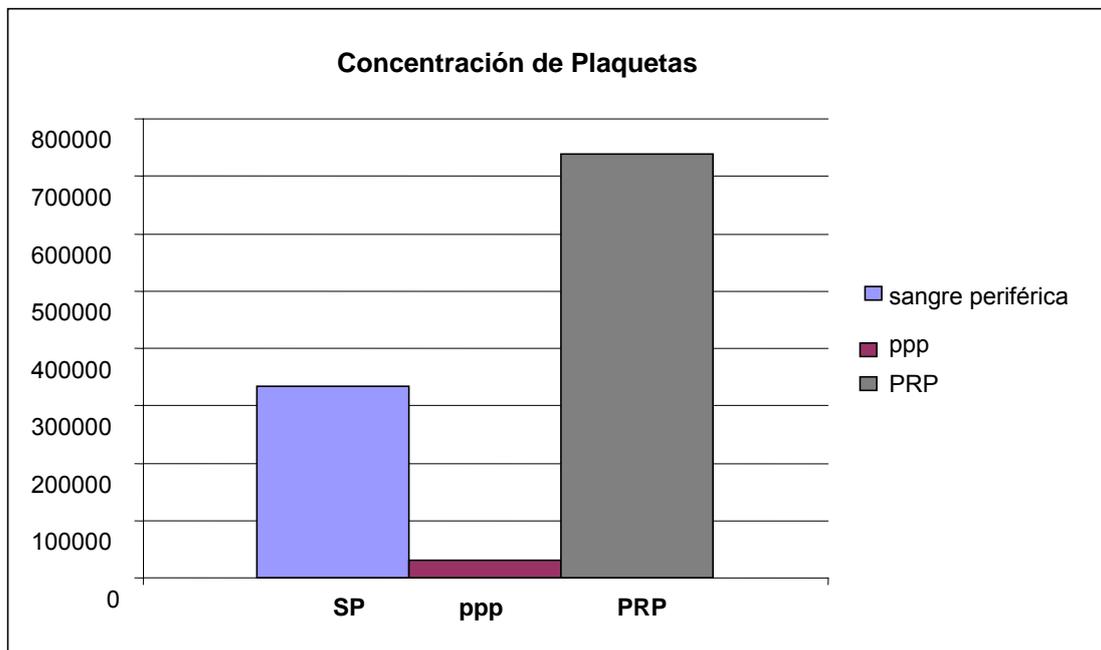
- El valor medio del número de plaquetas en sangre periférica fue de $344.533 /\mu\text{l} \pm 61.000$ [210.000 – 473000].

Grupo experimental ppp tratados con ppp

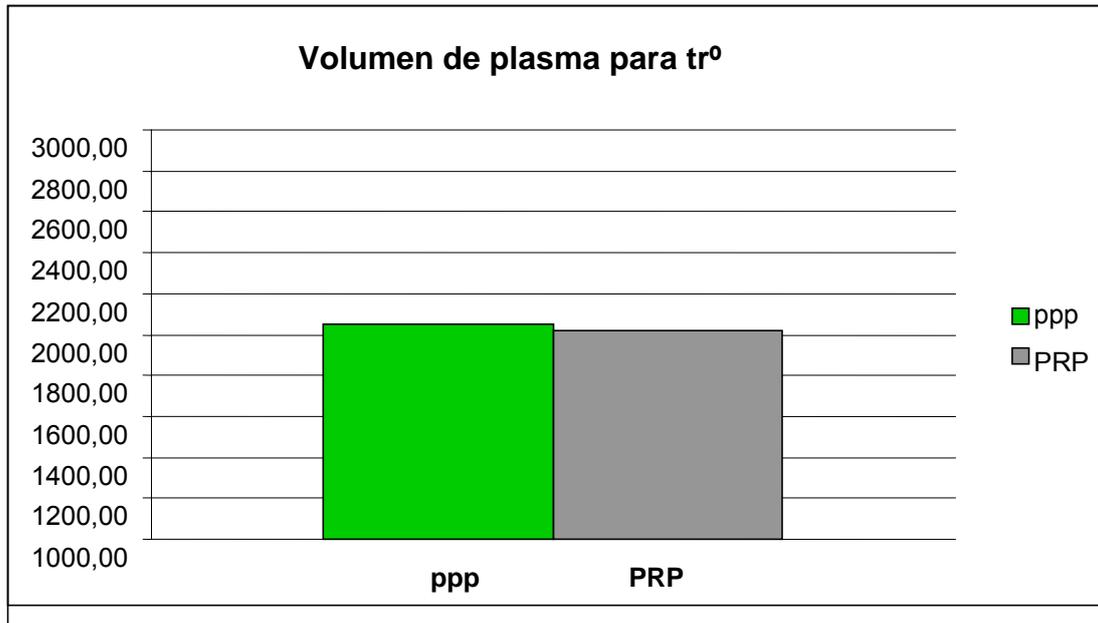
- El valor medio del número de plaquetas en el plasma pobre en plaquetas (ppp) fue de $36063 /\mu\text{l} \pm 8200$ [24000 – 56000]. Un 12% de la cifra en sangre periférica.
- El volumen medio de de ppp obtenido para tratamiento en los animales del grupo experimental tratados con ppp fue de $2053.00 \text{ cc} \pm 209.98 \text{ cc}$
- El volumen medio de ppp implantado en el defecto de peroné y tibial fue de 1026.50 ± 104.94

Grupo experimental PRP tratados con PRP

- El valor medio del número de plaquetas en el plasma rico en plaquetas (PRP) fue de 756143 / μ l \pm 37329 [695000 – 811000]. Un 205% de la cifra en sangre periférica.
- El volumen medio de de PRP obtenido para tratamiento en los animales del grupo experimental tratados con PRP fue de 2015.71 cc \pm 187.65 cc
- El volumen medio de PRP implantado en el defecto de peroné y tibial fue de 1007.86 \pm 93.82 cc



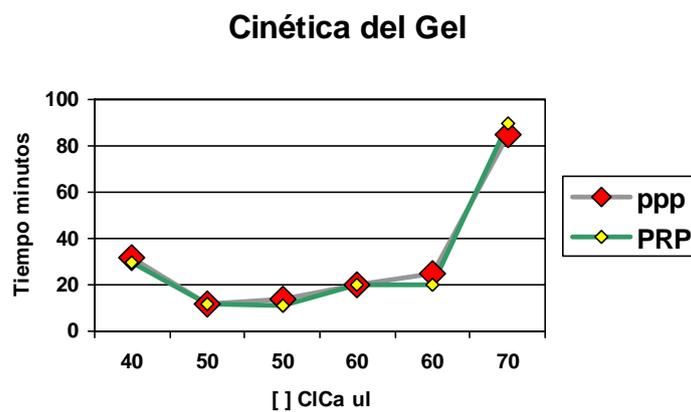
Gráfica 1. Concentración de plaquetas en sangre periférica, ppp y PRP en miles / μ l.



Gráfica 2. Volumen medio de gel utilizado en ambos grupos experimentales.

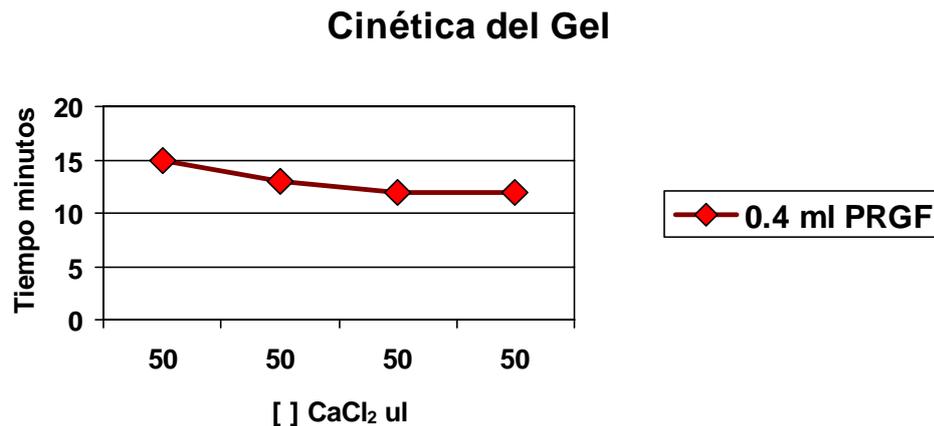
5.1..2 Cinética del Gel

Expresamos mediante una gráfica la relación tiempo concentración de cloruro cálcico para la formación del gel. Se utilizaron 0.4 ml de plasma activándolo con distintas concentraciones de CaCl_2 . Se describe la relación con el tiempo transcurrido hasta la obtención del gel. (Gráfica 3.).



Gráfica 3. Gráfica de la relación de la [] CaCl_2 con el tiempo.

En la gráfica 4 se describe el tiempo que precisaron distintas muestras de 0.4 cc de plasma para pasar a gel con una concentración constante de Cloruro Cálculo al 10% (CaCl_2)



Gráfica 4. Gráfica que expresa la relación de la [] CaCl_2 con el tiempo.

5.2 MEDICIÓN RADIOLÓGICA

Al final del capítulo exponemos unas tablas con los resultados obtenidos según las escalas de valoración.

Para nosotros, en nuestro trabajo la radiología no ha sido una técnica útil para extraer conclusiones sobre el proceso de regeneración ósea por:

- Dificultad para obtener proyecciones adecuadas en los dos planos
- Imposibilidad de valorar el defecto tibial

En nuestro trabajo la radiología nos sirvió de control para evaluar el estado de las muestras, descartar fracturas asociadas, calcificaciones extraóseas y punto de referencia para la descripción histológica.

5.3 MEDICIÓN TAC

Los resultados de este estudio se han agrupado de la siguiente manera:

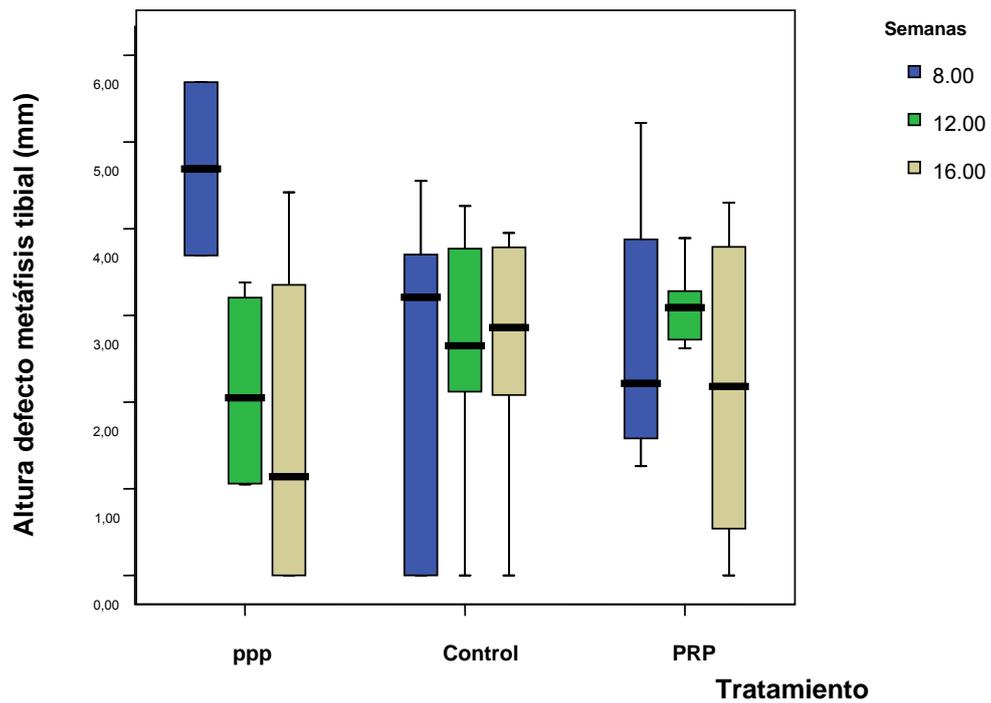
- Registros cuantitativos: Valores de las **variables geométricas** altura y anchura de los defectos generados en peroné y en metáfisis tibial; y de la **densidad mineral** ósea del tejido regenerado en ambos tipos de defectos.

5.3.1 Registros Cuantitativos

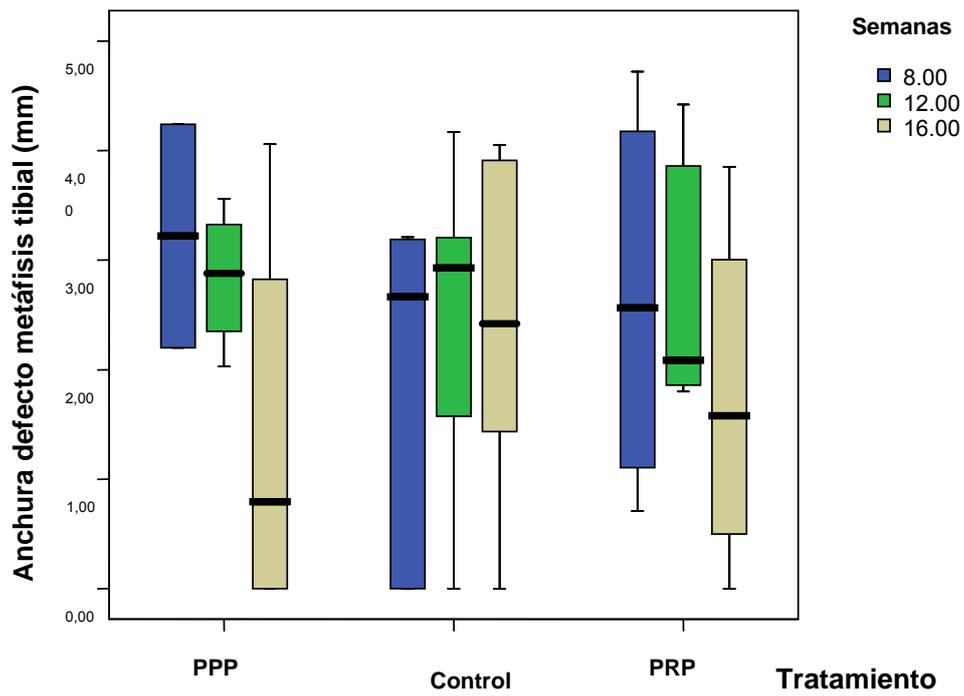
En este epígrafe se presentan los resultados cuantitativos de las siguientes variables analizadas:

- Altura del defecto metafisario tibial (en mm)
- Anchura del defecto metafisario (en mm)
- Volumen del defecto de peroné reparado (en mm³)
- Altura del defecto de peroné (en mm)
- Densidad mineral del defecto metafisario (N de Hounsfield)
- Densidad mineral del defecto de peroné (N de Hounsfield)

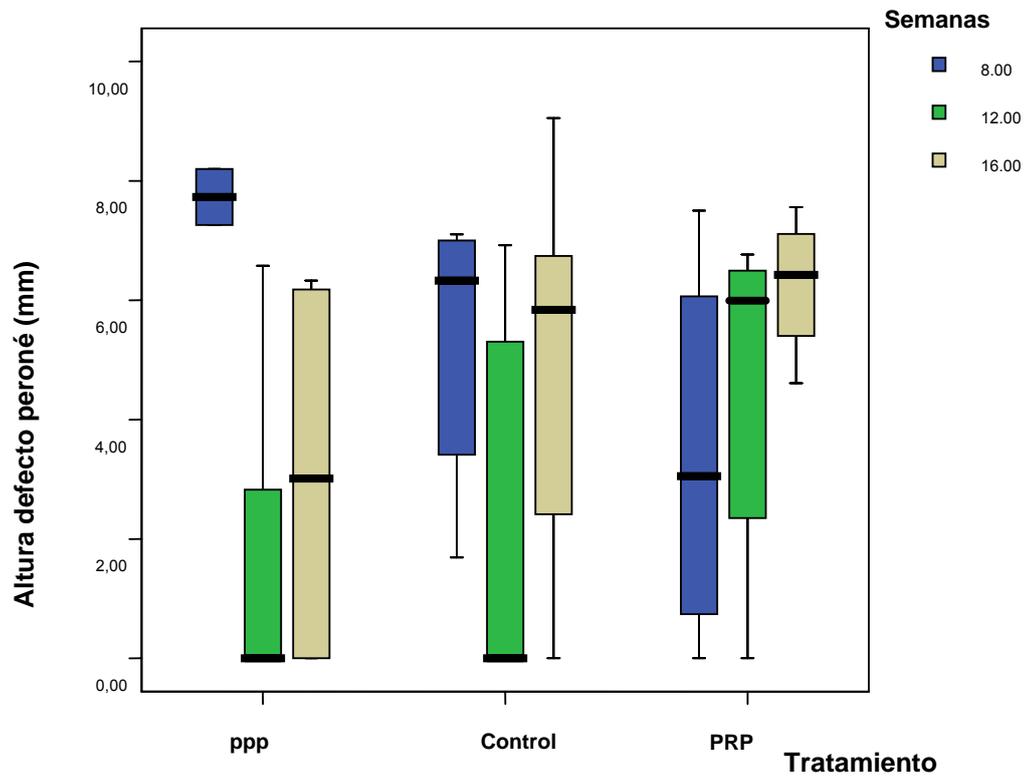
La agrupación de resultados se ha realizado atendiendo por un lado al estudio de los distintos métodos de concentración plaquetaria (grupo control, ppp y PRP) y, por otro, a la agrupación por período experimental (8, 12 y 16 semanas)



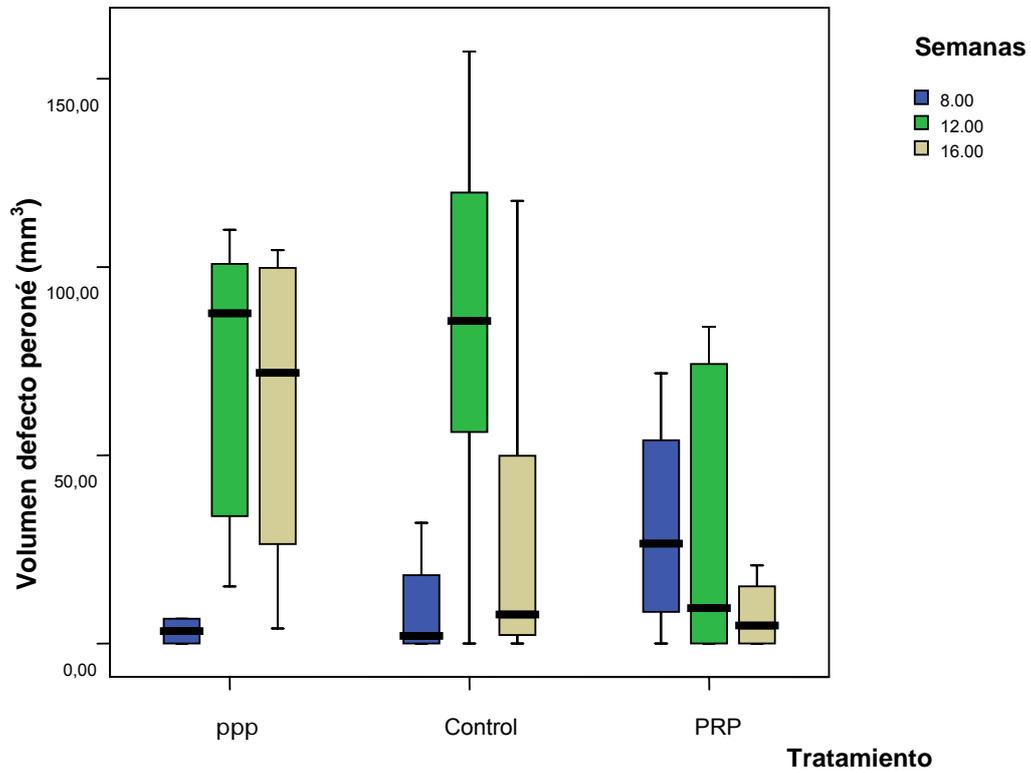
Gráfica 5. Altura del defecto de metáfisis tibial tras la aplicación de los distintos tratamientos y a lo largo de los tres períodos experimentales.



Gráfica 6. Anchura del defecto metafisario tibial tras la aplicación de los distintos tratamientos y a lo largo de los tres períodos experimentales.



Gráfica 7. *Altura del defecto de peroné tras la aplicación de los distintos tratamientos y lo largo de los tres períodos experimentales.*



Gráfica 8. Volumen del defecto de peroné reparado tras la aplicación de los distintos tratamientos y a lo largo de los tres períodos experimentales.

Densidad Mineral ósea en el defecto de peroné

Se ha analizado la densidad mineral ósea (DMO, en mg/cm^3) en las zonas del defecto de peroné en las que apreció tejido regenerado. La DMO de dicho tejido regenerado se ha estimado a partir de los parámetros de calibración referidos por Homolka y cols.¹⁰⁶ y se asumió una correlación lineal entre el número de Hounsfield (NH) y la DMO, siguiendo la siguiente ecuación:

$$DMO \text{ (expresado en } g/\text{cm}^3) = a \times NH + b$$

$$\text{Siendo } a = 0.760 \text{ y } b = 2.8$$

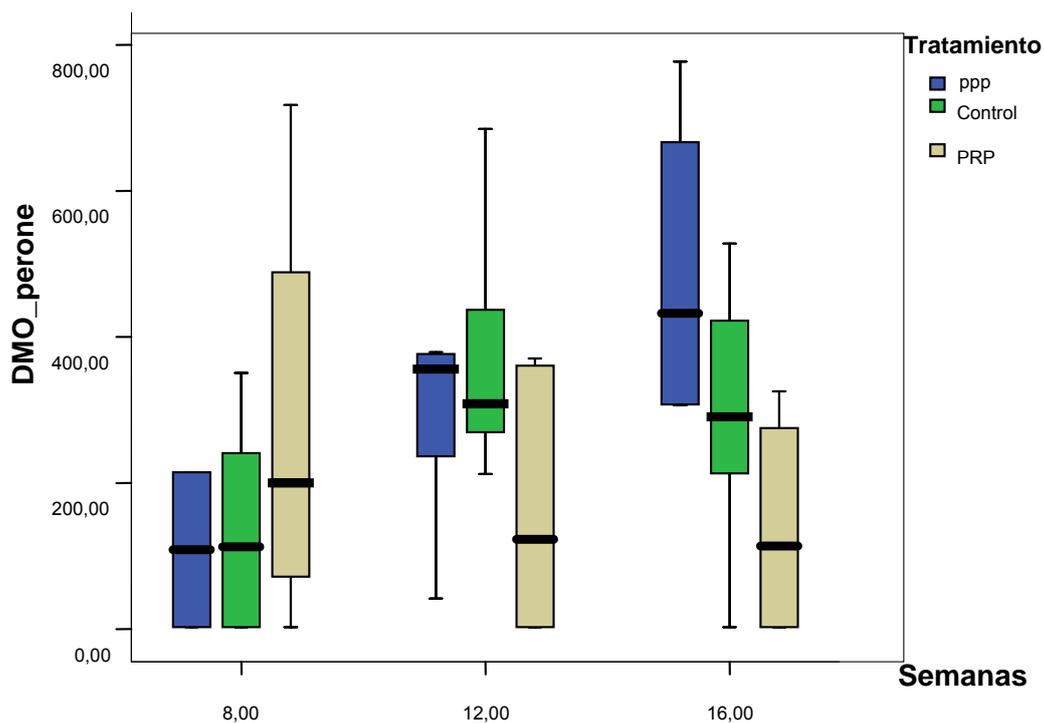
En la Tabla VII se presentan los valores medios de la DMO del tejido regenerado en los defectos de peroné y metafisario tibial a partir del número de Hounsfield que se registraron directamente en las imágenes digitales del TAC.

Tabla VII. Valor medio de la densidad mineral ósea (DMO) del tejido regenerado en los defectos de peroné y metafisario tibial

	ppp			Control			PRP		
Semanas	8	12	16	8	12	16	8	12	16
DMO defecto metafisis (mg/cm^3)	59.8	2.8	150.7	179.8	46.5	45.1	2.8	2.8	107.6
DMO defecto peroné (mg/cm^3)	108.8	278.2	487.3	137.2	359.4	401.5	280.4	163.9	139.1

En la Gráfica 9 se muestra la evolución a lo largo de los diferentes períodos experimentales de la densidad mineral ósea del tejido regenerado en el defecto del peroné. A las 8 semanas se observa que el grupo tratado con plasma rico en plaquetas muestra una mayor densidad mineral en el tejido regenerado. En cambio, a las 12 y 16 semanas este mismo grupo muestra los valores más bajos en comparación con los otros grupos. A las 12 semanas, tanto el grupo control como el grupo de concentrado pobre en plaquetas muestran valores similares y superiores a los del grupo de tratamiento modificado. A las 16 semanas, el grupo ppp ofrece valores más elevados que los otros dos grupos, incluso superiores a los del grupo control. Este dato, junto con el hecho de que el 50% de los casos tratados con el método convencional, a las 16 semanas de evolución muestran una regeneración completa (ver Tabla VII), podría indicar que el método convencional de baja concentración plaquetaria ofrece mejores resultados en fases avanzadas de la regeneración de defectos de tamaño crítico en peroné.

El grupo tratado con plasma pobre en plaquetas incrementa en todos los períodos experimentales la densidad mineral ósea del tejido regenerado, mientras que el grupo tratado con el concentrado rico en plaquetas muestra siempre valores similares, independientemente de la fase de evolución; y siempre con una elevada dispersión de datos. El grupo control, si bien muestra un incremento de la DMO entre la 8^a y 12^a semana, parece estabilizarse en la semana 16, con valores inferiores a los del grupo tratado con plasma pobre en plaquetas.



Gráfica 9. Evolución de la densidad mineral ósea del peroné de los grupos a lo largo de los distintos períodos experimentales.

Nivel de regeneración

- **Nivel de regeneración:** Distribución de casos atendiendo al nivel de regeneración tisular (ausencia de regeneración, regeneración parcial y regeneración total) atendiendo a defecto en peroné y al defecto metafisario tibial. En todos los casos se presenta una agrupación de resultados por método de obtención del concentrado plaquetario (concentrado pobre en plaquetas y concentrado rico en plaquetas) y por período experimental (8, 12 y 16 semanas).

En el caso del **defecto de peroné**, el criterio de adscripción a los grupos ha sido la siguiente:

- **No regeneración:** Cuando la distancia entre los extremos del defecto era ≥ 6 mm.
- **Regeneración parcial:** Cuando la distancia entre los extremos del defecto estaba comprendida entre 6 y 1 mm.
- **Regeneración completa:** Cuando la distancia entre los extremos del defecto era inferior a 1 mm.

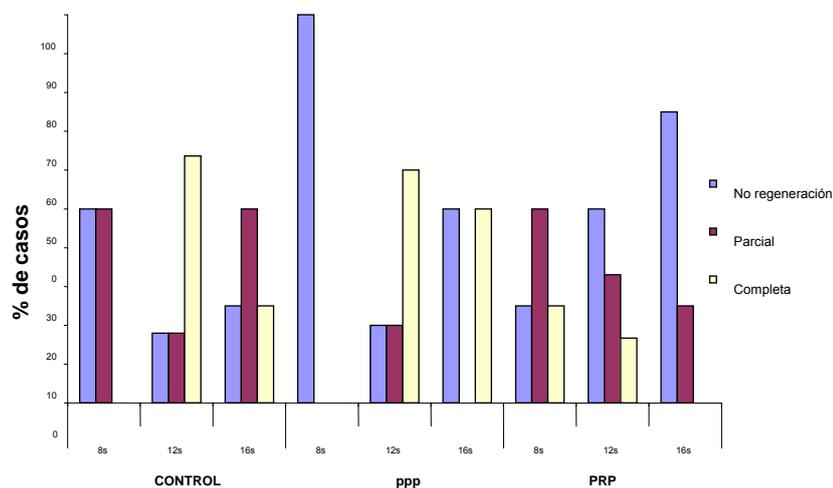
En la Tabla VIII y la Gráfica 10 se muestra el porcentaje de casos que mostraron diferentes niveles de regeneración (no regeneración, parcial y completa) del defecto de peroné en los distintos grupos experimentales. Los criterios de asignación a los distintos niveles de regeneración del defecto en peroné han sido los siguientes:

Tabla VIII. Regeneración en el defecto de peroné de los distintos grupos experimentales y control.

(entre paréntesis se señala el número de animales asignados a cada grupo)

	Semanas	No regeneración	Regeneración parcial	Regeneración completa
CONTROL	8	50% (3)	50% (3)	0% (0)
	12	18% (2)	18% (2)	64% (7)
	16	25% (3)	50% (3)	25% (2)
ppp	8	100% (2)	0% (0)	0% (0)
	12	20% (1)	20% (1)	60% (3)
	16	50% (2)	0% (0)	50% (2)
PRP	8	25% (1)	50% (2)	25% (1)
	12	50% (3)	33% (2)	17% (1)
	16	75% (3)	25% (1)	0% (0)

Defecto de peroné



Gráfica 10. Regeneración en el defecto de peroné de los distintos grupos experimentales y control (ppp: plasma pobre en plaquetas; PRP: Plasma rico en plaquetas).

El grupo control mostró una tendencia satisfactoria de regeneración del defecto de peroné durante los dos primeros períodos de evolución (8 y 12 semanas) en los que se observó como si bien a las 8 semanas existía un porcentaje elevado de ausencia de regeneración (50%), a las 12 semanas se observó como tan sólo el 18% de los casos siguen mostrando el defecto en su totalidad, mientras que en un 64% de los casos la regeneración ha sido completa. Por el contrario, al analizar lo que sucedió a las 16 semanas, se observa como el 25% de las muestras presentaban una ausencia total de regeneración (frente al 18% observado en el período anterior) y tan sólo el 25% lo han regenerado totalmente (frente a un 64% en el período de 12 semanas). No se ha encontrado una explicación satisfactoria que pueda justificar esta disminución en la tasa de regeneración del defecto de peroné a las 16 semanas. No parece que sea posible que una vez regenerado totalmente el defecto óseo, se produzca una resorción de tal magnitud que provoque una tasa de no-regeneración superior no sólo al grupo control de 12 semanas, sino incluso al grupo control de 8 semanas. Tampoco puede ser atribuible esta observación a la aplicación de PRP ya que nos estamos refiriendo al grupo control al que no se le adicionó el concentrado plaquetario, aunque nuestro diseño es diseño bilateral con posible interferencia contralateral.

En el grupo experimental tratado con el concentrado pobre en plaquetas (ppp) se observa que a las 8 semanas la totalidad de las muestras no han regenerado el defecto. En este primer período parece que la adición del concentrado plaquetario provoca un retraso en la regeneración del defecto si se compara con el grupo control que mostró un 50% de casos con regeneración parcial. Por el contrario, a las 8 semanas, el grupo tratado con concentrado rico en plaquetas (PRP) muestra resultados claramente mejores que el ppp y que el grupo control ya que tan sólo se observa una ausencia total de regeneración en un 25% de los casos, el 25% ha regenerado totalmente el defecto y un 50% lo han regenerado parcialmente.

Analizando los resultados del grupo ppp se observa algo similar a lo indicado para el grupo control y es que, si bien a las 12 semanas el índice de defectos no regenerados es tan sólo del 20%, a las 16 semanas se observa que este índice se ha incrementado hasta el 50% lo que supone una disminución en la tasa de regeneración a pesar de corresponder con un período de evolución posterior. Este hecho podría ser explicado suponiendo una tasa de resorción ósea más elevada en el caso de la aplicación de concentrado plaquetario pero una exhaustiva revisión bibliográfica no ha revelado una explicación fundamentada del mismo.

Los resultados observados en el grupo experimental de concentrado plasmático rico en plaquetas (PRP) parecen indicar que si bien a las 8 semanas la tasa de regeneración tisular fue muy elevada en un 75% de los casos, en etapas posteriores parece producirse una elevada tasa de resorción ósea ya que a las 12 semanas el 50% mostraron signos de regeneración parcial o total; y a las 16 semanas sólo el 25% reflejó signos de regeneración parcial, sin que se detecten casos de regeneración completa.

Tanto en el grupo control como en el grupo de concentrado rico en plaquetas se observa que a las 16 semanas disminuyó la tasa de regeneración tisular con respecto al período de 8 semanas. Este hecho ha sido analizado en detalle para estudiar las posibles causas del mismo. En cambio, el grupo del método convencional muestra como a las 16 semanas el 50% de los casos muestran una regeneración completa del defecto del peroné.

Se ha realizado un análisis estadístico para estudiar el posible efecto del factor tratamiento y del factor tiempo de evolución en el porcentaje de casos adscritos a cada grupo y no se han detectado diferencias estadísticamente significativas.

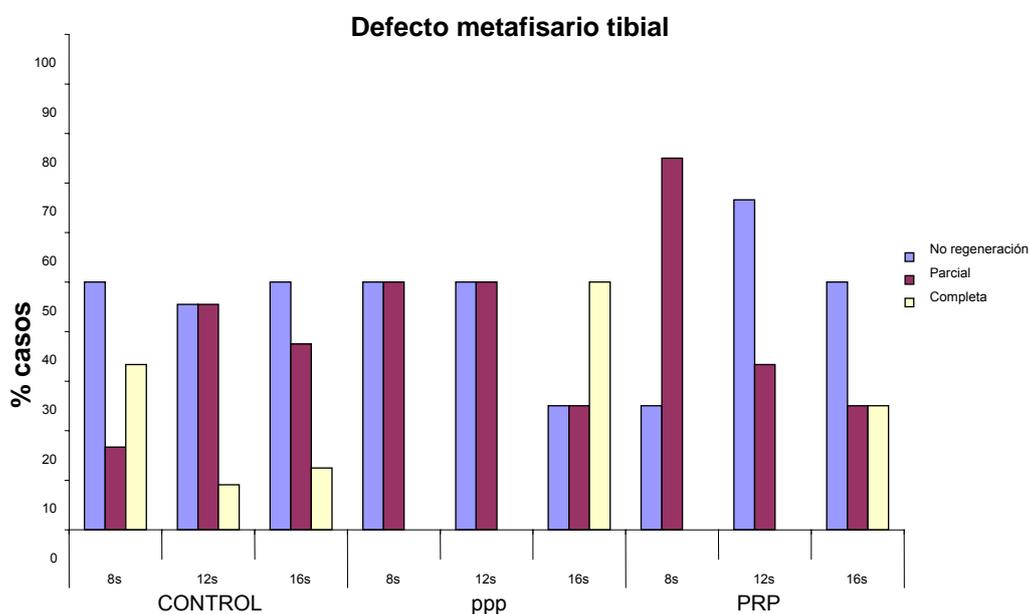
Defecto metafisario tibial

En la Tabla IX y Gráfica 11 se muestra el porcentaje de casos con distintos niveles de regeneración del defecto metafisario tibial observados en los distintos grupos experimentales. Los criterios de asignación a los distintos niveles de regeneración del defecto metafisario tibial fueron los siguientes:

- **No regeneración:** Cuando la distancia entre los extremos del defecto era ≥ 3 mm.
- **Regeneración parcial:** Cuando la distancia entre los extremos del defecto estaba comprendida entre 3 y 2 mm.
- **Regeneración completa:** Cuando la distancia entre los extremos del defecto era inferior a 2 mm.

Tabla IX. Regeneración en el defecto metafisario tibial de los distintos grupos experimentales y control

	Semanas	No regeneración	Regeneración parcial	Regeneración completa
CONTROL	8	50%	17%	33%
	12	45%	45%	9%
	16	50%	38%	13%
PPP	8	50%	50%	0%
	12	50%	50%	0%
	16	25%	25%	50%
PRP	8	25%	75%	0%
	12	67%	33%	0%
	16	50%	25%	25%



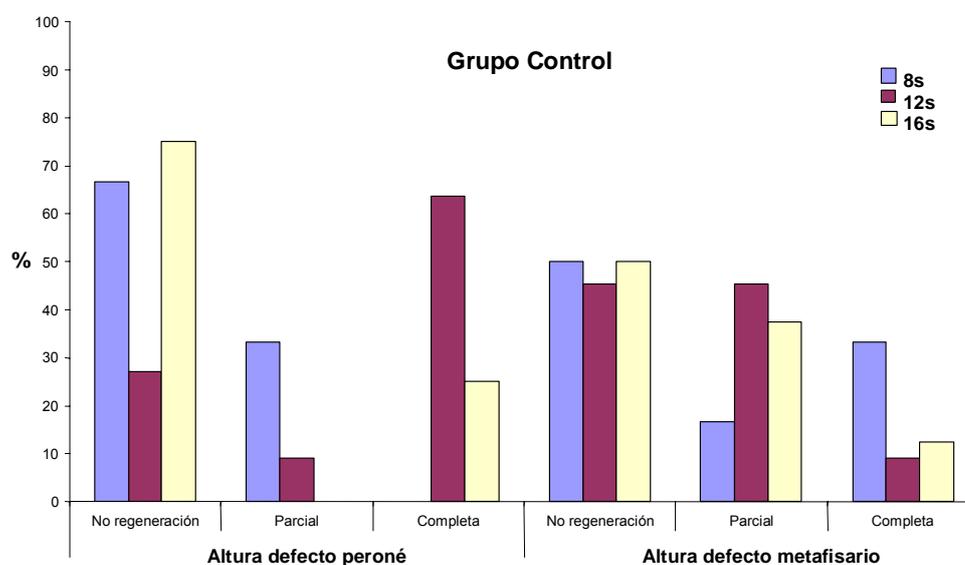
Gráfica 11. Regeneración en el defecto metafisario tibial de los distintos grupos experimentales y control (ppp: plasma pobre en plaquetas; PRP: Plasma rico en plaquetas).

En el caso del defecto metafisario tibial se observó que el grupo control mantiene a lo largo de los distintos períodos experimentales una distribución cercana al 50:50 de los casos regenerados frente a los no regenerados, aunque cabe destacar el hecho de que a las 8 semanas se observa el porcentaje de casos más elevado que muestran una regeneración completa (33%), mientras que a las 12 y 16 semanas los índices son del 9% y del 13% respectivamente.

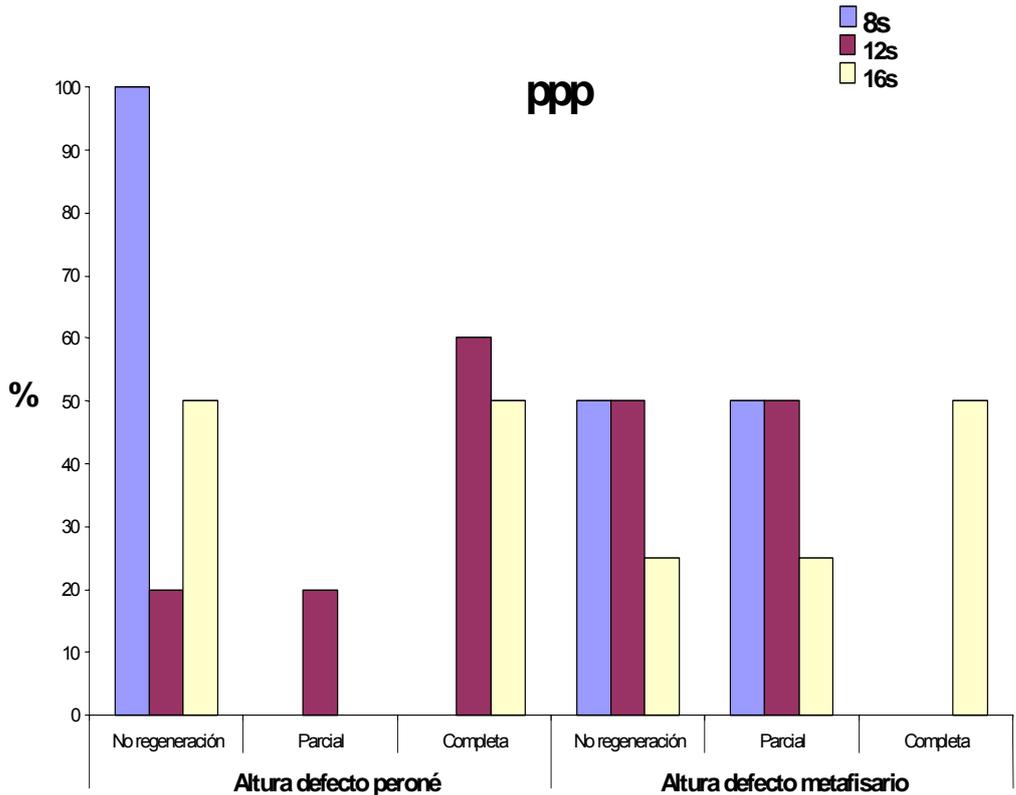
El grupo del plasma pobre en plaquetas (ppp) mostró tasas de regeneración parcial más elevadas que el grupo control a las 8 y 12 semanas, aunque no presenta ningún caso con regeneración total. En cambio, a las 16 semanas el 50% de los casos presenta una regeneración total mientras que en el grupo control sólo alcanzó valores del 13%.

En el grupo del método del plasma rico en plaquetas (PRP), a las 8 semanas se observa que el 75% de los casos presentan una regeneración parcial del defecto pero a las 12 semanas tan sólo el 33% muestran ese nivel de regeneración. En ninguno de los dos períodos experimentales se detectaron casos de regeneración total, al igual que sucedía en el grupo del plasma pobre en plaquetas (ppp). A las 16 semanas, un 25% de los casos presentó regeneración completa del defecto mientras que en el grupo de plasma pobre en plaquetas el porcentaje alcanzaba valores del 50%.

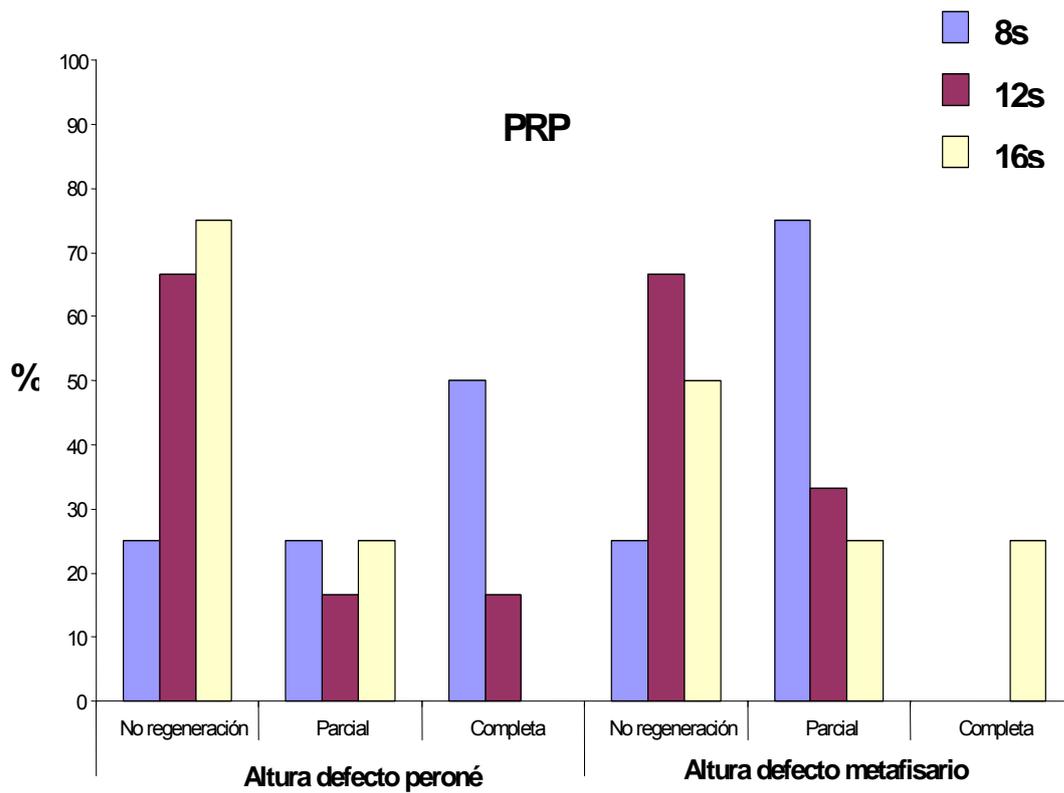
En la Gráfica 12 se representa el índice de regeneración de la altura del defecto en peroné y de la altura del defecto metafisario tibial atendiendo al grupo experimental (control, ppp y PRP) y al período experimental (8, 12 y 16 semanas).



Gráfica 12. Porcentajes de regeneración del defecto de peroné y del defecto metafisario tibial en el grupo control a las 8, 12 y 16 semanas.



Gráfica 13. Porcentajes de regeneración del defecto de peroné y del defecto metafisario tibial en el grupo del plasma pobre en plaquetas (ppp) a las 8, 12 y 16 semanas.



Gráfica 14. Porcentajes de regeneración del defecto de peroné y del defecto metafisario tibial en el grupo tratado plasma rico en plaquetas (PRP) a las 8, 12 y 16 semanas.

El análisis de varianza no se detectó diferencias significativas entre tipos de tratamiento y períodos experimentales, a excepción de las diferencias observadas en el grupo control entre las 8 y 16 semanas. A lo largo del tiempo existen diferencias significativas entre los volúmenes del defecto del peroné

Al comparar las variables a estudio en el grupo experimental, sin tener en cuenta el tiempo, bien sean tratados con plasma pobre en plaquetas o plasma rico en plaquetas y el control (tabla del anexo estadístico, diferencia de dos grupos) no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ser tratado o no ($p < 0,05$; prueba de rangos signados de Wilcoxon para 2 muestras dependientes).

Si realizamos un estudio de las mediciones de las distintas variables con el tiempo (Kruskal-Wallis para muestras independientes. Tabla X) observamos diferencias estadísticamente significativas en el volumen del defecto de peroné en los controles, ya descrito anteriormente. Queremos destacar que aunque no existen diferencias significativas, tanto la altura del defecto en los controles como la densidad del defecto metafisario en los casos se encuentran muy cercanos a la significación, lo que se denomina *border-lines* de significación. Se observan diferencias pero no estadísticamente significativas.

En el proceso en que los casos sean tratados con plasma pobre en plaquetas (ppp) no encontramos diferencias significativas con los controles, sin tener en cuenta los tiempos de recogida de datos. Tabla XI

Tabla X . Estudio estadístico entre el grupo ppp y el grupo control

	Altura defecto metafisario (mm) casos - Altura defecto metafisario (mm)	Anchura defecto metafisario (mm) casos - Anchura defecto metafisario (mm)	Densidad mineral defecto metafisario casos - Densidad mineral defecto metafisario	Altura defecto peroné (mm) casos - Altura defecto peroné (mm)	Densidad mineral defecto casos - Densidad mineral defecto peroné	Volumen defecto peroné (mm ³) casos - Volumen defecto peroné (mm ³)
Z	-,153(a)	-,561(b)	-,135(b)	,296(b)	-,235(a)	-,628(b)
Sig. asintót. (bilateral)	,878	,575	,893	,767	,814	,530

a Basado en los rangos negativos.

b Basado en los rangos positivos.

c Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon

En la opción en que los casos sean tratados con plasma rico en plaquetas (PRP) encontramos diferencias con los controles en el caso de la densidad mineral del defecto del peroné, sin tener en cuenta los tiempos de recogida de datos. Destacaríamos no la mejoría de un tratamiento frente a otro, pero sí que el volumen del defecto del peroné es casi significativamente mayor en el caso del tratamiento ppp que en el del PRP. Esta observación se podía leer del estudio de los datos en los gráficos. Existieron diferencias entre un tratamiento y otro fundamentalmente en variables del peroné. La densidad es menor cuando se aplica PRP en referencia a los controles. Valores *border – line*. Tabla XI

Tabla XI . Estudio entre el grupo PRP y el grupo control

	Altura defecto metafisario (mm) casos - Altura defecto metafisario (mm)	Anchura defecto metafisario (mm) casos - Anchura defecto metafisario (mm)	Densidad mineral defecto metafisario casos - Densidad mineral defecto metafisario	Altura defecto peroné (mm) casos - Altura defecto peroné (mm)	Densidad mineral defecto peroné casos - Densidad mineral defecto peroné	Volumen defecto peroné (mm ³) casos - Volumen defecto peroné (mm ³)
Z	-,031(a)	-,659(b)	-,674(a)	-1,363(b)	-2,118(a)	-1,334(a)
Sig. asintótico (bilateral.)	,975	,510	,500	,173	,034	,182

a Basado en los rangos positivos.

b Basado en los rangos negativos.

c Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon

5.3.2 Análisis de correlación

El análisis de correlación bivariada del recuento plaquetario entre sangre periférica y los dos tipos de concentrado plaquetario indica que no existe correlación significativa entre ambos parámetros (método Convencional, 0.139; método convencional modificado, 0.241). Este hecho parece indicar que no existe una relación directa entre el recuento plaquetario de sangre periférica y el recuento plaquetario del concentrado sanguíneo tras la utilización de cualquiera de los dos métodos empleados en aumentar el nivel de concentración plaquetaria.

Tampoco se observa correlación significativa entre el recuento plaquetario del concentrado sanguíneo siguiendo cualquiera de los dos métodos de concentración plaquetaria y las variables geométricas y densitométricas analizadas, tanto en defecto de peroné como en defectos metafisarios tibiales.

Las únicas correlaciones significativas observadas son las siguientes:

- Método ppp
 - Altura y anchura del defecto en metafisis tibial (correlación positiva).
 - Densidad mineral y anchura del defecto en metafisis tibial (correlación negativa).
 - Altura y densidad mineral del defecto de peroné (correlación negativa).
 - Altura y volumen del defecto de peroné (correlación negativa).
 - Densidad mineral y volumen del defecto de peroné (correlación positiva).

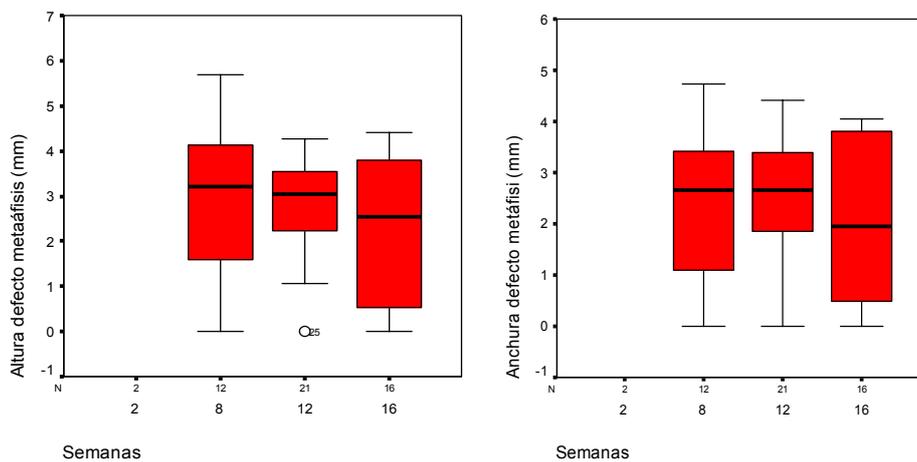
- Método PRP
 - Altura y anchura del defecto en metáfisis tibial (correlación positiva).
 - Altura y densidad mineral del defecto metafisario tibial (correlación negativa).
 - Altura y densidad mineral del defecto de peroné (correlación negativa).
 - Altura y volumen del defecto de peroné (correlación negativa)
 - Densidad mineral y volumen del defecto de peroné (correlación positiva).

No se observaron correlaciones significativas entre los defectos de peroné y metafisarios tibiales.

5.4 Resumen de resultados

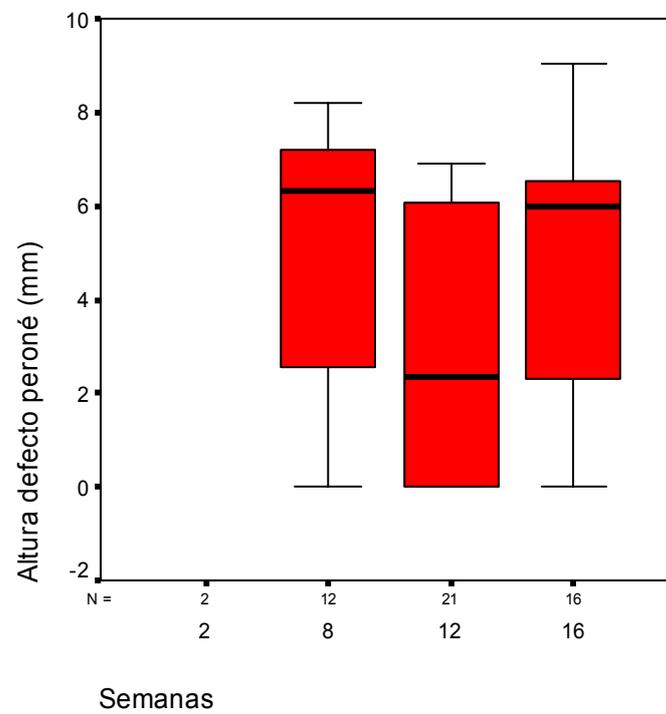
Mostramos una serie de gráficas donde resumimos las variables más representativas de nuestros resultados.

Si representamos las variables de los defectos respecto al periodo de evolución sin atender al tipo de tratamiento obtuvimos los siguientes resultados: Gráfica 15.



Gráfica 15. Diagrama de cajas. Se representa la evolución temporal de dos variables.

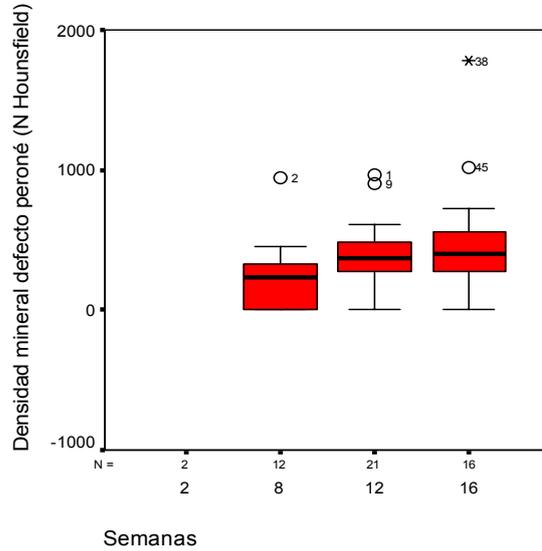
La altura y anchura del defecto metafisario tibial en términos generales mejoraron, existe una disminución con el tiempo, sin realizar distinción entre controles y grupos experimentales. En la siguiente gráfica observamos que la altura del defecto del peroné mejoró durante las 12 primeras semanas para comportarse a las 16 semanas de forma similar a las 8 semanas. Gráfica 16.



Gráfica 16. Diagrama de cajas. Se representa la evolución temporal de la variable altura residual del peroné.

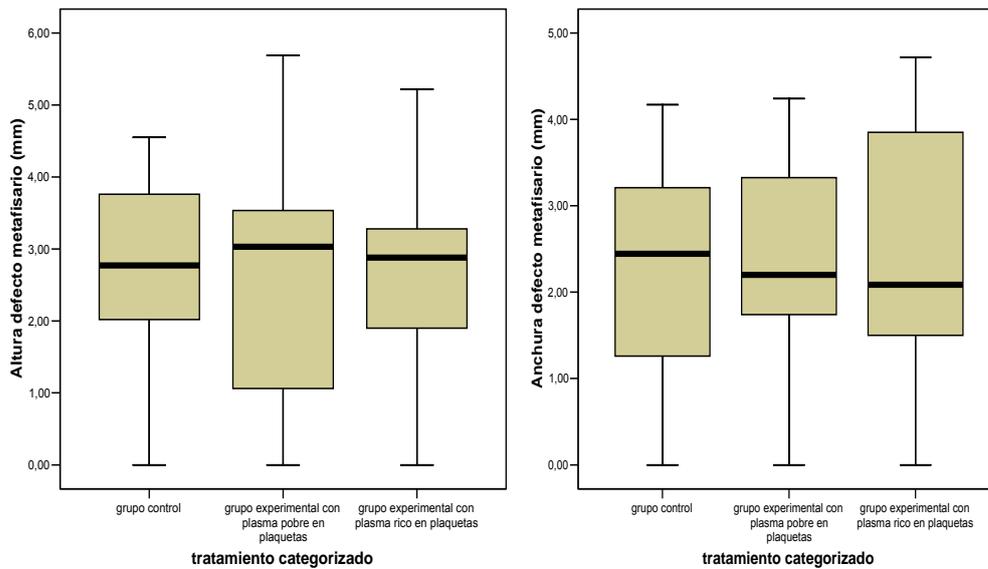
Pero al estudiar la densidad mineral del defecto de peroné observamos una discreta mejoría con el tiempo sin significación estadística.

Gráfica 17



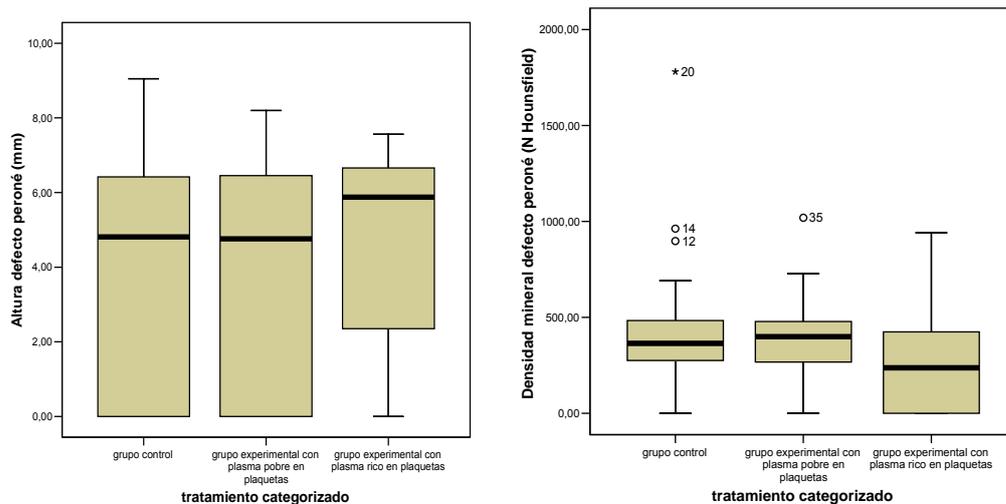
Gráfica 17.

Si relacionamos las variables más significativas con los distintos grupos experimentales (control, tratados con ppp y tratados con PRP) observamos los siguientes resultados. En el defecto metafisario tibial obtuvimos: Gráfica 18



Gráfica 18.

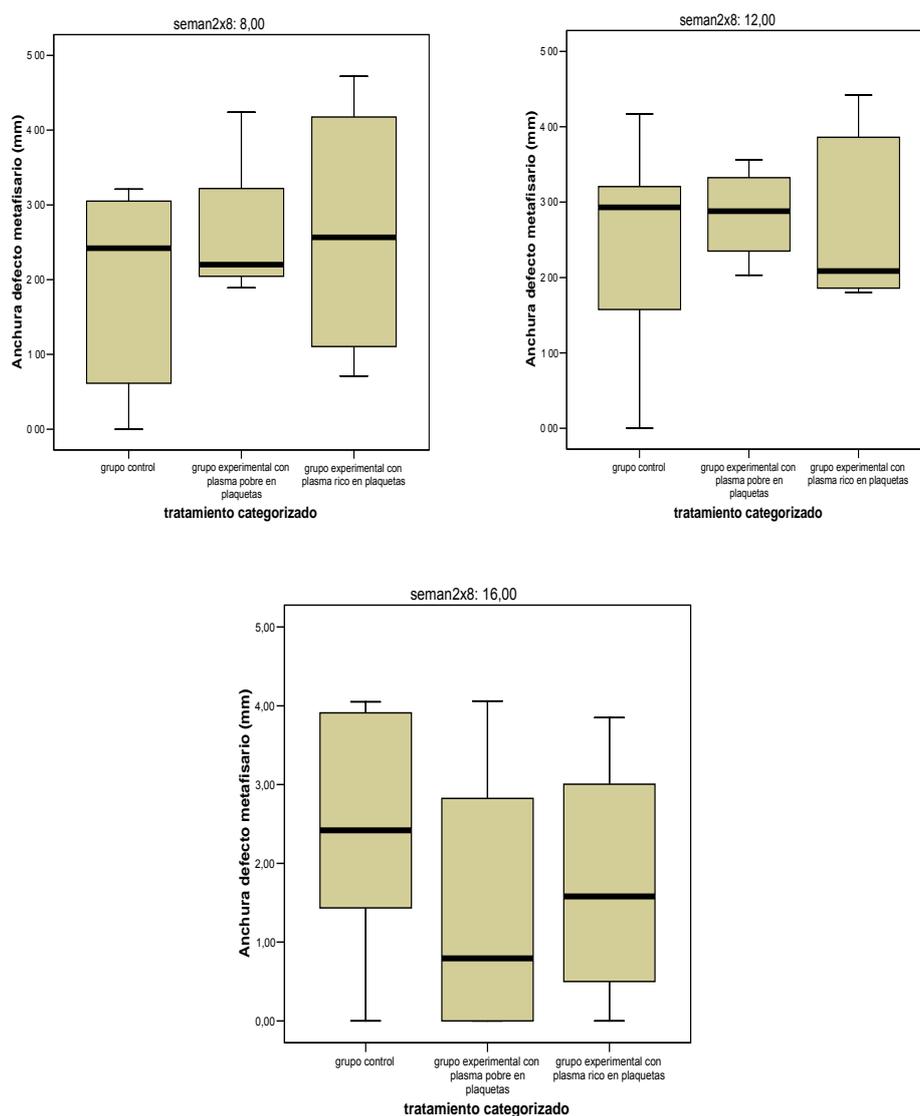
La altura y la anchura del defecto tibial en los grupos experimentales, sin tomar en consideración los periodos de tiempo no difieren del grupo control. En el defecto de peroné obtuvimos: Gráfica 19



Gráfica 19. Diagrama de cajas. Se representa la evolución de dos variables en función del grupo experimental que pertenecen.

No se encontraron diferencias importantes entre los distintos grupos experimentales. Destacar que se observó un muy discreto empeoramiento del grupo experimental tratado con PRP.

Si realizamos un análisis de las variables, según los grupos experimentales y los periodos temporales obtenemos lo siguiente: Gráfica 20

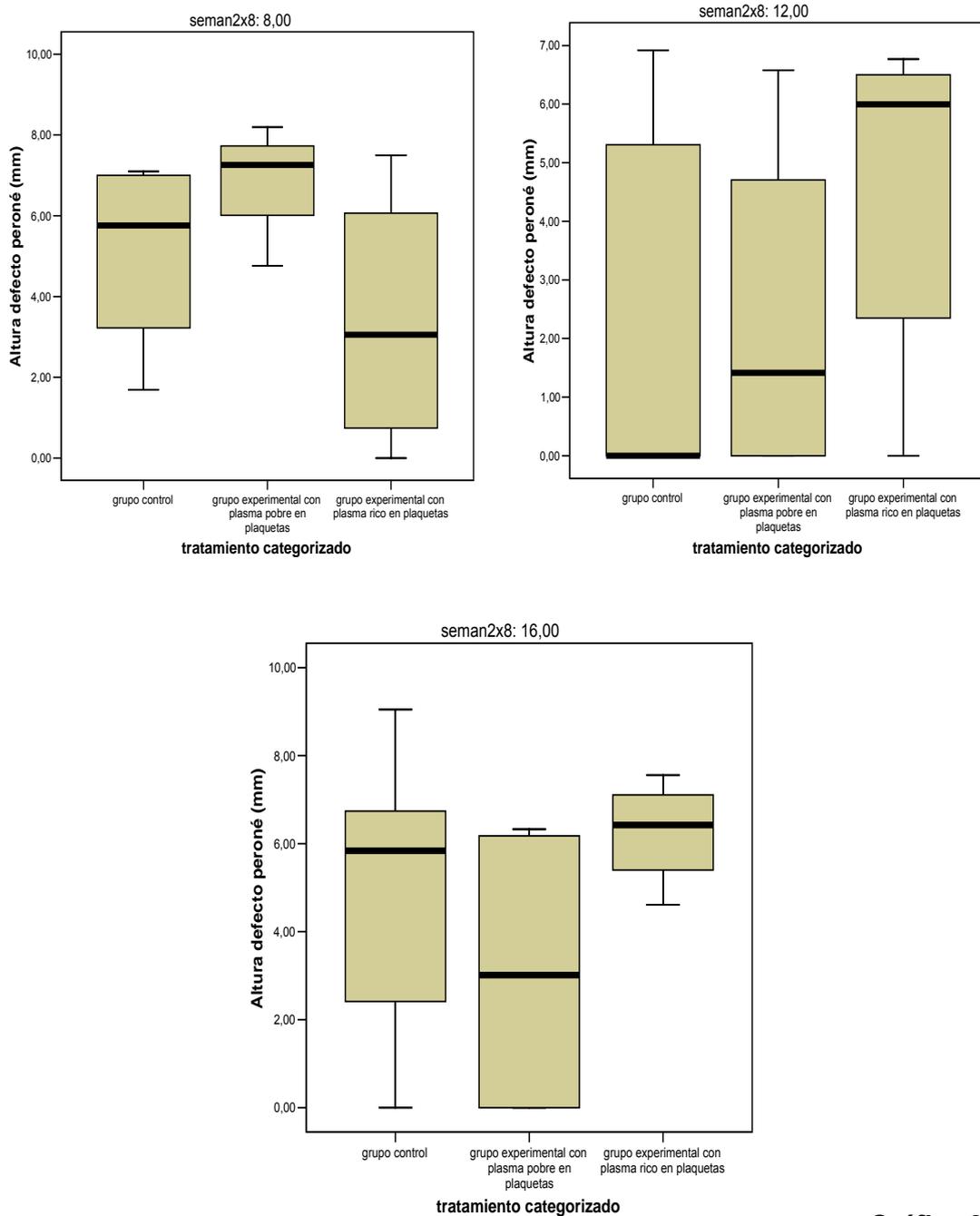


Gráfica 20. Diagrama de cajas. Se representa la evolución temporal de las variables en función del grupo experimental al que pertenecen.

En el defecto tibial se observa una mejoría real en los grupos experimentales respecto al control. Parece que el grupo experimental tratado con ppp presenta una reconstrucción mayor que el grupo PRP y que los controles. Estas diferencias observadas no fueron significativas.

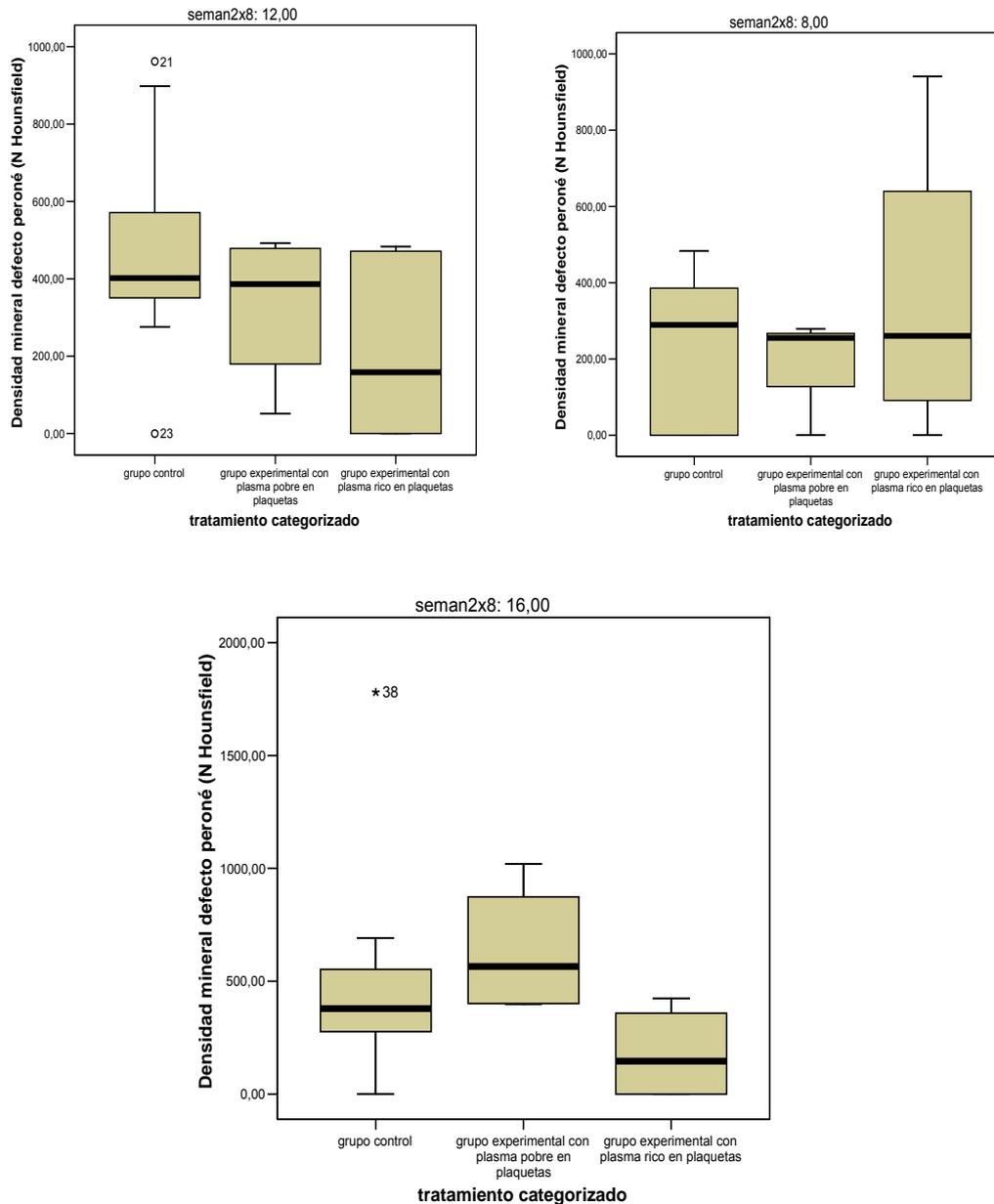
En el defecto de peroné encontramos de nuevo como existen datos que nos indican que en los estadios iniciales o tempranos presentamos unos signos de reconstrucción mayores que en los periodos finales del

seguimiento (16 semanas). Observamos las variables altura del defecto de peroné y densidad mineral del defecto de peroné. Gráfica 21 (diagrama de cajas).



Gráfica 21.

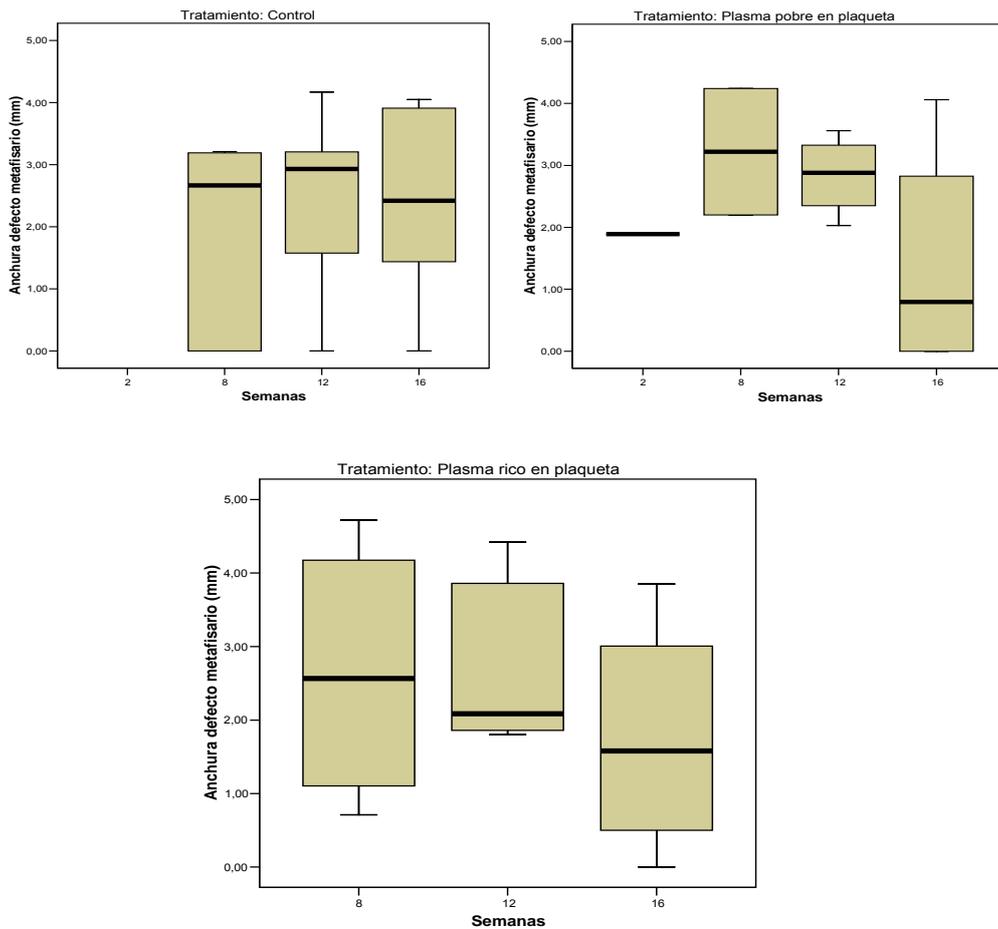
En la densidad mineral del defecto también se observó la misma tendencia de los resultados de las anteriores variables. Gráfica 22 (diagrama de cajas).



Gráfica 22.

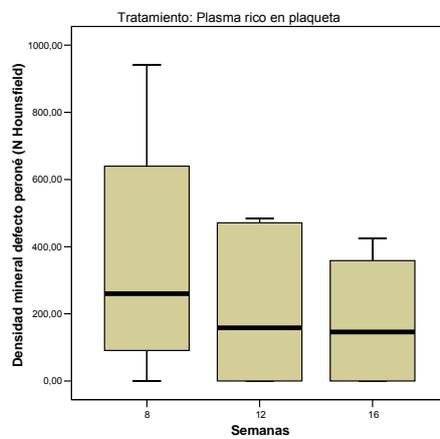
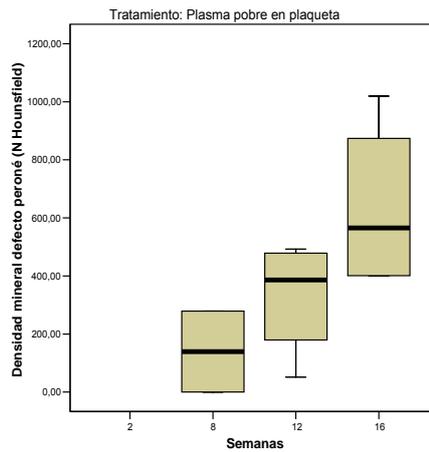
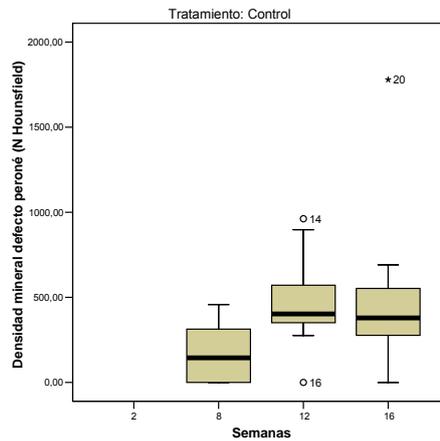
Si realizamos una representación de las variables clasificándolas por periodos de tiempo y cada grupo experimental no se observaron grandes diferencias, pero gráficamente se puede observar que el grupo experimental tratado con ppp obtiene mejores resultados en los distintos periodos temporales. Gráfica 23.

En el defecto metafisario tibial pudimos observar que los periodos de tiempo mejoraron los resultados con mayor índice de reconstrucción sobre todo en el grupo tratado con ppp. El grupo experimental PRP obtiene una mejoría evidente en los periodos iniciales para empeorar la reconstrucción con el tiempo.



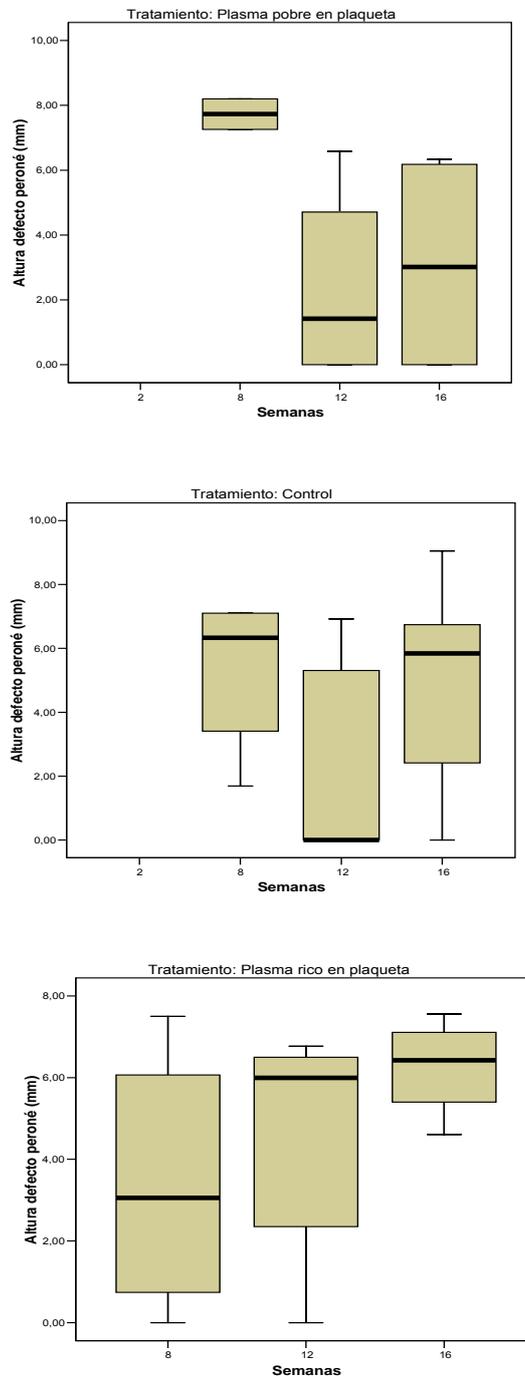
Gráfica 23.

Observemos en las gráficas siguientes como el grupo experimental ppp es capaz de mejorar la densidad ósea del defecto de peroné, sin ser estadísticamente significativas esas diferencias. Gráfica 24



Gráfica 24.

La variable altura del peroné continuó con el comportamiento habitual del estudio con un empeoramiento con el tiempo en los tres grupos experimentales. Gráfica 25.



Gráfica 25.

5.5 Resultados Generales de la Valoración histológica

Atendiendo a los diferentes estados histológicos en función del periodo de evolución vemos distintos estadios de madurez ósea. La regeneración ósea entre los extremos de un defecto se produjo fundamentalmente en nuestro modelo de forma centrípeta y se organizó principalmente por una osificación membranosa en los defectos del peroné, en alguno de los defectos tibiales pudimos observar una osificación endocondral muy desorganizada.

Es importante destacar que no se observa ninguna diferencia en el patrón de reparación entre los distintos grupos.

La forma de reparación y la tendencia que se deduce de la observación de los cortes histológicos es una reparación secundaria con la formación de un tejido interfragmentario fibroso y / o conectivo que progresivamente y de forma secundaria termina osificándose. En los periodos iniciales hasta las ocho semanas encontramos un tejido inmaduro, con áreas de osteoide con material extracelular desorganizado, muy celular.

En etapas sucesivas podemos observar un tejido parcialmente calcificado más organizado que el anterior que deja de ser un hueso reticular o plexiforme y reactivo para pasar a un hueso con mayor madurez. En las fases iniciales de maduración se observa como los osteoblastos depositan o entretejen el colágeno desorganizado, este es un tipo de hueso reticular no laminar. En periodos más avanzados de maduración pudimos observar una disposición más ordenada de la matriz extracelular con mayor grado de calcificación (ver imágenes con luz polarizada). Este tipo de hueso se asemejó más a un hueso laminar, maduro. El tejido fibroso conectivo indiferenciado que se observó alrededor de los fragmentos del defecto es un tejido fibroso muy celular de aspecto fusiforme; son las células pluripotenciales osteoprogenitoras.

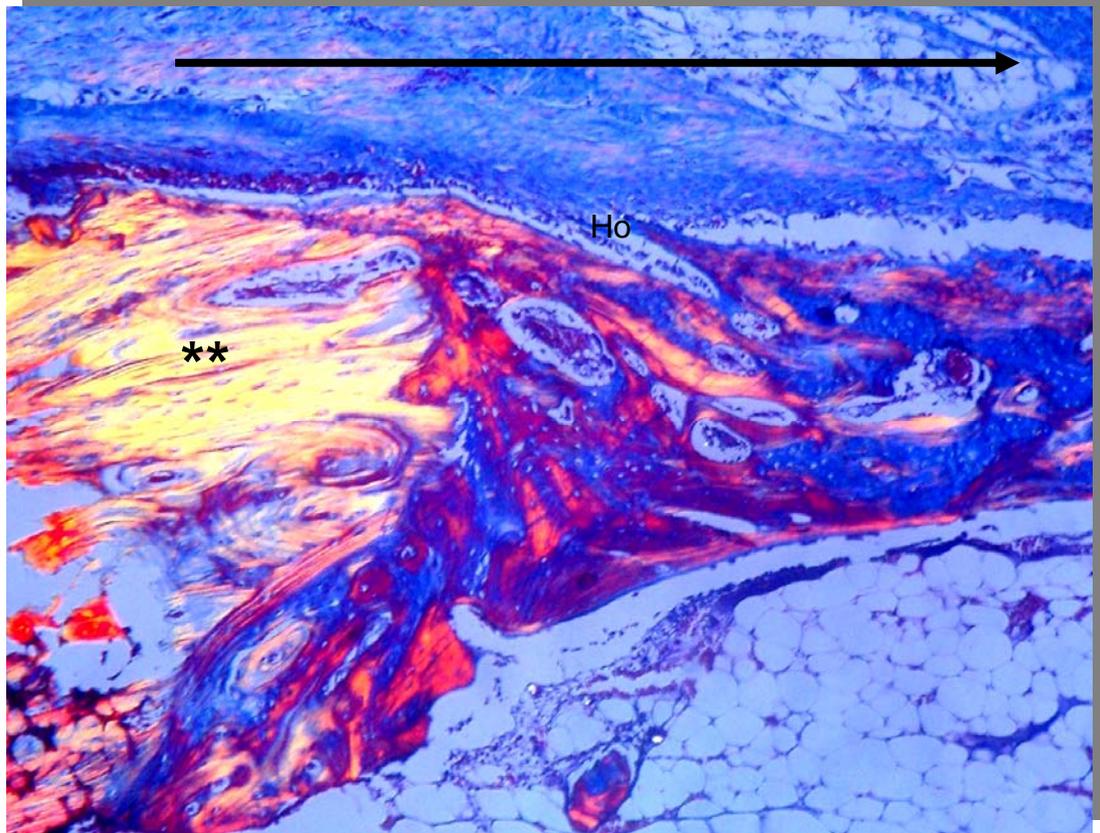


Figura 31. Imagen microscópica (10X) con luz polarizada donde observamos un hueso con cierto grado maduración y calcificación que presenta una organización de la matriz extracelular () regular en vecindad con un osteoide muy inmaduro, celular muy activo con grandes ribetes osteoblásticos (Ho). Se observa la dirección de la reparación. (→).**

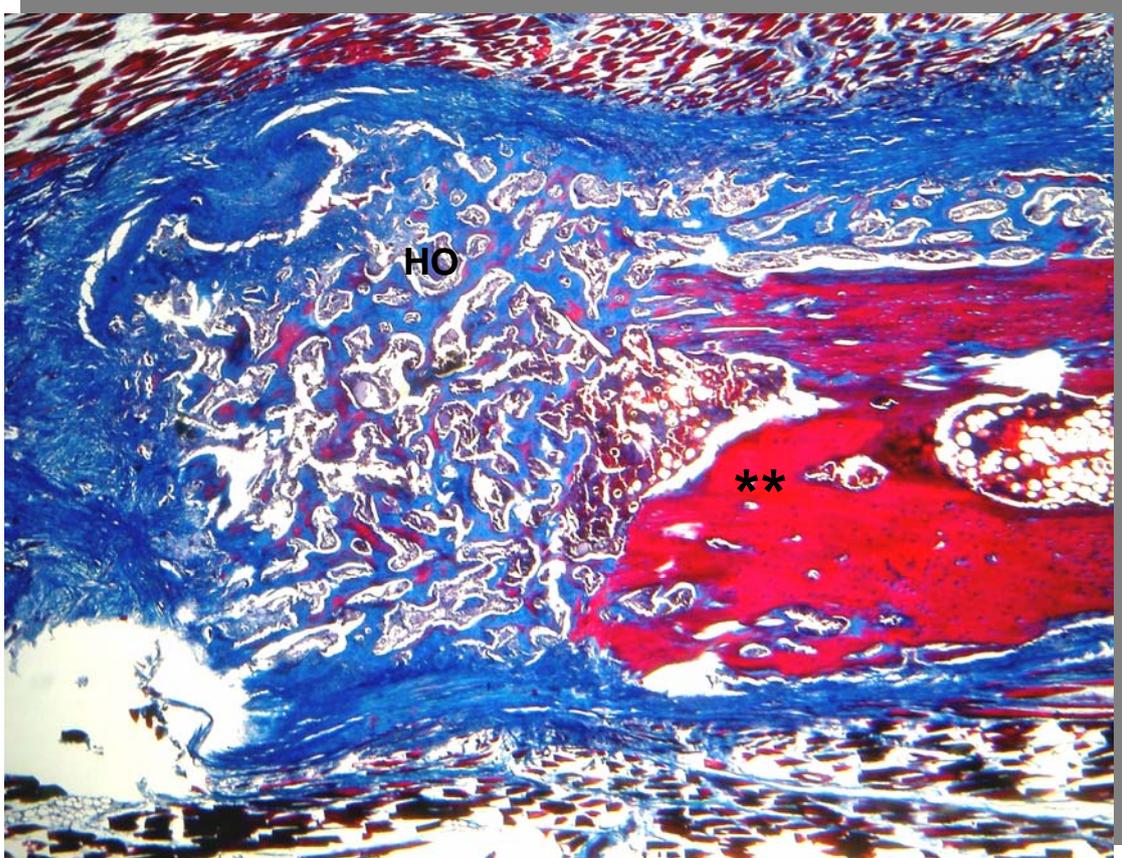


Figura 32. Imagen microscópica con tinción tricrómico de Masson (10X) donde observamos claramente la línea de reparación en extremo óseo del defecto. Podemos observar un hueso maduro calcificado, poco celular y lamelar (), junto a una zona de tejido conectivo irregular y celular que comienza a osificarse. Estamos ante un tejido osteoide inmaduro plexiforme y reticular. (Ho)**

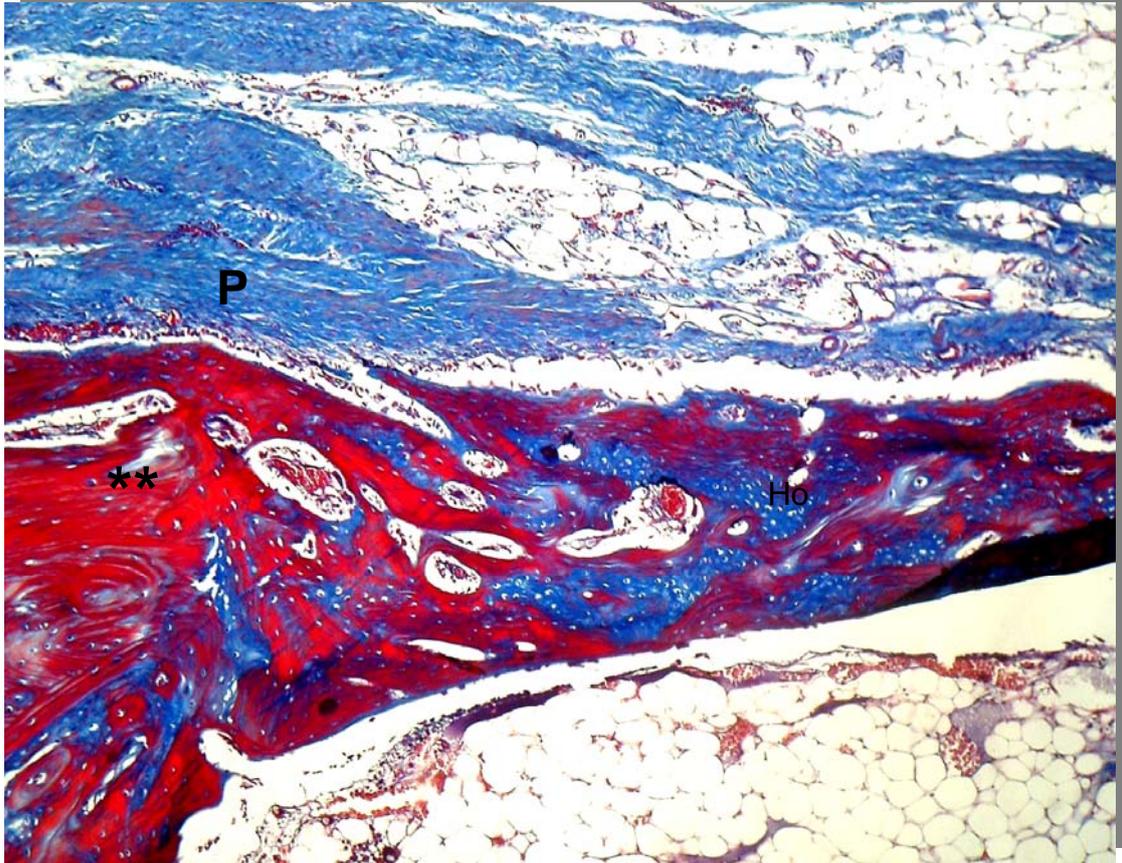


Figura 33. Imagen microscópica con tinción tricrómico de Masson (10X) donde se observa un regenerado óseo en distintas fases de maduración. El hueso más inmaduro (Ho) presenta gran desorganización, no calcificado, irregular y muy celular, al contrario del hueso más maduro (). Se observa gran actividad celular que proviene del periostio (P).**

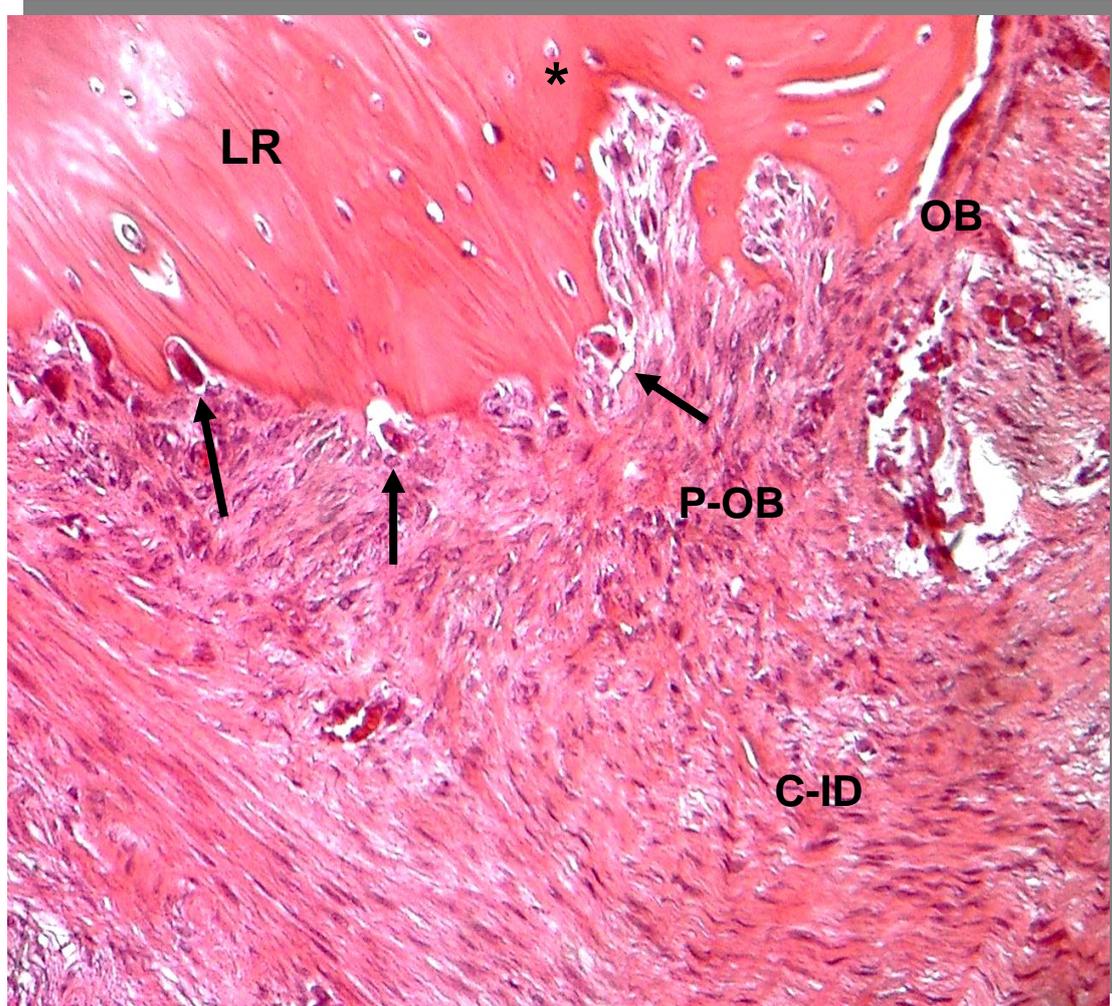


Figura 34. Imagen microscópica con tinción Hematoxilina-Eosina (10X) donde distinguimos claramente la celularidad del hueso y la zona de reparación. Hueso Laminar-Reticular (LR) maduro con pocas células (Osteocitos) (*). Frente de actividad con ribete osteoblástico (OB) formador con lagunas de Howship donde los osteoclastos (→) se encuentran en reabsorción. Complejo reabsorción-formación. El resto del tejido es un tejido conectivo muy celular fibroso donde se encuentran células muy indiferenciadas fusiformes progenitoras (C-ID) y células que se diferencian hacia osteoblastos. Pre-osteoblastos (P-OB).

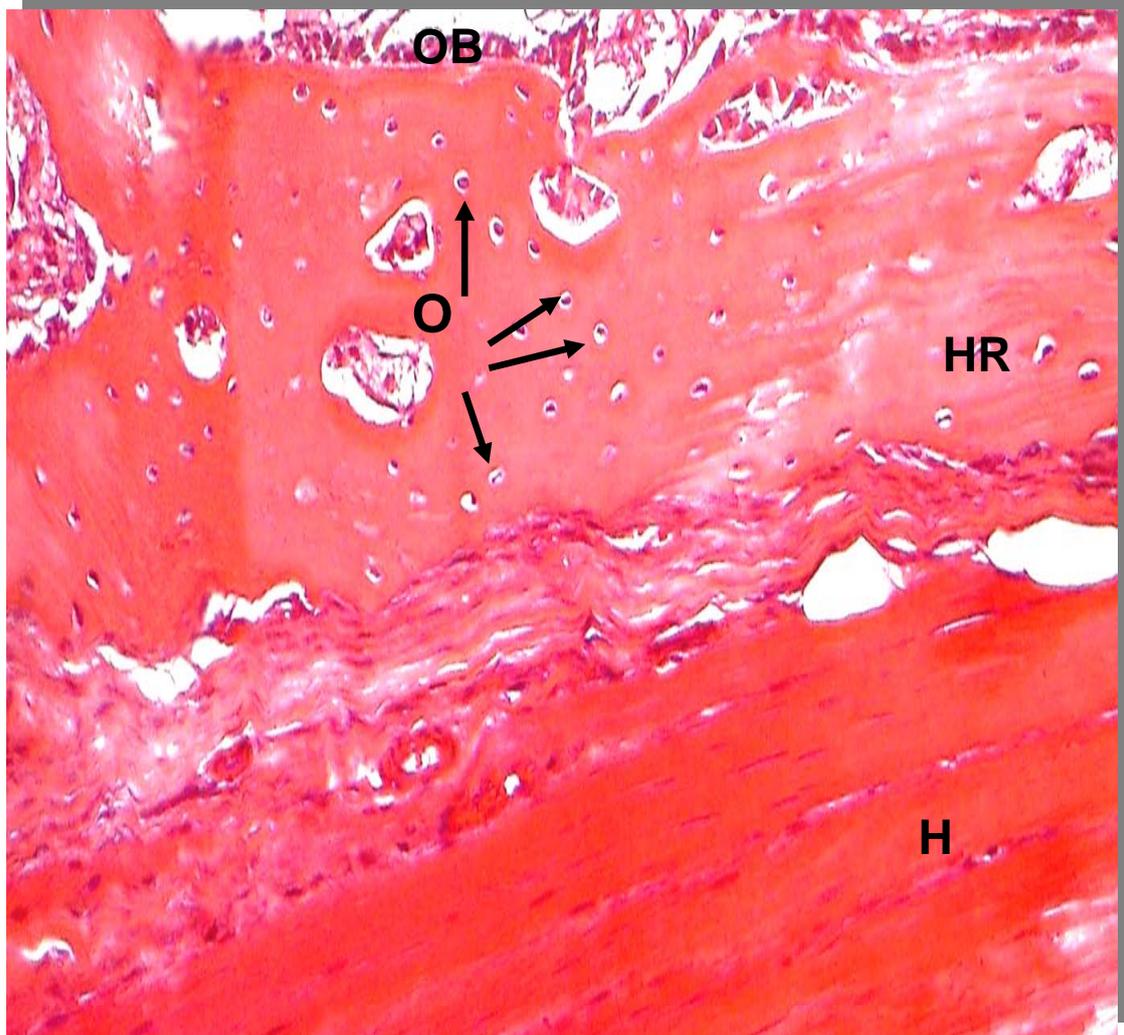


Figura 35. Imagen microscópica con tinción Hematoxilina-Eosina (20X). Se observa un hueso reticular (HR) depositándose sobre un hueso normal lamelar (H). Observamos un hueso reticular con gran celularidad tanto intrasustancia, Osteocitos (O), como en el frente formador, ribete osteoblástico (OB). Se observa claramente una osificación membranosa.

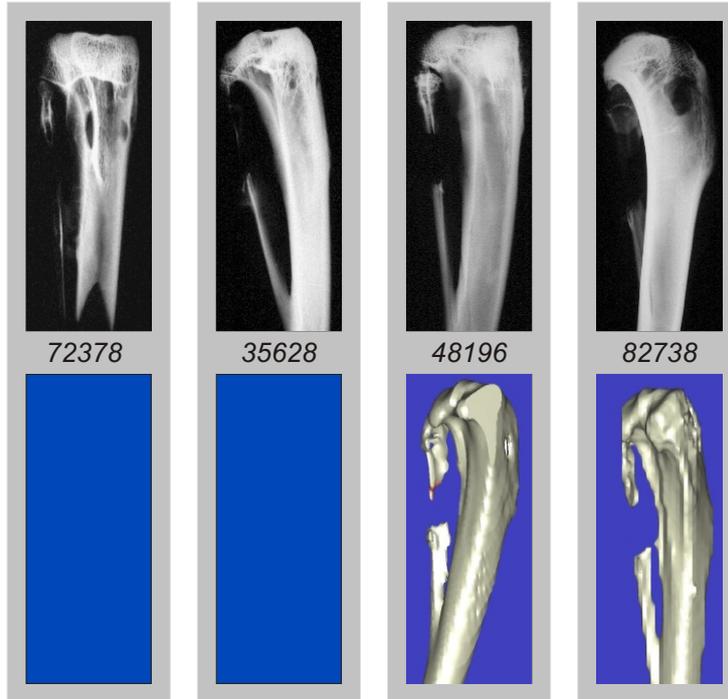
Galería de Imágenes

Imágenes Radiológicas

Reconstrucción 3D

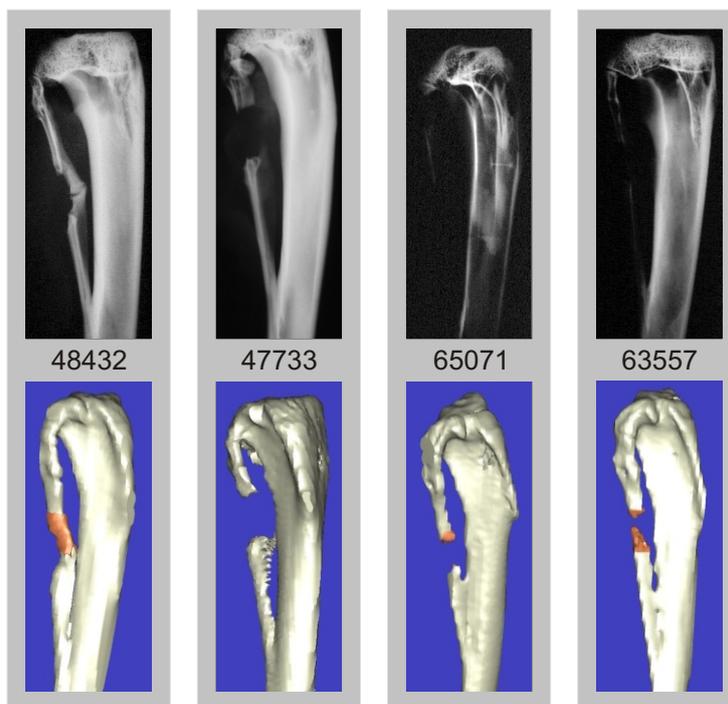
GRUPO PPP

8 SEMANAS



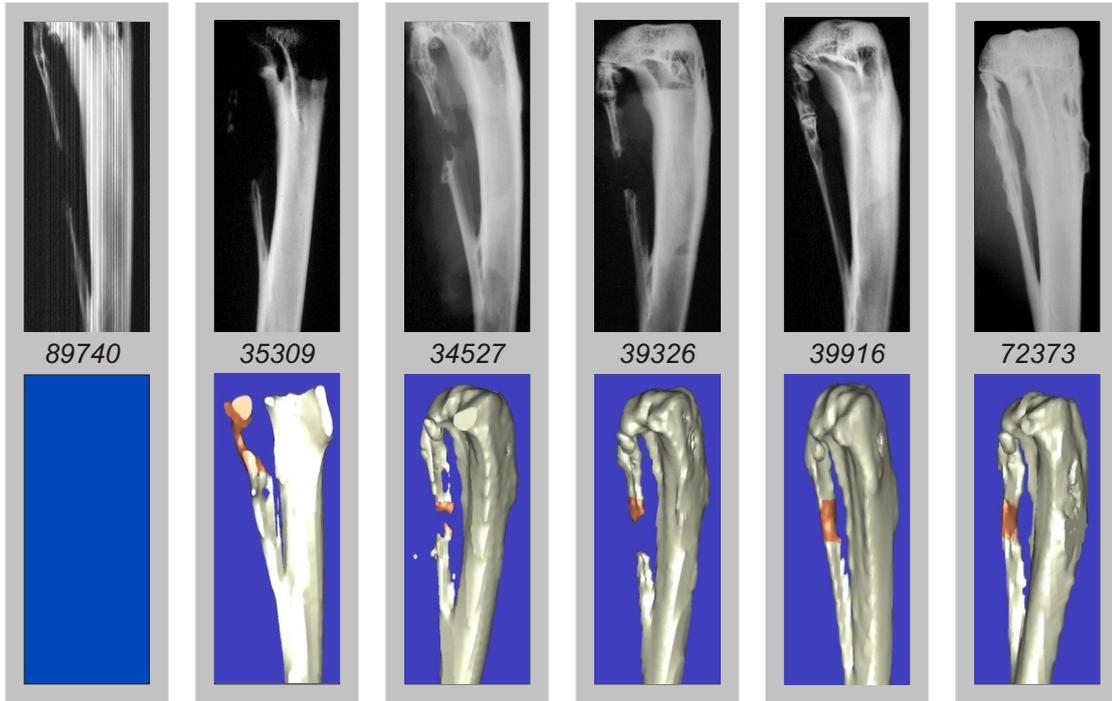
GRUPO PRP

8 SEMANAS



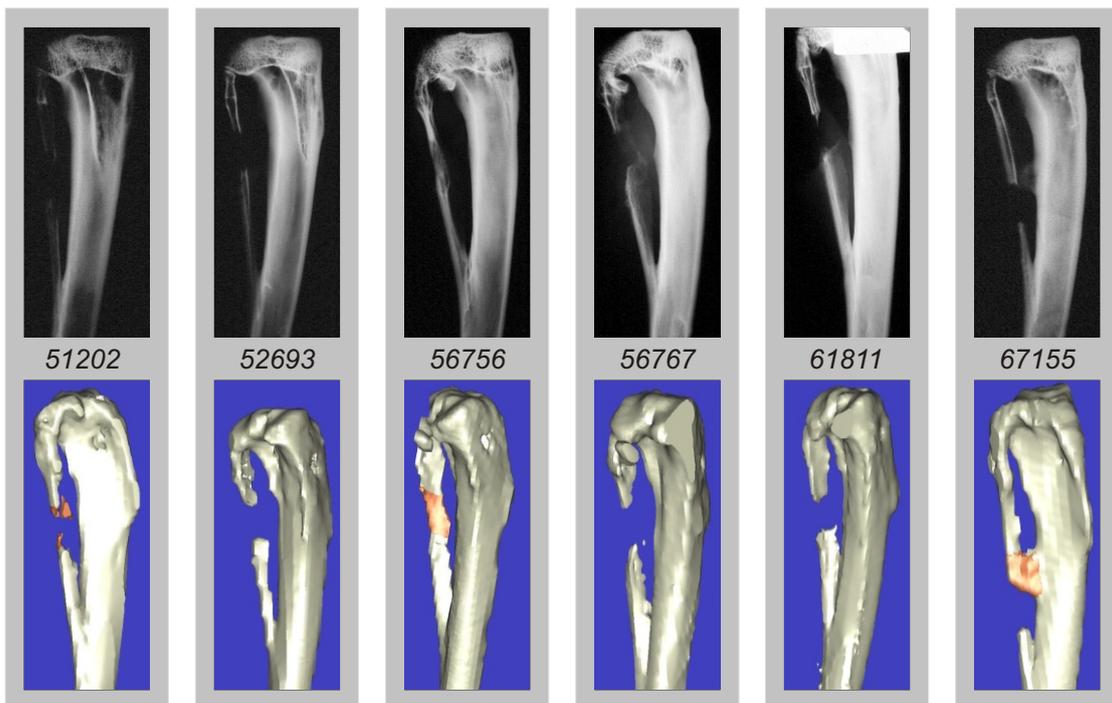
GRUPO PPP

12 SEMANAS



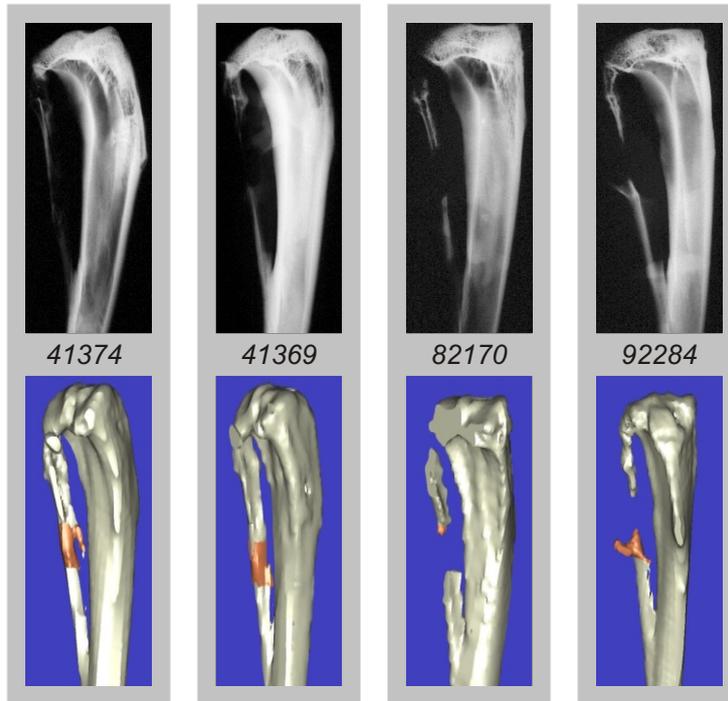
GRUPO PRP

12 SEMANAS



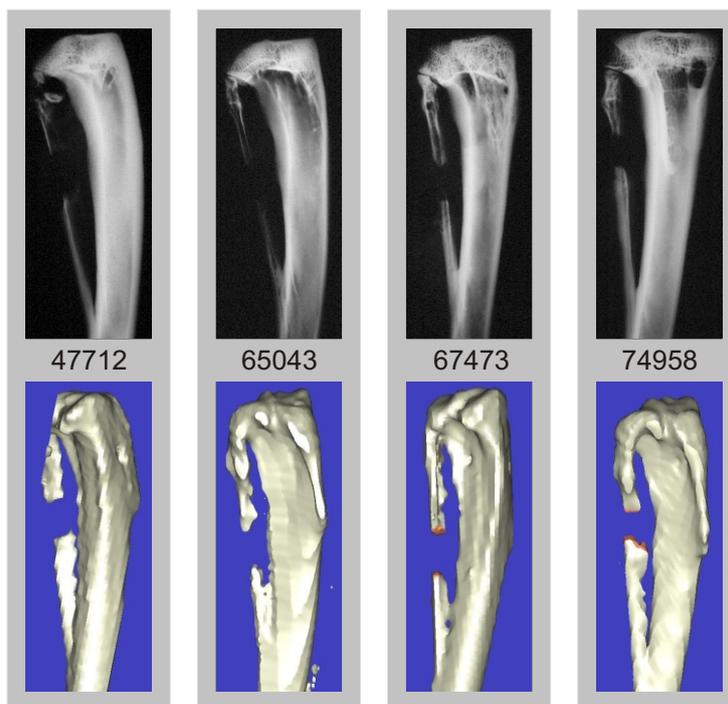
GRUPO PPP

16 SEMANAS



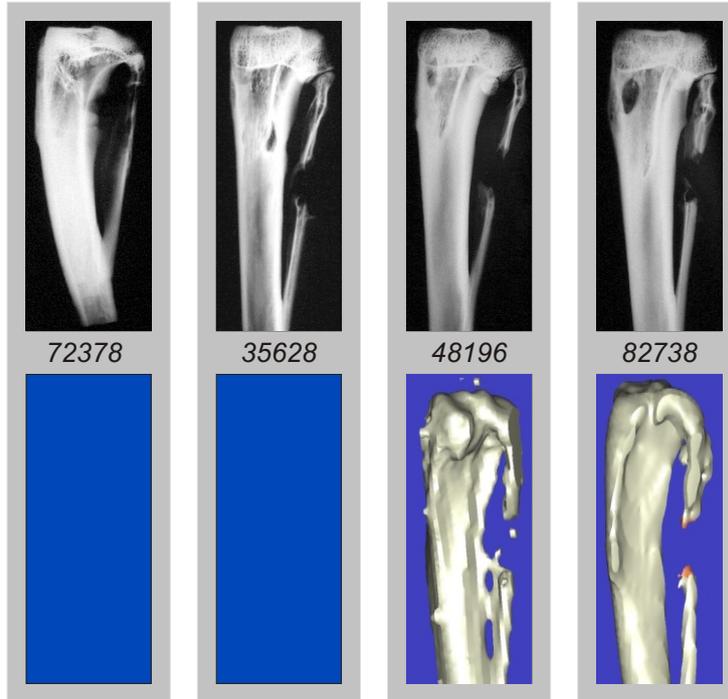
GRUPO PRP

16 SEMANAS



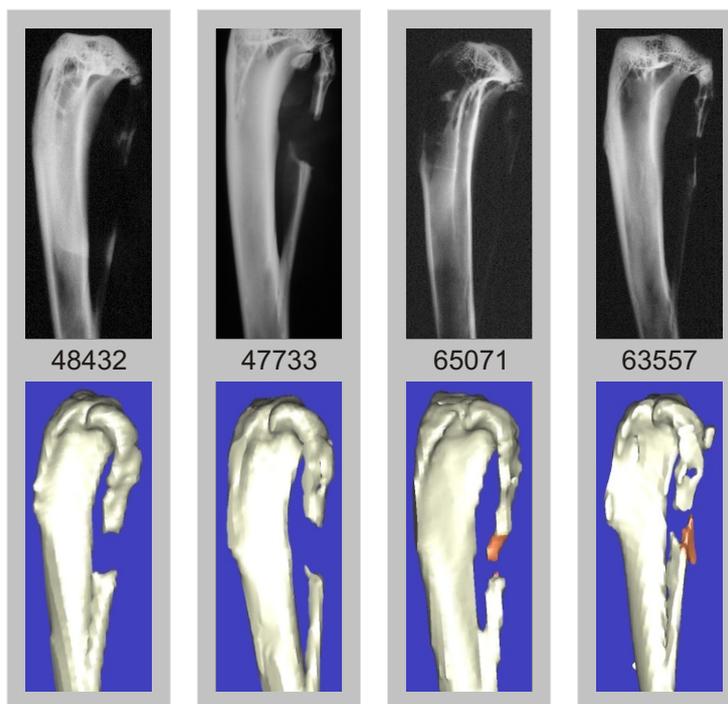
GRUPO CONTROL

8 SEMANAS



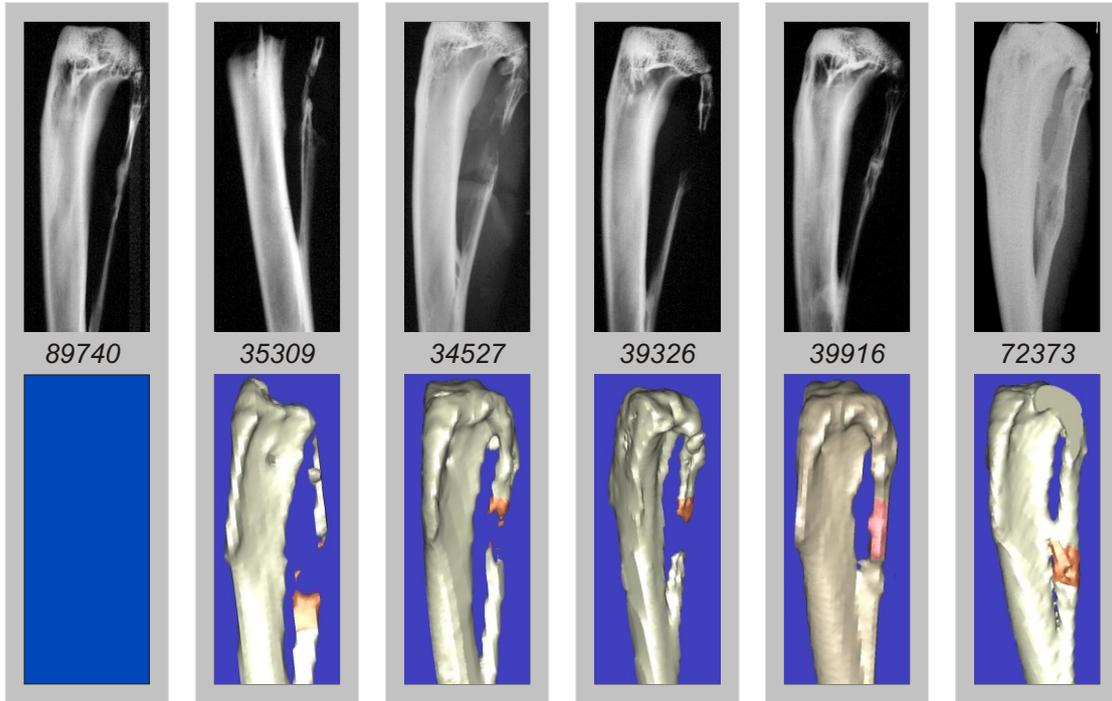
GRUPO CONTROL

8 SEMANAS



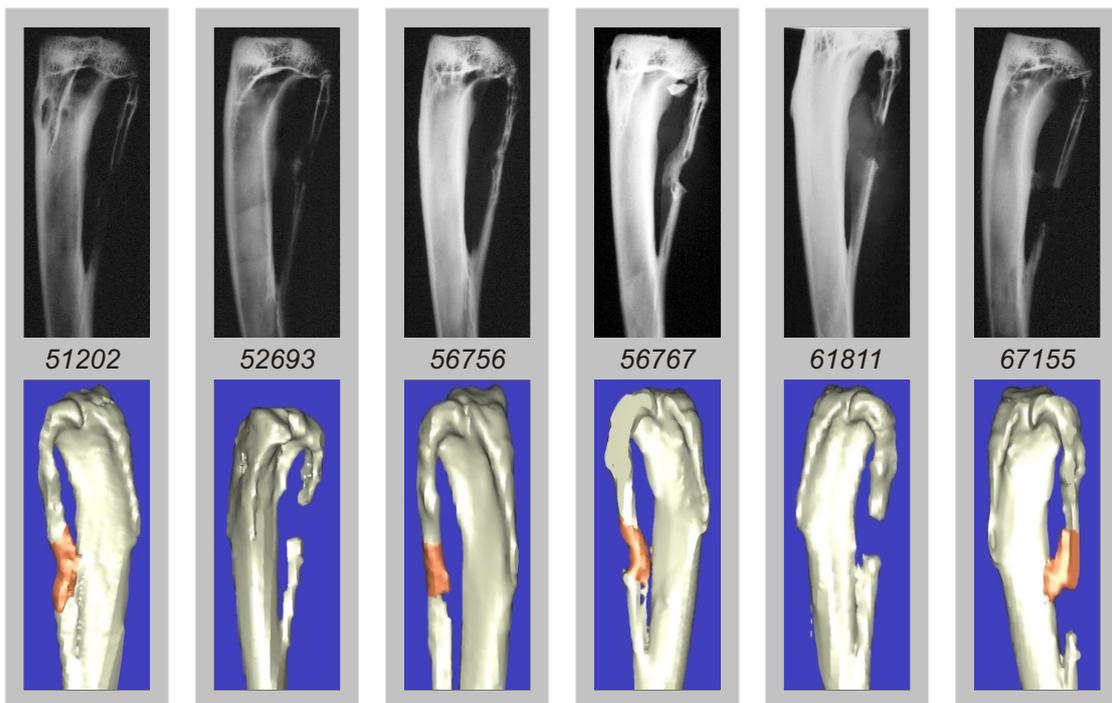
GRUPO CONTROL

12 SEMANAS



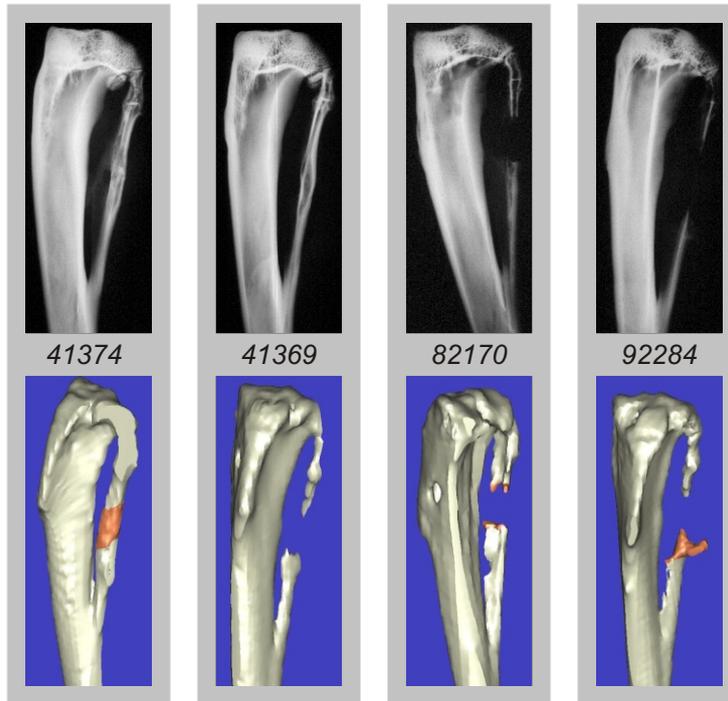
GRUPO CONTROL

12 SEMANAS



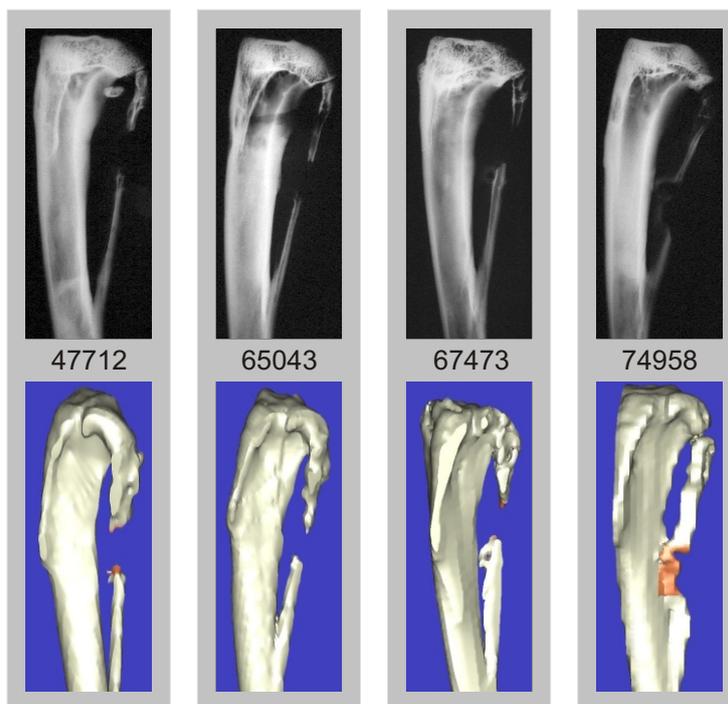
GRUPO CONTROL

16 SEMANAS



GRUPO CONTROL

16 SEMANAS



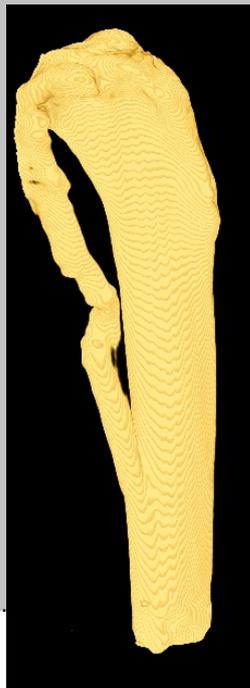
Imágenes Radiológicas e Histológicas de los especímenes



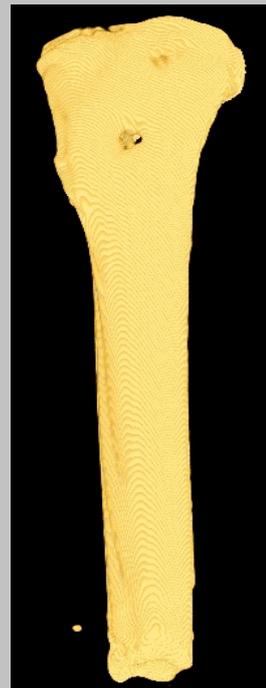
imagen radiográfica



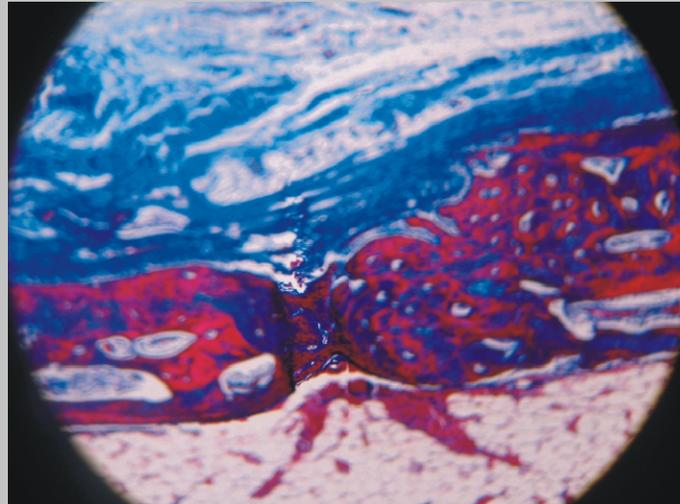
reconstrucción tridimensional



defecto de perone



defecto tibial



Tinción histológica de tricómico de Masson X10

Defecto Tibial.

Zona de consolidación y reparación del defecto donde se observa claramente un tejido muy inmaduro por regenerado del perióstio. Osificación membranosa.

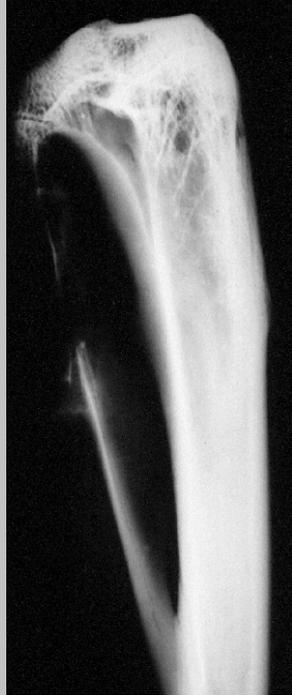
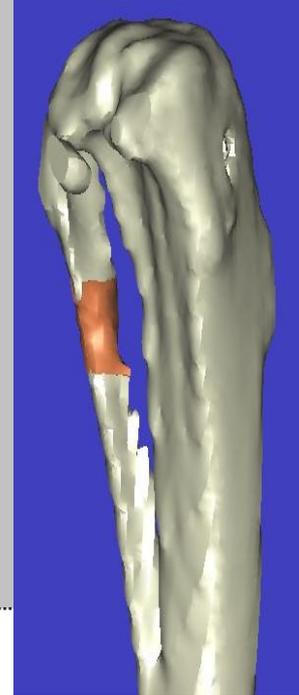


imagen radiográfica



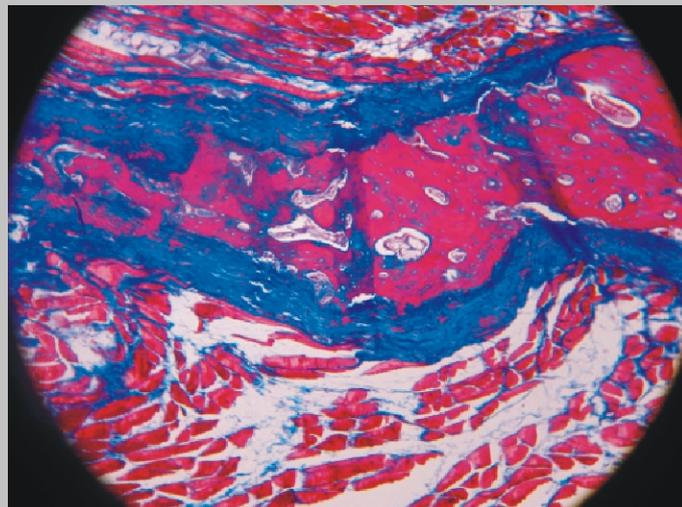
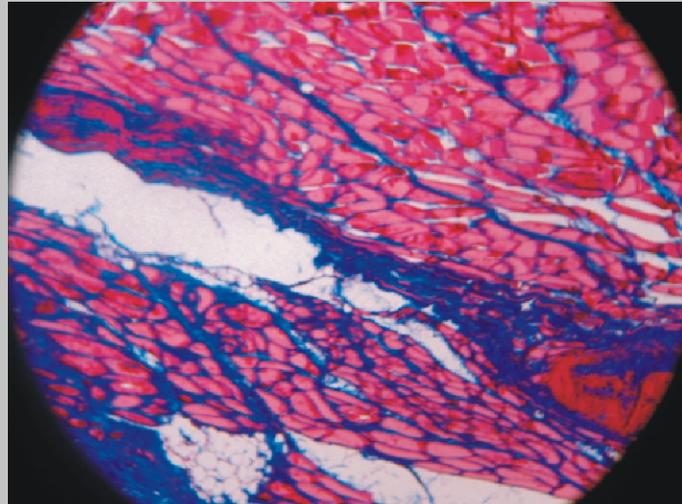
reconstrucción tridimensional



defecto de perone



defecto tibial



**Tinción histológica de tricómico de
Masson X10, X20**

*Se observa un tejido óseo inmaduro que está calcificando.
Osificación membranosa y endocondral. Reconstrucción
del defecto siempre de forma centripeta.*

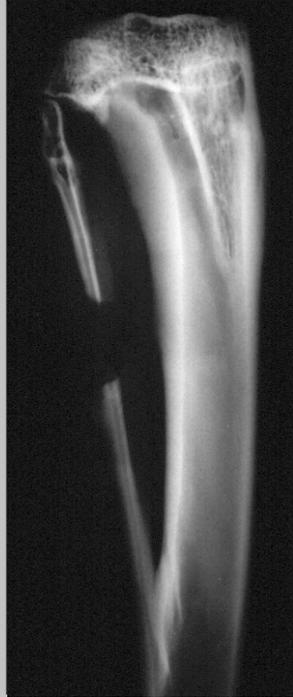
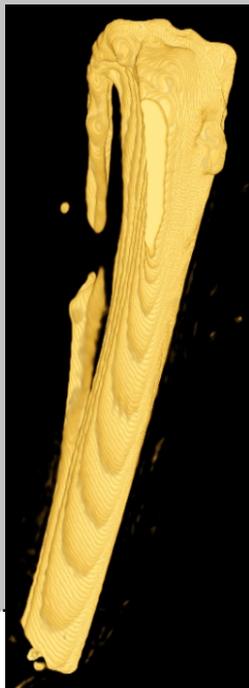


imagen radiográfica



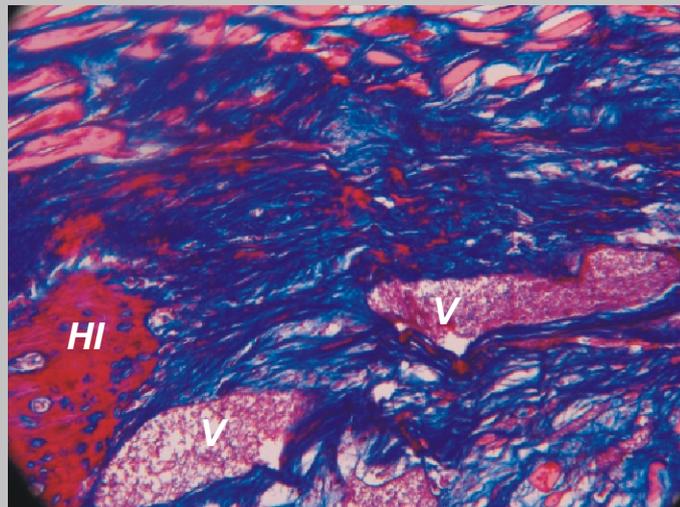
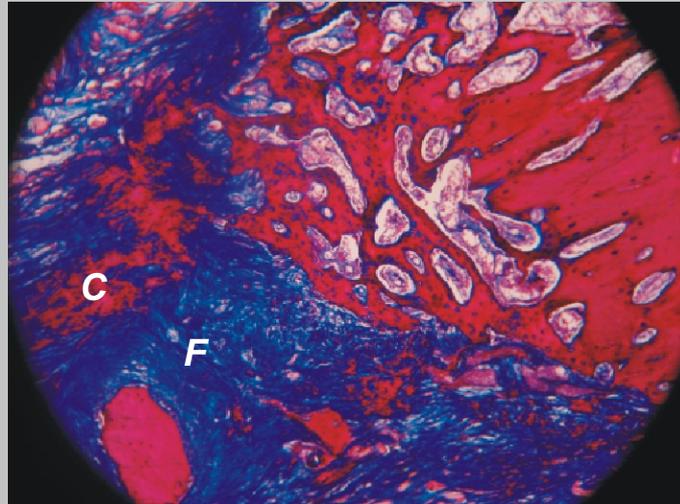
reconstrucción tridimensional



defecto de perone



defecto tibial

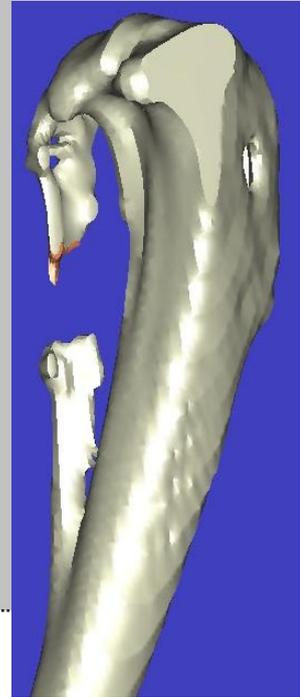


Tinción histológica de tricómico de Masson X10

Se observa una zona clara del defecto óseo con gran actividad celular. Tejido óseo inmaduro e irregular (HI). Predomina la zona de tejido fibrótico (F) con áreas claramente calcificadas (C). Zona hipervascularizada. Gran cantidad de vasos sanguíneos (V):



imagen radiográfica



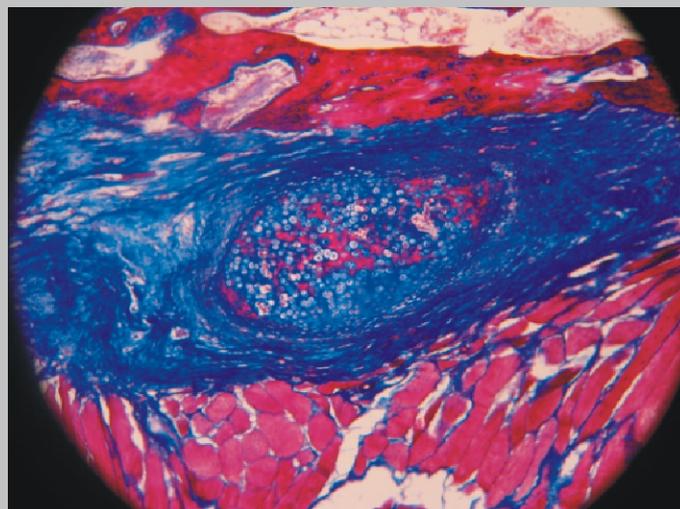
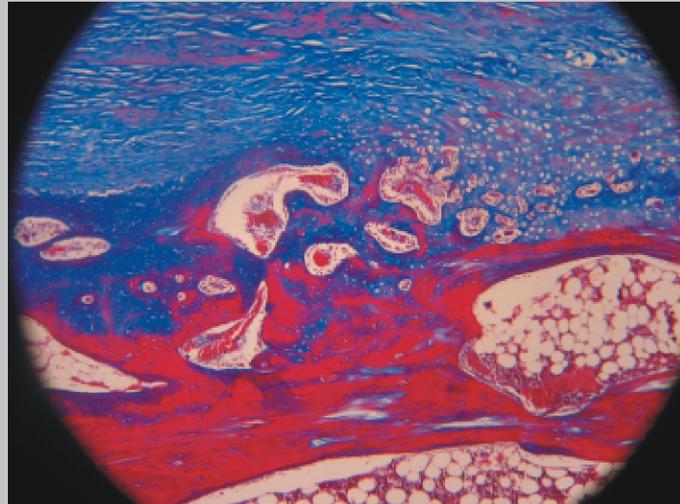
reconstrucción tridimensional



defecto de perone



defecto tibial



Tinción histológica de tricómico de Masson X10

Imagen clara de osificación endocondral, osificación medular, el tejido cartilaginoso comienza a transformarse en un hueso inmaduro. Areas de calcificación.

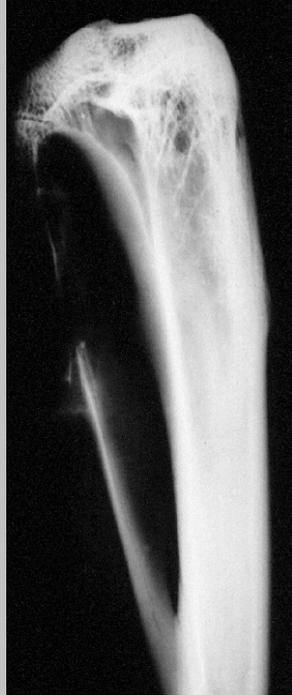
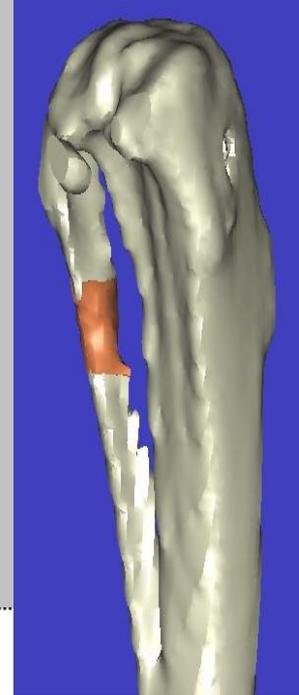


imagen radiográfica



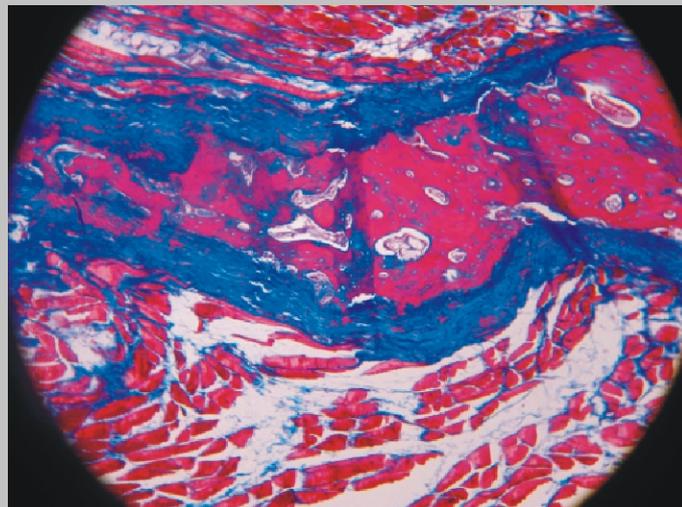
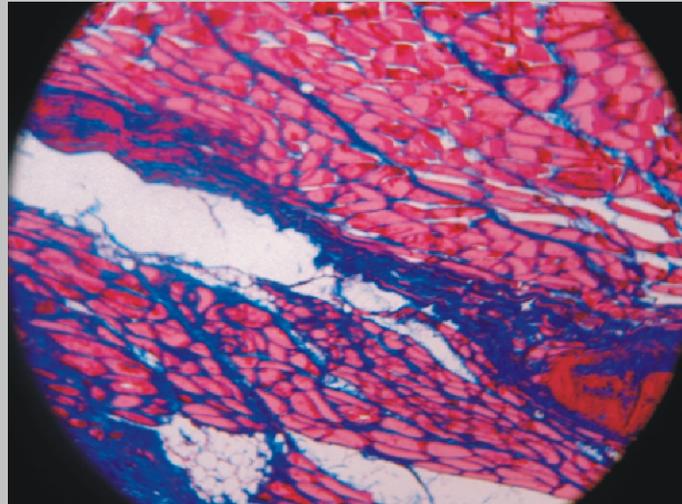
reconstrucción tridimensional



defecto de perone



defecto tibial



**Tinción histológica de tricómico de
Masson X10, X20**

*Se observa un tejido óseo inmaduro que está calcificando.
Osificación membranosa y endocondral. Reconstrucción
del defecto siempre de forma centripeta.*



imagen radiográfica



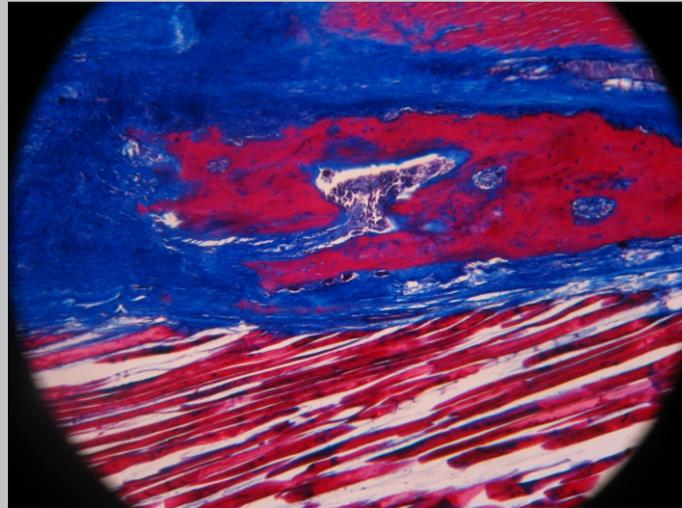
reconstrucción tridimensional



defecto de perone



defecto tibial



Tinción histológica de tricómico de Masson X10

Se observa un patrón claro de reacción perióstica con osificación membranosa.



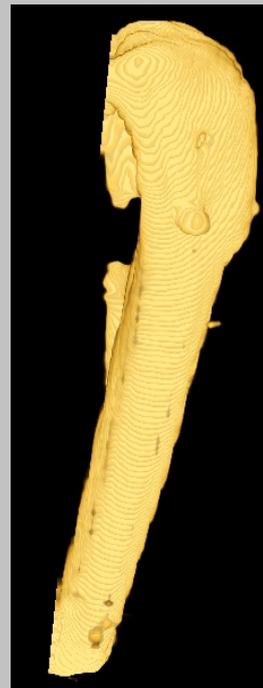
imagen radiográfica



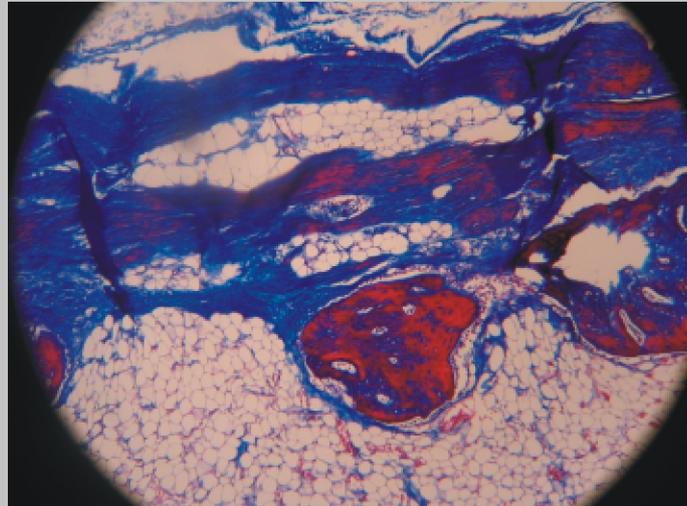
reconstrucción tridimensional



defecto de perone



defecto tibial



Tinción histológica de tricómico de Masson X10

Se observa una clara tendencia a la reconstrucción del defecto. Zona de gran actividad hística. Tejido inmaduro calcificado vascular. Región del defecto con tejido muy inmaduro con zonas de calcificación endocondral y membranosa.

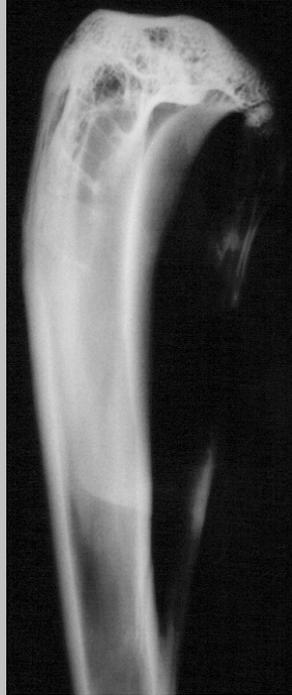
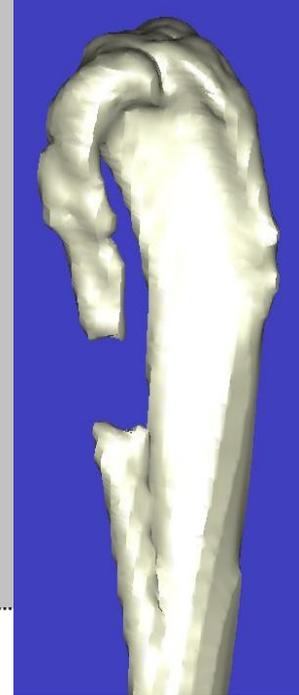


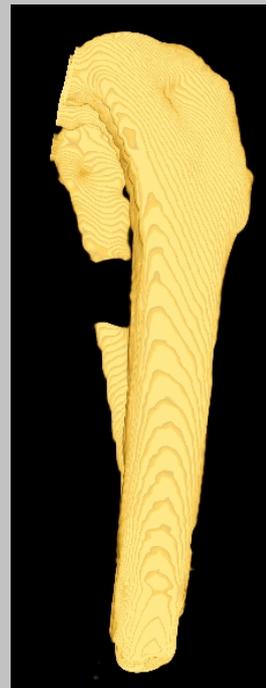
imagen radiográfica



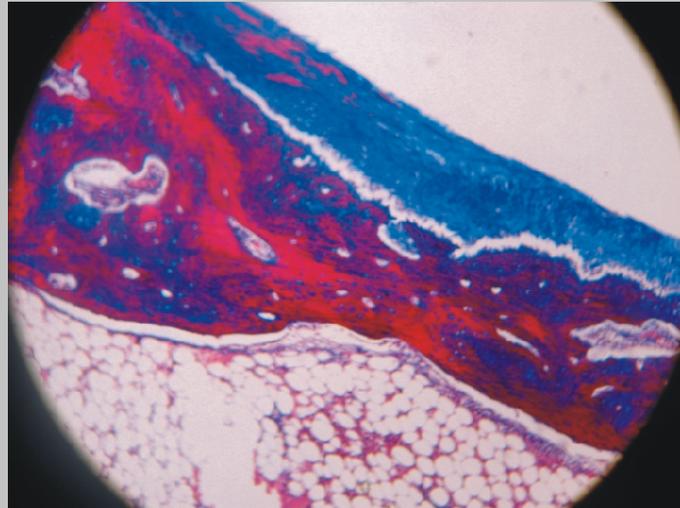
reconstrucción tridimensional



defecto de perone



defecto tibial



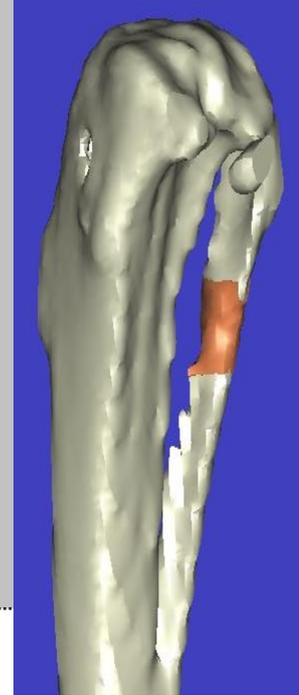
Tinción histológica de tricómico de Masson X10

Defecto Tibial.

Zona de consolidación y reparación del defecto donde se observa claramente un tejido muy inmaduro por regenerado del perióstio. Osificación membranosa.



imagen radiográfica



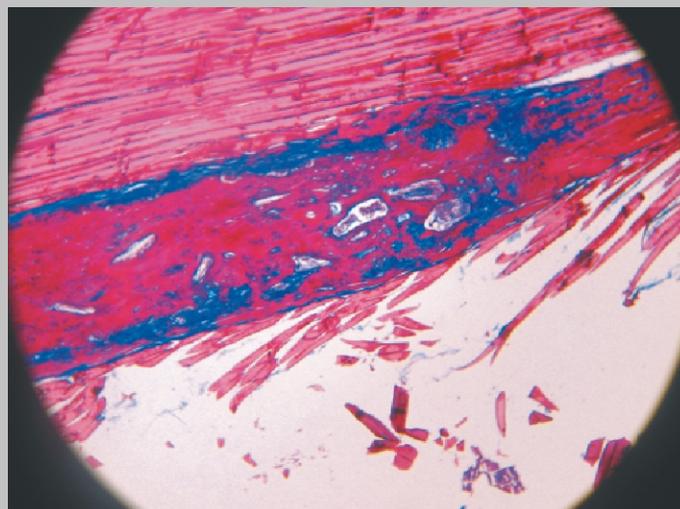
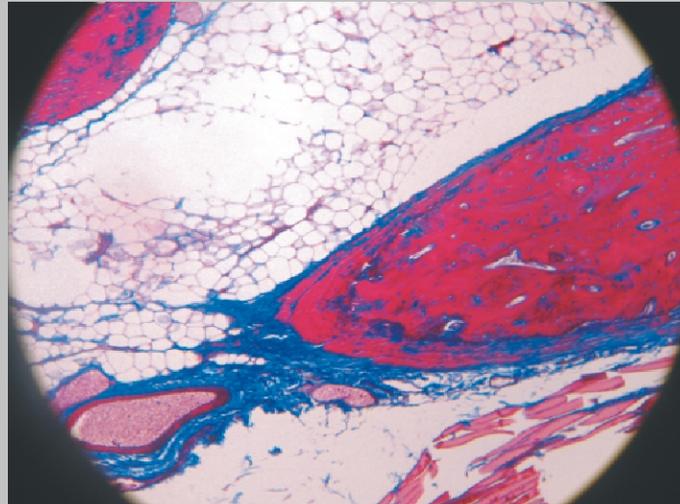
reconstrucción tridimensional



defecto de perone



defecto tibial

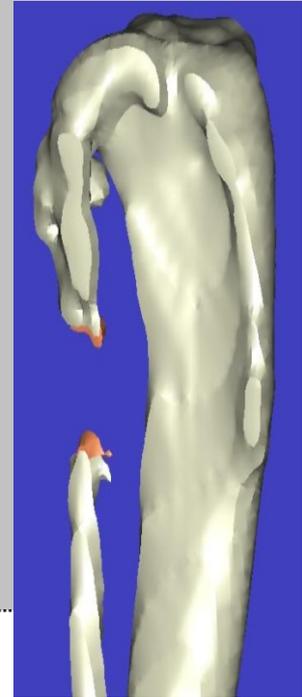


**Tinción histológica de tricómico de
Masson X10, X20**

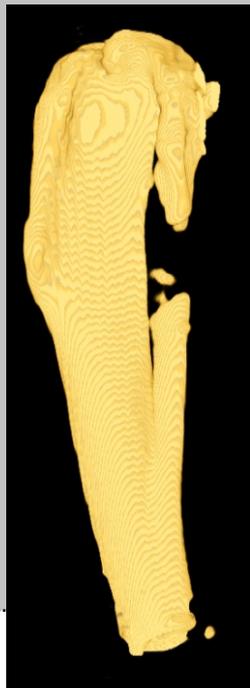
*Se observa un tejido óseo inmaduro que está calcificando.
Osificación membranosa y endocondral. Reconstrucción
del defecto siempre de forma centripeta.*



imagen radiográfica



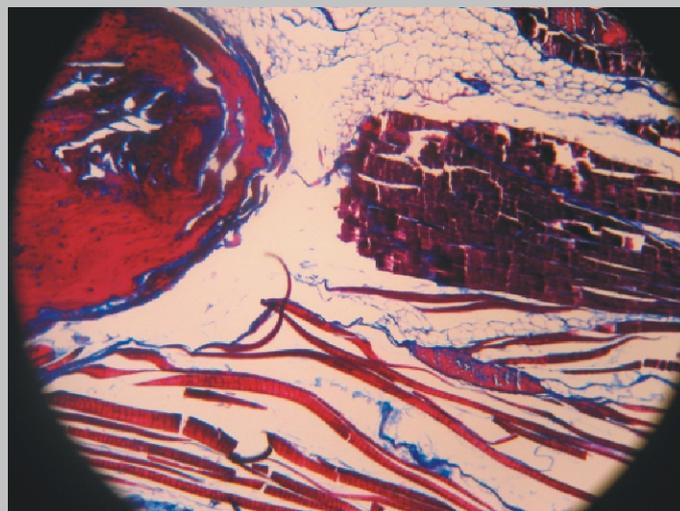
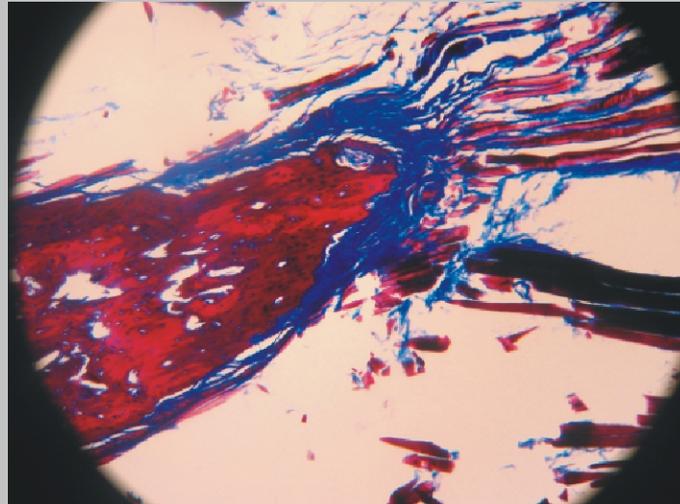
reconstrucción tridimensional



defecto de perone



defecto tibial

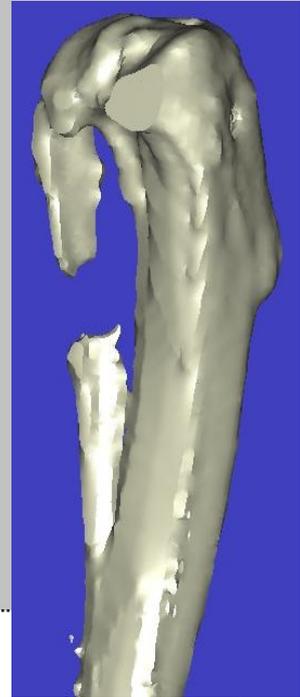


**Tinción histológica de tricómico de
Masson X10, X20**

*Se observa un tejido óseo inmaduro que está calcificando.
Osificación membranosa y endocondral. Reconstrucción
del defecto siempre de forma centripeta.*



imagen radiográfica



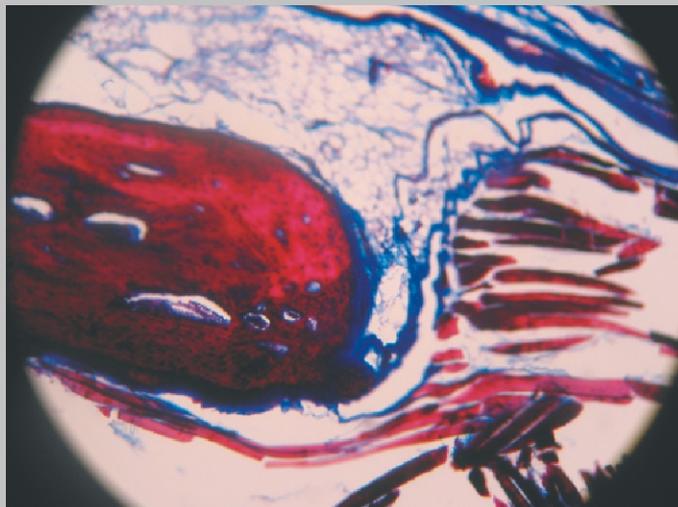
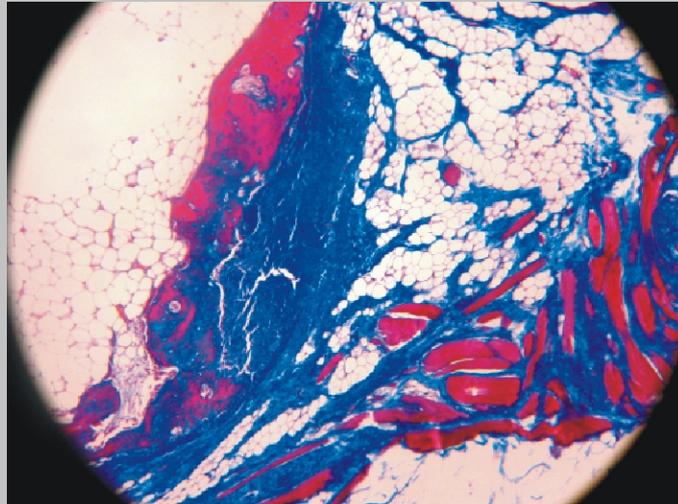
reconstrucción tridimensional



defecto de perone



defecto tibial



Tinción histológica de tricómico de Masson X10

Se observa un frente de osificación muy claro de tipo membranoso. Tejido fibroso que se calcifica. Observamos en el frente distintos tipos de células.

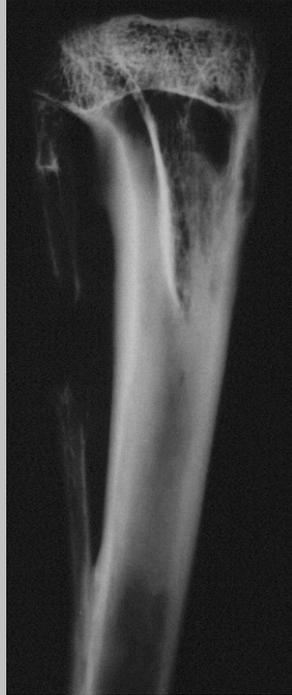
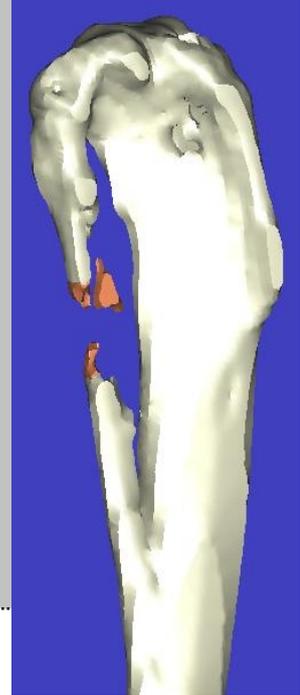


imagen radiográfica



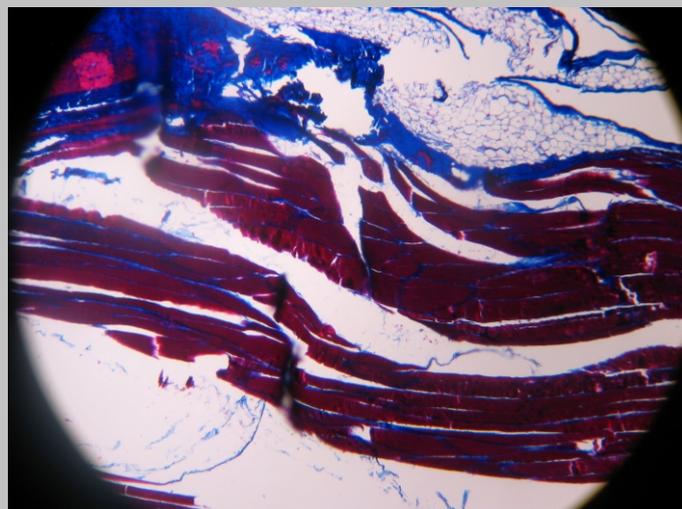
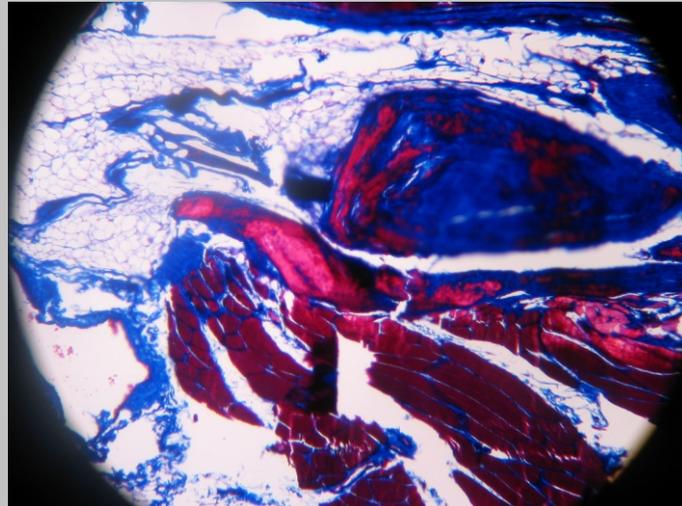
reconstrucción tridimensional



defecto de perone



defecto tibial



Tinción histológica de tricómico de Masson X10

*Se observa una zona de tejido fibroso con áreas calcificadas.
Poca celularidad.*

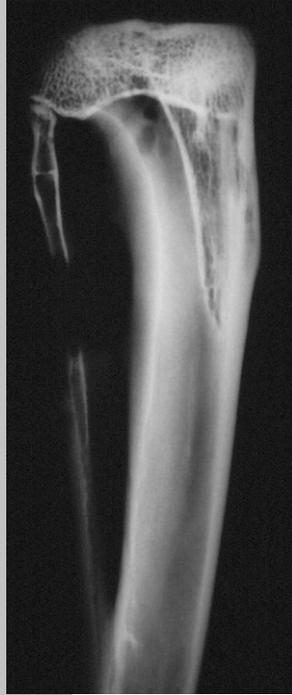
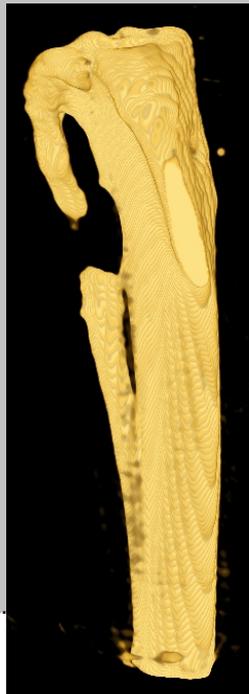


imagen radiográfica



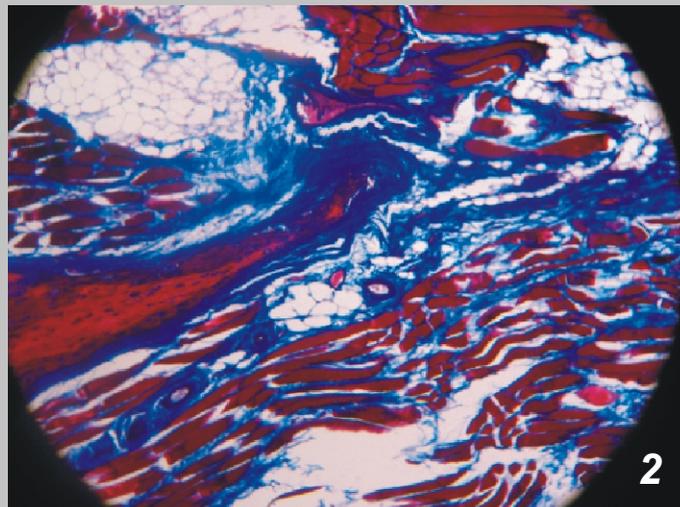
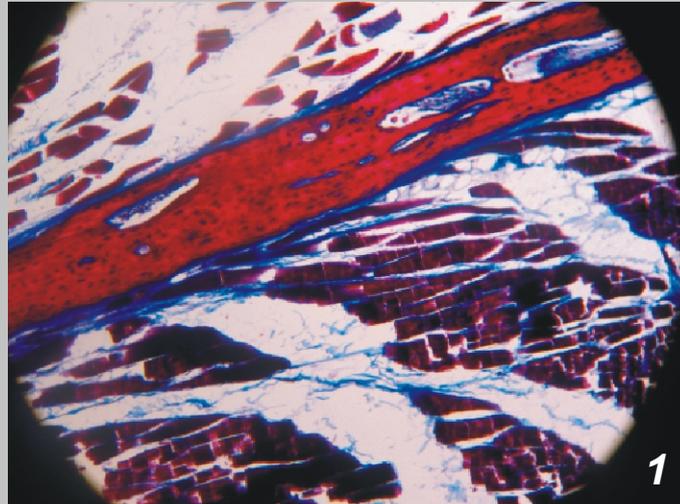
reconstrucción tridimensional



defecto de perone



defecto tibial



Tinción histológica de tricómico de Masson X10

1. Se observa una zona de hueso nuevo inmaduro formado por el perióstio. osificación membranosa.

2. Se observa un frente de osificación desde uno de los extremos del defecto. Reacción perióstica importante.



imagen radiográfica



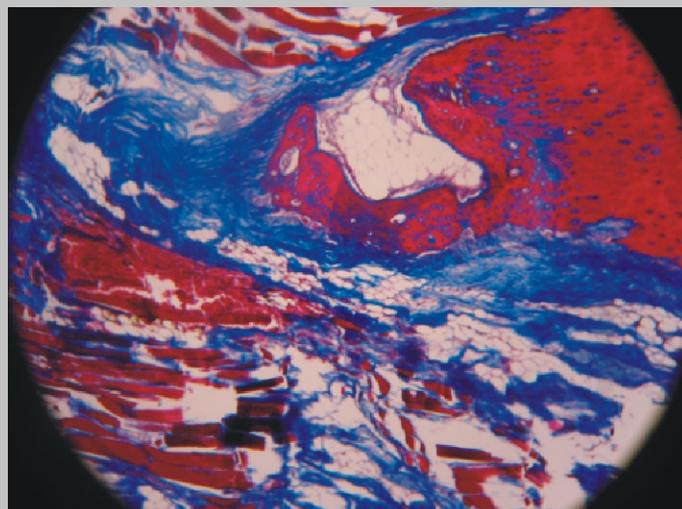
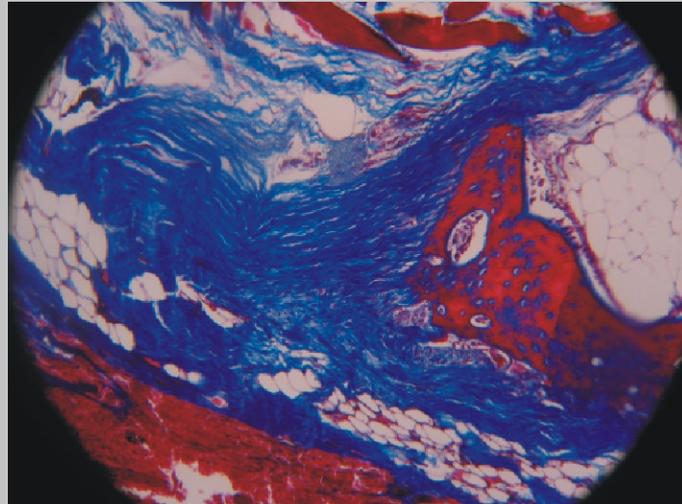
reconstrucción tridimensional



defecto de perone

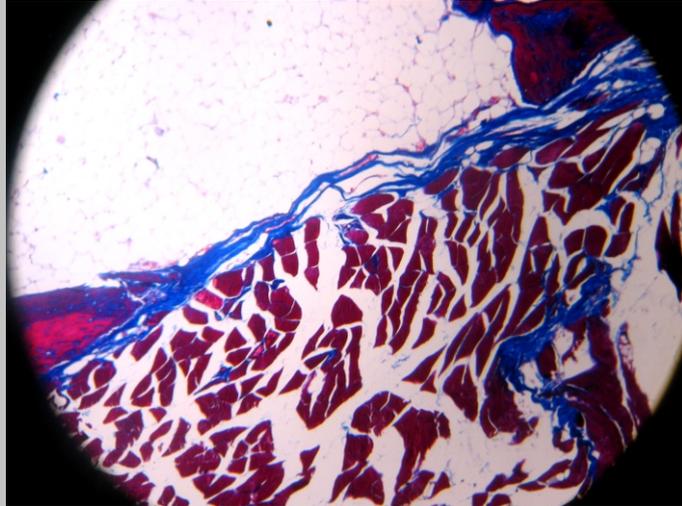


defecto tibial



Tinción histológica de tricómico de Masson X10

Se observa un frente de osificación desde uno de los extremos del defecto. Reacción perióstica importante. Tejido fibrovascular que se calcifica en punta de flecha. Grandes lagunas celulares en el interior del tejido.



Tinción histológica de tricómico de Masson X10

Se observa un aspecto de cono cortado con intensa reacción fibrótica en ambos extremos del defecto. Tejido fibroso que comienza a osificarse en los extremos. Hueso inmaduro muy celular. Posiblemente por reacciones de remodelación. Reabsorción y aposición de hueso inmaduro. Defecto óseo no reconstruido. tejido fibroso interfragmentario.



imagen radiográfica



reconstrucción tridimensional



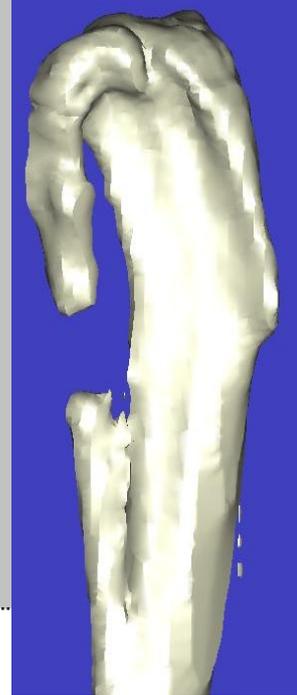
defecto de perone



defecto tibial



imagen radiográfica



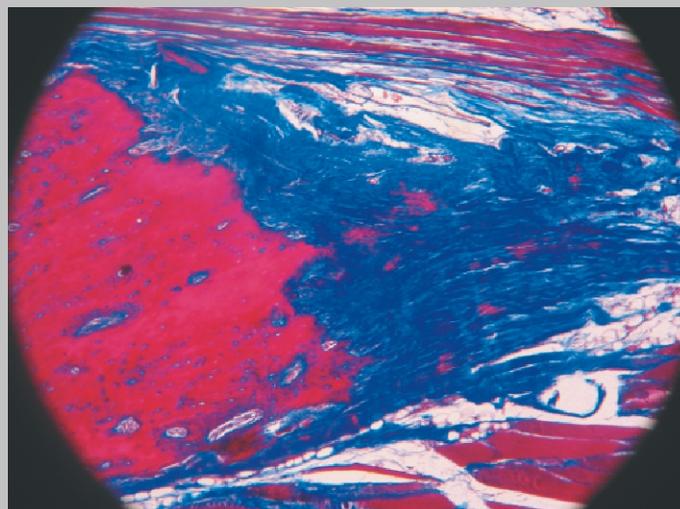
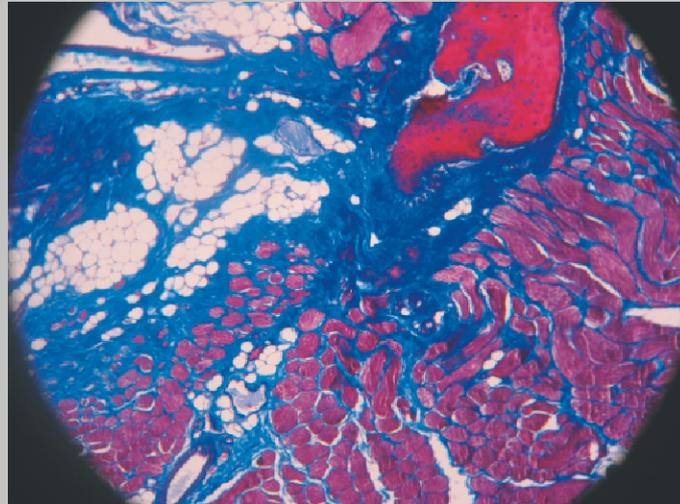
reconstrucción tridimensional



defecto de perone



defecto tibial



Tinción histológica de tricómico de Masson X10

Se observa un frente de osificación muy claro de tipo membranoso. tejido fibroso que se calcifica. Observamos en el frente distintos tipos de células.



imagen radiográfica



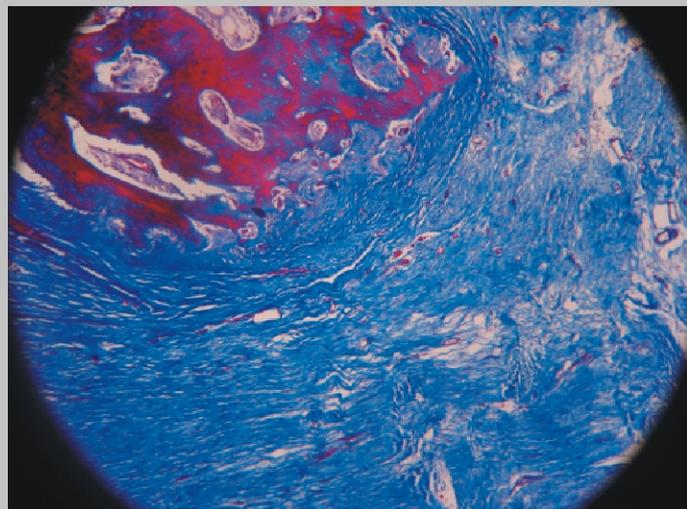
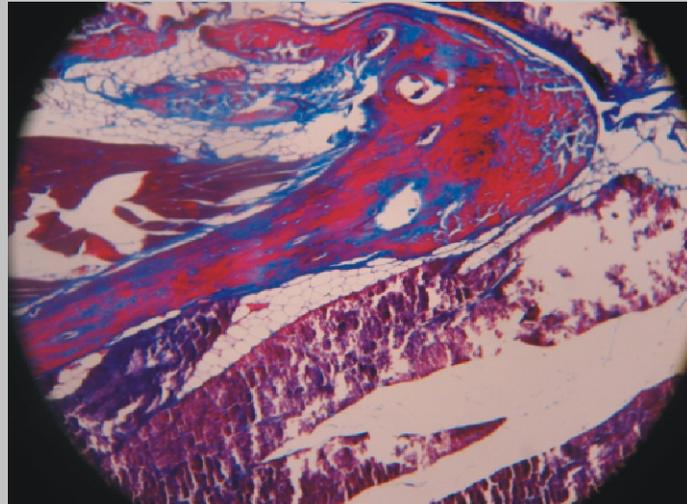
reconstrucción tridimensional



defecto de perone



defecto tibial



Tinción histológica de tricómico de Masson X10

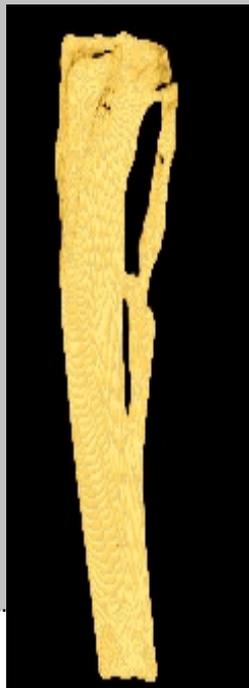
Se observa un frente de osificación muy claro de tipo membranoso. Tejido fibroso que se calcifica. Observamos en el frente distintos tipos de células.



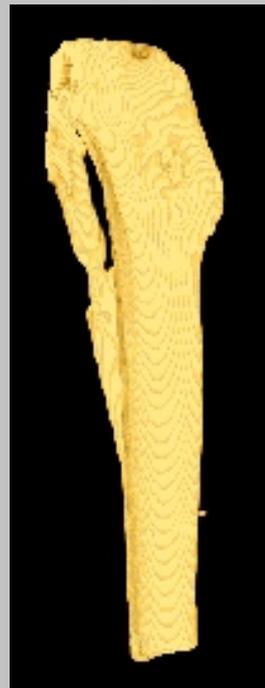
imagen radiográfica



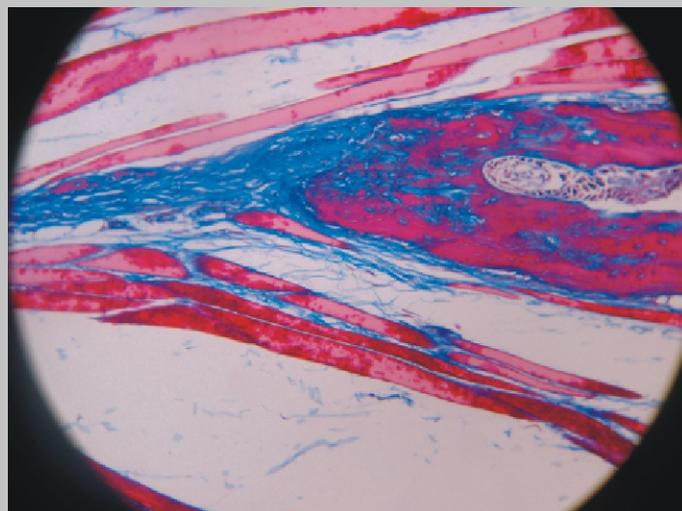
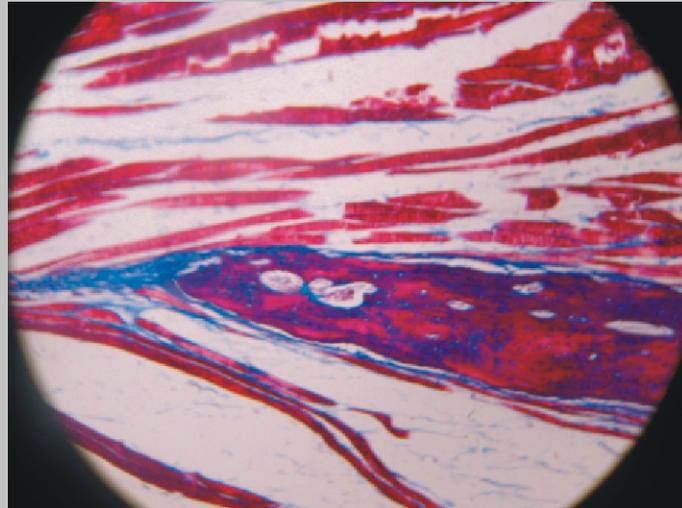
reconstrucción tridimensional



defecto de perone



defecto tibial



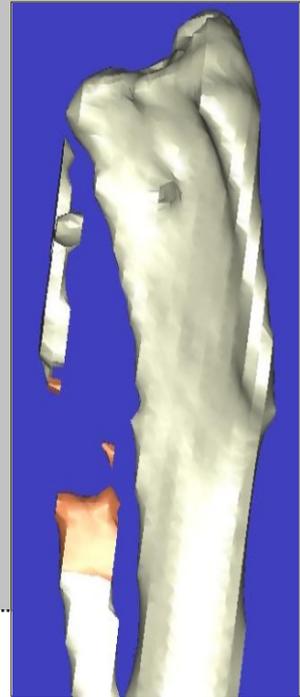
Tinción histológica de tricómico de Masson X10

Defecto peroné.

Extremos del defecto óseo de peroné donde se observa un hueso inmaduro irregular muy celular por osificación membranosa (periostio). Pequeñas zonas de calcificación del tejido fibroso.



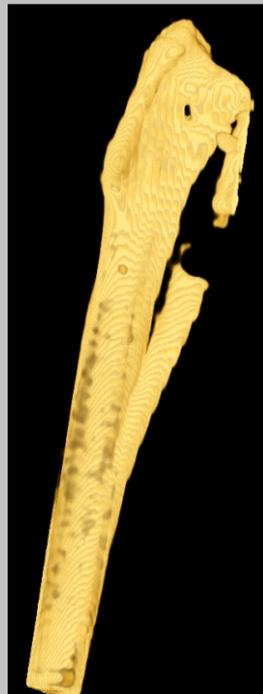
imagen radiográfica



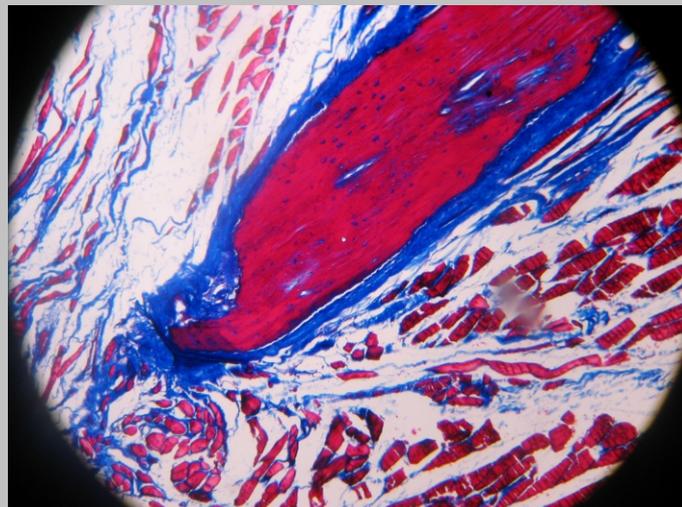
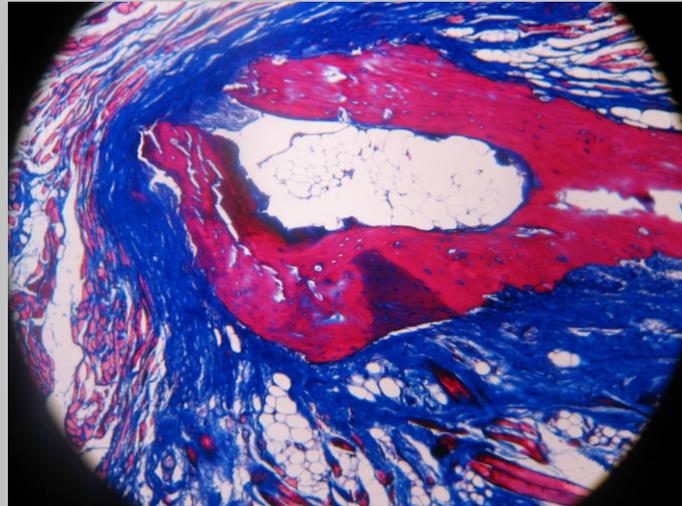
reconstrucción tridimensional



defecto de perone



defecto tibial



Tinción histológica de tricómico de Masson X10

Se observa un aspecto de cono cortado con intensa reacción celular en ambos extremos del defecto de peroné. Reacción perióstica con fibras de tejido fibroso que comienza a osificarse. Hueso inmaduro muy celular. Intento de cicatrización del defecto con tejido fibroso que tiende a calcificarse. No se observa un patrón claro de osificación membranosa ni endocondral.



imagen radiográfica

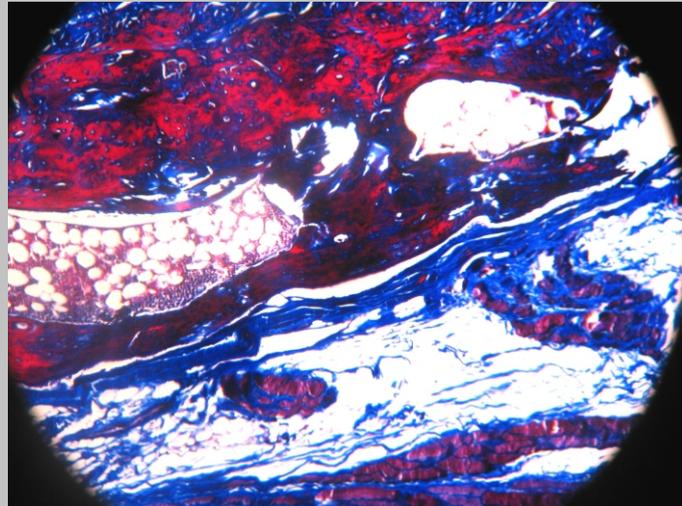
*reconstrucción
tridimensional*



defecto de perone



defecto tibial



Tinción histológica de tricómico de Masson X10

Se observa la regeneración de hueso muy inmaduro anarquico celular rodeado de tejido conjuntivo hipervascularizado. Tejido fibrovascular.

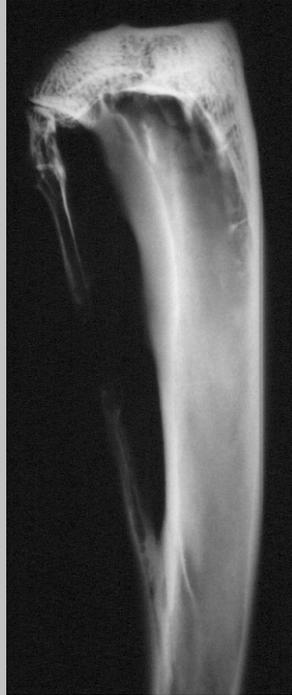


imagen radiográfica



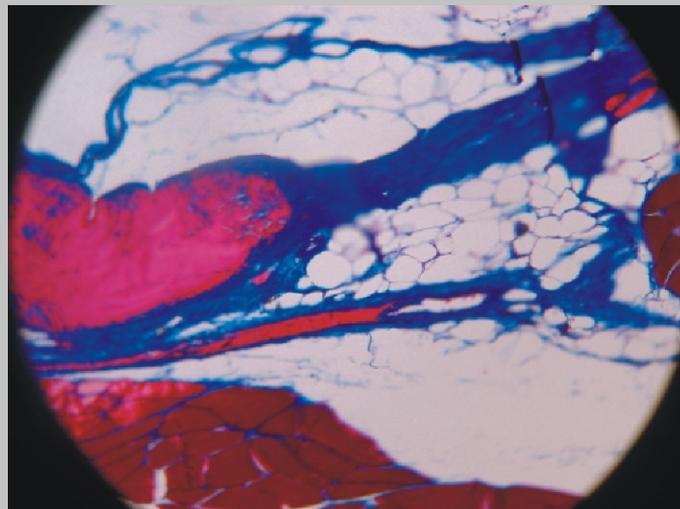
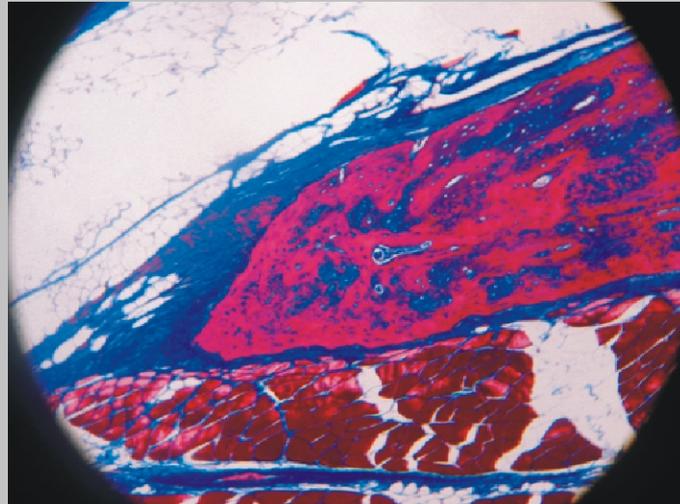
reconstrucción tridimensional



defecto de perone



defecto tibial



Tinción histológica de tricómico de Masson X10

*Se observa un tejido inmaduro que está calcificando.
Osificación membranosa y endocondral.
Reconstrucción del defecto siempre de forma centripeta.*



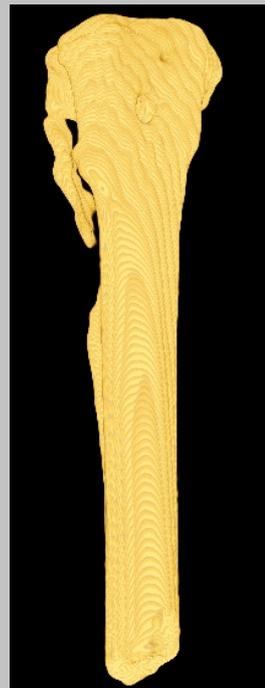
imagen radiográfica



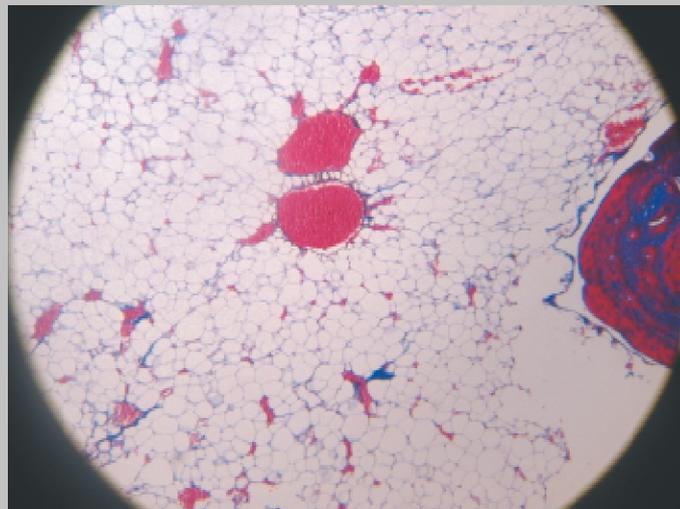
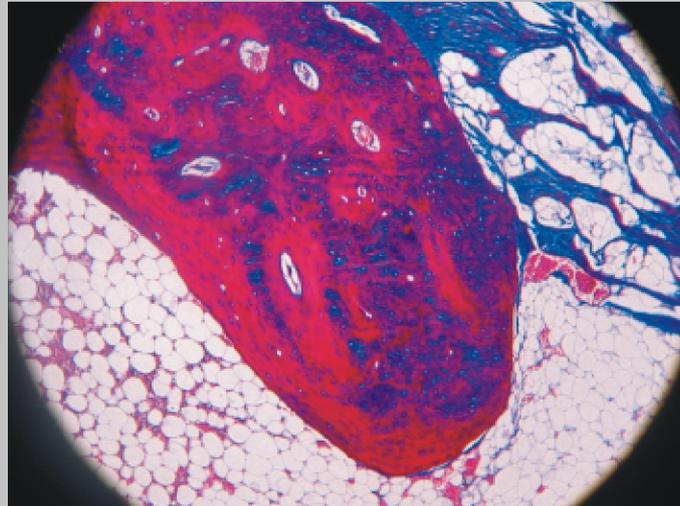
reconstrucción tridimensional



defecto de perone



defecto tibial

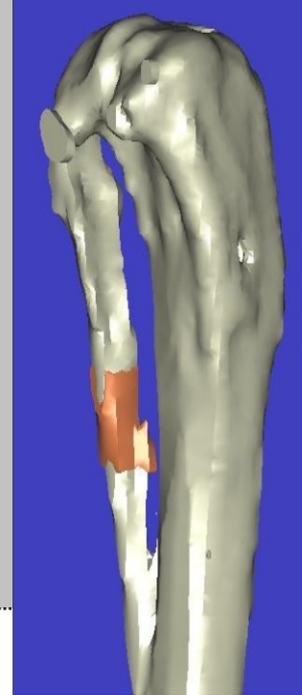


Tinción histológica de tricómico de Masson X10

Se observa un aspecto de cono cortado con intensa actividad celular en ambos extremos del defecto. Reacción perióstica con fibras de tejido fibroso que comienza a osificarse. Hueso inmaduro muy celular. Defecto no regenerado. Tejido fibroso con vasos. Únicamente se observa actividad osteoformadora en los extremos. En el extremo el hueso es inmaduro, irregular y muy celular. se observan zonas de tejido no calcificado, fibrótico o cartilaginoso.



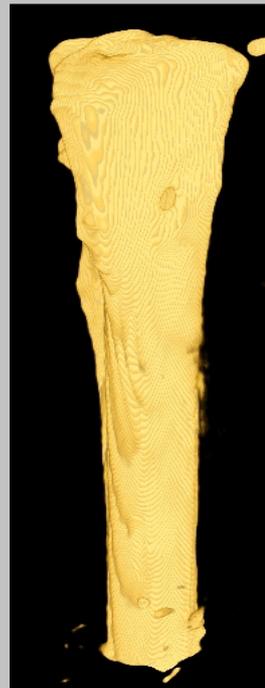
imagen radiográfica



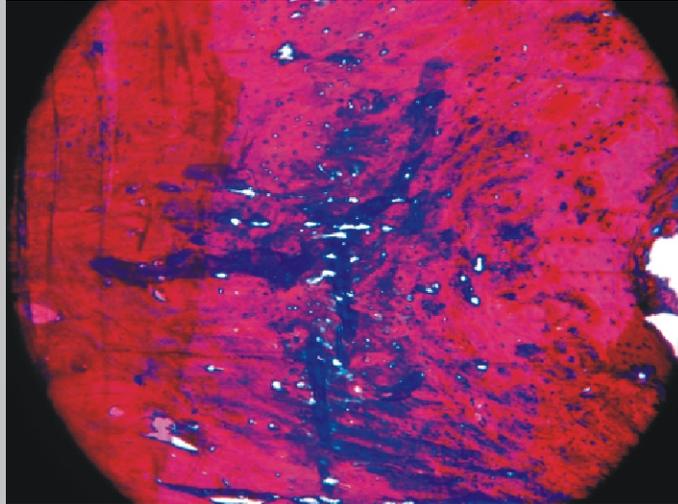
reconstrucción tridimensional



defecto de perone



defecto tibial

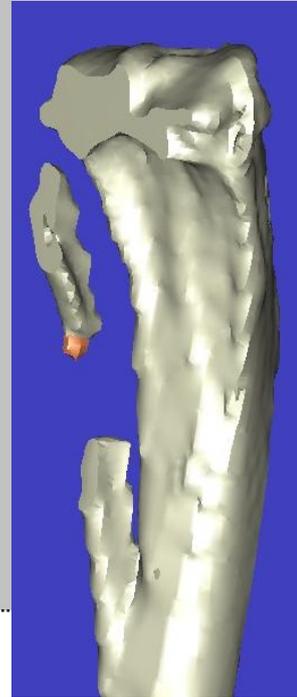


Tinción histológica de tricómico de Masson X10

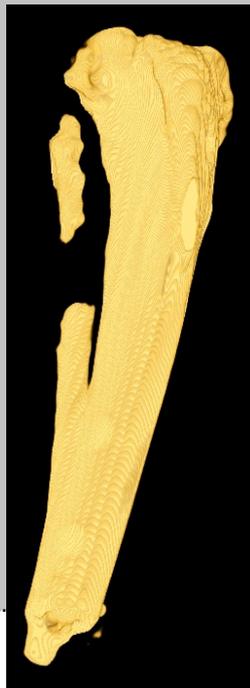
Se observa una reconstrucción completa del defecto por medio de regneación directa. Hueso inmaduro no laminar que se convierte en hueso laminar maduro.



imagen radiográfica



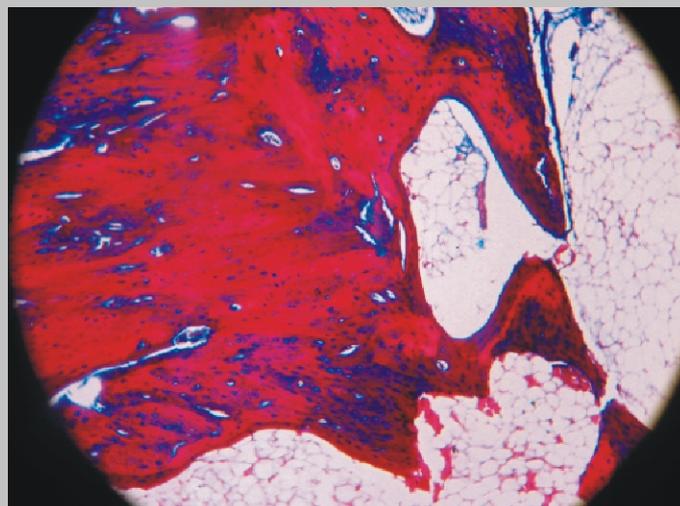
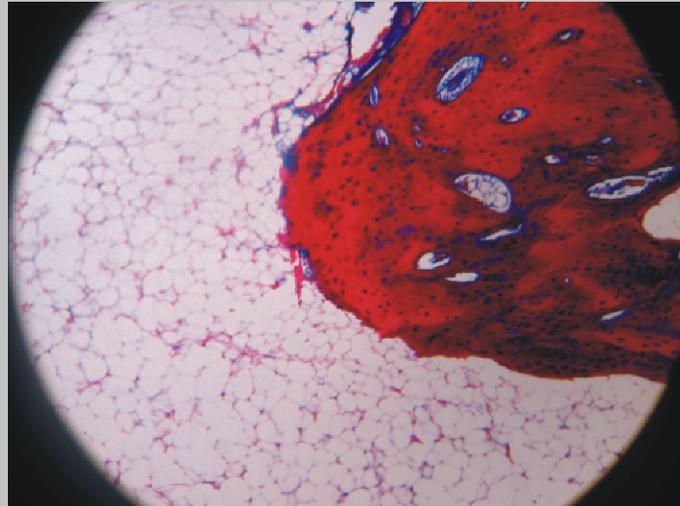
reconstrucción tridimensional



defecto de perone



defecto tibial

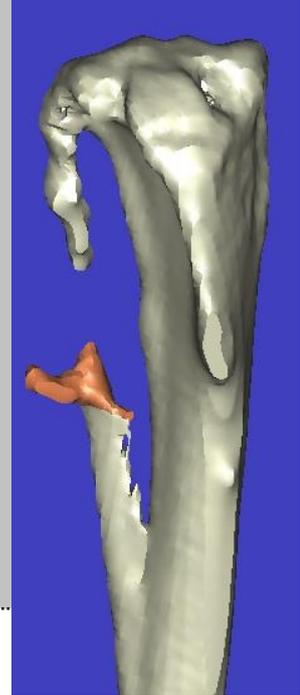


**Tinción histológica de tricómico de
Masson X10, X20**

*Se observa un tejido óseo inmaduro que está calcificando.
Osificación membranosa y endocondral. Reconstrucción
del defecto siempre de forma centripeta.*



imagen radiográfica



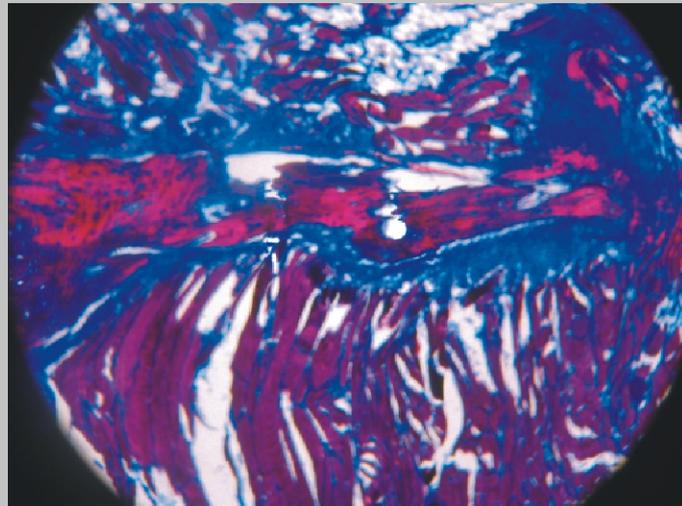
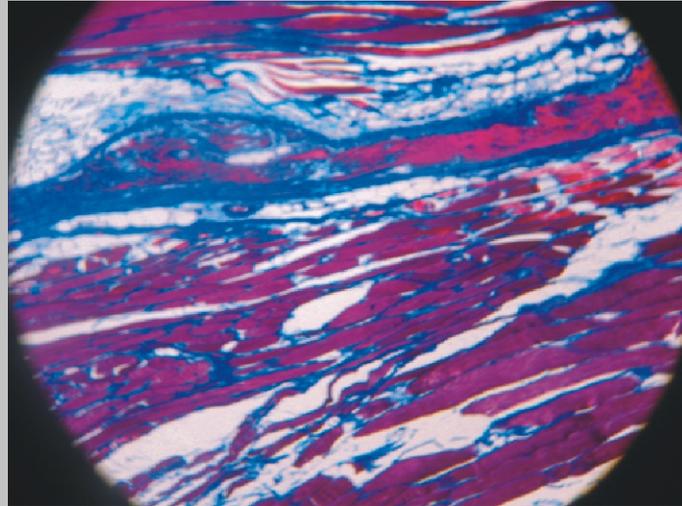
reconstrucción tridimensional



defecto de perone



defecto tibial

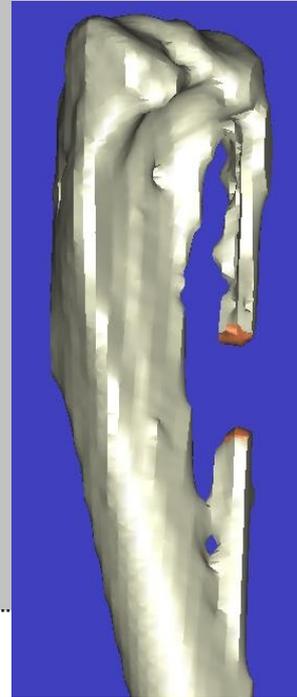


**Tinción histológica de tricómico de
Masson X10, X20**

*Se observa un tejido óseo inmaduro que está calcificando.
Osificación membranosa y endocondral. Reconstrucción
del defecto siempre de forma centripeta.*



imagen radiográfica



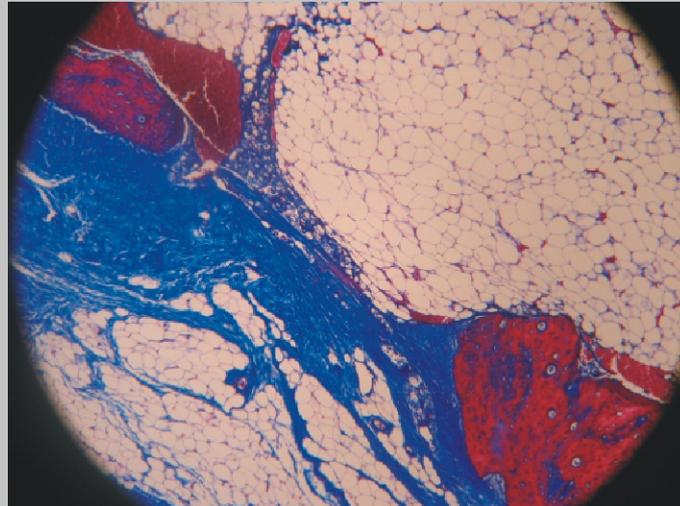
reconstrucción tridimensional



defecto de perone



defecto tibial

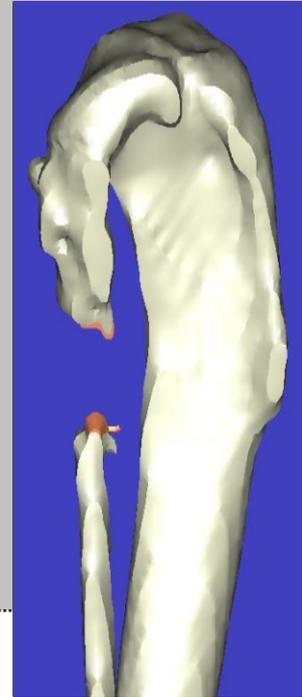


**Tinción histológica de tricómico de
Masson X10, X20**

*Se observa un tejido óseo inmaduro que está calcificando.
Osificación membranosa y endocondral. Reconstrucción
del defecto siempre de forma centripeta.*



imagen radiográfica



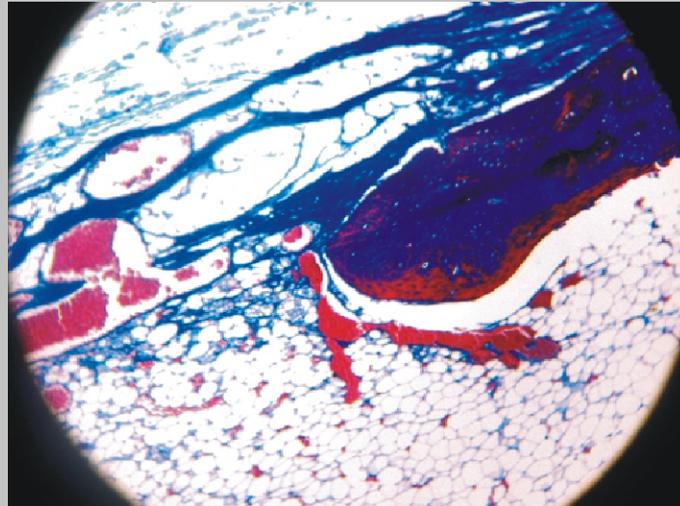
reconstrucción tridimensional



defecto de perone



defecto tibial



Tinción histológica de tricómico de Masson X10

Se observa un aspecto de cono cortado con intensa reacción celular en ambos extremos del defecto. Reacción perióstica con fibras de tejido fibroso que comienza a osificarse. Hueso inmaduro muy celular. Intento de cicatrización del defecto con tejido fibroso que tiende a calcificarse. Defecto no reconstruido pero con extremos muy activos con un tejido óseo inmaduro. Zona del defecto muy vascular.



imagen radiográfica



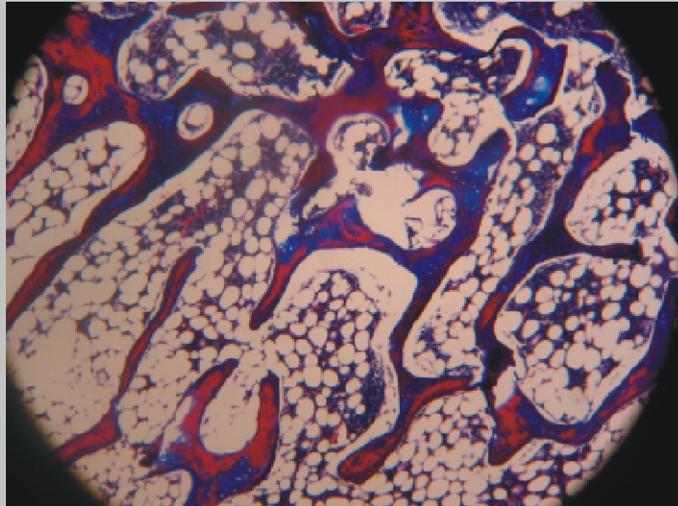
reconstrucción tridimensional



defecto de perone



defecto tibial

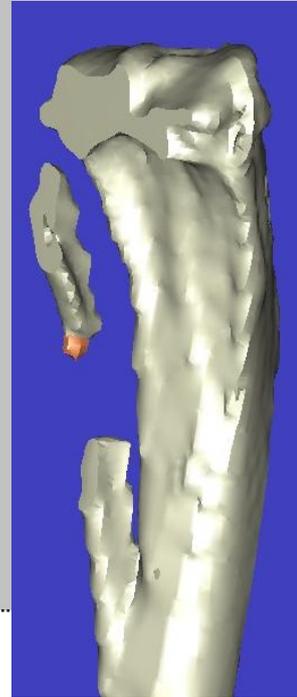


Tinción histológica de tricómico de Masson X10

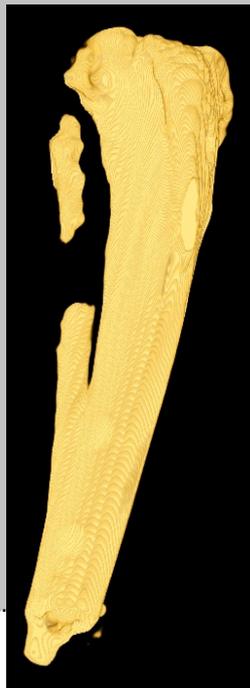
Se observa un tejido óseo inmaduro que se está calcificando. Patrón típico de hueso esponjoso.



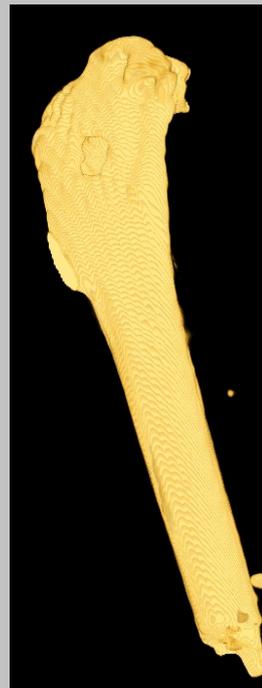
imagen radiográfica



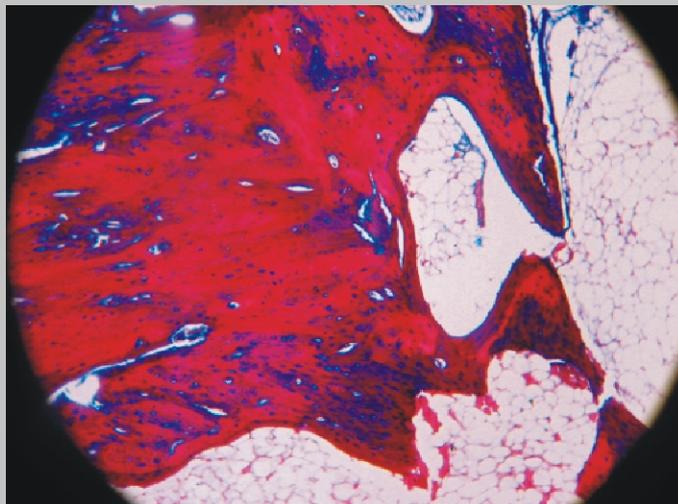
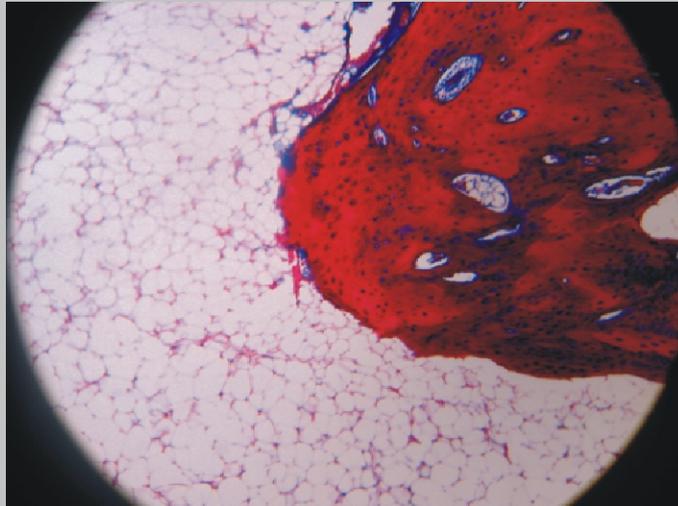
reconstrucción tridimensional



defecto de perone



defecto tibial



**Tinción histológica de tricómico de
Masson X10, X20**

*Se observa un tejido óseo inmaduro que está calcificando.
Osificación membranosa y endocondral. Reconstrucción
del defecto siempre de forma centripeta.*

ANEXO.**Resultados Radiológicos****Tabla Resultados radiológicos del grupo ppp**

8 semanas		12 semanas		16 semanas	
72378	1	39740	3	41374	3
35627	1	35309	1	41369	0
48196	2	72372	6	82170	0
82738	1	34527	4	92284	2
		39326	1		
		39916	5		
Total	1.25		3.30		1.25

Tabla de Resultados radiológicos del grupo PRP

8 semanas		12 semanas		16 semanas	
63357	0	52693	0	67473	0
65071	1	67155	1	74958	0
48432	3	51202	1	65003	1
47723	1	56767	3	47712	2
		56756	5		
		61811	2		
Total	1.25		2		0.75

Tabla de resultados radiológicos del grupo PRP

8 semanas		12 semanas		16 semanas	
72378	6	39740	6	41374	6
35627	5	35304	5	41369	8
48196	2	72373	6	81170	0
82738	3	34527	4	92284	1
63557	4	39326	0	67473	2
65071	2	39916	5	74958	5
48432	0	52693	5	65043	2
97733	2	67155	2	47712	1
		51202	2		
		56767	6		
		56756	7		
		61811	2		
Total	3		4.2		3.1

ANEXO. Estadística.

Tabla Resumen de los resultados de las principales variables estudiadas.

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
Altura defecto metafisario (mm)	56	,00	5,69	2,6408	1,45551
Anchura defecto metafisario (mm)	56	,00	4,72	2,3155	1,36111
Densidad mineral defecto metafisario (N° Hounsfield)	56	,00	551,44	77,5527	162,3471
Altura defecto peroné (mm)	56	,00	9,05	3,9594	3,04738
Densidad mineral defecto peroné (N° Hounsfield)	56	,00	1780,00	370,152	332,13176
Volumen defecto peroné (mm ³)	56	,00	157,20	42,1098	45,15193
Recuento plaquetario sangre periférica (miles/ml)	28	210000	473000	344461,5	60350,46
Recuento plaquetario concentrado (miles/ml)	28	24000	811000	423461,5	367492,0

Tabla de estadísticos de contrastes (Wilcoxon para muestras independientes).

	Altura defecto metafisario (mm) casos - Altura defecto metafisario (mm)	Anchura defecto metafisario (mm) casos - Anchura defecto metafisario (mm)	Densidad mineral defecto metafisario casos - Densidad mineral defecto metafisario	Altura defecto peroné (mm) casos - Altura defecto peroné (mm)	Densidad mineral defecto peroné casos - Densidad mineral defecto peroné	Volumen defecto peroné (mm ³) casos - Volumen defecto peroné (mm ³)
Z	-,057(a)	-,214(b)	-,866(a)	,860(b)	1,486(a)	-1,514(a)
Sig. asintót. (bilateral)	,954	,830	,386	,390	,137	,130

a Basado en los rangos positivos.

b Basado en los rangos negativos.

c Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon

Tabla de estadísticos de contrastes (Kruskal-Wallis para muestras independientes.)

	Altura defecto metafisario (mm)	Anchura defecto metafisario (mm)	Densidad mineral defecto metafisario (N Hounsfield)	Altura defecto peroné (mm)	Densidad mineral defecto peroné (N Hounsfield)	Volumen defecto peroné (mm ³)
Chi-cuadrado	,124	,914	4,472	5,179	2,705	9,134
gl	2	2	2	2	2	2
Sig. asintót.	,940	,633	,107	,075	,259	,010
Chi-cuadrado	1,930	3,067	4,864	1,318	1,065	1,307
gl	2	2	2	2	2	2
Sig. asintót.	,381	,216	,088	,517	,587	,520

a Prueba de Kruskal-Wallis

b Variable de agrupación: seman1

Tabla de Pruebas de normalidad para las distintas variables

	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Altura defecto metafisis (mm)	,167	25	,070	,864	25	,003
Anchura defecto metafisario (mm)	,158	25	,111	,919	25	,048
Densidad mineral defecto metafisario (N Hounsfield)	,433	25	,000	,605	25	,000
Altura defecto peroné (mm)	,237	25	,001	,840	25	,001
Densidad mineral defecto peroné (N Hounsfield)	,196	25	,015	,808	25	,000
Volumen defecto peroné (mm3)	,223	25	,002	,835	25	,001
Altura defecto metáfisis (mm) casos	,119	25	,200(*)	,960	25	,422
Anchura defecto metafisario (mm) casos	,145	25	,185	,946	25	,207
Densidad mineral defecto metafisario (N Hounsfield) casos	,492	25	,000	,453	25	,000
Altura defecto peroné (mm) casos	,198	25	,013	,846	25	,001
Densidad mineral defecto peroné (N Hounsfield) casos	,148	25	,167	,885	25	,009
Volumen defecto peroné (mm3) casos	,239	25	,001	,811	25	,000

Tabla de Coeficientes de correlación bivariada de Pearson para el grupo de aplicación del plasma pobre en plaquetas

	Altura defecto metáfisis (mm)	Anchura defecto metáfisis (mm)	Densidad mineral defecto metáfisis (NH)	Altura defecto peroné (mm)	Densidad mineral defecto peroné (NH)	Volumen defecto peroné (mm ³)	N Plaquetas/uL concentrado
Altura defecto metáfisis (mm)	1	,775(**)	-,509	,550	-,483	-,511	-,155
Anchura defecto metáfisis (mm)	,775(**)	1	-,655(*)	,254	-,508	-,283	,079
Densidad mineral defecto metáfisis (NH)	-,509	-,655(*)	1	,082	,103	,111	-,304
Altura defecto peroné (mm)	,550	,254	,082	1	-,716(**)	-,896(**)	-,332
Densidad mineral defecto peroné (NH)	-,483	-,508	,103	-,716(**)	1	,641(*)	,127
Volumen defecto peroné (mm ³)	-,511	-,283	,111	-,896(**)	,641(*)	1	,343
N Plaquetas/uL concentrado	-,155	,079	-,304	-,332	,127	,343	1

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

* La correlación es significante al nivel 0,05 (bilateral).

Tabla 1. Coeficientes de correlación bivariada de Pearson para el grupo de aplicación del plasma rico en plaquetas.

	Altura defecto metáfisis (mm)	Anchura defecto metáfisis (mm)	Densidad mineral defecto metáfisis (NH)	Altura defecto peroné (mm)	Densidad mineral defecto peroné (NH)	Volumen defecto peroné (mm ³)	N Plaquetas/uL concentrado
Altura defecto metáfisis (mm)	1	,845(**)	-,579(*)	-,036	-,017	-,043	,410
Anchura defecto metáfisis (mm)	,845(**)	1	-,476	,023	-,176	-,173	,324
Densidad mineral defecto metáfisis (NH)	-,579(*)	-,476	1	,207	-,255	-,222	-,271
Altura defecto peroné (mm)	-,036	,023	,207	1	-,759(**)	-,721(**)	,161
Densidad mineral defecto peroné (NH)	-,017	-,176	-,255	-,759(**)	1	,818(**)	,006
Volumen defecto peroné (mm ³)	-,043	-,173	-,222	-,721(**)	,818(**)	1	,098
N Plaquetas/uL concentrado	,410	,324	-,271	,161	,006	,098	1

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

* La correlación es significante al nivel 0,05 (bilateral).

Tratamiento	Semana	Altura defecto metáfisis (mm)	Anchura defecto metáfisis (mm)	Densidad mineral defecto metáfisis (N Hounsfield)	Altura defecto peroné (mm)	Densidad mineral defecto peroné (N Hounsfield)	Volumen defecto peroné (mm ³)	Referencia animal	Recuento plaquetario sangre periférica (N/μL)	Recuento plaquetario concentrado (N/μL)
CPP	2,00	3,16	1,89	,00	4,76	255,00	13,34	40150	282000	32000
CPP	8,00	3,69	2,20	,00	7,26	279,00	6,56	48196	473000	38000
CPP	8,00	5,69	4,24	150,00	8,20	,00	,00	82738	270000	28000
CPP	12,00	1,07	3,56	,00	,00	307,78	100,80	72373	318000	47000
CPP	12,00	1,05	2,03	,00	2,83	465,00	15,12	34527	340000	28000
CPP	12,00	3,03	2,67	,00	6,58	51,73	33,84	39326	337000	38000
CPP	12,00	.	.	.	,00	495,01	87,72	35309	247000	56000
CPP	12,00	3,38	3,09	,00	,00	492,08	109,87	39916	210000	24000
CPP	16,00	2,28	1,59	,00	,00	1019,25	104,50	41369	353000	42000
CPP	16,00	,00	,00	323,00	,00	728,20	95,04	41374	312000	29000
CPP	16,00	,00	,00	455,56	6,03	402,80	48,77	92284	297000	31000
CPP	16,00	4,42	4,06	,00	6,33	399,67	4,00	82170	311000	31000
CONTROL	2,00	2,46	1,23	,00	3,04	483,00	31,35	40150	.	.
CONTROL	8,00	3,70	3,21	277,00	3,41	289,63	32,03	63557	.	.
CONTROL	8,00	4,55	3,19	,00	1,69	457,75	18,09	65071	.	.
CONTROL	8,00	,00	,00	480,00	7,10	,00	,00	48432	.	.
CONTROL	8,00	,00	,00	480,33	7,00	,00	,00	47733	.	.

Tratamiento	Semanas	Altura defecto metáfisis	Anchura defecto metáfisis	Densidad mineral defecto metáfisis	Altura defecto peroné	Densidad mineral defecto peroné	Volumen defecto peroné	Referencia animal	Recuento plaquetario sangre periférica	Recuento plaquetario concentrado
CONTROL	8,00	2,89	2,91	160,00	6,90	,00	,00	48196	.	.
CONTROL	8,00	3,53	2,42	,00	5,76	313,67	4,03	82738	.	.
CONTROL	12,00	3,53	3,38	,00	,00	402,33	122,03	39916	.	.
CONTROL	12,00	2,65	1,78	,00	,00	897,67	117,50	51202	.	.
CONTROL	12,00	3,84	3,61	,00	6,92	,00	,00	61811	.	.
CONTROL	12,00	3,78	3,02	,00	,00	405,69	122,03	39316	.	.
CONTROL	12,00	2,02	1,26	,00	,00	275,83	90,79	56767	.	.
CONTROL	12,00	,00	,00	426,86	,00	355,00	157,20	72373	.	.
CONTROL	12,00	1,53	1,99	,00	6,09	374,00	35,09	35309	.	.
CONTROL	12,00	2,53	4,17	,00	4,79	346,67	25,46	34527	.	.
CONTROL	12,00	2,22	1,37	206,00	,00	962,00	77,31	56756	.	.
CONTROL	12,00	4,26	2,93	,00	,00	529,67	85,70	52693	.	.
CONTROL	12,00	3,76	3,03	,00	5,82	613,00	82,05	67155	.	.
CONTROL	16,00	2,62	1,73	,00	9,05	350,67	,66	41369	.	.
CONTROL	16,00	1,69	1,14	,00	4,83	278,80	11,13	65043	.	.
CONTROL	16,00	,00	,00	445,00	,00	1780,00	117,60	41374	.	.
CONTROL	16,00	3,95	3,78	,00	,00	691,17	83,94	74958	.	.
CONTROL	16,00	2,47	2,37	,00	5,97	407,67	4,28	67473	.	.
CONTROL	16,00	3,10	2,47	,00	5,71	413,50	3,91	47712	.	.
CONTROL	16,00	3,72	4,05	,00	7,06	,00	,00	92284	.	.
CONTROL	16,00	3,85	4,04	,00	6,42	274,75	15,77	82170	.	.
CRP	8,00	5,22	4,72	,00	4,63	338,25	16,86	65071	439000	810000
CRP	8,00	2,53	3,63	,00	1,48	182,00	36,19	63557	317000	712000
CRP	8,00	1,90	1,50	,00	7,50	,00	,00	47733	378000	723000
CRP	8,00	1,26	,71	,00	,00	940,80	71,79	48432	412000	695000

Tratamiento	Semanas	Altura defecto metáfisis	Anchura defecto metáfisis	Densidad mineral defecto metáfisis	Altura defecto peroné	Densidad mineral defecto peroné	Volumen defecto peroné	Referencia animal	Recuento plaquetario sangre periférica	Recuento plaquetario concentrado
CRP	12,00	3,89	4,42	,00	6,77	,00	,00	56767	351000	748000
CRP	12,00	2,72	3,86	,00	6,50	,00	,00	61811	428000	794000
CRP	12,00	3,04	1,86	,00	6,43	,00	,00	52693	378000	742000
CRP	12,00	3,28	2,05	,00	2,35	316,60	18,74	51202	322000	776000
CRP	12,00	3,14	2,12	,00	,00	483,80	74,22	56756	375000	775000
CRP	12,00	2,62	1,80	,00	5,56	471,25	84,10	67155	395000	811000
CRP	16,00	1,08	1,00	,00	6,19	292,40	9,57	67473	316000	793000
CRP	16,00	4,30	3,85	,00	4,61	424,75	20,73	74958	405000	747000
CRP	16,00	,00	,00	551,44	6,66	,00	,00	65043	356000	721000
CRP	16,00	3,28	2,16	,00	7,56	,00	,00	47712	334000	739000

(ppp) método de plasma pobre en plaquetas; (PRP) método de plasma rico en plaquetas.

6. DISCUSIÓN

El hueso es el único tejido del organismo que al ser dañado es capaz de regenerarse por medio de la creación de un tejido exactamente igual al original. De esta manera, cuando el hueso presenta soluciones de continuidad, ya sea por fracturas u otros defectos, se ponen en marcha de inmediato los mecanismos osteoformadores con la finalidad de restaurar el tejido óseo en el lugar de la lesión. Habitualmente, la dinámica del hueso es suficiente para reconstruir los defectos comunes, no obstante, en las pérdidas mayores de masa tisular se hace necesario recurrir al aporte de sustitutivos óseos para obtener la reparación.²²⁴

La reconstrucción de defectos en el sistema músculo esquelético es uno de los mayores retos a los que se enfrenta un cirujano ortopédico. El estilo de vida actual, los traumatismos deportivos laborales y los traumatismos de alta energía, resecciones tumorales, osteolisis protésicas son una fuente frecuente de grandes lesiones óseas y partes blandas. La sociedad actualmente exige y nos demanda soluciones en consonancia con los retos actuales. Los avances tecnológicos y la experimentación básica han permitido un mejor conocimiento de los procesos fisiológicos y patológicos del organismo humano y han desarrollado nuevas técnicas quirúrgicas con nuevos diseños de implantes y materiales quirúrgicos. Este desarrollo vanguardista y positivo nos acerca a la solución de los grandes problemas ortopédicos y traumatológicos pero en el tema de las grandes lesiones y defectos tiene sus limitaciones.

Hoy en día el mejor sustitutivo óseo es el hueso mismo, ya sea proveniente del propio paciente, como en el caso del autoinjerto óseo, o bien obtenido de un donante, como cuando se emplea un aloinjerto óseo. El autoinjerto o injerto autólogo continua siendo el único biomaterial que posee

la capacidad osteogénica, osteoinductora y osteoconductora, pero este genera una gran morbilidad de la zona donante y su disponibilidad es limitada.

La posibilidad de sustituir un tejido u órgano dañado o insuficiente siempre ha sido objeto de gran preocupación. Muchos han sido los avances realizados por la medicina para resolver los problemas de déficit óseo.

En 1965 comienza la era de los factores de crecimiento Urist²⁶³ realizó el descubrimiento clave al utilizar segmentos liofilizados desmineralizados de hueso de conejo inducían neoformación ósea en una bolsa intramuscular.

Reddi y Huggins en 1972²⁰³ utilizaron polvo de matriz desmineralizada y aumentaron la superficie para inducir con rapidez la cascada de osificación endocondral sobre una base predecible en una localización ectópica. La ventaja de la localización heterotópica, mostraba de una manera irrefutable, la inducción ósea *de novo*. Con este modelo tan simple se aportó un conocimiento inesperado sobre el aislamiento de señales que inician la reparación de las fracturas. Comenzaba la era molecular en cirugía ortopédica y Traumatología.

Las conocidas limitaciones de los injertos como sustitutos óseos, permitieron que la microcirugía vascular y la osteogénesis por distracción pudiesen entregar otro interesante aporte para la solución de defectos óseos específicos.

Todas las técnicas más novedosas, los nuevos materiales, las cerámicas y sustancias osteoconductivas por sí solas no lograron alcanzar la excelencia de la osteoinducción y osteogénesis, con lo que no pudieron hacer frente a la demanda fisiopatológica, que suponía una reconstrucción de un defecto músculo esquelético. La terapia génica y celular hoy por hoy continúa siendo un tema en investigación inicial.⁹⁰ La combinación de estos productos compuestos no resuelve la necesidad ni el problema.

Pese a todos los avances descritos, la sustitución del hueso continúa siendo un problema pendiente de resolver en nuestros días. Por lo anterior, en la década de los setenta comienzan a desarrollarse en diferentes laboratorios de ingeniería de los materiales, numerosas líneas de

investigación que ensayan la formulación y caracterización de variados biomateriales que puedan tener utilidad para promover la regeneración del tejido óseo.

Como hemos señalado, los biomateriales corresponden a todos aquellos materiales, elementos, sustancias o compuestos, elaborados con componentes naturales o artificiales, que pueden implantarse en un organismo vivo para reemplazar o reparar un tejido natural lesionado o irreversiblemente dañado, entre otros el tejido óseo.

Existe una gran diversidad de materiales en investigación o ensayados. Una de las líneas de investigación son los productos o materiales osteoinduceres, los factores de crecimiento que se encuentran en todas las células y en plasma sanguíneo. Estas señales moleculares se consideran esenciales para iniciar las etapas de reparación y consolidación de las fracturas.⁷⁰

En los años 70 Matras¹⁶⁴ utilizó un gel de fibrina autóloga para reconstruir lesiones en piel de ratones. Comienza a utilizarse sustancias plasmáticas para aumentar los procesos de reparación. Knighton en 1990¹³¹ y Lynch en 1991¹⁵¹ empiezan a utilizar plasma rico en plaquetas para reparar heridas cutáneas. Se pretende utilizar el potencial molecular que encierra el plasma sanguíneo y algunas de sus elementos formes, leucocitos y plaquetas para favorecer los procesos de reparación al aprovechar el potencial curativo que ofrecen las moléculas y los factores de crecimiento en las cascadas de la reparación. En nuestro modelo experimental en conejos no podemos demostrar que la adición de un gel rico en plaquetas mejore los procesos de reconstrucción ósea en comparación con un grupo control. No está demostrado por ningún ensayo clínico randomizado que la utilización de concentraciones elevadas de factores de crecimiento a excepción de la proteínas morfogenéticas²⁰² mejoren o estimulen los procesos de consolidación. Únicamente existen ciertos ensayos en cirugía maxilofacial sin resultados muy claros.^{9, 221, 260}

Las plaquetas son una fuente fisiológica de factores de crecimiento. El PDGF, el TGF-beta, el IGF, el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento derivado de los hepatocitos (HGF).^{1,2, 10, 78, 82, 85, 98,120, 148, 162, 176, 215, 232, 251,270,278}

Muchos autores han publicado resultados muy esperanzadores con la utilización de PRP en la clínica, en procesos de implantología y cirugía maxilofacial, incluso en estudios *in vitro* han demostrado la capacidad para aumentar el cultivo de células mesenquimales indiferenciadas y osteoblastos.^{120, 148, 273}

Existen muy pocos ensayos clínicos controlados publicados sobre el efecto del PRP.^{127, 161,162}

Esto unido a publicaciones que demuestran la poca utilidad el PRP hace que este tema tan novedoso tenga gran interés y suscite la polémica.^{78, 200, 228, 274}

Actualmente la práctica clínica de calidad, que exige la sociedad debe basarse en el conocimiento. La ignorancia sobre los factores que condicionan la salud, la historia natural de la enfermedad, el tipo de atención que prestamos y los tratamientos que aplicamos resultan muy caros a la sociedad, tanto en términos económicos como de bienestar físico, psíquico y social.

La investigación es un arma que nos ayuda a comprender la naturaleza de las cosas, la efectividad de los procedimientos quirúrgicos que aplicamos y los resultados en nuestros pacientes.

Investigar es elaborar una respuesta racional y objetiva frente a la incertidumbre. Lo que se pretende es construir modelos explicativos de la estructura de las cosas con la mayor verdad y claridad posible.³⁵

El propósito fundamental de nuestro estudio experimental es estimar la eficacia de una intervención o procedimiento quirúrgico, en nuestro caso la utilización de un plasma rico en plaquetas como estimulador óseo.

Nosotros hemos desarrollado un trabajo para valorar la capacidad de regeneración ósea de un material considerado hipotéticamente como

osteoinductor, el plasma rico en plaquetas o plasma rico en factores de crecimiento. El interés por este material surge por la gran eclosión de sistemas en el mercado para obtener este producto autólogo, muy asequible y hoy en día, práctica habitual en muchos procesos quirúrgicos en nuestro país, con comunicación de resultados muy espectaculares pero sin estudios con un potencial de evidencia científica elevada. Todos estos sistemas no han podido demostrar una efectividad y eficacia aceptable.

Nuestro modelo experimental de defecto óseo lo hemos desarrollado en el conejo, ¹⁹⁴ utilizando la tibia y peroné derechas como experimental y la izquierda como control. Justificamos la utilización del conejo y este modelo, con caso y control en el mismo animal, por ser un modelo animal bilateral “diseño de pares” utilizado en más del 95 % de los estudios sobre todo en diseños para estudiar fracturas y defectos óseos. ⁴ La comparación entre experimental y control es más eficiente. ^{4, 208} No producimos, en nuestro modelo una incapacidad del animal. Los defectos realizados están descritos en la literatura. Un defecto óseo segmentario de peroné y un defecto transcortical parcial de tibia. ^{250, 281} Elegimos estos defectos en el conejo por presentar una técnica fácil y sencilla de reproducir, no precisar ninguna fijación interna o externa, provocar poca alteración mecánica y poderle permitir al animal libertad de movimiento en el postoperatorio inmediato.

El protocolo elegido para obtener el plasma rico en plaquetas es el método de centrifugación y aislamiento de las fracciones ricas plaquetas descrito por el Dr. Anitua 2000. ⁹ Realizamos una modificación para obtener un rendimiento mayor, al igual que sucede en el artículo que presenta Efeoglu en el año 2004. ⁶⁹ Tomamos 10 ml de sangre y obtenemos unos valores similares y útiles para el experimento. La combinación de un doble centrifugado nos aporta una concentración de plaquetas similar a la descrita por otros autores en sus experimentos y casos clínicos. Otro punto de discusión en la literatura son el anticoagulante utilizado y el activador posterior para poner en marcha la cascada de

activación de las plaquetas. Según los autores Macey ¹⁵³ y Efeoglu ⁶⁹ el EDTA es el anticoagulante más recomendado cuando se utilizan protocolos automatizados de las casas comerciales. Pensamos como el Dr. Anitua, ⁷ Marx ¹⁶² y Witmann ²⁷⁵ que el citrato es el anticoagulante menos dañino para las plaquetas pero puede alterar la activación y producir un degranulado precoz o incluso inhibirlo. ¹⁵³ A pesar de estas aportaciones valorando las ventajas y los inconvenientes de los anticoagulantes pensamos como Efeoglu⁶⁹ que el anticoagulante de elección para preparar un PRP y utilizarlo directamente *in vivo* sin almacenar, es el citrato. No existe unanimidad sobre el protocolo ideal, existe mucha controversia sobre el número de plaquetas óptimo que debe poseer un PRP y calidad de estas plaquetas.²⁶⁹ En nuestro trabajo únicamente aportamos el número de plaquetas que utilizamos en la lesión, no hemos realizado la medición de la concentración de los distintos factores de crecimiento en el concentrado de plaquetas ppp o PRP, como sucede habitualmente en la práctica clínica diaria.

Existen autores que piensan que el número de plaquetas no es lo importante, sino la calidad de las plaquetas y el potencial para aportar factores de crecimiento a las fases iniciales de la reparación.^{6,7} Weibrich en el año 2004 ²⁶⁹ en experimentación animal afirmó que concentraciones plaquetarias de 10^6 / μL pueden tener un efecto positivo, pero concentraciones superiores al millón tienen un efecto inhibitorio en la osteointegración. La concentración media de nuestro PRP es de 750.000, similar a lo publicado por otros autores.^{7, 9, 161}

Hemos realizado un estudio cinético simple del tiempo que tarda en gelificarse el plasma y no encontramos diferencias entre el plasma pobre en plaquetas y el PRP. Estos resultados nos hacen suponer que la concentración de fibrinogeno, una proteína plasmática, que pasa a fibrina posee una concentración similar en el ppp y en el PRP. Las modificaciones realizadas a los parámetros de centrifugación propuestos por Dr. Anitua para obtener un plasma rico en plaquetas las podemos justificar por la gran

variabilidad que presentan los distintos parámetros hematológicas en los conejos. Los conejos macho tienen hematocritos inferiores a las hembras y el tamaño de las plaquetas es inferior al tamaño de las plaquetas humanas.⁶⁹

En nuestro estudio experimental el análisis realizado de los parámetros geométricos y densitométricos óseos ha sido a partir de las variables obtenidas de las secuencias de TAC y posterior reconstrucción.¹⁰⁶ No hemos analizado los resultados obtenidos por radiología simple por sus limitaciones tanto para la obtención técnica de las proyecciones adecuadas, como el valor para correlacionar los resultados con otras técnicas. Recordemos que para valorar la aparición de formación ósea, debe existir aparición de trabéculas en algunas proyecciones. En nuestra opinión pensamos que el papel de la radiología simple en la valoración de materiales y regeneración ósea únicamente debe realizarse para control de nivel de osteotomías, descartar complicaciones etc, no debe utilizarse para valoraciones cuantitativas. La histología e histomorfometría es fundamental para valorar los procesos de regeneración ósea. En nuestro trabajo no hemos profundizado en su estudio no iba a aportar nuevos datos, únicamente podría confirmar las tendencias obtenidas con las imágenes de reconstrucción tridimensional. El estudio histológico simple ha servido en nuestro estudio para valorar de forma cualitativa el tipo de neoformación ósea y la dirección de la formación y relleno de los distintos defectos. Al igual que la histomorfometría, los estudios mecánicos tienen una validez y utilidad muy importante en la valoración de sustancias osteoformadoras y procesos de regeneración ósea.

Con los resultados obtenidos en nuestro trabajo podemos observar como el grupo control presenta una tendencia satisfactoria de regeneración del defecto de peroné durante los dos primeros períodos de evolución, (8 y 12 semanas), en los que se observa como si bien a las 8 semanas existe un porcentaje elevado de ausencia de regeneración (50%), a las 12 semanas se observa como tan sólo el 18% de los casos siguen mostrando el defecto en

su totalidad, mientras que en un 64% de los casos la regeneración ha sido completa.

Por el contrario, al analizar lo que sucede a las 16 semanas, se observa como el 25% de las muestras presentan una ausencia total de regeneración (frente al 18% observado en el período anterior) y tan sólo el 25% lo han regenerado totalmente (frente a un 64% en el período de 12 semanas). No se ha encontrado una explicación satisfactoria que pueda justificar esta disminución en la tasa de regeneración del defecto de peroné a las 16 semanas. Tampoco puede ser atribuible esta observación a la aplicación de PRP ya que nos estamos refiriendo al grupo control al que no se le adicionó el concentrado plaquetario. Pero podríamos explicar los resultados atribuyendo esta reacción a los efectos sistémicos del gel utilizado, ya que nuestro modelo es un modelo bilateral y bioquímicamente podría afectarse el miembro contralateral.²³⁷

En el grupo experimental tratado con el concentrado pobre en plaquetas (ppp) se observa que a las 8 semanas la totalidad de las muestras no han regenerado el defecto. En este primer período parece que la adición del concentrado plaquetario provoca un retraso en la regeneración del defecto si se compara con el grupo control que mostró un 50% de casos con regeneración parcial. Por el contrario, a las 8 semanas el grupo tratado con concentrado rico en plaquetas (PRP) muestra resultados claramente mejores que el ppp y que el grupo control, ya que tan sólo se observa una ausencia total de regeneración en un 25% de los casos, el 25% ha regenerado totalmente el defecto y un 50% lo han regenerado parcialmente.

Analizando los resultados del grupo ppp se observa algo similar a lo indicado para el grupo control y es que, si bien a las 12 semanas el índice de defectos no regenerados es tan sólo del 20%, a las 16 semanas se observa que este índice se ha incrementado hasta el 50%, lo que supone una disminución en la tasa de regeneración a pesar de corresponder con un período de evolución posterior. Este hecho podría ser explicado suponiendo una tasa de resorción ósea más elevada en el caso de la aplicación de

concentrado plaquetario, pero una exhaustiva revisión bibliográfica no ha revelado una explicación fundamentada del mismo.

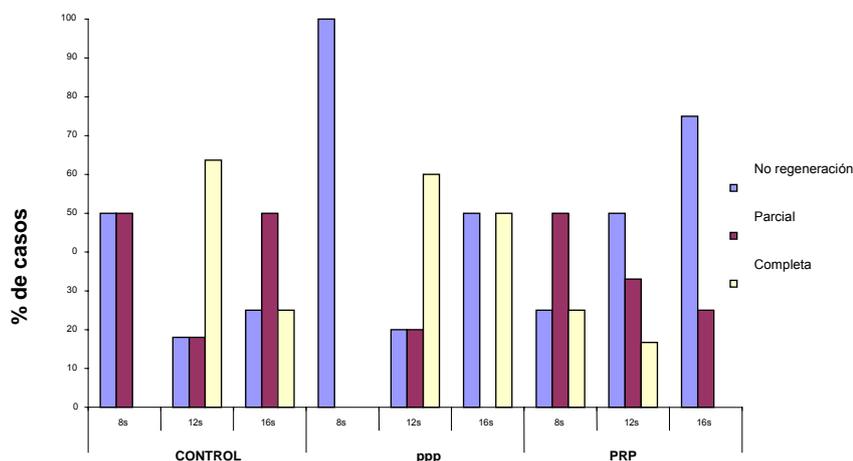
Los resultados observados en el grupo experimental tratado con un concentrado rico en plaquetas (PRP) parecen indicar que si bien a las 8 semanas la tasa de regeneración tisular es muy elevada en un 75% de los casos, esto podría explicarse por el mecanismo de acción de los factores de crecimiento que actúan fundamentalmente como mitógenos en las fases más iniciales de la cascada de la reparación.^{53, 138}

En etapas posteriores parece producirse una elevada tasa de resorción ósea ya que a las 12 semanas el 50% muestra signos de regeneración parcial o total, y a las 16 semanas sólo el 25% refleja signos de regeneración parcial, sin que se detecten casos de regeneración completa.

Tanto en el grupo control como en el grupo de concentrado rico en plaquetas se observa que a las 16 semanas disminuye la tasa de regeneración tisular, con respecto al período de 8 semanas. Si realizamos un análisis de variable por variable observamos que el comportamiento ilógico se debe fundamentalmente a la variable “altura del defecto peroné”, variable que se mide en función de la visualización o no de hueso en las imágenes de reconstrucción. No obstante otras variables del defecto de peroné, como la “densidad mineral” se comportan de forma lógica con un aumento claro de los valores en relación con la secuencia temporal. Este comportamiento podría deberse a que la variable altura residual del defecto de peroné obtenida con las imágenes de reconstrucción no aporta una validez adecuada, sin poder demostrarlo de forma plausible. En consecuencia estos son los resultados obtenidos sin existir una explicación coherente por el momento. En cambio, el grupo tratado con un plasma pobre en plaquetas muestra como a las 16 semanas el 50% de los casos muestran una regeneración completa del defecto del peroné.

En la siguiente gráfica podemos observar los resultados obtenidos en defecto óseo del peroné en los distintos grupos experimentales. Gráfica 26.

Defecto de peroné

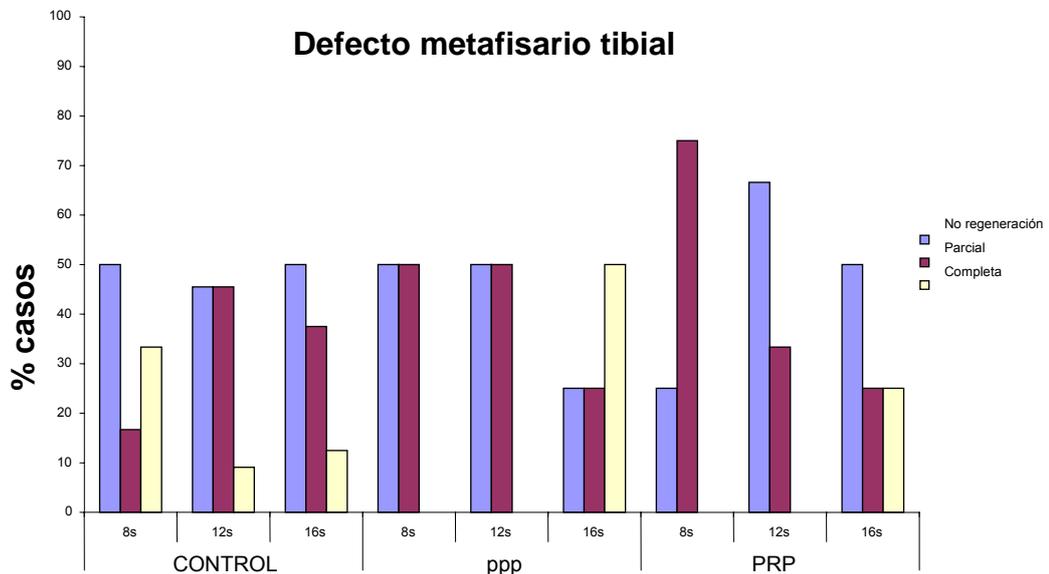


Gráfica 26.

En el caso del defecto metafisario tibial se observa que el grupo control mantiene a lo largo de los distintos períodos experimentales una distribución cercana al 50:50 de los casos regenerados, frente a los no regenerados, aunque cabe destacar el hecho de que a las 8 semanas se observa el porcentaje de casos más elevado que muestran una regeneración completa (33%), mientras que a las 12 y 16 semanas los índices son del 9% y del 13% respectivamente.

El grupo del método tratado con plasma pobre en plaquetas (ppp) muestra tasas de regeneración parcial más elevadas que el grupo control a las 8 y 12 semanas, aunque no presenta ningún caso con regeneración total. En cambio, a las 16 semanas el 50% de los casos presenta una regeneración total, mientras que en el grupo control sólo alcanzó valores del 13%.

En el grupo tratado con plasma pobre en plaquetas a las 8 semanas se observa que el 75% de los casos presentan una regeneración parcial del defecto pero a las 12 semanas tan sólo el 33% muestran ese nivel de regeneración. En ninguno de los dos períodos experimentales se detectan casos de regeneración total, al igual que sucedía en el grupo del método ppp. A las 16 semanas, un 25% de los casos presenta regeneración completa del defecto mientras que en el grupo de método ppp el porcentaje alcanzaba valores del 50%. Gráfica 27.



Gráfica 27.

Se ha realizado un análisis estadístico para estudiar el posible efecto del factor tratamiento y del factor tiempo de evolución en el porcentaje de casos adscritos a cada grupo y no se han detectado diferencias estadísticamente significativas.

En cuanto a la valoración densitométrica del tejido regenerado en el defecto del peroné en los diferentes períodos experimentales, vemos que a las 8 semanas se observa que el grupo tratado con plasma rico en plaquetas (PRP) muestra una mayor densidad mineral en el tejido regenerado. En cambio, a las 12 y 16 semanas este mismo grupo muestra los valores más bajos en comparación con los otros grupos. A las 12 semanas, tanto el grupo control como el grupo de concentrado pobre en plaquetas (ppp) muestran valores similares y superiores a los del grupo de tratamiento con (PRP). A las 16 semanas, el grupo ppp ofrece valores más elevados que los otros dos grupos, incluso superiores a los del grupo control. Este dato, junto con el hecho de que el 50% de los casos tratados con el método ppp y a las 16 semanas de evolución muestran una regeneración completa, podría indicar que el método pobre en plaquetas de baja concentración plaquetaria ofrece mejores resultados en fases avanzadas de la regeneración de defectos de tamaño crítico en peroné. Pero el análisis estadístico no muestra diferencias significativas. Se realizó un análisis de varianza; el cual no detectó diferencias significativas entre tipos de tratamiento y períodos experimentales.

El grupo tratado con plasma pobre en plaquetas incrementa en todos los períodos experimentales la densidad mineral ósea del tejido regenerado, mientras que el grupo tratado con el concentrado rico en plaquetas muestra siempre valores similares, independientemente de la fase de evolución; y siempre con una elevada dispersión de datos. El grupo control, si bien muestra un incremento de la DMO entre la 8ª y 12ª semana, parece estabilizarse en la semana 16, con valores inferiores a los del grupo tratado con plasma pobre en plaquetas. Esta situación parece indicar que lo importante no es conseguir una cantidad elevada de plaquetas, sino unas plaquetas y proteínas plasmáticas útiles. Ranly en su artículo de año 2005²⁰⁰ demuestra en su trabajo como una concentración elevada de PDGF llega a suprimir la formación ósea. Este hecho podría justificar los resultados que

obtenemos en nuestros controles al ser un modelo bilateral con posible efecto sistémico.

En el propio trabajo de Ranly ²⁰⁰ dosis bajas de PDGF añadidas al injerto se comportan de forma similar a los controles. Ranly ²⁰⁰ afirma que altas dosis de un mitógeno puede inhibir las cascadas de la reparación. Los factores de crecimiento, que el plasma rico en plaquetas pretende aportar para modular y aumentar los procesos de cicatrización, se administran en las primaras fases de la reparación aunque posteriormente distintas células, osteoblastos y osteoclastos pueden secretar más factores de crecimiento. Aunque no se conocen con exactitud los motivos por los que el PDGF aumenta la formación ósea sin actuar sobre la serie cartilaginosa, en nuestro trabajo hemos observado en el estudio histológico muy poca osificación endocondral lo que está en sintonía con lo publicado. Aunque el factor de crecimiento más abundante en las plaquetas y en los geles de plaquetas es el PDGF, también existen otros factores como el TGF- β con resultados contradictorios. Estos factores pueden potenciar la actividad de las proteínas morfogenéticas, disminuirla o incrementar la fibrosis. ^{52, 139}

El plasma rico en plaquetas ha sido utilizado en distintas situaciones, combinado con distintos materiales y con resultados muy dispares. El exacto potencial del plasma rico en plaquetas en la modulación y mejora de la consolidación ósea es muy difícil de demostrar. ²³³

En el estudio de Jensen ¹¹⁵ en que se crearon defectos óseos en mandíbula de mini-cerdos y se añadió concentrado plaquetario en autoinjertos, hueso bovino o fosfato-tricálcico sintético, se indica que no existe correlación entre el recuento plaquetario de la sangre y del concentrado plaquetario, y no se observa correlación entre el recuento plaquetario y la concentración de PDGF-AB ni de TGF-b. Resultados en sintonía con los obtenidos en nuestro trabajo.

Este hecho parece indicar que no existe una relación directa entre el recuento plaquetario de sangre periférica y el recuento plaquetario del concentrado sanguíneo tras la utilización de cualquiera de los dos métodos

empleados para aumentar el nivel de concentración plaquetaria. Esta observación coincide con la realizada por Jensen ¹¹⁴ en defectos mandibulares en mini-cerdos.

En nuestro trabajo no se observan signos de estimulación por parte del concentrado plaquetario sobre la tasa de formación ósea en caso de uso como sustituto óseo. De todo ello se deduce que es necesario realizar una investigación en profundidad para tratar de identificar la concentración óptima de plaquetas y las combinaciones de factores de crecimiento que permitan una óptima estimulación de la regeneración ósea y, para ello, parece evidente la necesidad de desarrollar un método fiable de obtención del concentrado plaquetario.

El trabajo de Wiltfang ²⁷⁸ en el que se aplica PRP para analizar la regeneración de defectos óseos de tamaño crítico en el hueso frontal de mini-cerdos y en el que se utilizaron diversos tipos de injertos (hueso autógeno, gránulos de fosfato tricálcico –CeraSorb-, bloques de hueso esponjoso bovino –BioOss- y esponja de colágeno –Colloss-) se observa que el PRP no añade ningún efecto beneficioso en el caso de los sustitutos óseos xenogénicos. Sin embargo, se observó un efecto significativo en el grupo de hueso autógeno.

Los estudios de Aghaloo ^{1,2} señalan que se observa un incremento de la formación ósea en defectos de tamaño no-crítico cuando se adiciona PRP a sustitutos óseos como el BioOss.

Los resultados del estudio de Schlegel ²³² indican que, como era de esperar, el mejor tratamiento para defectos óseos de tamaño crítico es la utilización de hueso autólogo. Sin embargo la combinación de hueso autólogo con PRP no proporciona resultados significativamente mejores. Los grupos experimentales tratados con colágeno bovino muestran que su aplicación local simula el efecto del hueso autólogo e intensifica la regeneración ósea cuando se compara con el grupo control.

El estudio de Jung ¹¹⁷ en defectos de 6 mm en el cráneo de conejos indica que la aplicación de geles de fibrina o de PRP no da lugar a una mejor

reparación del defecto. La aplicación de rhBMP-2 en dichos defectos mejora el proceso de reparación a las 4 semanas. Tanto los geles de PRP como los de fibrina tienen la misma efectividad como sistemas de liberación de rhBMP-2.¹³⁵

El trabajo de Sánchez²²⁰ tiene como objetivo evaluar la capacidad de regeneración del PRP adicionado a injertos óseos xenogénicos mediante el análisis histomorfométrico de defectos dentales en perros. La principal conclusión es que el PRP muestra un bajo potencial regenerativo en este modelo.

Los estudios de Centrella en 1991⁵⁰ demostraron que el PDGF aislado era capaz de estimular la mitogénesis y la migración de pre-osteoblastos en un cultivo *in vitro*, pero existen trabajos que demuestran que esa proliferación y multiplicación no se traducen en un efecto fisiológico que mejore la capacidad de cicatrización de los tejidos.¹⁰⁴ Todas las observaciones realizadas en los estudios *in vitro* hacen pensar que en vivo el PDGF aumenta la replicación celular pero no la diferenciación, se trata concretamente de un factor de crecimiento puramente mitogénico. Ranly²⁰⁰ en su trabajo sugiere que el PDGF podría estimular la formación ósea aumentando el número de células progenitoras osteocondrales, situación que no hemos observado en nuestro trabajo ya que no hemos visto un incremento de la osificación endocondral en el estudio descriptivo histológico.

En estudios de implantología y maxilofacial se ha demostrado que este factor en combinación con otros puede aumentar la regeneración ósea.¹⁴⁹ No está claro que exista una concentración óptima de FC. Elevar la dosis puede tener un efecto indeseado; es muy importante el equilibrio.¹⁰⁸ Los resultados publicados por Graziani⁹⁶ podrían justificar los hallazgos y observaciones de nuestro experimento.

Uno de los puntos de máxima discusión es conseguir un método que asegure una concentración de factores de crecimiento adecuado en el concentrado de plaquetas. El factor de crecimiento que se utiliza para valorar la activación efectiva de las plaquetas y signos de degranulación es el TGF-

β 1. En la actualidad se están desarrollando nuevos sistemas de obtención de concentrado de FC, tema muy en discusión.⁶⁶

En nuestro estudio hemos demostrado que un plasma concentrado en plaquetas no consigue modular y aumentar la tasa de regeneración ósea. No podemos afirmar que la utilización de forma aislada del plasma rico en plaquetas tenga una capacidad osteoinductora. El hecho que un gel pobre en plaquetas obtenga unos resultados mejores que el gel rico en plaquetas, nos podría permitir decir que en el proceso de regeneración ósea y consolidación de las fracturas, intervienen muchos factores de crecimiento en distintas fases. Los plasmas ricos en plaquetas poseen unas concentraciones de diferentes factores y no conocemos de forma exacta el equilibrio adecuado para obtener el efecto deseado.

No podemos decir, que elevadas concentraciones de factores de crecimiento, puedan inhibir el proceso osteoinductivo por no encontrar diferencias significativas en nuestros estudios, pero el signo de los resultados obtenidos apuntan en esa dirección, al igual que distintos trabajos publicados.^{134, 200} La concentración de factores de crecimientos en el plasma rico en plaquetas varía según el método de preparación utilizado.¹⁷¹

Por los estudios analizados parece muy clara que la utilización de geles con aporte masivo de factores de crecimiento no desarrolla una condición suprafisiológica como estimulador de los procesos reparativos. El equilibrio y la sinergia de los distintos factores de crecimiento pueden tener efectos positivos o negativos.⁴⁸

La utilización de forma aislada de factores osteoinductores no BMPs no está justificada. Nuestros resultados están en consonancia con la bibliografía consultada. Sí parece existir un efecto positivo de los FC cuando se utilizan con médula ósea y células pluripotenciales.⁶¹

Por los resultados obtenidos en nuestro trabajo experimental en conejos y los publicados en la literatura, la utilización en clínica de forma desmesurada de concentrados plaquetares, en nuestra opinión, no cumple a día de hoy la aplicación de una técnica con elevado rigor científico y con

datos de medicina basada en la evidencia.⁸⁰ No existen trabajos con potencia científica que demuestren que la utilización de estos productos ofrezca una eficacia, efectividad clínica y mucho menos una eficiencia asumible por los sistemas sanitarios. La utilización clínica de estos sistemas debería acompañarse de cierto rigor científico, técnico y un análisis adecuado de los riesgos y beneficios, así como de la utilidad clínica para poder realizar una actuación médica más ética y alejarse de modas, inercias o situaciones que se propagan con éxito sin saber muy bien porqué.

Con los resultados que hemos obtenido en este estudio y para conseguir los objetivos anunciados pensamos que deberíamos continuar con una línea de investigación futura que acometa los siguientes puntos fundamentales:

1. Estandarizar un protocolo de obtención del plasma rico en plaquetas, que sea útil, eficaz y efectivo.
2. Estudiar y analizar cualitativa, cuantitativa y funcionalmente los distintos factores de crecimiento que puedan existir en un PRP. Describir el equilibrio fisiológico global de la actuación conjunta de estos factores y la dirección de su acción en los procesos de reparación tisular. Valorar la relación de las sustancia activa con distintos transportadores o “carriers”.
3. Basándose en lo anteriormente expuesto:
 - Diseñar un modelo experimental para estudiar la eficacia del nuevo PRP como sustancia osteopromotora en combinación con otros materiales (autoinjerto, células indiferenciadas o células madre pluripotenciales).

- Realizar un diseño experimental para estudiar los efectos del PRP en la reparación de partes blandas (lesiones musculares, cicatrización de tendones y reparación de heridas cutáneas).

En consecuencia pensamos que es necesario desarrollar una investigación básica para conocer de forma adecuada los procesos moleculares de la reparación ósea, y en que situaciones clínicas puede ser beneficioso la utilización de moléculas osteoinductoras. No debemos olvidar, que en el proceso de consolidación y regeneración ósea están implicados otros factores muy importantes, como los intrínsecos a la fractura (tipo, localización), factores mecánicos y los dependientes del propio paciente.

Recordar que nuestro objetivo fundamental en la práctica clínica es aumentar la eficacia de nuestras actuaciones, y la clave de esta eficacia, viene dada por la mejor investigación médica.

7. CONCLUSIONES

1. No existe una relación directa entre el recuento plaquetario en sangre periférica y el recuento plaquetario del concentrado sanguíneo tras la utilización de cualquiera de los dos métodos empleados en aumentar el nivel de concentración plaquetaria. Hay gran variabilidad en la preparación de los concentrados plaquetarios.
2. No se observa correlación significativa entre el recuento plaquetario del concentrado sanguíneo siguiendo cualquiera de los dos métodos de concentración plaquetaria, y las variables geométricas y densitométricas analizadas, tanto en defecto de peroné como en defectos metafisarios tibiales.
3. Las únicas correlaciones significativas se detectan exclusivamente entre variables geométricas y densitométricas de un mismo defecto, pero no existen correlaciones cruzadas entre ambos tipos de defectos. No se observa relación entre comportamiento del defecto cortical (peroné) y el defecto metafisario (tibial). Son muestras independientes.
4. El plasma Pobre en Plaquetas (ppp) y el plasma Rico en Plaquetas (PRP) en nuestro diseño experimental, no modifica los procesos de reparación y cicatrización respecto al grupo control.

5. La utilización de forma aislada de sustancias con concentraciones elevadas de Factores de crecimiento y otras proteínas plasmáticas, plasma rico en plaquetas (PRP), en nuestro diseño experimental en conejos no se comporta como material osteoinductor ni osteopromotor.

1. **Aghaloo TA., Moy PK., Freymiller EG.** Evaluation of platelet-rich plasma in combination with freeze-dried bone in the rabbit cranium. *Clin Oral Implants Resh* 2005; 16:250-257.
2. **Aghaloo TL., Moy PK., Freymiller EG.** Evaluation of platelet-rich plasma in combination with anorganic bovine bone in the rabbit cranium:a pilot study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2004; 19:59-65.
3. **Amédée J., Baquey Ch.** Les matériaux du futur. Les matériaux ostéoinducteurs. Passuti N.:Biomatériaux de substitution de l'os et ducartilage. **Conf Ens SOFCOT n° 57. Expansion Scientifique Française. París, 1996.**
4. **An YH., Friedman RJ.** Animal models of bone defect repair. En. Animal Models in Orthopaedic Research Florida CRP Press LLC.1999.
5. **Andrew JG., Hoyland JA., Freemont AJ., Marsh DR.** Platelet-derived growth factor expression in normally healing human fractures. *Bone* 1995; 16:455-460.
6. **Anitua E., Andia I., Sánchez M., Azofra R., Zalduendo M., de la Fuente M., et al.** Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture. *J Orthop Res* 2005; 23:281-286.
7. **Anitua E., Andia I., Ardanza J., et al.** Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost* 2004; 91:4-15.
8. **Anitua E.** The use of plasma-rich growth factors (PRGF) in Oral surgery. *Pract Proced Aesthet Dent* 2001; 13:487-493.
9. **Anitua E.** Un nuevo enfoque en la regeneración ósea. Plasma rico en factores de crecimiento. (PRGF). Vitoria Ed. Puesta al día S.L, 2000.
10. **Anitua E.** Plasma Rich in growth Factors: Preliminary results o use in the preparation of Future Sites for Implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999; 14:529-535.
11. **Antonaides HN., Williams LT.** Human platelet-derived growth factor: structures and functions. *Federation Proc* 1983; 42:2630-2634.
12. **Arm DM., Tencer AF., Bain SD., Celino D.** Effect of controll and release of platelet-derived growth factor from a porous hydroxyapatite implant on bone ingrowth. *Biomaterials* 1996; 17:703-709.
13. **Arrington ED., Smith WJ., Chambers HG., Bucknell AL., Davino NA.** Complications of iliac crest bone graft harvesting. *Clin Orthop* 1996; 329:300-309.
14. **Ascencio D., et al.** Experimental induction of heterotopic bone in abdominal implants. *Wound Rep Reg* 2004; 12:643-649.
15. **Aseichev A., Azizova O., Zhambalova BA.** Effect of UV-Modified Fibrinogen on Platelet Aggregation in Platelet-Rich Plasma. *Esperimental noi Biologii Meditsiny* 2002; 133:51-54
16. **Aspenberg P., Basic N., Tägil M., Vukicevic S.** Reduced expression of BMP-3 due to mechanical loading. A link between mechanical stimuli and tissue differentiation. *Acta Orthop Scand* 2000; 71:558-562.
17. **Aspenberg P., Virchenko O.** Platelet concentrate injection improves

- Achilles tendon repair in rats. *Acta Orthop Scand* 2004; 75:93–99.
18. Balaburski G., O'Connor P. Determination of variations in gene expression during fracture healing. *Acta Orthop Scand* 2003; 74:22-30.
 19. Bejcek BE., Li DY., Deue TF. Transformation by v-sis occurs by an internal autoactivation mechanism. *Science* 1989; 245:1496-1499.
 20. Bennet NT., Schultz GS. Growth factors and wound healing biochemical properties of growth factors and their receptors. *Am J Surg* 1993; 165:728-737.
 21. Bhanot S., Alex JC. Current applications of platelet gels in facial plastic surgery. *Facial Plast Surg* 2002; 18:27-33.
 22. Bloomfield S. Cellular and molecular mechanism for the bone response to mechanical loading. *Int J Spor Nutr Exerc Metabol* 2001; 11:128-136.
 23. Blum B., Moseley J., Miller L., Richelsoph K., Haggard W. Measurement of bone morphogenetic proteins and other growth factors in demineralized bone matrix. *Orthopedics* 2004; 27(suppl):s161–s165.
 24. Boden S., Einhorn T., De Long W. Commonly used enhancers of bone healing. *AAOS Instr Course Handout* 2006.
 25. Boden SD. Overview of the biology of lumbar spine fusion and principles for selecting a bone graft substitute. *Spine* 2002; 27(suppl):s26-s31.
 26. Bostrom MP., Saleh KJ., Einhorn TA. Osteoinductive growth factors in preclinical fracture and long bone defects models. *Orthop Clin North Am* 1999; 30:647-58.
 27. Bostrom MPG., Asnis P. Transforming growth factor beat in fracture repair. *Clin Orthop* 1998; 355s:s124-s131.
 28. Bostrom MPG., Camacho NP. Potencial role of bone morphogenetic proteins in fracture healing. *Clin Orthop* 1998; 237(suppl):s274-s282.
 29. Bowen-Pope DF., Van Koppen A., Schatteman G. Is PDGF really important? Testing the hypothesis. *Trends Genet* 1991; 7:413-418.
 30. Braddock M., Houston P., Campbell C., Ashcroft P. Born Again Bone:Tissue Engineering for Bone Repair. *News Physiol Sci* 2001; 16:208-213.
 31. Breddin HK. Can platelet aggregometry be standardized?. *Platelets* 2005; 16:151-158.
 32. Buchholz RW. Nonallograft Osteoconductive Bone Graft Substitutes. *Clin Orthop* 2002; 395:44-52.
 33. Buckwalter JA., Glimcher MJ., Cooper RR., Recker R. Bone biology. II:Formation, form, modeling, remodeling, and regulation of cell function. *AAOS Instr Cours* 1996; 45:387-399.
 34. Buckwalter JA., Glimcher MJ., Cooper RR., Recker R. Bone biology. I: structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. *AAOS Instr Course* 1996; 45:371-386.
 35. Bunge M. La investigación científica. Ariel methods. Barcelona, 1989.
 36. Burwell RG. Studies in the transplantation of bone. VI. Further observations concerning the antigenicity of homologous cortical and cancellous bone. *J Bone Joint Surg* 1963; 45-B:597-612.

37. **Butterfired KJ., Bennett J., Gronowicz G., Adams D.** Effect of platelet-rich plasma with autogenous bone graft for maxillary sinus augmentation in a rabbit model. *J Oral Maxillofac Surg* 2005; 63:370-376.
38. **Camargo P., Lekovic V., Weinlaender M.** Platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral combined with guided tissue regeneration in the treatment of intrabony defects in humans. *J Periodont Res* 2002; 37:300-306.
39. **Camelo M., Nevins ML., Schenk RK., Lynch SE., Nevins M.** Periodontal regeneration in human Class II furcations using purified recombinant human platelet-derived growth factor-BB (rhPDGF-BB) with bone allograft. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2003; 23:213–325.
40. **Canalis E., McCarthy T., Centrella M.** Isolation and characterization of insulin-like growth factor I (somatomedin-c) from cultures of fetal rat calvariae. *Endocrinology* 1989; 122:22-27.
41. **Canalis E., McCarthy TL., Centrella M.** Effects of platelet-derived growth factor on bone formation in vitro. *J Cell Physiol* 1989; 140:530-537.
42. **Canalis E., Varghese S., McCarthy TL., Centrella M.** Role of platelet derived growth factor in bone cell function. *Growth Regul* 1992; 2:151-155.
43. **Capanna R., Campanacci DA., Caldora P., Biase De.** Healing of large bone defects with allogenic bone grafts enriched with utologous bone marrow buffy coat and platelet-rich plasma. *J Bone Joint Surg* 2005; 87-B(suppl):1 – 59.
44. **Carpenter JE., Hipp JA., Gerhart TN., et al.** Failure of growth hormone to alter fracture healing biomechanics in a rabbit model. *J Bone Joint Surg* 1992; 74-A:359-367.
45. **Carreon LY., Glassman SD., Anekstein Y., Puno R.** Platelet Gel (AGF) Fails to increase fusion rates in instrumented Posterolateral Fusions. *Spine* 2005; 30: 243-246.
46. **Carter CA., Jolly DG., Worden CE., Hendren DG., Kane CJ.** Platelet-rich plasma gel promotes differentiation and regeneration during equine wound healing. *Exp Mod Pathol* 2003; 74:244-255.
47. **Carter DR., et al.** Mechanobiology of Skeletal Regeneration. *Clin Orthop* 1998; 355s:s41-s55.
48. **Celotti F., Colciago A., Negri-Cesi P., Pravettoni A., Zaninetti R., Sacchi MC.** Effect of platelet-rich plasma on migration and proliferation of SaOS-2 osteoblasts:role of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta. *Wound Repair Regen* 2006; 14:195-202.
49. **Centrella M.** Human platelet derived TGF- β stimulates parameters of bone growth in fetal rat calvariae. *Endocrinology* 1986; 119:2306-2312.
50. **Centrella M., McCarthy TL., Kusmik WF., Canalis E.** Relative binding and biochemical effects of heterodimeric and homodimeric isoforms of platelet-derived growth factor in osteoblast-enriched cultures from fetal rat bone. *J Cell Physiol* 1991; 147:420–426.
51. **Chao E., Inoue N.** Biophysical stimulation of bone fracture repair, regeneration and remodelling. *Eur*

- cells materials* 2003; 6:72-85.
52. **Chen P., Carrington JL., Hammonds RG., Reddi AH.** Stimulation of chondrogenesis in limb bud mesoderm cells by recombinant human bone morphogenetic protein 2B (BMP-2B) and modulation by transforming growth factor beta 1 and beta 2. *Exp Cell Res* 1991; 195:509–515.
 53. **Cheung E., et al.** Growth factor based-system for use as bone graft substitutes. In Bone graft substitutes. Rossemoont 2003.
 54. **Choi BH., Im CJ., Huh JY., Suh JJ., Lee SH.** Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in autogenous bone graft. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004; 33:56–59.
 55. **Claes L., Augat P., Suger G., Wilke HJ.** Influence of size and stability of the osteotomy gap on the success of fractures healing. *J Orthop Res* 1997; 15:577-584.
 56. **Claes L., et al.** Efectos de los factores mecánicos en el proceso de consolidación de fracturas. *Clin Orthop* 1998; 355s:s132-s147.
 57. **Comín M., Peris JL., Prat JM., Dejoz JR., Vera PM., Hoyos JV.** Biomecánica de la fractura ósea y técnicas de reparación. Instituto de Biomecánica de Valencia. Valencia: Ed. Martín 1999.
 58. **Concejo C., Ripalda P., Forriol F.** Reparación de un defecto de mandíbula. Estudio experimental macroscópico en ovejas. *Patología del Aparato Locomotor* 2004; 2:105-113.
 59. **Cross KJ., Mustoe TA.** Growth factors in wound healing. *Surg Clin North Am* 2003; 83: 531-545.
 60. **Curylo LJ., et al.** Spinal Arthrodesis in a rabbit spine fusion model. *Spine* 1999; 24:434-438.
 61. **Dallari D., Fini M., Stagni C., Torricelli P., et al.** In vivo study on the healing of bone defects treated with bone marrow stromal cells, platelet-rich plasma, and freeze-dried bone allografts, alone and in combination. *J Orthop Res* 2006; 24:877-888.
 62. **De Boer HH.** The history of bone grafts. *Clin Orthop* 1988; 226:292-297.
 63. **De Coster T., Gehlert RJ., Mikola EA., Pirela-Cruz M.** Management of Posttraumatic Segmental Bone Defects. *J Am Acad Orthop Surg* 2004; 12:28-38.
 64. **De Obarrio JJ., Arausz-Dutari L., Chamberlain TM.** The use of autologous growth factors in periodontal surgical therapy: platelet gel biotechnology- case reports. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2000; 20:486-497.
 65. **Del Valle ME., Maestro. A., García Suárez O., et al.** Distribución de los receptores para el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGFR α y PDGFR β) en el sistema músculo-esquelético. *Patología del Aparato Locomotor* 2006; 4:3-11.
 66. **Dohan D., Choukroun J., Diss A., et al.** Platelet-rich fibrin (PRF):A second-generation platelet concentrate. Part I:Technological concepts and evolution. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006; 101:34-44.
 67. **Dvorak HF.** VEGF, microvascular hypermeability and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995; 79:1029-1046.

68. Edwards B., Edwards J., Scarborough N. Allograft bone:the influence of processing on safety performance. *Orthop Clin North Am* 1999; 30:571-581.
69. Efeoglu C., Akçay YD., Ertürk SA. Modified Method for Preparing Platelet-Rich Plasma: An Experimental Study. *J Oral Maxillofac Surg* 2004; 62:1403-1407.
70. Einhorn TA. The Cell and Molecular Biology of Fracture Healing. *Clin Orthop* 1998; 355s:s7-s21.
71. Eppley BL., Woodell JE., Higgins J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma:implications for wound healing. *Plast Reconstr Surg* 2004; 114:1502-1508.
72. Fennis JP., Stoelinga PJ., Jansen JA. Mandibular reconstruction:a histological and histomorphometric study on the use of autogenous scaffolds, particulate cortico-cancellous bone grafts and platelet rich plasma in goats. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004; 33:48-55.
73. Fennis JP., Stoelinga PJ., Jansen JA. Reconstruction of the mandible with an autogenous irradiated cortical scaffold, autogenous corticocancellous bone-graft and autogenous platelet-rich-plasma:an animal experiment. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2005; 34:158-166.
74. Fennis JP., Stoelinga PJ., Merzk MA., Jansen JA. Reconstruction of the mandible with a poly (D,L-lactide) scaffold, autogenous corticocancellous bone graft, and autogenous platelet-rich plasma:an animal experiment. *Tissue Eng* 2005; 11:1045-1453.
75. Ferreira CF., Gomes MC., et al. Platelet-rich plasma influence on human osteoblasts growth. *Clin Oral Implants Res* 2005; 16:456-460.
76. Fink B., et al. Factors affecting bone regeneration in Ilizarov callus distraction. *Unfallchirurg* 1995; 98:633-639.
77. Finkemeier CG. Current concepts review. Bone grafting and bone grafts substitutes. *J Bone Joint Surg* 2002; 84-A:454-464.
78. Forum S., Wallace S., Tarnow D., Cho SC. Effect of Platelet-Rich Plasma on Bone growth and Osteointegration in Human Maxillary Sinus Grafts:Three Bilateral Case Reports. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2002; 22:45-53.
79. Fredriksson L., Li H., Eriksson U. The PDGF family four gene products form five dimeric isoforms. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005; 15:197-204.
80. Freymiller EG., Aghaloo TL. Platelet rich plasma: Ready or not? *J Oral Maxillofac Surg* 2004; 62:484-488.
81. Friedenber ZB., Roberts PG., Didizian NH., Brighton CT. Stimulation of fracture healing by Direct Current in the Rabbit Fibula. *J Bone Joint Surg* 1971; 53-A:1400-1408.
82. Fuerst G., Gruber R., Tangl S., Mittlbock M. Effect of platelet-released growth factors and collagen typi I on osseus regeneration of mandibular defects. *Journal of Clinical Periodontology* 2004; 31:784-790.
83. Fuerst G., Gruber R., Tangl S., Sanroman F. Enhanced bone to implant contact by platelet-released growth factors in mandibular cortical bone:a histomorphometric study in

- minipigs. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2003; 18:685-690.
84. Gandhi A., Dumas C., O'Connor JP., Parsons JR., Lin SS. The effects of local platelet rich plasma delivery on diabetic fracture healing. *Bone* 2005; 38:540-546.
85. Gandhi A., Bibbo C., Pinzur M., Lin SS. The role of platelet-rich plasma in foot and ankle surgery. *Foot Ankle Clin* 2005; 10:621-637.
86. García FJ., García JM., Perez-Caballer AJ. Fundamentos de los procesos de reparación tisular: factores de crecimiento. *Rev Ortop Traumatol* 2005; 49 (suppl1):5-16.
87. Garg AK. The use of platelet rich plasma to enhance the success of bone grafts around dental implants. *Dent Implant Update* 2000; 11:17-20.
88. Gerard D., Carlson ER., Gotcher JE., Jacobs M. Effects of platelet rich plasma on the healing of autologous bone grafted mandibular defects in dogs. *Oral Maxillofac Surg* 2006; 64:443-451.
89. Giannobile WV., Whitson SW., Lynch SE. Non-coordinate control of bone formation displayed by growth factor combinations with IGF-I. *Dent Res* 1997; 76:1569-1578.
90. Gil J., Garrido R., Gil R. y Melgosa M. Material para la reparación y sustitución ósea. Factores de crecimiento y terapia genética en Cirugía Ortopédica y Traumatología. *MAPFRE Medicina* 2003; 14:51-65.
91. Gil J., Gil R., Montón I., et al. Materiales biodegradables compuestos como posibles sustitutos óseos. Implantación experimental en conejos. *Patología del Aparato Locomotor* 2003; 1:101-107.
92. Goulet JA., Senunas LE., DeSilva GA., Greenfield MPH. Autogenous iliac crest bone graft, complications and functional assessment. *Clin Orthop* 1997; 339:76-81.
93. Grageda E., Lozada JL., Boyne PJ., Caplanis N., McMillan PJ. Bone formation in the maxillary sinus by using platelet-rich plasma: an experimental study in sheep. *J Oral Implantol* 2005; 31:2-17.
94. Grant M., Jerdan J., Merimee T. IGF-I modulates endothelial cell chemotaxis. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 65:370-371.
95. Grant WP., Jerlin EA., Pietrzak WS., Tam HS. The utilization of autologous growth factors for the facilitation of fusion in complex neuropathic fractures in the diabetic population. *Clin Podiatr Med Surg North Am* 2005; 22:561-584.
96. Graziani F., Ivanovski S., Cei S., Ducci F., Tonetti M., Gabriele M. The in vitro effect of different PRP concentrations on osteoblasts and fibroblasts. *Clin Oral Implants Res* 2006; 17:212-219.
97. Gross PL., Rand ML., Barrow DV., et al. Platelet function in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Arterioscl Thromb* 1991; 11:610-615.
98. Gruber R., Karreth F., Frommlet F., Fischer MB., Watzek G. Platelets are mitogenic for periosteum-derived cells. *J Orthop Res* 2003; 21:941-948.
99. Guerado E., et al. Células madre e ingeniería tisular ósea. Bases

- celulares y perspectivas terapéuticas. Tema de actualización. *Rev Ortop Traumatol* 2003; 47:362-374.
100. Harris SE., Bonewald LF., Harris MA., et al. Effects of transforming growth factor β on bone nodule formation and expression of bone morphogenetic protein 2, osteocalcin, osteopontin, alkaline phosphatase, and Type 1 collagen mRNA in long-term cultures of fetal rat calvarial osteoblasts. *J Bone Miner Res* 1999; 12:955-963.
101. Hee TH., Majd ME., Holt RT., Myers L. Do autologous growth factors enhance transforaminal lumbar interbody fusion? *Eur Spine J* 2003; 12:400-407.
102. Heldin C., Westermark B. Mechanism of Action and In Vivo Role of Platelet-Derived Growth Factor. *Physiol Rev* 1999; 79:1283-1316
103. Herndon DN., Nguyen TL., Gilpin DA. Growth factors. Local and systemic. *Arch Surg*.1993; 128:1227-1233.
104. Hock JM., Canalis E. PDGF enhances bone cell replication but not differentiated function of osteoblast. *Endocrinology* 1994; 134:1423-1428.
105. Hokugo A., Ozeki M., Kawakami O., Sugimoto K., Muchimoto K., Morita S., Tabata Y. Augmented bone regeneration activity of platelet-rich plasma by biodegradable gelatin hydrogel. *Tissue Eng* 2005; 11:1224-1233.
106. Homolka P., Beer A., Birkfellner W., Nowotny R., Gahleitner A., Tschabitscher M, Bergmann H. Bone mineral density measurement with dental quantitative CT prior to dental implant placement in cadaver mandibles: pilot study. *Radiology* 2002; 224:247-252.
107. Howes R., Bowness GR., Grotendorst GR., et al. Platelet-derived growth factor enhances demineralized bone matrix induced cartilage and bone formation. *Calcif Tissue Int* 1988; 42:34-38.
108. Hsieh SC., Graves DT. Pulse application of platelet-derived growth factor enhances formation of a mineralizing matrix while continuous application is inhibitory. *J Cell Biochem* 1998; 69:169-180.
109. Ilizarov GA. The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues: Part II. The influence of the rate and frequency of distraction. *Clin Orthop* 1989; 263:45-54.
110. Ilizarov GA. Transosseous Osteosynthesis:Theoretical and Clinical Aspects of the Regeneration and Growth of Tissue. Germany:springer-Verlag, Berlin, 1992.
111. Ip TH. Using platelet-rich plasma to enhance a composite graft in the maxillary sinus. *Dent Implantol Update* 2003; 14:9-14.
112. Jakse N., Tangl S., Gilli R., Berghold A., Lorenzoni M., Eskici A., Haas R., Pertl C. Influence of PRP on autogenous sinus grafts. An experimental study on sheep. *Clin Oral Implants Res* 2003; 14:578-583.
113. Jenis LG., Banco RJ., Kwon BA. Prospective study of Autologous Growth Factors(AGF) in lumbar interbody fusion. *J Spine* 2006; 6:14-20.
114. Jensen SS., Broggin N., Weibrich G., Hjorting-Hansen E., Schenk R., Buser D. Bone regeneration in standardized bone defects with autografts or bone substitutes in

- combination with platelet concentrate: a histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2005; 20:703-712.
115. Jensen TB., Rahbek O., Overgaard S., Soballe K. No effect of platelet-rich plasma with frozen or processed bone allograft around noncemented implants. *Int Orthop* 2005; 29:67-72.
116. Joyce ME., Roberts AB., Sporn MB., Bolander ME. Role of growth factors- β and the initiation of chondrogenesis and osteogenesis in the rat femur. *J Cell Biol* 1990; 110:2195-2207.
117. Jung RE. Schmoekel HG. Zwahlen R. Kokovic V. Hammerle CHF. Weber FE. Platelet-rich plasma and fibrin as delivery systems for recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Clin Oral Implants Res* 2005; 16:676-682.
118. Kanno T., Takahashi T., Tsujisawa T., Ariyoshi W., Nishihara T. Platelet-rich plasma enhances human osteoblast-like cell proliferation and differentiation. *J Oral Maxillofac Surg* 2005; 63:362-369.
119. Kasperk CG. Interactions of growth factors present in bone matrix with bone cells effects on DNA synthesis and alkaline phosphatase. *Growth Factors* 1990; 3:147-158.
120. Kassolis JD., Reynold MA. Evaluation of the adjunctive benefits of platelet-rich plasma in subantral sinus augmentation. *J Craniofac Surg* 2005; 16:280-287.
121. Katthagen BD. Bone regeneration with bone substitutes. An animal study. Springer Verlag, Berlin, 1986.
122. Khan SN., Cammisa FP., Sandhu HS., et al. The Biology of bone grafting. *J Am Acad Orthop Surg* 2005; 13:77-86.
123. Khan SN., Fraser JF., Sandhu HS., et al. Use of Osteopromotive growth factors, demineralized bone matrix, and ceramics to enhance spinal fusion. *J Am Acad Orthop Surg* 2005; 13:129-137.
124. Khan SN., Tomin E., Lane JM. Clinical applications of bone graft substitutes. *Orthop Clin North Am* 2000; 31:389-398.
125. Kieswetter K., Schwartz Z., Alderete M., Dean DD., Boyan BD. Platelet derived growth factor stimulates chondrocyte proliferation but prevents endochondral maturation. *Endocrinology* 1997; 6:257-264.
126. Killian O., Flesch L., Wenisch S., Taborski B., Jork A., Schnettler R., Jonuleit T. Effects of platelet growth factors on human mesenchymal stem cells and human endothelial cells in vitro. *Eur J Med Res* 2004; 9:337-344.
127. Kim SG., Chung CH., Kim YK., Park IC., Lim SC. Use of particulate dentin-plaster of Paris combination with without platelet-rich plasma in the treatment of bone defects around implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002; 17:86-94.
128. Kim WI., Mohan RR., Mohan RR., Wilson SE. Effect of PDGF, IL-alpha, and BMP2/4 on corneal fibroblast chemotaxis: expression of the platelet-derived growth factor system

- in the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40:1364-1372.
129. Kingsley DM. The transforming growth factor beta superfamily: New members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev* 1994; 8:133-146.
130. Knighton DR, Doucette M, Fiegel VD, Ciresi K, Butler E, Austin L. The use of platelet derived wound healing formula in human clinical trials. *Prog Clin Biol Res* 1988; 266:319-29.
131. Knighton DR., Ciresi K., Fiegel VD., Schumerth S., Butler E., Cerra F. Stimulation of repair in chronic, nonhealing, cutaneous ulcers using platelet-derived wound healing formula. *Surg Gynecol Obstet* 1990; 170:56-90.
132. Knighton DR., Hunt TK., Thakral KK., Goodson WH. Role of platelets and fibrin in the healing sequence:an in vivo study of angiogenesis and collagen synthesis. *Ann Surg* 1982; 196:379-388.
133. Ksander GA., Sawamura SJ., Ogawa Y., Sundsmo J., McPherson JM. The effect of platelet releasate on wound healing in animal models. *J Am Acad Dermatol* 1990; 22:781-791.
134. Kubota K., Sakikawa C., Katsumata M., Nakamura T., Wakabayashi K. Platelet-derived growth factor BB secreted from osteoclasts acts as an osteoblastogenesis inhibitory factor. *J Bone Miner Res* 2002; 17:257-265.
135. Lalani Z., Wong M., Brey EM., Mikos AG., Duke PJ. Spatial and temporal localization of transforming growth factor-beta1, bone morphogenetic protein-2, and platelet-derived growth factor-A in healing tooth extraction sockets in a rabbit model. *J Oral Maxillofac Surg* 2003; 61:1061-1072.
136. Landesberg R., Roy M., Glickman RS. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. *J Oral Maxillofac Surg* 2000; 58:297-301.
137. Lane JM., Sandhu HS. Current approaches to experimental bone grafting. *Orthop Clin North Am* 1987; 18:213-225.
138. Laurencin CT. Bone Graft Substitutes. Ed ASTM international. Rossemont Illinois, 2003.
139. Lee YM., Park YJ., Lee SI., Ku Y., Han SB., Klokkevold PR., Chung CP. The bone regenerative effect of platelet-derived growth factor-BB delivered with a chitosan tricalcium phosphate sponge camera. *J Periodontol* 2000; 71:418-424.
140. Li H., Pujicz Z., Xiao Y., Bartold PM. Identification of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in commercial demineralized freeze-dried bone allograft preparations:pilot study. *Clin Implant Dent Relat Res* 2000; 2:110-117.
141. Li X., Eriksson U. Novel PDGF family members: PDGF-C and PDGF-D *Cytokine Growth Factor Rev* 2003; 14:91-98.
142. Lieberman J., Daluiski A., Einhorn T. Revisión de Conceptos actuales. El papel de los factores de crecimiento en la reparación ósea. *J Bone Joint Surg* 2002; 84-A:1032-1053.

143. Lind M. Growth factor stimulation of bone healing Effects on osteoblasts, osteomies and implants fixation *Acta Orthop Scand* 1998; 283(suppl).
144. Lind M. Growth factors:possible new clinical tools. A review. *Acta Orthop Scand* 1996; 67:407–417.
145. Lind M., Deleuran B., Thestrup-Pedersen K., Soballe K., Eriksen EF., Bunger C. Chemotaxis of human osteoblasts. Effects of osteotropic growth factors. *AIPMIS* 1995; 103:140-146.
146. López-Oliva Muñoz F., Vicario Espinosa C., Almoguera Villacañas IR. Plasma rico en plaquetas. Análisis comparativo de cuatro presentaciones comerciales. *Patología del Aparato Locomotor* 2003; 1:59-66
147. Lowery GL., Kulkarni S., Pennisi AE. Use of Autologous Growth Factors in Lumbar Spinal Fusion. *Bone* 1999; 252(suppl):s47-s50.
148. Lucarelli E., Fini M., Beccheroni A., Giavaresi G., DiBella C., Aldini, NN, Guzzardella G., Martini L., Cenacchi A., DiMaggio N., Sangiorgi L., Fornasari PM. Stromal stem cells and platelet-rich plasma improve bone allograft integration. *Clin Orthop* 2005; 435:62-68.
149. Lynch SE, Colvin RB, Autoniades HN. Growth factors in wound healing single synergistic effects on partial thickness porcine skin wounds *J Clin Invest* 1998; 84:640-646.
150. Lynch SE, Williams RC, Polson AM, Howell TH, Reddy MS, Zappa UE, Antoniades HN. A combination of platelet-derived and insulin-like growth factors enhances periodontal regeneration. *J Clin Periodontol* 1989; 16:545–548.
151. Lynch SE., Buser D., Hernandez RA., Weber HP., Stich H., Fox CH., Williams RC. Effects of platelet-derived growth factor/insulin-like growth factor-I combination on bone regeneration around titanium dental implants. Results of a pilot study in beagle dogs. *J Periodontol* 1991; 62:710–716.
152. Lyons RM, Keski-Oja J, Moses HL. Proteolytic activation of latent transforming growth factor-beta from fibroblast-conditioned medium. *J Cell Biol* 1988; 106:1659–1665.
153. Macey M., et al. Evaluation of the anticoagulants EDTA and citrate, theophylline, adenosine and dipyridamole for assessing platelet activation on the ADVIA 120 hematology system. *Clin Chem* 2002; 48:891-899.
154. Malizos K., Zalavras ChG., Soucacos PN., Beris AE., Urbaniak JR. Free Vascularized Fibular Grafts for Reconstruction of Skeletal Defects. *J Am Acad Orthop Surg* 2004; 12:360-369.
155. Mankin HJ. Complications of allograft surgery. En Friedlander G.E.; Mankin H.J.; Sell K.W (Ed.): Osteochondral allografts. Biology, banking and clinical applications. Little Brown and Co. Boston, 1983.
156. Mannaioni PF., Di Bello MG., Massini E. Platelets and inflammation:role of platelet-derived growth factor, adhesión molecules and histamine. *Inflam Res* 1997; 46:4-18.
157. Marden LJ., Fan RSP., Peirce GF., et al. Platelet derived growth factors

- inhibit bone regeneration induced by ostogenin, a BMP, in rat craniotomy defects. *J Clin Invest* 1993; 92:2897-2905.
158. Margolis DJ., Kantor J., Santanna J., Strom BL., Berlin JA. Effectiveness of platelet releasate for the treatment of diabetic neuropathic foot ulcers. *Diabetes Care* 2001; 24:483-8.
159. Martin P. Wound healing: The aim for perfect skin regeneration. *Science* 1997; 276:75-81.
160. Martinez-Gonzalez JM., Cano-Sanchez J., Gonzalo-Lafuente JC., Campo-Trapero J., Esparza-Gomez G., Seoane J. Do ambulatory-use Platelet-Rich Plasma (PRP) concentrates present risks? *Medicina Oral* 2002; 7:375-390.
161. Marx R. Platelet Rich plasma: Evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004; 62:489-496.
162. Marx RE., Carlson ER., Eichstaedt RM. Platelet-rich plasma Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998; 85:638-646.
163. Massagué J. The TGF- β family. *Annu Rev Cell Biol* 1990; 6:597-641.
164. Matras H. The use of fibrin glue in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg* 1982; 40:617-21.
165. McCarthy TL., Centrella M., Canalis E. Insulin-like growth factor (IGF) and bone. *Connect Tissue Res* 1989; 20:277-282.
166. McKibbin B. The biology of fracture healing in long bones. *J Bone Joint Surg* 1978; 60-B:150-162.
167. Merz MA, Fennis JP, Verhagen CM. Stoelting PJ. Reconstruction of the mandible using preshaped 2.3 mm titanium plates, autogenous particulate cortico-cancellous bone grafts and platelet rich plasma: a report on eight patients. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004; 33:733-739.
168. Meyrueis P., Cazenave A. Consolidation des fractures: Fracture healing. **EMC-Reumatologie Orthopédie** 2004.
169. Mitlak D., et al. The effect of systemically administered PDGF-BB on rodent skeleton. *J Bone Miner Res* 1996; 11:238-247.
170. Monov G., et al. The effect of platelet-rich plasma upon implant stability measured by resonance frequency analysis in the lower anterior mandibles. *Clin oral Implants Res* 2005; 16:461-465.
171. Moroff G., Kline L., Dabay M., Hunter S., Johnson A., McNeil D., Nixon J. Sawyer S., Taylor H., Whitley P., Wahab F., Murphy S. Reevaluation of the resting time period when preparing whole blood-derived platelet concentrates with the platelet-rich plasma method. *Transfusión* 2006; 46:572-577.
172. Mott DA., Mailhot J., Cuenin MF., Sharawy M., Borke J. Enhancement of osteoblast proliferation in vitro by selective enrichment of demineralized freeze-dried bone allograft with specific growth factors. *J Oral Implantol* 2002; 28:57-66.
173. Munuera L., Cordero J. Ingeniería Tisular ósea Cursos de actualización, 38 Congreso Nacional SECOT. 2001: 65-79
174. Muschler GF., Lane JM. Orthopedic surgery. En Habal MR., Reddi AH: Bone grafts and bone substitutes.

- Philadelphia Saunders.1992.375-407
175. Mustoe TA., Purdy J., Gramates P., Deuel TF., Thomason A., Pierce GF. Reversal of impaired wound healing in irradiated rats by platelet-derived growth factor-BB. *Am J Surg* 1989; 158:345-350.
176. Nakamura N., et al. Local application on FGF increases bone mass in rabbits. *Arch Orthop Trauma Surg* 1996; 115:344-346.
177. Nakamura N., Shino K., Natsuume T., et al. Early biological effect of in vivo gene transfer of platelet – derived growth factor (PDGF-B) into healing patellar ligament. *Gene Ther* 1998; 5:1165-1170.
178. Nash TJ., Howlett CR., Martin C., Steele J., Johnson KA., Hicklin DJ. Effect of platelet-derived growth factor on tibial osteotomies in rabbits. *Bone* 1994; 15:203–208.
179. Nather A. Research Methodology in orthopaedics and reconstructive surgery. Ed World Scientific. Danvers MA, 2002.
180. Nevins M., Camelo M., Nevins ML., Schenk RK., Lynch SE. Periodontal regeneration in humans using recombinant human platelet-derived growth factor-BB (rhPDGF-BB) and allogenic bone. *J Periodontol* 2003; 74:1282–1292.
181. Nielsen HJ., Werther K., Mynster, Brünner N. Soluble vascular endothelial growth factor in various blood transfusion components. *Transfusión* 1999; 39:1078-1083.
182. Noda M. In vivo stimulation of bone formation by TGF- β . *Endocrinology* 1998; 124:2991-2994.
183. Nunamaker DM. Experimental of fracture repair. *Clin Orthop* 1998; 355s:s56-s65.
184. Ottolenghi CE. Massive osteoarticular bone grafts. *J Bone Joint Surg* 1966; 48-B:646-659.
185. Ozkaynak E., Rueger DC., Drier EA., et al. OP-1 cDNA encodes an osteogénica protein in the TGF- β family. *EMBO* 1990; 79:2085-2093.
186. Paques M., Chastang C., Mathis A., Sahel J., Massin P., Dosquet C., Korobelnik JF., Le Gargasson JF., Gaudric A. Effect of autologous platelet concentrate in surgery for idiopathic macular hole: results of a multicenter, double-masked, randomized trial. Platelets in Macular Hole Surgery Group. *Ophthalmology* 1999; 106:932–938.
187. Park YJ., Lee YM., Park SN., Sheen SY., Chung CP., Lee SJ. Platelet derived growth factor releasing chitosan sponge for periodontal bone regeneration. *Biomaterial* 2000; 21:153-159.
188. Passuti N., Delecryn J., Gouin F., Heymann D. Substituts osseux. Encycl Méd Chir, Appareil locomoteur; Elsevier, Paris-France, 1999.
189. Peris JL. Estudio biomecánico de la fractura. En Biomecánica de la fractura ósea y técnicas de reparación. Ed. Martín. Valencia, 1992.
190. Petrungraro P. Using Platelet-Rich Plasma to Accelerate Soft Tissue Maturation in Esthetic Periodontal Surgery. *J Periodontol* 2001; 22:729-745.
191. Pfeilschifter J. Stimulation of bone matrix apposition in vitro by local

- growth factors. *Endocrinology* 1990; 127:69-75.
192. Philippart P., Brasseur M., Hoyaux D., Pochet R. Human recombinant tissue factor, platelet-rich plasma, and tetracycline induce a high-quality human bone graft:a 5-year survey. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2003; 18:411-416.
193. Plachokova AS., van den Dolder J., Stoeltinga PJ., Jansen JA. The bone regenerative effect of platelet-rich plasma in combination with an osteoconductive material in rat cranial defects. *Clin Oral Impl Res* 2006; 17:305-311.
194. Popesko P., Rajtová, V., Horak J. A Colour Atlas of Anatomy of small laboratory animals. Rabbit. Ed.Wolfe publishing Ltd, 1992.
195. Powell DM., Chang E., Fariior E. Recovery From Deep-Plane Rytidectomy Following Unilateral Wound Treatment With Autologous Platelet Gel. *Arch Facial Plast Surg* 2001; 3:245-250.
196. Pryor ME., Polimeni G., Koo KT., Hartman MJ., Gross H., April M., Safadi FF., Wikesjo UM. Analysis of rat calvaria defects implanted with a platelet-rich plasma preparation: histologic and histometric observations. *J Clin Periodontol* 2005; 32:966-972.
197. Quigley RL., Perkins JA., Gottner RJ., Curran RD., et al. Intraoperative procuremente of autologous fibrin glue. *Am Thorac Surg* 1993; 56:387-389.
198. Radomsky ML., et al. Potential Role of fibroblast growth factor in Enhancement of fracture healing *Clin Orthop* 1998; 355s:s283-s293.
199. Raghoobar GM., Schortinghuis J., Liem RS., Ruben JL., van der Wal JE., Vissink A. Does platelet-rich plasma promote remodeling of autologous bone grafts used for augmentation of the maxillary sinus floor? *Clin Oral Implants Res* 2005; 16:349-356.
200. Ranly DM., Mcmillan J., Keller T., Lohmann CH., Meunch T. Platelet derived Growth factor inhibits Demineralized Bone Matrix Induced intramuscular Cartilage and bone formation. A Study of immunocompromised mice. *J Bone Joint Surg Am* 2005; 87:2052-2064.
201. Rasuba L., Yoshikawa H., Nagata K., Iijima T., Ohishi M. Platelet-derived growth factor and bone morphogenetic protein in the healing of mandibular fractures in rats. *J Oral Maxillofac Surg* 2003; 41:173-178.
202. Reddi A.H. Initiation of fracture Repair by bone Morphogenetic Proteins. *Clin Orthop* 1998; 355s:s66-s72.
203. Reddi AH, Huggins CB. Biochemical sequences in the transformation of normal fibroblasts in adolescent rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 1972; 69:1601-1605.
204. Reddi AH. Bone morphogenetic proteins:from basic science to clinical applications. *J Bone Joint Surg* 2001; 83-A(suppl):s1-s6.
205. Reddi AH. Regulation of local differentiation of cartilage and bone by extracellular matrix: a cascade type mechanism. *Prog Clin Biol Res* 1982; 110:261-268.
206. Redlich A., et al. Bone engineering on the basis of periosteal cells cultured in polymer fleches. *J Materials science* 1999; 10:767-772.

207. Rendu F., Brohard-Bohn B. Review Article. The platelet Release reaction: granules constituents, secretion and functions. *Platelets* 2001; 12:261– 273.
208. Rivera J., et al. Injertos óseos. Nueva alternativa. Fase III. Obtención caracterización y evaluación de Hidroxiapatita sintética y proteínas morfagénicas óseas en un modelo experimental Lapino. *Rev Col Cienc Pec* 2004; 17:20-28.
209. Robson M., et al. The future of recombinant growth factors in wound healing *Am J Surg* 1998; 176:80s-82s.
210. Rodriguez A. , Anastassov GE., Lee H., Buchbinder D., Wettan H. Maxillary sinus augmentation with deproteinated bovine bone and platelet rich plasma with simultaneous insertion of endosseous implants. *J Oral Maxillofac Surg* 2003; 61:157–163.
211. Roldan JC., Jepsen S., Miller J., Freitag S., Rueger DC., Acil Y., Terheyden H. Bone formation in the presence of platelet-rich plasma vs. bone morphogenetic protein-7. *Bone* 2004; 34:80-90.
212. Rosier R., Evans C.H. Molecular Biology in Orthopaedics. AAOS. Rossemont Illinois, 2003.
213. Rosier RN., et al. The Potential Role of Transforming growth factor Beta in Fracture Healing. *Clin Orthop* 1998; 355s:s294-s300.
214. Ross R., Raines EW., Bowen-Pope DF. The biology of platelet-derived growth factor. *Cell* 1986; 46:155-169.
215. Rutherford RB., Niekrash CE., Kennedy JE., Charette MF. Platelet-derived and insulin-like growth factors stimulate regeneration of periodontal attachment in monkeys. *J Periodontal Res* 1992; 27:285–290.
216. Rutherford RB., Ryan ME., Kennedy JE., Tucker MM., Charette MF. Platelet-derived growth factor and dexamethasone combined with a collagen matrix induce regeneration of the periodontium in monkeys. *J Clin Periodontol* 1993; 20:537–544.
217. Sampath TK., Reddi AH. Homology of bone inductive proteins from human, monkey, bovine and rat extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80:6591-6595.
218. Sanchez AR., Eckert SE., Sheridan PJ., Weaver AL. Influence of platelet-rich plasma added to xenogeneic bone grafts on bone mineral density associated with dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2005; 20:526-532.
219. Sanchez AR., Sherida PJ., Eckert SE., Weaver AL. Influence of platelet-rich plasma added to xenogeneic bone grafts in periimplant defects:a vital fluorescence study in dogs. *Clin Implant Dent Relat Res* 2005; 7:61-69
220. Sanchez AR., Sheridan PJ., Eckert SE., Weaver AL. Regenerative potential of platelet-rich plasma added to xenogenic bone grafts in peri-implant defects:a histomorphometric analysis in dogs. *J Periodontol* 2005; 76:1637-1644.
221. Sanchez AR., Sheridan PJ., Kupp LI. Is platelet-rich plasma the perfect enhancement factor? A current review *Int J Oral Maxillofac*

- Implants* 2003; 18:93-103.
222. Sánchez M., Azofra L, Anitua E., Andía I, Padilla S, Santisteban L, et al. Plasma rich in growth factors to treat an articular cartilage avulsion: a case report. *Med Sci Sports Exerc* 2003; 35:1648-1652.
223. Sánchez M., Azofra L., Aizpurúa B., Elorriaga R., Anitua E., Andía I. Use of autologous plasma rich in growth factors in arthroscopic surgery. *Cuader Artroscopia* 2003; 10:12-19.
224. Sánchez Martín M. Injertos óseos en traumatología y Cirugía Ortopédica. Secretariado de publicaciones e intercambio editorial. Universidad de Valladolid. Valladolid, 2005.
225. Sanchis Olmos V. El banco de huesos del Hospital Provincial de Madrid. *Acta Ortop Traum* 1953; 1:3-15.
226. Sandell LJ., Grodzinsky AJ. Tissue engineering of Bone, from Tissue engineering in musculoskeletal Clinical Practice. AAOS symposium 2003.
227. Sanzana ES. Estudio comparativo de la utilidad de los cementos y vidrios basados en fosfatos de calcio como sustitutivos óseos en defectos cavitarios experimentales. Tesis Doctoral. Universitat de Barcelona. Barcelona, 2004.
228. Sarkar MR., Augat P., Shefelbine SJ., Schorlemmer S., Huber-Lang M., Claes L., Kinzl L., Ignatius A. Bone formation in a long bone defect model using a platelet-rich plasma-loaded collagen scaffold. *Biomaterials* 2006; 27:1817-1823.
229. Sarment DP., Cooke JW., Miller SE., Jin Q., McGuire MK., Kao RT., McClain PK., McAllister BS., Lynch SE. Effect of rhPDGF-BB on bone turnover during periodontal repair. *J Clin Periodontol* 2006; 33:135-140.
230. Sarmiento A., Latta L., Stoll JE. The effects of function in fracture healing and stability. En Principles of Fracture Healing. *AAOS Instr Cours* 1984:83-106.
231. Schilephake H. Bone growth factors in maxillofacial skeletal reconstruction. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2002; 31:469-84.
232. Schlegel KA., Donath K., Rupprecht S., Falk S., Zimmermann R., Felszeghy E., Wilfang J. De novo bone formation using bovine collagen and platelet-rich plasma. *Biomaterials* 2004; 25:5387-5393.
233. Schliephake H. Bone growth factors in maxillofacial skeletal reconstruction. *Int J. Oral Maxillofac Surg* 2002; 31:469-484.
234. Schmidmaier G., Wildemann B., Gäbelein T., et al. Synergistic effects of IGF-I and TGF- β 1 on fracture healing in rats. *Acta Orthop Scand* 2003; 74:602-604.
235. Schmidmaier G., Wildemann E., Ostapowicz D. Long-term effects of local growth factor (IGF-I and TGF- β 1) treatment on fracture healing. A safety study for using growth factors *J Orthop Res* 2004; 22:514-519.
236. Schmitz IP., Hollinger T. The biology of platelet-rich plasma. *J Oral Maxillofac Surg* 2001; 59:1119-1121.
237. Schwartz Z., Somers A., Mellonig JT., Carnes DL., Wozney JM., Dean DD., Cochran DL., Boyan BD. Addition of human recombinant bone

- morphogenetic protein-2 to inactive commercial human demineralized freeze-dried bone allograft makes an effective composite bone inductive implant material. *J Periodontol* 1998; 69:1337-1345.
238. Sciadini MF., Johnson KD. Evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 as bone-graft substitute in a canine segmental defect model. *J Orthop Res* 2000; 18:289-302.
239. Servold SA. Growth factor impact on wound healing. *Clin Podiatr Med Surg.* 1991; 8:937-53.
240. Shih SD., Rees TD., Miller EG., Wright M., Lacopino AM. The effects of platelet-derived growth factor-BB and insuline-like growth factor on epithelial dysplasia. *J Periodont* 1996; 67:1224-32.
241. Siebrecht M., De Rooij P., Arm M., Olsson ML., Aspenberg P. Platelet Concentrate Increases Bone Ingrowth into Porous Hydroxyapatite. *Orthopedics* 2002; 25:1345-1357
242. Simpson AH., Mills L., Noble B. The role of growth factors and related agents in accelerating fracture healing *J Bone Joint Surg* 2006; 88-B:701-705.
243. Slater M., Patava J., Kingham K., Mason RS. Involvement of Platelets in Stimulating Osteogenic Activity. *J Bone Joint Surg* 1995; 13:655-663.
244. SlavinJ. The role of cytokines in wound healing *Pathol* 1996; 178:5-10.
245. Soffer E., Ouhayoun JP., Anagnostou F. Fibrin sealants and platelet preparations in bone and periodontal healing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003; 95:521-528.
246. Sonnleitner D., Huemer P., Sullivan DA. Simplified Technique for Producing Platelet-Rich Plasma and Platelet Concentrate for Intraoral Bone Grafting Techniques:A Technical Note. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2000; 15:879-882.
247. Steigmann M., Garg AK. A Comparative Study of Bilateral Sinus Lifts Perfored with Platelet-Rich Plasma Alone Versus Alloplastic Graft Material Reconstituted with Blood. *Implant Dent* 2005; 14:261-266.
248. Street J., Bao M., deGuzman L., et al. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *PNAS* 2002; 99:9656-9661.
249. Suba Z., Takacs D., Gyulai-Gaal S., Kovacs K. Facilitation of beta-tricalcium phosphate-induced alveolar bone regeneration by platelet-rich plasma in beagle dogs:a histologic and histomorphometric study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2004; 19:832-838.
250. TaguchiY. et al. Autoclaved autograft combined with vascularized bonemarrow. *Clin Orthop* 1995; 320:220-226.
251. Tayapongsak P., et al. Autologous fibrin adhesive in mandibular reconstruction with particulae cancellous bone an marrow. *J Oral Maxillofac Surg* 1994; 52:161-166.
252. Taylor GI., Miller GDH., Ham FJ. The free vascularized bone graft:A clinical extension of microvascular techniques. *Plast Reconstr Surg* 1975; 55:533-538.
253. Thaller SR., Dart A., Tesluk H. The effects of insulin-like growth factor I on critical-size calvarial defects in

- Sprague-Dawley rats. *Ann Plast Surg* 1993; 31:429-433.
254. Thor A., Wannfors K., Sennerby L., Rasmusson L. Reconstruction of the severely resorbed maxilla with autogenous bone, platelet-rich plasma, and implants: 1-year results of a controlled prospective 5-year study. *Clin Implant Dent Relat Res* 2005; 7:209-220.
255. Thorwarth M., Wehrhan F., Schultze-Mosgau S., Wiltfang J., Schlegel KA. PRP modulates expression of bone matrix proteins in vivo without long-term effects on bone formation. *Bone* 2006; 38:30-40.
256. Tischler M. Platelet rich plasma. The use of autologous growth factors to enhance bone and soft tissue grafts. *N Y State Dent J* 2002; 68:22-24.
257. Trippel SB. Potential Role of insulin like growth factors in fracture healing. *Clin Orthop* 1998; 355s:s301-s313.
258. Trippel SB., Coutts RD., Einhorn TA. Growth Factors as Therapeutic Agents. *J Bone Joint Surg* 1996; 78-A:826-837.
259. Tsay R., Vo J., Burke A., Eisig S. Differential growth factor retention by platelet rich plasma composites. *J Oral Maxillofac Surg* 2005; 63:521-528.
260. Tözüm T., Demiralp B. Platelet-Rich Plasma: A Promising Innovation in Dentistry. *J Can Dent Assoc* 2003; 69:664a-h.
261. Uglow M., Peat R., Hile M., et al. Low-Intensity Ultrasound Stimulation in Distraction Osteogenesis in Rabbits. *Clin Orthop* 2003; 417:303-312.
262. Uhl E., Rosken F., Sirsjo A., Messmer K. Influence of platelet-derived growth factor on microcirculation during normal and impaired wound healing. *Wound Repair Regen* 2003; 11:361-367.
263. Urist MR. Bone formation by autoinduction. *Science* 1965; 150:893-899.
264. Urist MR. The search and the discovery of bone morphogenetic protein (BMP). En:Urist MR.; O'Connor B.; Burwell RG.:Bone grafts, derivatives and substitutes, pp. 315-62. Oxford, Butterworth-Heinzmann, 1994.
265. Van Waarde MA., Van Assen AJ., Kampinga HH. Quantification of Transforming Growth Factor- β in Biological Material Using Cells Transfected with a Plasminogen Activator Inhibitor-1. Promoter-Luciferase Construct. *Anal Biochem* 1997; 247:45-51.
266. Vats A., Tolley NS., Buttery LDK., Polak JM. The stem cell in orthopaedic surgery. *J Bone Joint Surg* 2004; 86-B:159-164.
267. Volkov M. Allotransplantation of joints. *J Bone Joint Surg* 1970; 52-B:49-53.
268. Waters JR., Roberts KC. Database review of possible factors influencing point-of care platelet gel manufacture. *J Extra Corpor Technol* 2004; 36:250-254.
269. Weibrich G., Hansen T., Kleis W., Buch R., Hitzler WE. Effect of platelet concentration in platelet rich plasma on pre-implant bone regeneration. *Bone* 2004; 34:665-671.
270. Weibrich G., Kleis WK., Hafner G., Hitzler WE. Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet

- count. *J Cranio - Maxillofac Surg* 2002; 30:97-102.
271. Weibrich G., Kleis WK., Hitzler WE., Hafner G. Comparison of the platelet concentrate collection system with the plasmarich-in-growth-factors kit to produce platelet-rich plasma: a technical report. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2005; 20:118-123.
272. Weibrich G., Wilfried K., Kleis G., et al. The Harvest Smart PRePTM system versus the Friadent-Schütze platelet-Richplasma kit Comparison of a semiautomatic method with a more complex method for the preparation of platelet concentrates. *Clin Oral Impl Res* 2003; 14:233-239.
273. Weibrich G., Wilfried K., Kleis G., Hafner G. Growth Factor Levels in the Platelet-rich Plasma Produced by 2 Different Methods: Curasan-type PRP Kit Versus PCCS PRP System. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002; 17:184-190.
274. Weiner D., Walker K. Efficacy of autologous growth factors in lumbar intertransverse fusion. *Spine* 2003; 28:1968-1971.
275. Whitman DH., Ronald DDS., Berry L., Green DM. Platelet Gel. An Autologous Alternative to Fibrin Glue with Applications in Oral and Maxillofacial Surgery. *J Oral Maxillofac Surg* 1997; 55:1294-1299.
276. Wildemann B., Bamdad P., Holmer Ch., et al. Local delivery of growth factors from coated titanium plates increases osteotomy healing in rats. *Bone* 2004; 34:862-868.
277. Williams DF., Black J., Doherty PJ. Second consensus conference on definitions in biomaterials. En: Biomaterials Tissue Interfaces. Ed. by Doherty PJ, Williams RI, Williams DF, Lee AJC. Elsevier Amsterdam. 1992:525-533
278. Wiltfang J, Kloss FR., Kessler P, Nkenke E, Schultze-Mosgau S, Zimmermann R, Schlegel KA. Effects of platelet-rich plasma on bone healing in combination with autogenous bone and bone substitutes in critical-size defects. An animal experiment. *Clin Oral Implants Res* 2004; 15:187-193.
279. Wozney JM., Rosen V, Celeste AJ, Mitscock LM., Whitters MJ., Kriz RW., Hewick RM., Wang EA. Novel regulators of bone formation:molecular clones and activities. *Science* 1988; 242:1528-1534.
280. Wozney JM., Rosen V. Bone morphogenetic protein and Bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair. *Clin Orthop* 1998; 346:26-37.
281. Yang CY., Simmons DJ., Lozano R. The healing of grafts combining freeze-dried and demineralised allogeneic bone in rabbit *Clin Orthop* 1994; 288:286-93.
282. Yazawa M., Ogata H., Nakajima T., Mori T., Wantanabe N., Handa M. Basic studies on the clinical applications of platelet-rich plasma. *Cell Transplant* 2003; 12:509-518.
283. Yee A., Bae H., Friess D., et al. Augmentation of Rabbit Posterolateral Spondylodesis Using a Novel Demineralized Bone Matrix-Hyaluronan Putty. *Spine* 2003; 28:2435-2440.
284. Yomanda Y, Veda M., Naika T., Takahashi M., Rata K., Nagasaka T. Autogenous injectable bone for regeneration with mesenchymal stem

- cells and platelet-rich plasma:tissue-engineered bone regeneration. *Tissue Eng* 2004; 10:955-64.
285. Yoon ST., Boden SD. Osteoinductive Molecules in Orthopaedics:Basic Science and Preclinical Studies. *Clin Orthop* 2002; 395:33-43.
286. Yoshikawa Y., Abrahamsson SO. Dose-related cellular effects of platelet-driven growth factor-BB differ in various types of rabbit tendons in vitro. *Acta Orthop Scand* 2001; 72:287-292.
287. Zechner W., Tangl S., Tepper G., Furst G., Bernhart T., Raas R., Mailath G., Watzek G. Influence of platelet-rich plasma on osseous healing of dental implants:a histologic and histomorphometric study in minipigs. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2003; 18:15-22.
288. Zhang Z., Chen J., Jin D. Platelet-derived growth factor (PDGF)-BB stimulates osteoclastic bone resorption directly:the role of receptor beta. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 251:190-194.
289. Zimmermann R., et al. Different preparation methods to obtain platelet components as a source of growth factors for local application. *Transfusión* 2001; 41:1217-1224.
290. Zuim JM. Ciencia y tecnología en protección y experimentación animal. McGraw-Hill. 2001.

