

**Universitat de València**

**Facultat de Medicina i Odontologia**

**EFFECTO DE LOS FACTORES DE  
CRECIMIENTO DERIVADOS DE LAS  
PLAQUETAS EN LA REPARACIÓN DE  
DEFECTO ÓSEO CORTICAL**

**TESIS DOCTORAL**

**D. Joaquín Carrasco Luna**

**Programa 040 Cirugía y sus  
especialidades**

**Directores:**

**Prof. Dr. Francisco Gomar Sancho**

**Dr. Daniel Bonete Lluch**





**Universitat de València**

**Facultat de Medicina i Odontologia**

**Departamento de Cirugía**

**Programa: 040 Cirugía y sus especialidades**

**EFECTO DE LOS FACTORES DE  
CRECIMIENTO DERIVADOS DE LAS  
PLAQUETAS EN LA REPARACIÓN DE  
DEFECTO ÓSEO CORTICAL**

Trabajo presentado por

D. Joaquín Carrasco Luna

Para optar al grado de Doctor en Medicina

**Directores:**

**Prof. Dr. Francisco Gomar Sancho**

**Dr. Daniel Bonete Lluch**



D. FRANCISCO GOMAR SANCHO, Catedrático de Traumatología y Cirugía Ortopédica del Departamento de Cirugía de la Facultat de Medicina i Odontologia de la Universitat de Valencia.

D. DANIEL BONETE LLUCH, Doctor en Cirugía Ortopédica y Traumatología. Facultativo especialista de área Valencia. Hospital Universitari i Politècnic "La Fe".

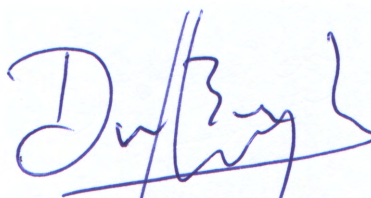
CERTIFICAN:

Que el trabajo presentado por D. Joaquín Carrasco Luna, titulado "Efecto de los factores de crecimiento derivados de las plaquetas en la reparación ósea cortical" ha sido realizado bajo nuestra dirección y reúne los requisitos necesarios para su presentación y defensa para poder optar al grado de Doctor

Y para que así conste, firmamos el presente certificado en Valencia a 6 de Octubre de 2015.



Fdo. Prof. D. Francisco Gomar Sancho



Fdo. D. Daniel Bonete Lluch



## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar quiero dar las gracias al Profesor Dr. Francisco Gomar Sancho por darme la oportunidad de realizar ésta mi segunda Tesis Doctoral. Quiero agradecerle, sus enseñanzas, su apoyo, su sentido crítico que me han motivado para superar este proyecto en un campo tan apasionante como es la Cirugía.

Al Dr. Daniel Bonete LLuch, gracias por su estímulo, paciencia y por su amistad dentro y fuera del quirófano.

Quiero agradecer también a todo el personal del Departamento de Cirugía, compañeros, por vuestro apoyo y colaboración en todo momento. Muy especialmente a Amor García, por su amistad, consejos, y tan buen trabajo en la Histología.

Dr. Sandra Sheffelbine, and musculoskeletal research group of the Department of Bioengineering, at Imperial College of London for inviting me and giving me all facilities. Your teaching has made me grow. Thank you very much indeed.

Dr. Michael Doube, thank you first, for introducing me on digital imaging, advices on bone J and Image J and secondly, for making me feel part of the group in London.

También quiero agradecer al personal técnico de la granja de la Universidad Politécnica de Valencia, por su paciencia y ayuda en todo momento con el manejo de los animales.

Muy especialmente a Anna mi mujer, sin tu apoyo, ayuda y comprensión en todo momento, no hubiera sido posible este trabajo.

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

Gracias por todo.



A Anna, Álvaro y Nicolás

Mi única razón de ser





Por mis padres

Estábais en lo cierto

*.... Y para el investigador no existe alegría comparable a la de  
un descubrimiento, por pequeño que sea...*

**Alexander Fleming**





Figura 1. Imagen células osteocitos.....	27
Figura 2. Imagen células osteoclastos.....	28
Figura 3. Fases proceso consolidación ósea.....	29
Figura 4. Valores HU dependiente de la energía en KeV de la radiación.....	50
Figura 5. Valores HU dependiente de la energía en KeV de la radiación según el tipo de tejido a estudio.....	50
Figura 6. Determinación de tamaño muestral.....	73
Figura 7. Estabulario de la UPV.....	74
Figura 8. Técnica toma de muestra sangre periférica.....	77
Figura 9. Detalle del rasurado del miembro torácico.....	78
Figura 10. Detalle de la incisión.....	79
Figura 11. Modelo cubito y radio miembro torácico ovino.....	79
Figura 12. Detalle de la exposición del cúbito.....	80
Figura 13. Detalle de la extracción del hueso.....	80
Figura 14. Detalle del defecto óseo creado.....	80
Figura 15. Detalle relleno con aloinjerto 2,5 cc.....	81
Figura 16. Sutura de la herida.....	81
Figura 17. Aloinjerto congelado a -70 °C.....	82
Figura 18. Detalle de Plasma Rico en Plaquetas activado.....	85
Figura 19. Detalle placa determinación factores crecimiento Elisa.....	86
Figura 20. Gap Grupo Control 1 a).....	88
Figura 21. Gap Grupo Control 1 b).....	88
Figura 22. Duo Diagnos de Philips.....	89
Figura 23. Sistema TAC estación CTCC01, ProSpeed, General Electric.....	90
Figura 24. Callo de fractura. Reconstrucción 3D.....	92
Figura 25. Hueso cortical sano color gris, y callo de fractura, de color naranja.....	94
Figura 26 Volumen callo fractura. Algoritmo calculo.....	94
Figura 27. Representación callo de fractura mediante segmentación de la imagen digitalizada.....	95
Figura 28. Representación callo de fractura mediante segmentación de la imagen digitalizada Thickness.....	95
Figura 29. Algoritmo calculo grosor trabecular.....	96
Figura 30. Representación distancia 3D. plug-in Michael Daube. Bone J.....	97
Figura 31. Calculo número de Euler.....	98
Figura 32. Representación Analyze Skeleton Bone J.....	99
Figura 33. Representación Analyze Skeleton y Thickness Bone J. Muestra control 47.....	99
Figura 34. Representación esferoide.....	100
Figura 35. Ejemplo de datos obtenidos para los ejes a, b, c, en el estudio del aplanamiento trabecular. Bone J pluggin plateness.....	100
Figura 36. DF se conoce dimensión fractal.....	101
Figura 37. Phantoms de Hidroxiapatita vs Concentración.....	103

Figura 38. Imagen de TAC de los Phantoms de hidroxiapatita.....	104
Figura 39. Imagen de las muestras descalcificadas en fresco..	106
Figura 40. Control radiológico de la descalcificación .....	106
Figura 41. Procesador de Tejidos Histoquined.....	107
Figura 42. Unidad de parafina, montado de bloques .....	108
Figura 43. Estación de trabajo, acoplada a Microscopio Leica. Para la toma de imágenes digitales.....	111
Figura 44. Reparación completa y espontánea en el 100 % de los casos. Defecto consolidado a las 8 semanas. Defecto de 1,4 cm observamos que no se comporta como defecto crítico.....	118
Figura 45. Defecto de 1,4 y 2,0 cm. Osteotomía .....	118
Figura 46. No hay reparación en el 100 % de los casos. Defecto no consolidado a las 8 semanas. Defecto de 2,0 cm, observamos que se comporta como defecto crítico .....	119
Figura 47. No hay reparación en el 100% de los casos a las 8 semanas de evolución. Es por tanto un defecto crítico no consolidado.....	132
Figura 48. Se observa que al añadir al defecto óseo masa de hueso córtico-esponjoso, aparece consolidación parcial, con regeneración de hueso nuevo.....	133
Figura 49. Se observa que al añadir al defecto óseo masa de hueso córtico esponjoso, PRP aparece también consolidación parcial, con regeneración de hueso nuevo, pero no modifica el efecto del aloinjerto.....	134
Figura 50. Reconstrucción 3D del callo de fractura. A 47, B 63, C 501, D 95, E 506, F 535.....	136
Figura 51. Reconstrucción 3D del callo de fractura. A 97, B 118, C 75, D 508, E 520.....	137
Figura 52. Reconstrucción 3D del callo de fractura A 73, B 88, C 102, D 519, E 524.....	138
Figura 53. Callos de fractura control. A 47, B 63, C 501, D 95,E 535, F 506 .....	139
Figura 54. Callos de fractura. Aloinjerto. A 97, B 118, C 75, D 508, E 520 .....	140
Figura 55. Callos de fractura. Aloinjerto + PRP. A 75, B 88, C 102 D 519 E 524 .....	141
Figura 56. Representación grosor trabecular en el callo de fractura. Control.....	146
Figura 57. Representación grosor trabecular en el callo de fractura. Aloinjerto .....	147
Figura 58. Representación grosor trabecular en el callo de fractura. Aloinjerto+ P-PRP .....	148
Figura 59. Representación esqueleto trabecular con inserción trabecular. Control .....	158
Figura 60. Representación esqueleto trabecular con inserción trabecular. Aloinjerto .....	159
Figura 61. Representación esqueleto trabecular con inserción trabecular. Aloinjerto+P-PRP.....	160
Figura 62. Representación esqueleto trabecular atendiendo características de las trabéculas. Control trabecular. Aloinjerto+P-PRP.....	164
Figura 63. Representación esqueleto trabecular atendiendo características de las trabéculas. Aloinjerto control trabecular. Aloinjerto+P-PRP.....	165
Figura 64. Representación esqueleto trabecular atendiendo características de las trabéculas. Aloinjerto + P-PRP	166
Figura 65. Tricrómico de Masson (4x) .Observamos punta de osificación con patrón de osificación mixta, actividad perióstica y hueso neoformado inmaduro. Proceso de osificación membranosa.....	188
Figura 66 Tricrómico de Masson. 4x .Intención de osificación por aposición, osificación membranosa. Hueso nuevo, bien orientado .....	189
Figura 67 Tricrómico de masson (4X). Creación de callo primario, irregular inmaduro, con poca vascularización... 189	
Figura 68 .Tricrómico de Masson (4X) Gap óseo, entre extremos, con gran actividad de osificación de tejido perióstico. Tejido hiper celular con actividad osteoblástica y osteoclástica. ....	190
Figura 69 Tricrómico de Masson. A(40X) fibroblastos totipotentes, callo mas conectivo.B. (20X) Hiper celularidad .	191

- 
- Figura 70 Tricómico de Masson (4X) A Osteointegración. Gran actividad osificación, chips de aloinjerto en resorción/calificación. B Hiper celularidad. Osificación, Matriz osteoblástica con vascularización endocondral células pluripotenciales osteoprogenitoras ..... 192
- Figura 71 Hematoxilina Eosina (10x), A. proceso de osificación. Lagunas rellenas de matriz formadora de hueso B. Callo duro Este tipo de hueso se asemeja más a un hueso laminar, maduro vascularizado ..... 193
- Figura 72 Tricómico de Masson, (10 x), osificación membranosa, por aposición perióstica ..... 194
- Figura 73. Tricómico de Masson (4X) A Proceso osificación entre bordes, se obtiene proceso con menor celularidad que el caso anterior. B Osificación con menos potencia, zonas, vascularizadas ..... 195
- Figura 74 Tricómico de Masson A (10x) La consolidación secundaria presenta osificación membranosa por aposición y mucha menos reacción endocondral que en el caso de aloinjerto solo. El hueso formado por este proceso es un hueso perióstico. B (4X), Proceso osteointegración chips, con menor actividad que en el caso de aloinjerto ... 196
- Figura 75 Hematoxilina eosina (10 X) A. Encontramos un tejido inmaduro, con áreas de osteoide con material extracelular desorganizado. B. se observa como los osteoblastos depositan o entretejen el colágeno desorganizado, este es un tipo de hueso reticular no laminar. .... 197





Gráfica 1. Regresión lineal pg/ml PDGF vs Abs 450-570 .....	83
Gráfica 2. Regresión lineal pg/ml PDGF vs Abs 450-570 .....	83
Gráfica 3. Diagrama cajas para la variable número de plaquetas .....	121
Gráfica 4. Liberación total de PDGF según velocidad de sedimentación .....	124
Gráfica 5. Liberación total de TGF $\beta$ 1 según velocidad de sedimentación .....	125
Gráfica 6. Diagrama cajas para la variable cantidad PDGF .....	125
Gráfica 7. Diagrama cajas para la variable cantidad TGF $\beta$ 1 .....	126
Gráfica 8. Liberación PDGF tras la activación con trombina y $\text{CaCl}_2$ 10% .....	127
Gráfica 9. Liberación TGF $\beta$ 1 tras la activación con trombina y $\text{CaCl}_2$ .....	128
Gráfica 10. Velocidad de liberación .....	128
Gráfica 11. Estequiometría TGF $\beta$ 1 vs PDGF. Relación de factores de crecimiento .....	130
Gráfica 12. Variación de la estequiometría de factores vs tiempo .....	130
Gráfica 13. Diagrama cajas para la variable volumen de callo .....	142
Gráfica 14. Diagrama cajas para la variable volumen de callo consolidación total .....	143
Gráfica 15. Diagrama cajas para la variable distancia entre bordes de fractura .....	145
Gráfica 16. Diagrama cajas para la variable grosor trabecular .....	150
Gráfica 17. Diagrama cajas para la variable conectividad trabéculas conectadas .....	154
Gráfica 18. Diagrama cajas para la variable conectividad trabéculas conectadas/ $\text{mm}^3$ .....	154
Gráfica 19. Diagrama cajas para la variable conectividad trabéculas callo consolidado .....	155
Gráfica 20. Diagrama cajas para la variable numero ramificaciones .....	161
Gráfica 21. Diagrama cajas para la variable número voxels de unión .....	161
Gráfica 22. Diagrama cajas para la variable longitud media de ramas .....	162
Gráfica 23. Diagrama cajas para la variable longitud máxima de ramas .....	162
Gráfica 24. Diagrama cajas para la variable longitud mínima de ramas .....	163
Gráfica 25. Representación intercepción trabecular MIL (anisotropía). Valores entre 0,4 y 0,6 .....	168
Gráfica 26. Representación ajuste lineal recuento de cajas superficie trabecular .....	171
Gráfica 27. Diagrama de cajas para la variable aplanamiento .....	172
Gráfica 28. Diagrama de cajas para la variable anisotropía .....	172
Gráfica 29. Diagrama de cajas para la variable dimensión fractal .....	173
Gráfica 30. Diagrama de cajas para la variable densidad mineral ósea .....	182
Gráfica 31. Diagrama de cajas para la variable densidad mineral ósea cortical .....	184



Tabla 1. Valores de parámetros sanguíneos <sup>249,250</sup> .....	75
Tabla 2. Resolución de alto contraste .....	90
Tabla 3. Especificaciones phantoms .....	103
Tabla 4. Ajuste intensidad de gris vs mg de hidroxiapatita escala de gris de 8 bits .....	104
Tabla 5. Ajuste intensidad de gris vs mg de hidroxiapatita escala de gris de 16 bits .....	104
Tabla 6. Defecto cortical crítico .....	119
Tabla 7. Valor medio del nº de plaquetas/ $\mu$ l determinadas en sangre periférica .....	120
Tabla 8. Valor medio del nº de plaquetas/ $\mu$ l determinadas en PRP mediante una sola centrifugación .....	120
Tabla 9. Valor medio nº de plaquetas/ml con una 2º centrifugación a 3500 rpm 8 ' .....	121
Tabla 10. Contenido basal factores crecimiento en sangre periférica .....	123
Tabla 11. Cinética de Liberación de PDGF .....	124
Tabla 12. Cinética de liberación de TGF $\beta$ 1 .....	125
Tabla 13. Análisis Anova $\alpha = 0,05$ .....	127
Tabla 14. Homogeneidad varianzas $\alpha = 0,05$ .....	127
Tabla 15. Contenido total .....	129
Tabla 16. Estudio de Correlación plaquetas vs factores crecimiento .....	131
Tabla 17. Estudio consolidación de fractura .....	135
Tabla 18. Criterios Consolidación .....	135
Tabla 19. Volumen Callo muestras control .....	139
Tabla 20. Volumen Callo muestras aloinjerto .....	140
Tabla 21. Volumen Callo muestras aloinjerto + P-PRP .....	141
Tabla 22. Volumen del callo de fractura consolidación parcial .....	142
Tabla 23. Volumen del callo de fractura consolidación total .....	143
Tabla 24. Distancia entre bordes de fractura .....	144
Tabla 25. Distancia 3D resumen .....	145
Tabla 26. Grosor Trabecular (Thickness) .....	149
Tabla 27. Grosor Trabecular Thickness Resumen .....	149
Tabla 28. Análisis de Anova $\alpha = 0,05$ .....	151
Tabla 29. Homogeneidad varianzas $\alpha = 0,05$ .....	151
Tabla 30. Coeficiente de Pearson .....	151
Tabla 31. Valores Conectividad. Trabéculas conectadas .....	153
Tabla 32. Tabla Resumen Conectividad .....	155
Tabla 33. Esqueleto Trabecular .....	156
Tabla 34. Esqueleto Trabecular resumen .....	157
Tabla 35. Estudio Aplanamiento. Plateness .....	167
Tabla 36. Determinación Anisotropía .....	169
Tabla 37. Dimensión Fractal .....	170
Tabla 38. Análisis de Anova $\alpha = 0,05$ .....	174

---

Tabla 39. Homogeneidad varianzas $\alpha= 0,05$ .....	175
Tabla 40. Coeficiente de Pearson.....	175
Tabla 41. Análisis de Anova $\alpha= 0,05$ .....	175
Tabla 42. Homogeneidad varianzas $\alpha= 0,05$ .....	176
Tabla 43. Coeficiente de Pearson.....	176
Tabla 44. Análisis de Anova $\alpha= 0,05$ .....	177
Tabla 45. Homogeneidad varianzas $\alpha= 0,05$ .....	177
Tabla 46. Coeficiente de Pearson.....	178
Tabla 47. DMO Control.....	180
Tabla 48. DMO Aloiinjerto.....	180
Tabla 49. DMO Aloiinjerto+ P-PRP.....	181
Tabla 50. Determinación DMO en el callo de fractura.....	181
Tabla 51. DMO Cortical Control.....	182
Tabla 52. DMO Aloiinjerto.....	183
Tabla 53. DMO Aloiinjerto + P-PRP.....	183
Tabla 54. Determinación DMO en el hueso cortical.....	184
Tabla 55. Análisis de Anova $\alpha= 0,05$ .....	185
Tabla 56. Homogeneidad varianzas $\alpha= 0,05$ .....	186
Tabla 57. Coeficiente de Pearson.....	186
Tabla 58. Coeficiente de Pearson DMO vs histomorfometría.....	186
Tabla 59. Coeficiente de Pearson DMO vs geometría trabecular.....	187

---

**Créditos de las ilustraciones:**

**Portada** de *curtorum chirurgia per insitionen* 1597 Gaspare Tagliacozzi  
(Ilustración de la portada)

**Ilustración 1.** Cuadro de Jaime Huguet 1460. Representa a los Santos Cosme y Damián realizando un injerto de pierna

<http://greffe-don-organe.skyrock.com/1610408674-L-histoire-de-la-greffe.html>.  
(página2).

**Ilustración 2.** Estructura de una plaqueta activada. Micrografía electrónica. Platelets Michelson AD. Platelets, second edition, academic press, 2007. (página 68).

**Ilustración 3.** Retrato europeo de Al-Razi, del compendio de tratados médicos de Gerardo Cremona, 1114-1187. (página 72)

**Ilustración 4.** Cuadro de los detalles anatómicos delineados por el célebre pintor Peter Berrettini Cortona. Libro de la medicina. De los médicos brujos a los robots cirujanos. Clifford A. Pickover Ed. Librero 2013. (página 116).

**Ilustración 5.** Modelos de estructura trabecular Trabéculas. Autor Foto Joaquín Carrasco. (página 200).

**Ilustración 6.** Estructuras fractales (superior: fotografía aérea marismas. Inferior: Fotografía microscopía óptica hueso trabecular) fractal. Marismas rio piedras en Cartaya Huelva. Imagen Hematoxilina-Eosina Autor Foto Joaquín Carrasco. (página 234).

**Ilustración 7.** Representación artística del interior de la Biblioteca de Alejandría, en base a algunas evidencias arqueológicas (O. Von Corven) siglo XIX. (página 238).



**ABREVIATURAS**

P-PRP . Plasma rico en plaquetas puro.

L-PRP .Plasma Rico en Plaquetas y Leucocitos

PRF .Plasma rico en Fibrina

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

HA .Hidroxiapatita

GH . Somatotropina

FC .Factor de crecimiento

DMO .Densidad Mineral Ósea.

TAC .Tomografía Axial Computarizada.

DBM .Matriz ósea desmineralizada

TB .Hueso Trabecular







# 1. INTRODUCCIÓN

**Ilustración 1.** Cuadro de Jaime Huguet 1460. Representa a los Santos Cosme y Damián realizando un injerto de pierna.

Cuando el hueso presenta procesos regenerativos, 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. La reparación ósea puede considerarse como un fenómeno regenerativo debido a que se establece la organización estructural característica, incluida la médula ósea y sus componentes<sup>1</sup>.

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<sup>2,3,4</sup>.

El hueso es de los pocos órganos que presenta procesos por tanto de regeneración más que simple reparación, es capaz de regenerar hueso nuevo idéntico al preexistente.

Los sustitutos óseos pueden actuar sobre el hueso huésped tras una lesión, o inserción de un implante, mediante procesos fisiológicos de remodelación o cicatrización por medio de tres mecanismos diferentes:

**Osteoconducción:** Es la capacidad de un material o injerto para realizar la función de estructura, andamio o soporte para el crecimiento celular y vascular.

**Osteoinducción:** Es la capacidad de una sustancia para intervenir en un tejido inmaduro y producir la diferenciación en un tejido maduro.

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

Actualmente el mejor sustitutivo óseo es el hueso mismo, ya sea autólogo, como en el caso del autoinjerto óseo, o bien obtenido de un donante, aloinjerto óseo.

El autoinjerto o injerto autólogo, continúa siendo el único biomaterial que posee la capacidad osteogénica, osteoinductora y osteoconductora, pero éste genera una gran morbilidad de la zona donante y su disponibilidad es limitada<sup>5,6</sup>.

Los bancos de huesos suplen estos problemas pero entonces aparecen otros factores limitantes, uno es el "económico" y otro es la reacción inmunológica. El sustituto óseo ideal debería ser: Osteogénico, biocompatible y bioabsorbible<sup>7</sup>.

La congelación de los injertos (por debajo de -60° C), produce una reducción de la respuesta inmunológica, mientras que otros métodos de procesado, como la liofilización, a la vez que reducen significativamente la reacción inmunológica, deterioran otras cualidades, como las propiedades físicas y biológicas, y reducen la capacidad osteoinductiva por degradación de las proteínas<sup>8,9,10</sup>.

La progresiva complejidad de los procedimientos de reconstrucción, así como la disponibilidad de tejido musculoesquelético procedente de donantes humanos, ha potenciado la creciente utilización de injertos en cirugía ortopédica. Pero esta no es la única intervención posible. Desde hace años hemos asistido al desarrollo de nuevos biomateriales que aportan sus propiedades mecánicas y actúan como andamiaje que favorecen la invasión de hueso originado desde el hueso vivo adyacente.

La investigación celular ha avanzado extraordinariamente, permitiendo obtener y reproducir células madres, o células inmaduras, orientando su diferenciación a la estirpe tisular que nos interese.

La matriz ósea desmineralizada (DBM en inglés) es un biomaterial osteoconductor y osteoinductor comercial utilizado en defectos óseos con un largo historial de uso clínico en diversas formas. Es una matriz orgánica extraída de huesos humanos, y conserva gran parte de los componentes proteínicos nativos de hueso, con pequeñas cantidades de sólidos a base de calcio, fosfatos inorgánicos y algunos restos celulares. Muchos de los componentes proteicos de DBM (por ejemplo, factores de crecimiento) son conocidos por ser agentes osteogénicos potentes. Comercialmente se sirve como masilla, pasta, láminas y piezas flexibles, DBM proporciona una matriz degradable que facilita la liberación endógena de estos compuestos en el lugar de la herida del hueso donde se coloca quirúrgicamente para llenar defectos óseos, induciendo la formación de hueso nuevo y acelerar la curación<sup>11</sup>.

Si bien las soluciones mecánicas han sido el pilar de intervenciones ortopédicas para trastornos musculoesqueléticos, en la actualidad está en marcha la búsqueda de nuevas estrategias de tratamiento<sup>12</sup>.

Los productos denominados ortobiológicos abarcan una gama amplia de productos, a nivel macroscópico, como son los sustitutos de injerto óseo (polímeros, cerámicas etc.), hasta nivel microscópico, como son tratamientos con factores de crecimiento, proteínas morfogenéticas y otros sustitutivos como P15 etc.

El tratamiento quirúrgico de las fracturas no consolidadas, a menudo requiere del uso de materiales osteogénicos con una adecuada estabilización para establecer una continuidad ósea. El P15-BGS parece ofrecer una alternativa segura, económica y clínicamente útil al autoinjerto en la reparación de este tipo de fracturas<sup>13</sup>.

Estos biomateriales se seleccionan inicialmente para la restauración estructural basada en sus propiedades biomecánicas. Los últimos andamiajes tisulares han sido

diseñados para ser bioactivos o biorreabsorbibles con el fin de mejorar el crecimiento del tejido óseo y la vascularización. Gracias a que son estructuras porosas, hechas de materiales biodegradables que albergan diferentes factores de crecimiento, fármacos, genes, o células madre en su interior, son capaces de vehiculizar estas sustancias justo en el foco de la lesión<sup>14</sup>.

Algunos de ellos tales como los derivados del sulfato y fosfato de calcio despiertan mucho interés. Son sustitutivos óseos a partir de HIDROXIAPATITA, con poco poder de biorreabsorción, y poca facilidad de manejo, sustancias cerámicas, implantes porosos y biovidrios etc<sup>7</sup>.

El concepto de ingeniería celular, la construcción de un nuevo tejido a partir de nuevas células, andamiajes tisulares adecuados capaces de dotar soporte estructural y estímulo mediante factores de crecimiento<sup>15</sup> está generando grandes esperanzas de conseguir respuestas adecuadas a la regeneración ósea completa, después de bastantes años de investigación. Finalmente se van conociendo y aislando los distintos factores de crecimiento que actúan en todas las fases del ciclo celular y modulan la actividad metabólica como una opción factible y práctica.

De todas estas soluciones hay una amplia variedad de evidencias clínicas las más controvertidas clínico es el plasma enriquecido en plaquetas, también conocido como plasma rico en plaquetas (PRP), concentrado rico en plaquetas (PRC), o gel de plaquetas autólogo.

## 1.1 CONCENTRADOS PLAQUETARIOS

Las plaquetas son el producto final de los megacariocitos y se forman en la medula ósea. No tienen núcleo y no se pueden replicar<sup>16</sup>.

Las plaquetas ayudan a prevenir la pérdida de sangre en las heridas vasculares para ello adhieren agregados y forman una superficie precoagulante favoreciendo la generación de trombina y fibrina<sup>17</sup>. Las plaquetas actúan en la curación de las heridas de la siguiente manera:

1º Aparecen inmediatamente en el lugar de la herida en grandes cantidades.

2º Crean el ambiente local (*in situ*) necesario para la regeneración tisular gracias a la liberación de proteínas secretadas por la activación de los gránulos alfa.

Además las plaquetas expresan y liberan sustancias que favorecen la reparación tisular e influyen en los procesos de angiogénesis, inflamatorios y respuesta inmune<sup>18</sup>

Desde los años 90 se ha venido utilizando preparados plasmáticos autólogos con unas diferencias muy significativas con respecto al proceso natural del hematoma. Así la composición natural en el lugar de la herida supone 95% de células rojas, 4% de plaquetas y un 1% de serie blanca, en cambio en los preparados autólogos de plaquetas, el 95% son plaquetas, 4% células rojas y 1% de serie blanca<sup>16</sup>.

El desarrollo de concentrados plaquetarios ha generado una gran diversidad de productos de uso quirúrgico. Reciben diferentes nombres dependiendo de la composición tanto en series celulares como en factores de crecimiento. Así se conoce como P-PRP, al plasma rico en plaquetas puro, también se denomina PRF o PRGF; el L PRP plasma rico en plaquetas con leucocitos; P-PRF, plasma rico en fibrina y el L-PRF plasma rico en fibrina y leucocitos<sup>19</sup>.

Las plaquetas contienen cierto número de factores de crecimiento. Los factores de crecimiento son proteínas que desempeñan un papel esencial en la migración, diferenciación y proliferación celular. Se han descrito un gran número de estas proteínas, pero en el tema que nos ocupa, los más importantes son PDGF (Growth factor derived from platelets) TGF- $\beta$  (Transformed  $\beta$  growth factor), FGF (Fibroblast growth factor), VEGF. (Vascular endothelial growth factor), e IGF (Insulin-Growth factor)<sup>20</sup>.

Los factores de crecimiento plaquetarios, en concreto se han mostrado como un método eficaz en implantología maxilar con capacidad osteogénica, favoreciendo o promoviendo hueso nuevo<sup>21</sup>.

El uso directo de los factores de crecimiento tiene un elevado coste económico, y son necesarias dosis repetidas para conseguir un efecto terapéutico clínicamente evidente<sup>15,16</sup>. Por este motivo, la hipótesis de trabajo que ha conducido al desarrollo del PRP es que en un producto con mayor concentración de plaquetas, proporcionaría mayores niveles de factores de crecimiento en relación lineal<sup>22</sup>. La producción de este gel permitiría una liberación sostenida de factores de crecimiento.

### 1.1.1 PRF

El plasma rico en factores de crecimiento PRF representa un nuevo paso en el concepto del uso del gel plaquetario como vehículo terapéutico. Supone el uso de un concentrado plaquetario en el que la concentración y determinación de los factores de crecimiento es conocida de antemano y pasaría a denominarse como concentrado en factores de crecimiento. Los datos clínicos nos revelan que el uso de PRF actuaría como una matriz favorable para el desarrollo de la curación sin procesos inflamatorios excesivos generando la liberación de citoquinas<sup>23,24</sup>.

Los factores de crecimiento son proteínas que desempeñan un papel esencial en funciones como: la migración, diferenciación y proliferación celular<sup>25</sup>.

Estas proteínas incluyen: el PDGF (Growth factor derived from platelets), incluidos los isómeros aa, bb, ab, el TGF- $\beta$  (Transformed  $\beta$  growth factor), incluyendo los isómeros b1, b2 y b3, el factor plaquetario<sup>26</sup>, la interleuquina-1, derivado de plaquetas factor de la angiogénesis, VEGF (Vascular endothelial growth factor), factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento endotelial, factor de crecimiento epitelial, similar a la insulina, la osteocalcina, osteonectina, fibrinógeno, vitronectina, fibronectina, y thrombospondin-1<sup>27</sup>.

Las plaquetas pueden secretar activamente estas proteínas dentro inmediatamente después de la coagulación, con más del 95% de los factores de crecimiento presintetizados secretados en el intervalo de 1 hora<sup>26</sup>. Después de esta primera segregación de los factores de crecimiento, las plaquetas sintetizan y secretan factores de crecimiento adicionales durante varios días tras la lesión<sup>26</sup>.

Sánchez *et al.* utilizan la denominación de plasma rico en factores de crecimiento por primera vez en un estudio clínico sobre la reparación de fracturas de difícil consolidación, y observaron que la infiltración percutánea mejoraba la regeneración ósea tras una media de 3 infiltraciones in situ en un periodo de 4,9 meses<sup>21</sup>.



Por tanto un aumento suprafisiológico de plaquetas autólogas tendría beneficios en la curación de las heridas<sup>28</sup>, aunque es necesario validar estos efectos.

El plasma rico en proteínas por sí sólo no es osteoinductivo, no puede inducir la formación de hueso nuevo *ex novo*. Sólo las proteínas morfogénicas óseas (BMP)<sup>20</sup>, inducen hueso *ex novo*. El PRP actúa sobre las células con capacidad de consolidación con el objeto de incrementar su número (capacidad mitogénica) y estimular el crecimiento vascular interno (capacidad angiogénica). Por lo tanto, es poco probable que estimule la formación de hueso con 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. La degranulación de las plaquetas además nos proporciona otros tipos de sustancias como proteínas plasmáticas, proteínas reguladoras negativas PF4 y sustancias vasoactivas del contenido de los gránulos densos de las plaquetas<sup>29</sup>.

### **1.1.2 PRP**

El plasma rico en plaquetas es aquel que, en un volumen de plasma autólogo posee una concentración de plaquetas superior a los valores basales. El valor medio de las plaquetas plasmáticas es de 200.000/ $\mu$ l aproximadamente. Se ha demostrado que la concentración de 1.000.000 plaquetas por  $\mu$ l, es el valor ideal para asegurar un aporte de factores de crecimiento óptimo para potenciar la consolidación de huesos y tejidos blandos. El plasma rico en plaquetas (PRP) parece ser un avance decisivo en la estimulación y reparación celular de algunos tejidos. Se trata de una biotecnología relativamente nueva que despierta un interés creciente en la ingeniería de tejidos y terapia celular. Dado lo novedoso de la técnica, puede que no se comprenda con exactitud y se realice un uso incorrecto<sup>30</sup>.

El Dr. Eduardo Anitúa ha desarrollado una técnica que consiste en la extracción de 20 cc. de sangre del paciente, centrifugación, para diferenciar las fracciones del plasma y separar la más rica en plaquetas. Esta fracción acumula una cantidad 4,5 veces más que el valor basal. Una vez separada esta fracción, se enriquece con calcio que actúa como factor coagulante, a los pocos minutos adquiere una disposición gelatinosa que es la que se aplica en uso clínico. El resultado de este procedimiento es una fibrina autóloga empapada de factores de crecimiento que van a estimular el organismo para que sustituya los tejidos viejos, deteriorados o destruidos. Algunas

mejoras obtenidas con PRP hasta ahora son: un aumento masa ósea del 136% y una mayor adherencia en cirugía maxilar. Con un nivel plaquetario de 2,6 veces superior a lo normal, el 99% de los casos el resultado ha sido satisfactorio<sup>31</sup>.

Hay autores que consideran que el PRP óptimo se consigue mediante una sola centrifugación<sup>31</sup>, en cambio, otros autores como Max *et al.* aseguran que el PRP obtenido con una sola centrifugación no es un PRP, sino una mezcla de PRP y PPP (plasma pobre en plaquetas)<sup>32</sup>. Valores de PRP por debajo de 4 veces el nivel basal es un PRP diluido. Según el método utilizado se puede obtener, concentrados 3-8 veces el nivel basal<sup>33</sup>.

El PRP contiene dos tipos de componentes uno fibrilar y otro celular. Esta estructura perfectamente reconocible en microscopía electrónica le permite actuar como vehículo para transportar células y moléculas proteicas, capacidad osteoconductiva<sup>34</sup>.

El PRP autólogo es la combinación de 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 y la epitelización de lesiones. Los gránulos alfa de las plaquetas contienen más de 30 proteínas bioactivas, muchas de las cuales tienen un papel fundamental en la hemostasia y/o reparación de los tejidos<sup>27,30,35</sup>.

La mayoría de concentrados de plaquetas para uso quirúrgico, se denominan plasma rico en plaquetas (PRP) de forma genérica pero es una denominación demasiado general e incompleta, que lleva a muchas confusiones en la base de datos científica. Es necesario un sistema de terminología precisa y sencilla que clasifique estos concentrados de plaquetas para su uso quirúrgico.

Se ha propuesto cuatro categorías principales que abarcan la mayoría de concentrados plaquetarios, que se pueden definir fácilmente, dependiendo de su contenido en leucocitos y fibrina:

1. Plasma rico en plaquetas puro (P-PRP), tales como PRP separador de células, Vivostat, Plasma rico en factores de crecimiento PRF o PRGF<sup>36</sup>.
2. Plasma rico en plaquetas con leucocitos (PRP-L), como Curasan, Regen, Plateltex, SmartPrep, PCCS, Magallanes, Ángel o GPS PRP.
3. Plasma rico en fibrina (P-PRF), tales como Fibrinet; y Leukocyte.

4. Plasma rico en fibrina con leucocitos (L-PRF), tales como PRF de Choukroun.

P-PRP y L-PRP se refieren a la forma líquida no activada de estos productos, y las versiones activadas se denominarían respectivamente, geles de P PRP y geles de L-PRP. El propósito de esta búsqueda de consenso en la terminología es abogar por una caracterización más profunda de estos productos. Los investigadores tienen que ser conscientes de la compleja naturaleza de estos biomateriales, con el fin de evitar malentendidos y conclusiones erróneas a la hora de valorar su efectividad<sup>19</sup>.

Esta no es la única clasificación posible, dependiendo del tipo de activación, del tipo de anticoagulante utilizado y la metodología utilizada en la concentración de plaquetas, proporcionaría diferentes características a los concentrados plaquetarios.

A pesar del entusiasmo que ha despertado el desarrollo del producto entre algunos autores y la difusión que han realizado las empresas que comercializan los kits de obtención del PRP, siguen existiendo dudas sobre la verdadera eficacia del Plasma Rico en Plaquetas sobre la regeneración esquelética<sup>27,37,38,39</sup>.

### **1.1.3 Factores negativos en la utilización de PRP/PRF**

El uso del PRP no está exento de ciertos riesgos, hay autores que alertan de posibles efectos perjudiciales:

Los concentrados de uso clínico de factores de crecimiento podrían actuar, como promotores en la carcinogénesis, favoreciendo la división y promoción de células previamente mutadas o "iniciadas". El uso de PRP/PRF puede tener una posible relación con la aparición de tumores malignos, debido a que en la carcinogénesis las sustancias promotoras van a actuar únicamente sobre el aumento de la proliferación celular<sup>40</sup>.

El uso de trombina bovina en la activación del PRP se relaciona con el desarrollo de anticuerpos contra el factor V y XI dando lugar a la aparición de coagulopatías mortales. Este efecto no parece ser un fenómeno dosis-dependiente<sup>41,42</sup>.

Marx *et al.* en cambio, suponen que en el uso de PRP se utiliza trombina bovina para gelificar la preparación, y que no entra en contacto directo con la circulación sistémica, por lo que su utilización no presentaría ningún riesgo<sup>32</sup>.

Otro punto importante a tener en cuenta en la reparación de tejidos es cuando la cantidad de factores de crecimiento genera un efecto catabólico en vez de un efecto anabólico como correspondería. Esta complicación no se puede evitar en las técnicas

actuales porque el efecto terapéutico no se puede controlar al desconocer la concentración real de factores de crecimiento. Así el uso de factores angiogénicos, al promover la neovascularización y el crecimiento de nuevos vasos produce un exceso de actividad anabólica dando como resultado una artrofibrosis.

Del mismo modo la aparición de osificación heterotópica es debida una diferenciación aberrante de condrocitos y fibroblastos.

Por tanto queda pendiente un control preciso de la respuesta a la adición de factores exógenos y su futura validación como terapia<sup>43</sup>.

Existen informes positivos sobre la aplicación en lesiones musculares, tendinosas, o en el empleo en cirugía maxilar, pero se trata de estudios clínicos preliminares, casos clínicos sin seguimiento a largo plazo<sup>44</sup>.

Por otro lado, hay varios trabajos publicados en los que la utilización PRP/PRF no tiene efecto o incluso su efecto es negativo<sup>32,45-51</sup>.

Se hace necesario estudiar por tanto las características del PRP, el procedimiento de aplicación, los periodos de tiempo en su aplicación en conjunción con la naturaleza de las heridas.

## 1.2 ANTECEDENTES HISTÓRICOS

La separación de componentes de la sangre para la aplicación quirúrgica tiene una larga historia; la separación de fibrinógeno, como un adhesivo de fibrina para uso intraoperatorio ayuda a la hemostasia tópica y ha encontrado aplicaciones en muchos entornos clínicos<sup>52</sup>.

Ya en 1994, se empezó a utilizar un adhesivo de fibrina autógena en el hueso esponjoso durante la reconstrucción mandibular<sup>53</sup>.

En 1997, Whitman utilizó el gel de plaquetas en cirugía oral y maxilofacial, utilizándolo no sólo como adhesivo tisular sino también como procedimiento para la consolidación inicial de injertos córtico-esponjosos en los maxilares<sup>54</sup>.

Posteriormente se desarrolló la técnica del gel plaquetario con todas las proteínas plaquetarias y menor concentración de fibrinógeno<sup>55,56</sup>.

Marx *et al.*<sup>57</sup> observaron la presencia de 2 factores de crecimiento: PDGF, TGF- $\beta$ 1 en los concentrados de plaquetas utilizados y concluyeron que:

1. La adición de PRP aceleraba la velocidad de formación ósea y el grado de formación ósea durante al menos 6 meses.
2. Era técnicamente posible secuestrar, concentrar y añadir un mayor número de plaquetas (y en consecuencia de factores de crecimiento) a los injertos óseos.
3. Las células madre de la médula esponjosa contenían receptores para los factores de crecimiento. Para ello recurrieron a la separación de una muestra de sangre en sus componentes y emplearon la fracción plasmática como crioprecipitado. Observaron una consolidación ósea precoz, que se atribuyó al mayor número de células osteocompetentes que quedaban en la red de fibrina<sup>57</sup>.

Este hallazgo positivo condujo a un mayor interés y el uso de PRP dentro de los campos de la cirugía oral y maxilofacial<sup>31,58,59</sup>.

Desde la década de 1990, el PRP ha visto crecer su uso de forma prolífica a través de una creciente variedad de campos quirúrgicos, para incluir ahora aplicaciones que van desde la curación de tejidos blandos<sup>60,61</sup>, la cirugía estética<sup>62,63</sup>, quemaduras<sup>64</sup>, tejido nervioso<sup>65,66</sup>, y úlceras cutáneas crónicas<sup>67</sup>. Aunque la gama de aplicaciones potenciales sigue aumentando, todavía no se dispone de una indicación concluyente para el uso en la curación de hueso.

Anitúa *et al.*<sup>30</sup>, estudiando el efecto del PRP sobre células de tendón cultivado, encontraron un incremento en la proliferación de tenocitos, los cuales, además, sintetizan VEGF, y éste en un sistema *in vivo*, presumiblemente promueve la neoangiogénesis<sup>26</sup>.

Todos estos compuestos están diseñados para liberar factores de crecimiento y ofrece una manera fácil y rentable para obtener una alta concentración de factores de crecimiento autólogos para la cicatrización de los tejidos y su regeneración.

Pero, ¿cómo se prepara el PRP?, ¿cómo se activa y cómo se produce la liberación de factores de crecimiento? está todavía por consensuar. Se han publicado diferentes métodos de obtención de concentrados plaquetarios y se ha determinado la cantidad de factores de crecimiento, pero es tal la cantidad de métodos diferentes, que en realidad no estamos utilizando el mismo compuesto, y por tanto no es posible comparar los efectos de cada uno de ellos. El único consenso es que el PRP autólogo es la combinación de siete factores de crecimiento naturales dentro de un coágulo normal que actúa como portador<sup>7,21,68</sup>.

Estos factores de crecimiento tales como TGF- $\beta$ , PDGF, VEGF etc son histopromotores, y actúan en la curación mediante la quimiotaxis celular, proliferación y diferenciación, eliminación de restos de tejidos, la angiogénesis y la fijación de la matriz extracelular<sup>51</sup>. Actúan también como transductores de señal a las células y funcionan como parte de una red de comunicaciones celular<sup>58,69,70</sup>.

Se ha utilizado los distintos concentrados plaquetarios tanto en modelos animales como en humanos en el tratamiento de lesiones del aparato locomotor<sup>71,72</sup>, en evaluación de implantes odontológicos<sup>73</sup> y como pegamento biológico<sup>74,75,76,77</sup>, con resultados completamente contradictorios, Así tiene efectos clínicos beneficiosos en pacientes con tendinopatías pero por el contrario el papel del PRP en cirugía osteoarticular no está tan claro<sup>5,78</sup>.

El uso de PRP hace necesario que cuantos más factores de crecimiento se liberen y se localicen en la herida, más células madre se estimulan para producir tejido nuevo, por lo tanto, esto permite probablemente que el cuerpo sane más rápido y de manera más eficiente, pero ¿cuáles son los límites?<sup>79,80</sup>

Los concentrados de plaquetas de uso tópico son herramientas innovadoras de la medicina regenerativa y sus efectos en diversas situaciones terapéuticas se debaten acaloradamente en convenciones y congresos. Por desgracia, este campo de

investigación se centró principalmente en los factores de crecimiento plaquetario, y la arquitectura de la fibrina y el contenido de leucocitos de estos productos han sido obviados. En las cuatro familias de concentrados de plaquetas, 2 familias contienen concentraciones significativas de leucocitos: L-PRP (Leukocyte- plasma rico en plaquetas) y L-PRF (Leukocyte- rico en plaquetas de fibrina).

La presencia de leucocitos tiene un gran impacto en la biología de estos productos, no sólo debido a sus propiedades inmunológicas y antibacterianas, sino porque participan en el proceso de cicatrización de la herida, la regulación de la proliferación y diferenciación celular.

Los leucocitos son actores clave de muchos concentrados de plaquetas, y una mejor comprensión de sus efectos es un tema importante a tener en cuenta para la caracterización y el desarrollo de estas tecnologías<sup>81</sup>.

Todavía quedan muchas cuestiones abiertas sobre la preparación, los riesgos y el uso clínico del PRP. En la actualidad no existe un consenso sobre el uso, producción y caracterización de PRP y son necesarios más estudios clínicos y biológicos para establecer una pauta<sup>33</sup>.

## 1.3 FACTORES DE CRECIMIENTO

¿Cuál es el mecanismo de acción de estas proteínas, que vías de señalización son las requeridas para su función? ¿Cómo modulan su actuación?

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

Desarrollan su efecto mediante:

**Efecto paracrino**, cuando el efecto del factor de crecimiento se produce sobre el funcionamiento de una célula o grupo celular adyacente.

**Efecto autocrino**, cuando el efecto del factor de crecimiento se produce sobre el funcionamiento de la célula que la produce.

**Efecto endocrino**, las moléculas señalizadoras (factores de crecimiento) son secretadas por células endocrinas especializadas y se transportan por el sistema vascular sanguíneo o linfático, actuando sobre células diana localizadas en lugares alejados del organismo.

En cirugía osteoarticular, cada vez se hace más necesaria la utilización de esta serie de sustancias promotoras del crecimiento en las zonas donde el sistema músculo-esquelético tiene una lesión, con un importante papel en la reparación ósea.

Así el factor  $\beta$  transformador del crecimiento, las proteínas óseas morfogenéticas, los factores de crecimiento de fibroblastos, los factores de crecimiento tipo insulina y los factores de crecimiento derivados de plaquetas<sup>68</sup>, son los tipos de sustancias más utilizados<sup>7</sup>, el factor limitante es su precio, y en el uso clínico, las terapias repetitivas hasta conseguir un efecto terapéutico clínicamente evidente<sup>21,82</sup>. Por este motivo, el desarrollo de productos como el PRP facilitaría mucho, la dosificación de los factores de crecimiento al aumentar su concentración con el número de plaquetas<sup>79</sup>.

La producción de geles plaquetarios supondría por tanto la liberación sostenida de los factores de crecimiento justo en el sitio de la reparación tras la degranulación.

Los efectos de los factores de crecimiento pueden ser descritos atendiendo también a la respuesta mediada por el tipo de receptor: así tenemos:



**Receptores tirosinquinasa RTKs.** Receptores que atraviesan la membrana plasmática y tienen actividad enzimática intrínseca. Estos receptores incluyen a aquellos que son quinasas de tirosina (PDGF, insulina, los receptores de EGF y de FGF), fosfatasa de tirosina (proteína CD45 de las células de T y de los macrófagos), guanilato ciclasas (receptores del péptido natriurético) y quinasas de serina/treonina (activina y los receptores de TGF- $\beta$ ). Los receptores con actividad intrínseca de quinasa de tirosina son capaces de la auto-fosforilación así como de fosforilar a otros sustratos. Además, varias familias de receptores carecen de actividad enzimática intrínseca, sin embargo están asociados con quinasas de tirosina intracelulares mediante interacciones directas proteína-proteína.

**Receptores asociados a proteína G.** Receptores que están asociados, dentro de la célula, a las proteínas G (que se unen e hidrolizan al GTP). Los receptores que interactúan con las proteínas-G tienen una estructura que se caracterizan porque atraviesan la membrana celular 7 veces, porque estos receptores tienen 7 dominios transmembrana. Estos receptores se llaman receptores serpentina. Ejemplos de esta clase son los receptores adrenérgicos, receptores del olor, y ciertos receptores hormonas (glucagón, angiotensina, vasopresina y bradicinina).

**Receptores serin/treonin quinasas.** Receptores con actividad quinasa de Serina/Treonina (RSTKs)<sup>43</sup>.

Los receptores de la superfamilia de TGF  $\beta$ 1 tienen actividad de quinasa de serina/treonina. Hay más de 30 proteínas de múltiples funciones de la superfamilia de TGF- $\beta$ 1 que también incluye los activinas, inhibinas y las proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs). Esta superfamilia de proteínas puede inducir y/o inhibir la proliferación o diferenciación celular y regular la migración y la adherencia de varios tipos de células. Las vías de señalización utilizadas por el TGF  $\beta$ 1, activina y receptores BMP son diferentes a las vías de los receptores con actividad intrínseca de la tirosinquinasa o de las vías asociadas con las tirosinquinasa intracelulares.

Por lo menos 17 tipos de RSTKs se han aislado y pueden dividirse en 2 subfamilias identificadas como receptores tipo I y tipo II. Los ligandos primero se unen a los receptores tipo II que entonces llevan a la interacción con los receptores tipo I. Cuando se forma el complejo entre el ligando y las 2 formas del receptor, el receptor tipo II fosforila al receptor tipo I lo que lleva a la iniciación de la cascada señalización intracelular. Un efecto predominante del TGF $\beta$ 1 es regulación de la progresión durante el ciclo celular.

De entre los factores de crecimiento segregados por las plaquetas los más estudiados y con efectos más determinantes son: el factor  $\beta$  transformante del crecimiento TGF- $\beta$  (Transformed  $\beta$  growth factor), el factor de crecimiento derivado de las plaquetas PDGF (Growth factor derived from platelets), las proteínas óseas morfogenéticas (BMP), los factores de crecimiento de fibroblastos FGF (Fibroblast growth factor), los factores de crecimiento tipo insulina IGF (Insulin-Growth factor) y por último, los de origen vasoendotelial VEGF. (Vascular endothelial growth factor)<sup>7,83,84</sup>.

### 1.3.1 TGF $\beta$ 1 Factor de crecimiento transformante

El factor transformante forma parte de una superfamilia de proteínas citoquinas, como BMP, TGF  $\beta$  etc. Se han descrito hasta cinco isoformas del TGF- $\beta$  en diferentes organismos. En las plaquetas se ha identificado un heterodímero del TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ 1.2). En mamíferos se han descrito tres formas del TGF-( $\beta$ 1,  $\beta$ 2 y  $\beta$ 3), y en aves y anfibios existen las isoformas  $\beta$ 4 y  $\beta$ 5<sup>85</sup>. Estas proteínas son traducidas a partir de la transcripción de diferentes cromosomas (19q13, 1q41 y 14q24) en humanos, pero poseen 80% de homología en la secuencia de aminoácidos entre sí.

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  $\beta$ 1 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<sup>86,87</sup>. Está también implicado en la proliferación, migración y apoptosis en diferentes tipos celulares.

Por otro lado, hay indicios de que un aumento sistémico en el factor de crecimiento transformante 1 (TGF-  $\beta$ 1) interfiere con los efectos beneficiosos de BMP (Proteínas morfogenéticas óseas) que juegan un papel clave en la formación de hueso y la aplicación tópica de proteína recombinante humana rhBMP-2 y rhBMP-7 se ha visto que mejora la curación de fracturas complejas. Sin embargo, hasta un 36% de los pacientes con fractura concomitante no responden a esta terapia<sup>88</sup>.

### 1.3.2 PDGF Factor de crecimiento derivado de las plaquetas

Las plaquetas están involucradas en cuatro funciones destacadas:

- 1 - Sellan las discontinuidades que puedan producirse en el endotelio vascular manteniendo así su integridad.
- 2 - Ayudan a la hemostasia formando agregados plaquetarios.
- 3 - Facilitan la hemostasia secundaria (coagulación) y la formación de fibrina.
- 4 - Actúan sobre la reparación vascular mediante los factores de crecimiento derivados 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 además en otros tipos de células. La síntesis de PDGF se ve favorecida como respuesta a estímulos externos, tensión de oxígeno baja, trombina o la estimulación por otros factores de crecimiento.

Su principal actividad es mitogénica.

El factor derivado de las plaquetas recombinante humano, presenta 3 isoformas distintas PDGF-AA, PDGF-AB and PDGF-BB, y se ha visto que inciden de forma distinta sobre la contractibilidad de los anillos de aorta así como en la regulación de la concentración de  $[Ca^{2+}]_i$ , el pH intracelular y el tromboxano TXA<sub>2</sub><sup>89</sup>.

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 y Williams purificaron la molécula mediante electroforesis en 1981, y más tarde se definió su estructura<sup>90</sup>.

La función principal de PDGF es promover la quimiotaxis. Este factor está secretado por las plaquetas en el callo de fractura y en lugar de la lesión, este factor puede producir el reclutamiento de células mesenquimales y otras células reparativas<sup>91</sup>. El efecto mitogénico sobre los osteoblastos es el reflejo de su acción primaria en el hueso<sup>92</sup>.

Incrementan la osteogénesis aumentando el volumen y la densidad del callo óseo, estimulan la migración de células endoteliales y la producción de fibras musculares lisas. Esto se produce mediante interacciones célula a célula y con la

liberación de mediadores solubles que estimulan la mitogénesis de las células de la musculatura lisa y de los fibroblastos.

### 1.3.3 IGF – Factor de crecimiento tipo insulina

Los factores de crecimiento similares a la insulina (IGF, de insulin-like growth factors) son péptidos con una estructura homóloga a la proinsulina. Existen 2 tipos de IGF, el IGF-I o somatomedina C y el IGF-II.

El IGF-I es el que mejor se correlaciona con el estado secretor de somatotropina (GH). Actúa estimulando la osificación de tipo endocondral, característica del cartílago de crecimiento.

El IGF-II parece tener una mayor relevancia durante la vida fetal, es el factor de crecimiento más abundante en el hueso.

Los IGF se sintetizan en el hígado y en múltiples tejidos por la acción de la GH y son los principales mediadores de las acciones de la GH.

Tienen acción estimuladora del crecimiento, potencian la acción de la insulina y regulan la proliferación celular. Aunque la expresión de IGF-I es ubicua, el origen de la mayor parte del IGF circulante es hepático. Las proteínas de transporte de los IGF, *insulin-like growth factor binding proteins* (IGFBP)<sup>93</sup> forman una gran familia de la que se han descrito 6 formas principales numeradas como IGFBP-1 a 6<sup>94</sup>. La IGF-1 circula en su mayor parte unida a IGFBP-3. El receptor del IGF BP-3 transporta IGF1 a las plaquetas en sangre y se acumula en los gránulos alfa<sup>95</sup>.

### 1.3.4 HGF Factor de crecimiento hepático.

El HGF presenta actividad mitogénica para hepatocitos. Se acumula en los gránulos alfa de las plaquetas. El factor de crecimiento de hepatocitos es de efecto paracrino con actividad en el crecimiento celular, la motilidad y es un factor morfogénico.

Es secretado por las células mesenquimales y no sólo actúa principalmente sobre las células epiteliales y células endoteliales, sino que también actúa sobre las células progenitoras hematopoyéticas mediante la activación del receptor tirosinquinasa<sup>96,97</sup>.

### **1.3.5 VEGF Factor de crecimiento vasoendotelial**

VEGF, presenta 5 isoformas distintas, actúa en los receptores de tirosinquinasa de las células endoteliales. Es un potente angiogénico. El factor de crecimiento vasoendotelial (VEGF) es fundamental para el desarrollo de los vasos sanguíneos y la proliferación de las células endoteliales, Hoy en día se está trabajando en terapias anti VEGF, para evitar el crecimiento incontrolado de tumores y neovascularización<sup>98,99</sup>.

### **1.3.6 FGF Factor de crecimiento de fibroblastos.**

El FGF está presente en la reparación normal de una fractura. Presenta actividad mitogénica, angiogénesis y diferenciación celular, *in vitro* e *in vivo*. Están ligados a la proliferación sintética de osteoblastos y condrocitos y ligado a la heparina incluye hasta 9 proteínas distintas.

Los miembros mejor estudiados de la familia de los FGFs son el factor de crecimiento para fibroblastos ácido (FGFa o FGF-1) y el factor de crecimiento para fibroblastos básico (FGFb o FGF-2).

La FGF2 presente en las plaquetas aumenta la proliferación de células endoteliales. Dependiendo de la dosis administrada pueden favorecer o perjudicar la reparación ósea.

Estos factores de crecimiento inducen la síntesis de ADN y la división celular, pero también tienen otras funciones no mitogénicas<sup>100,101</sup>. Además, se ha logrado obtener, por ingeniería genética, FGFs que tengan solo parte de sus actividades biológicas<sup>101</sup>.

### **1.3.7 EGF Factor de crecimiento endotelial**

EGF estimula epitelización y actúa sobre los fibroblastos y músculo liso. Se encuentra en la saliva.

La EGF junto con TGF y HGF, explican el efecto curativo de la saliva en los animales.

El EGF, tiene actividad mitógena, proapoptótica, quimiotaxis y diferenciación de células epiteliales, renales, gliales y fibroblastos<sup>102</sup>.

## Terapia con factores de crecimiento

Los factores de crecimiento plaquetarios, en concreto se han demostrado como un método eficaz en implantología maxilar favoreciendo o promoviendo la respuesta osteogénica<sup>56</sup>.

De las diferentes estrategias para la implantación de los factores de crecimiento:

1 - En la década de los años 60, Urist, describió el método consistente en la extracción y purificación de una mezcla de proteínas que incluyen la proteína ósea morfogenética del hueso cortical de procedencia animal o humana.

2 - La utilización de proteína ósea morfogenética recombinante tipo 2 mediante clonación y secuenciación genética, se ha utilizado en las últimas décadas con diferente eficacia según el tipo de reparación.

3 - La transmisión del ácido que codifica un factor de crecimiento en lugar de la implantación de la propia proteína codificada.

4. Extractos de Fibrina, Concentrados Plaquetarios, Plasma rico en plaquetas, Plasma rico en Factores de crecimiento<sup>7,33,103</sup>.

Se puede destacar algunas diferencias en la liberación de los factores de crecimiento y las proteínas de la matriz ósea entre 2 familias de concentrados de plaquetas:

1 Plasma rico en plaquetas Puro (P-PRP)

2. Plasma rico en fibrina y leucocitos (L-PRF)

Estas 2 familias son los extremos opuestos en términos de arquitectura de fibrina y el contenido en leucocitos.

Durante 7 días, las membranas de gel L-PRF (LPRF activado) liberan lentamente cantidades significativamente más grandes de 3 factores de crecimiento clave (Transforming Growth Factor 1 (TGF1)), derivado de plaquetas factor de crecimiento AB (PDGF-AB), el factor de crecimiento vasoendotelial (VEGF) y de las proteínas de la matriz (fibronectina, vitronectina y trombospondina).

En el caso de las membranas de gel-P PRP, presenta un patrón de liberación distinto<sup>19</sup>.

En ambos concentrados de plaquetas, vitronectina es la única molécula liberada casi completamente después de sólo 4 horas, lo que sugiere que esta molécula no se encuentra atrapada en la matriz de fibrina y no está producida por los leucocitos. Además las membranas de gel-P PRP se disuelven completamente en el medio de cultivo después de sólo de 5 días, mientras que las membranas L-PRF están todavía intactas después de 7 días.

Esta simple demostración muestra que la polimerización y la arquitectura final de la matriz de fibrina influyen considerablemente en la capacidad de atrapamiento/liberación del gel activado. También sugiere que las poblaciones de leucocitos tienen una fuerte influencia en la liberación de algunos factores de crecimiento, particularmente TGF  $\beta$ <sup>19</sup>.

La determinación de los factores de crecimiento en los preparados plasmáticos autólogos es un paso muy importante en la comprensión del efecto terapéutico de los mismos y así mismo la constatación del aumento de concentración por el proceso de activación del preparado, determina la reproducibilidad de la metodología para estandarizar su uso.

## 1.4 ACTIVACIÓN PRP

Una vez obtenido el concentrado plaquetario, según los diferentes modelos, mediante simple o doble centrifugación, se hace necesario la activación del mismo, para generar la descarga de factores de crecimiento mediante la degranulación plaquetaria.

Landesberg<sup>58</sup> demostró que la activación de las plaquetas se ve afectada por diversos factores, tales como la liberación de factores de crecimiento, el tipo de coagulante utilizado, la velocidad y duración de la centrifugación, así como la preparación de gel<sup>69,104,105</sup>.

El anticoagulante utilizado en la mayoría de procesos suele ser citrato sódico<sup>33</sup>.

En un ensayo para determinar el efecto de los distintos anticoagulantes: citrato, EDTA, citrato de adenosina-dipiridamol-teofilina-citrato-fosfato-dextrosa-adenina (CPDA) y dipiridamol-teofilina-citrato-fosfato en plasma rico en plaquetas (PRP) a partir de sangre entera venosa, se siguió la presencia de agregados y la estabilidad mediante la técnica de dispersión de luz dinámica de las plaquetas con ThromboLUX (TLX), en comparación con el resto, sólo se ven diferencias significativas de mejora en el efecto anticoagulante en las muestras con citrato dextrosa<sup>106</sup>.

Otros autores han visto además que la adición de dextrosa mejora la estabilidad de los preparados así como la reducción de volumen para obtener los mismos resultados<sup>51</sup>.

Luego el uso de citrato con dextrosa, es un buen candidato para caracterizar, el plasma rico en plaquetas.

Otro punto importante es la degranulación plaquetaria, la mayoría de procesos de activación del PRP o PRF se basan en la adición de trombina exógena, aunque algunos autores lo utilizan en conjunción con  $\text{CaCl}_2$ <sup>107</sup>.

Seth<sup>108</sup> afirma que la falta de trombina en el proceso de preparación del PRP previene la activación prematura de las plaquetas y la degranulación. Y observa que la adición de trombina produce la liberación inmediata de citoquinas. Para sus estudios propone la utilización de PRFM, (matriz de plaquetas ricas en fibrina) preparada sin trombina exógena.

El concentrado de factores de crecimiento es un producto inestable y difícil de administrar en numerosas aplicaciones clínicas en igual condiciones.



Para producir una textura estable se suele utilizar  $\text{CaCl}_2$  + trombina exógena para activar las plaquetas y los residuos de fibrina. Un exceso de trombina genera la degranulación irreversible de las plaquetas con la pérdida de integridad de las plaquetas y la consecuente liberación de factores de crecimiento de forma inmediata, este hecho lo hace particularmente interesante para su uso clínico. Los métodos de obtención de concentrado de plaquetas denominado PRFM sin la adición de trombina consigue la liberación paulatina de factores de crecimiento durante al menos 7 días<sup>109</sup>.

En un estudio en ratas, se determinó el efecto de la activación con trombina y calcio a diferentes concentraciones sobre la liberación de factores de crecimiento VEGF, TGF, PDGF-BB y  $[\beta]$  IL-1. La activación del PRP con calcio y trombina activa una inmediata liberación de VEGF, PDGF-BB y TGF  $\beta$ 1 y una liberación retardada de  $[\beta]$  IL-1 en los sobrenadantes de PRP con correlación positiva, sin embargo, PRP activado no mejora la neoformación ósea<sup>110</sup>.

La elección del activador de plaquetas puede influir significativamente en la cinética de liberación<sup>111</sup>.

Los diferentes tipos de concentrados plaquetarios, además presentan una amplia gama de modelos de sedimentación, con lo que el número de plaquetas, presenta una gran variabilidad<sup>36,112,113,114</sup>.

La presencia, tipo y cantidad de leucocitos concentrados en los PRP ha sido controvertida<sup>114,115</sup> por un lado puede beneficiar los procesos de regeneración de tejidos pero también, implican a los leucocitos en la formación de fibrosis y aumento de la inflamación<sup>116</sup>.

La activación con colágeno sin trombina, muestra un patrón de liberación sostenido durante días<sup>117</sup>, mientras que el patrón de liberación de factores de crecimiento tras la activación con trombina presenta una cinética de liberación completamente distinta, mucho más rápida<sup>36</sup>.

Toda esta variabilidad de preparados plaquetarios origina una gran disparidad de estudios y resultados. Los distintos PRP, difieren en la cantidad de plaquetas y factores de crecimiento lo cual dificulta realmente las pautas de su uso con efectos clínicos reproducibles<sup>33,36</sup>.

En nuestro estudio, hemos realizado un P-PRP con citrato dextrosa, sin leucocitos y activado con trombina y calcio, mediante diferentes métodos de

---

concentración plaquetaria, como modelo de plasma rico en factores de crecimiento para estudiar y caracterizar la liberación de factores de crecimiento.

## 1.5 PROCESO DE REPARACIÓN Y CONSOLIDACIÓN ÓSEA

El proceso de reparación y consolidación, tiene numerosos condicionantes que pueden permitir o no la reparación completa del hueso.

Existen tres importantes áreas condicionantes en la reparación de las heridas:

1º Ambiental. La herida deber ser estable cerrada bien vascularizada y libre de infección.

2º. Celular. Las células reparadoras deben ser capaces de migrar a los bordes de las heridas desde el tejido sano.

3º. Bioquímica. Los factores de crecimiento y otras citoquinas deben estar presentes en concentración suficiente para estimular los mecanismos de reparación tisular.<sup>107</sup>

Además, en la consolidación y reparación de las fracturas aparece cuatro respuestas distintas que se producen en:

- La médula ósea
- La cortical ósea
- El periostio
- Las partes blandas circundantes.

En función del tipo de lesión, fractura y localización predominaran o podrán producirse simultáneamente una o varias de estas respuestas.

Tras una fractura o lesión se produce la secreción local de múltiples factores de crecimiento, como el TGF  $\beta$ 1, VEGF, FGF, PDGF que determinarán la respuesta cicatrizante<sup>118</sup>.

Estos factores actúan mediante la inducción celular sobre todo para las células blancas, células osteoprogenitoras, etc, en diferentes fases:

**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 inducción de nuevas células indiferenciadas.

**Fase Proliferativa**, mediante la multiplicación y la formación de una masa celular indiferenciada a partir de las células mesenquimales y las células osteoprogenitoras.

Tras la proliferación, éstas células, maduran a osteoblastos, o condrocitos y estimulan la formación ósea mediante una osificación membranosa u osificación endocondral.

**Fase de *Diferenciación celular***, la función diferencial del osteoblasto es la secreción de la matriz extracelular a un ritmo de 2 a 3  $\mu\text{m}$  por día que da lugar a la formación de osteoide. Tras su calcificación a un ritmo de 1-2  $\mu\text{m}$  por día, se transforma en hueso maduro. Actualmente, se sabe que:

1.- sintetizan las proteínas colágenas el colágeno de tipo I que constituye el 90% de las proteínas del hueso y no colágenas de la matriz orgánica del hueso

2.- dirigen la disposición de las fibrillas de la matriz extracelular

3.- actividad enzimática fosfatasa alcalina y colagenasa, y producen la mineralización de la sustancia osteoide

4.- Sintetizan citoquinas específicas que modulan la fase de resorción llevada a cabo por los osteoclastos

5. producen otras proteínas como la osteocalcina y las proteínas Gla matriciales, y glicoproteínas fosforiladas incluyendo las sialoproteínas I y II, la osteopontina y la osteonectina

6.- sintetizan factores de crecimiento.

Molecularmente, uno de los compuestos orgánicos más abundante del tejido óseo son las proteínas de colágeno (90%), el 10% restante son las no-colágenas.

Estas proteínas se encargan de regular la mineralización, controlar la multiplicación, diferenciación e interacción entre la matriz y las distintas células, así como los factores de crecimiento óseo y otras moléculas osteoinductoras<sup>119</sup>.



**Figura 1.** Imagen células osteocitos

Los osteocitos son las células más abundantes del hueso (10 veces más que los osteoblastos). Poseen forma estrellada y su cuerpo se sitúa en el interior de lagunas u osteoplasmas se comunican entre sí a través de los conductos calcóforos que están llenos de fluido óseo extracelular. Los osteocitos también participan en la síntesis y mineralización de la matriz osteoide, pero se cree que su función principal es la de controlar el remodelado óseo, detectando las variaciones mecánicas de las cargas, fenómeno denominado mecanotransducción.

Las células encargadas de la reabsorción son los osteoclastos. Se trata de células grandes (100  $\mu\text{m}$ ), multinucleadas, ricas en mitocondrias y vacuolas. Los osteoclastos contienen fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP), que permite la defosforilación de las proteínas, cuya actividad es aprovechada para su identificación, tanto *in vivo* como *in vitro*<sup>119</sup>.

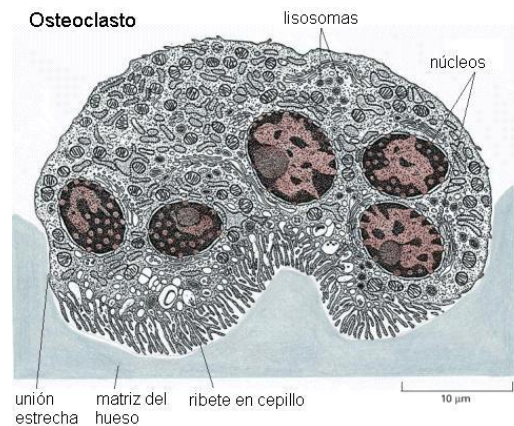


Figura 2. Imagen células osteoclastos

### 1.5.1 Consolidación

Landry publicó en 1996, la respuesta a la lesión ósea explicando los diferentes grupos celulares que aparecen día a día hasta la consolidación; en el primer día, aparecen células inflamatorias, en el tercer día osteoblastos y material osteoide, al quinto día proliferación de tejido de granulación, al séptimo día hay formación del callo blando, a las 2 semanas se presenta tejido fibroso en el callo, a los 21 días se encuentra hueso nuevo en la superficie cortical<sup>120</sup>.

La consolidación ósea, comienza gracias a la estabilización generada por los callos perióstico y endóstico, proceso que restablece la continuidad de los extremos de la fractura.

En histología, la consolidación de las fracturas se puede clasificar en dos tipos<sup>5,121</sup>

#### Consolidación primaria

La consolidación primaria está considerada como una consolidación "osteonal", los osteoclastos generan la formación de túneles a través del hueso necrosado en los bordes de la fractura. Los osteoblastos recubren estos túneles y

depositan nuevas láminas alrededor de ellos para formar nuevas osteonas, restaurando la continuidad del hueso.

Esta consolidación primaria de la cortical no es una verdadera regeneración ósea sino una forma de unir los extremos óseos a través de los procesos de remodelación, requiere una gran estabilidad mediante fijación interna e inmovilización rígida y no se forma callo perióstico, y en la práctica es el tipo menos frecuente<sup>122,123</sup>.

### Consolidación secundaria

Es la más común, y consiste en respuestas del periostio y las partes blandas circundantes con formación posterior de un callo en el foco de fractura. La respuesta más importante en este tipo de consolidación es la producida por el periostio, las células indiferenciadas osteoprogenitoras generan una formación ósea membranosa y formación de hueso endocondral embrionario. Este tipo de consolidación se ve favorecida por los micromovimientos y la carga. Si durante este periodo la fractura carece de condiciones de estabilidad, suficientes se puede generar una pseudoartrosis hipertrófica<sup>124,125</sup>.

En la consolidación ósea, el proceso de osificación endocondral<sup>126</sup>, generalmente se divide en cuatro fases consecutivas, pero superpuestas:

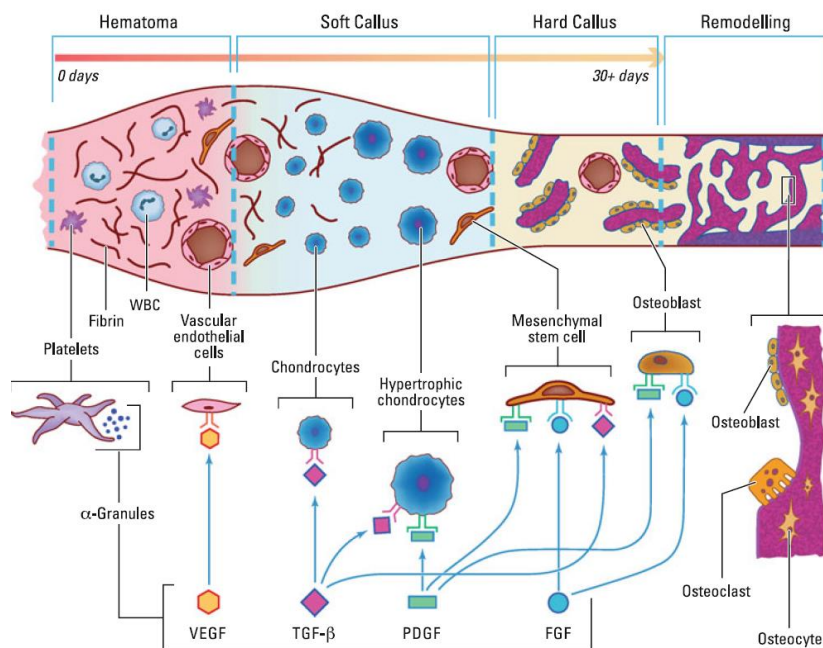


Figura 3. Fases proceso consolidación ósea<sup>118</sup>.

- formación de hematomas
- formación de callo blando
- formación del callo duro
- remodelación<sup>127,128</sup>

#### **1.5.1.1 Formación de hematoma y fase inflamatoria**

La fractura o lesión ósea produce la rotura de los vasos sanguíneos periósticos y medulares, y la aparición de células del sistema inmune, formándose un hematoma y se liberan factores que promueven la consolidación: factores quimiotácticos, mitogénicos e inductores de la diferenciación celular a tejido óseo maduro<sup>2,129</sup>.

El hematoma de fractura está formado por un soporte de fibrina que facilita la migración celular, proliferación y síntesis de matriz ósea. A nivel del foco fracturario el pH es ácido, pero según avanza el estado del hematoma, la fosfatasa alcalina alcanza su nivel de actividad óptimo, favoreciendo la mineralización del callo óseo. Y el pH se alcaliniza progresivamente.

La fase inflamatoria de la cicatrización ósea está regulada por citoquinas pro-inflamatorias secretadas por la invasión de macrófagos, leucocitos polimorfonucleares y linfocitos<sup>126</sup>. 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.

El hueso necrosado en los bordes de la fractura es eliminado paulatinamente por la acción de los leucocitos polimorfonucleares y la descarga de citoquinas. La lesión vascular interrumpe el aporte sanguíneo a los osteocitos y por ello en los extremos fracturarios no se encuentran células vivas. 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.

La expresión de factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) y la interleucina-1 (IL-1) presenta picos a 24 h después de la lesión, optimizando la activación de vías de señalización secundarias que intervendrán en los siguientes procesos que darán lugar a la formación de callo<sup>130</sup>.

### 1.5.1.2 Formación callo blando

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. Tras la fase inflamatoria, la neovascularización y formación de tejido fibroso conducen al desarrollo de cartílago hialino, formando el callo blando. El desarrollo del callo blando implica la formación precoz de un callo externo que recubre la fractura y la formación más tarde de un callo medular.

Este callo blando se somete a la mineralización del cartílago y la posterior formación de tejido óseo que es el soporte mecánico para la formación del callo óseo duro. Proliferan células precursoras óseas, osteoblastos y condroblastos. El callo blando está compuesto por osteoide, cartílago y colágeno.

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<sup>5,121</sup>.

### 1.5.1.3 Formación callo duro

Por último, la conversión del callo duro para hueso laminar funcional progresa a través de la remodelación ósea continua<sup>131</sup>.

En esta fase el cartílago se calcifica y proporciona la base para los osteoblastos y el posterior depósito y 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<sup>2</sup>.



El osteoide y el cartílago del callo blando externo, perióstico y medular se mineralizan, a medida que se transforman en hueso fibroso. Tras estos procesos, se produce la mineralización de la matriz ósea.

### **1.5.2 Remodelación**

El hueso presenta un potencial de reparación muy elevado a través de proceso dinámico de remodelación que envuelve la neoformación y la reabsorción ósea, caracterizando la casi total ausencia de cicatriz. A pesar de ello, algunos defectos óseos no presentan remodelación espontánea, necesitando factores que estimulen la reparación<sup>132,133</sup>.

La velocidad de reparación del hueso es inferior a la de otros tejidos, motivo por el cual también en algunos casos es necesario la utilización de materiales de reconstrucción ósea que actúen como injertos y auxilien el proceso de reparación ósea<sup>134</sup>.

Durante la fase final el abundante callo duro se remodela lentamente desde hueso fibroso inmaduro hasta hueso laminar maduro. La actividad osteoclástica y osteoblástica transforman el hueso fibroso en 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.

Hay que tener en cuenta, también, que el proceso de consolidación no es homogéneo a lo largo de todo el callo. Hay 4 grandes zonas: el canal medular, el área entre las corticales, la capa subperióstica y los tejidos blandos adyacentes.

El canal medular y el área entre corticales crean “callo blando” y crean hueso mediante osificación endocondral, mientras que el área subperióstica y los tejidos blandos que rodean a la fractura forman “callo duro” y crean hueso mediante osificación intramembranosa<sup>2,125,135</sup>.

Cuando la remodelación del callo óseo concluye completamente, se recuperan las propiedades mecánicas originales del hueso comprometido<sup>136</sup>.

### 1.5.3 Factores que influyen en la consolidación de las fracturas

Los factores que favorecen la consolidación positivamente son:

**Tipo de fractura.** Las más favorecidas fracturas en áreas de hueso esponjoso,

**Tipo de estabilización.** Una estabilización correcta, inmovilización y carga

**Tipo de Aporte de factores de crecimiento.** Atendiendo, a sustitutivos óseos, los injertos óseos, los biomateriales, la matriz ósea desmineralizada,

Los factores que dificultan la consolidación son:

**Tipo de fractura** las menos favorecidas, 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.

**Tipo de aporte de factores de crecimiento,** 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.

## 1.6 DEFECTO CRÍTICO

Desarrollar estándares de modelo de fractura para los estudios experimentales sobre la reparación y consolidación de defectos óseos, requiere de definiciones claras de conceptos como: unión, retraso en la cicatrización y no unión o defecto crítico. Desafortunadamente, no existe un criterio generalizado o estandarizado que sea consistente en toda la literatura.

Modelos de defecto crítico CDS (critical size defect) son modelos de no unión, se pueden conseguir mediante el uso de un defecto segmentario que excede la capacidad de curación del hueso normal. El tamaño del defecto crítico depende del modelo específico, sobre todo en la escala filogenética del animal. En general, una CSD puede ser definida como un defecto, superior a 1,5-3,0 veces el diámetro del hueso<sup>137,138</sup>.

Las definiciones más aceptadas sobre modelos de fractura son:

**Modelo de Unión:** en general, la unión se define como la adhesión estructural de los bordes de dos o más cuerpos. Durante la curación de fracturas, unión indica la renovación de la continuidad ósea en el hueso fracturado.

**Modelo de unión retardada** podría por lo tanto definirse mejor como un retraso en la curación del hueso comparación con un grupo control adecuado.

**Modelo de no unión** es el fracaso permanente de cicatrización ósea. Se caracteriza por el cese completo de la formación ósea perióstica y endostal con la formación de cicatrices en el espacio de la fractura.

Se considera defecto crítico por definición, cuando no se cura durante toda la vida del animal si se dejan solos.

La evolución en el tiempo de curación de la fracturas (movimiento interfragmentario) depende del tipo de especie en el modelo animal, así el periodo estándar de curación de fractura de ratones es de 3 semanas, en las ratas 4 semanas, en las ovejas 9 semanas y los seres humanos alrededor de 15 semanas<sup>139,140</sup>.

Si bien la definición precisa de defecto crítico es controvertida, el concepto de defecto crítico después de un período adecuado de curación está bien reconocida, generando una falta de reparación ósea o pseudoartrosis. A pesar de este concepto tan extendido no existe una definición universalmente aceptada de la falta de unión en la literatura. La (FDA) Food and Drug Administration define el defecto crítico como una

fractura que no cura en un periodo de al menos nueve meses en total en el que no ha habido signos de curación durante al menos tres meses.

Otros definen el defecto crítico como una fractura en el que haya transcurrido un mínimo de seis meses sin ninguna mejora.

El defecto crítico debe distinguirse de las uniones con retraso, o la unión ósea eventual de una fractura después de un largo período de curación atípico.

Las pseudoartrosis se clasifican en función de su aspecto radiográfico, ya sea como hipertrófica o atrófica.

**Pseudoartrosis hipertróficas**, son causadas por el movimiento excesivo en el lugar de la fractura, o con estabilización ósea insuficiente en el ámbito de la fractura. En esta situación, los factores biológicos esenciales para la curación están presentes; sin embargo el exceso de movimiento en el lugar de la fractura impide la formación de puente óseo. En situaciones de pseudoartrosis hipertrófica, la curación exitosa se logra mediante la eliminación de los tejidos anormales fibrosas, cartilaginosas y adiposo interpuestos entre los extremos de los huesos móviles y proporcionando una estabilización más rígida y robusta en todo el foco de fractura.

**Pseudoartrosis atróficas**, son el resultado de las condiciones biológicas inadecuadas para la curación, y plantean comparativamente un reto mayor. Una vascularización inadecuada y/o condiciones metabólicas desfavorables conducen a discapacidad de curación. Las pseudoartrosis atróficas aparecen en las radiografías como el hueso embotado termina con poca o ninguna evidencia de osteoide o deposición mineral<sup>86</sup>.

Mora *et al.*, definen como fallo en la curación periodos entre 6-9 meses de evolución, considerando retrasos en la unión en periodos de hasta 3 meses<sup>141,142</sup>.

El modelo experimental descrito por Schmitz y Hollinger<sup>143</sup> define un defecto de tamaño crítico como el defecto intraóseo más pequeño, en un hueso determinado de una especie concreta que no regenera espontáneamente durante la vida del animal<sup>144</sup>.

Por otro lado, para determinar los modelos idóneos de defectos experimentales Bosch sugiere que en estudios o modelos de regeneración ósea, el defecto óseo experimental:

- no debe ser menor que el defecto de tamaño crítico para esa especie animal
- el hueso estudiado debe incluir una parte de cortical y otra medular

- se debe asegurar la estabilidad mecánica en el lecho de regeneración
- el riesgo de fractura debe ser mínimo
- y debe ser posible hacer un seguimiento adecuado de la evolución del defecto, pudiendo confirmar la regeneración ósea tanto histológica como radiográficamente.

Además, sería aconsejable que los animales a estudio, no sean una carga económica excesiva, accesibles, fáciles de manejar y de anestesiar<sup>145,146</sup>.

En un defecto crítico, no se producirá curación de la fractura, el intento de regeneración ósea genera la formación de tejido fibroso, en vez de hueso, aunque siempre existe cierta cantidad de regeneración ósea desde los bordes del defecto.

Esta falta de consenso general para definir el defecto crítico además está interrelacionado con una amplia variedad de resultados experimentales completamente diversos y difíciles de ordenar.

El tamaño del defecto crítico en calota de conejo es controvertido, mientras algunos autores consideran este tamaño de 15 mm<sup>147</sup>.

En otros estudios se ha comprobado que defectos de 9 mm no se producía regeneración espontánea a las 8 semanas<sup>148</sup>.

En un modelo experimental en cánidos, con un defecto crítico de 8 mm, se estudió la consolidación ósea en dos grupos de tratamiento. El grupo I, con coágulo sanguíneo, y el grupo II, con injerto autólogo. En un periodo de 6 semanas el grupo 2 presentó partículas de hueso autógeno utilizadas para el relleno en estado de reabsorción avanzada en ausencia de los bordes nítidos entre el defecto y el hueso preexistente.

De este modo los autores concluyen que el método que auxilia en el proceso de reparación ósea como los injertos óseos autógenos, están indicados en la recuperación de defectos críticos, iguales o mayores de 8mm<sup>133</sup>.

En nuestro modelo de fractura, hemos estudiado la consolidación y reparación de un defecto crítico cubital en ovejas y el modelo experimental, requiere de un defecto óseo, que sea incapaz de regenerarse por sí mismo. Para ello hemos utilizado un tamaño de defecto en la proporción de más de 1,5 veces el tamaño medular.

---

Hemos estudiado la consolidación del cúbito en dos tamaños de gap correspondiente a una masa ósea de 14 mm y 20 mm de longitud en un periodo de 8 semanas de evolución.

## 1.7 UTILIZACION DE INJERTOS

Con la esperanza de facilitar la consolidación ósea, el uso de injertos óseos, sustitutos óseos y ortobiológicos se está generalizando, ya que, en algunos casos la propia respuesta biológica intrínseca, e incluso la estabilización quirúrgica concurrente, son insuficientes. La biología de la curación de fracturas gracias a las propiedades osteoinductivas, osteoconductoras y osteogénicas de estos sustratos ha sido ampliamente reconocida en la literatura tanto en investigación básica como en la práctica ortopédica clínica<sup>140</sup>.

### 1.7.1 Historia de los aloinjertos

Desde tiempos antiguos, se relata el episodio hagiográfico de Cosme y Damián que fueron considerados como los altos patronos de los aloinjertos, implantaron la pierna del cadáver de un africano a un blanco que había sufrido una amputación y, por su tratamiento médico, fueron sentenciados a muerte por el emperador Diocleciano en el año 287 DC. Como así aparece narrado por Santiago de la Vorágine en la “Leyenda Dorada”<sup>149</sup>.

En 1597 Gaspare Tagliacozzi creó partes completas de la cara, reconstruyó una nariz a partir de un colgajo de piel del brazo, manteniendo el brazo suturado durante días<sup>150</sup>.

En 1668, apareció publicado el procedimiento quirúrgico del cirujano holandés Job Janszoon Van Meekeren (1611- 1666) considerado como el primer trasplante de hueso con éxito, fue un xenoinjerto de perro en la cabeza de un noble llamado Butterlijn. Tras la intervención, el paciente se recuperó completamente<sup>151</sup>.

En tiempos más modernos, el primer aloinjerto publicados en la literatura fue realizado por William Mac Eween, cirujano escocés quien en 1879 trató a un paciente de 3 años de edad con pseudoartrosis. Utilizó un aloinjerto de tibia de un paciente de 7 años. La intervención fue un éxito y le proporcionó reconocimiento internacional y reavivó el interés en los injertos óseos<sup>152</sup>.

Durante la segunda mitad del siglo XIX y principios siglo XX, Ollier, cirujano francés acuñó el término de autoinjerto, aloinjerto y xenoinjerto.

En 1893 Barth en Alemania, es el primero en observar el proceso de necrosis de los injertos óseos en sus estudios histológicos<sup>153</sup>. Estudió el proceso de necrosis del injerto, la reabsorción del hueso necrótico y la subsecuente neoformación ósea.

Por otro lado, Curtis en USA publicó sus experiencias con injertos óseos<sup>154</sup>. Definió el concepto de osteoconducción al utilizar hueso descalcificado para tratar defectos cavitarios. Es el primer autor que plantea los injertos óseos como una estructura de soporte temporal que permite la neoformación ósea.

En 1907, Huntington publica un método que permite la curación de defectos segmentarios tibiales mediante el empleo de un segmento de peroné vascularizado<sup>155</sup>

En 1908, Buchmann presenta las primeras autoartroplastias biológicas en dos casos de anquilosis de codo<sup>156</sup>.

Ese mismo año, Lexer publicó el caso de un trasplante de una hemiarticulación, (al final fueron 23 trasplantes articulares de rodilla y 11 parciales) los cuales evaluó en 1923 confirmando un 50% de resultados óptimos<sup>157,158</sup>.

Gracias a estos trabajos se generó un interés creciente de los cirujanos ortopédicos por el empleo de los aloinjertos masivos para reconstrucción de grandes defectos esqueléticos<sup>159</sup>.

En 1914, Phemister describió, el proceso de “creeping substitution”, sustitución por arrastre del hueso necrótico”. Donde considera que una parte de las células del injerto óseo siguen vivas, lo que le otorga propiedades osteogénicas. Además, afirmó que la fragmentación de las piezas favorece la incorporación de los injertos ya que sobrevive un mayor número de células, al mantenerse más tiempo nutridas<sup>160</sup>.

En ese mismo año Josef Horak publicó la necesidad que el donante de hueso, esté completamente sano para no contaminar o infectar al receptor<sup>161</sup>.

Todos estos trabajos, permitieron el desarrollo de tecnologías que facilitaban la recuperación, procesamiento y almacenamiento de tejido óseo, y la detección de agentes infecciosos, de esta manera se potenció el surgimiento de los sistemas de almacenamiento de tejidos, sobre todo hueso.

El primero de todos fue de Ollier en 1876. Posteriormente Albee 1916 y en 1942 Inclán fundó el primer banco de huesos<sup>162,163</sup>.



En 1946, Wilson fundó el banco de huesos del Hospital for Special Surgery de Nueva York<sup>164</sup>. Las piezas proceden de intervenciones quirúrgicas y eran almacenadas a - 27°C en bolsas estériles.

En España, es en 1951 cuando se fundó el primer banco de huesos nacional en el Hospital Provincial de Madrid empleando huesos provenientes de amputaciones, en ocasiones traumáticas y otras por gangrenas gaseosas y conservándolas con Timerosal<sup>165</sup>.

En 1953 se constituyó el Banco Nacional de Huesos como una sección del Instituto de Hematología y Hematoterapia del Hospital Provincial de Madrid<sup>166,167</sup>.

En la década de los 50 Bonfiglio publicó los primeros trabajos sobre la inmunogenicidad generada por los aloinjertos<sup>168</sup>. Y ya en 1963 Burwell publicó que el hueso almacenado durante una semana a una temperatura de -20°C tiene menor inmunogenicidad<sup>169</sup>.

De esta forma, la congelación se transformó en el método más utilizado para la conservación de los injertos óseos<sup>170,171</sup>.

En 1965 y 1970, Ottolenghi y Volkov publicaron, respectivamente, sus trabajos de reemplazo óseo y articular con alotransplantes óseos<sup>172,173</sup>.

En 1971 se fundó el primer banco de huesos moderno en el Massachussets General Hospital de Boston por Mankin<sup>157</sup>.

### **1.7.2 Propiedades de injertos óseos**

Los injertos óseos, sustitutos óseos y factores bioactivos actúan sobre la cicatrización ósea a través de una variedad de mecanismos con capacidad osteoconductiva, osteoinductiva y mecanismos osteogénicas.

#### **Propiedades osteoconductivas.**

Osteoconducción es el proceso por el cual una estructura de soporte o andamiaje implantado permite pasivamente el crecimiento interno de capilares de acogida, el tejido perivascular y células madre mesenquimales. Microscópicamente, estos andamios tienen una estructura similar a la del hueso esponjoso. Esta estructura es primordial para la remodelación del hueso y permite una sustitución gradual del injerto mediante la formación de hueso nuevo y la reabsorción del hueso del injerto<sup>174</sup>. La reabsorción osteoclástica mediada por los osteoclastos, es la capacidad de eliminar mineral óseo<sup>175</sup>.

Entre los andamios osteoconductivos más utilizados tenemos cementos de sulfato cálcico y fosfato cálcico.

### **Propiedades osteoinductivas**

Osteoinducción es el proceso por el que las células mesenquimales reclutadas para diferenciarse en condroblastos y osteoblastos, a su vez, forman hueso nuevo por el proceso de osificación endosteal para la síntesis de matriz ósea mineralizada<sup>176</sup>.

Este proceso especializado está modulado principalmente por factores de crecimiento, como las proteínas morfogenéticas óseas (BMP) -2, -4 y -7; factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); interleucinas; factores de crecimiento de fibroblastos (FGF); factores estimulantes de colonias de granulocitos y macrófagos; y factores angiogénicos como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).

### **Propiedades osteogénicas.**

La osteogénesis es la síntesis de hueso nuevo por las células donantes derivadas del propio hueso o de injerto.

Las células que intervienen en este proceso incluyen células mesenquimales, osteoblastos y osteocitos. Sólo están involucrados en este proceso injertos autólogos frescos y trasplantes de médula ósea, ya sea automática o aloinjertada<sup>140,177</sup>.

## **1.7.3. Tipos de injertos:**

### **1.7.3.1 Según su origen:**

**Injertos autólogos de hueso.** Autoinjertos es el proceso por el cual la materia ósea se extrae de un sitio anatómico y se trasplanta a otro sitio en el mismo paciente. Este tipo de injerto óseo se considera el estándar de oro, ya que confiere histocompatibilidad completa y además posee capacidad osteoinductiva, osteoconductiva y osteogénica. Esta es la razón por la cual los autoinjertos cicatrizan y se incorporan más rápido que los aloinjertos óseos<sup>178</sup>. Sin embargo, el injerto autólogo tiene varias limitaciones relacionadas con el proceso de recolección. Estos incluyen dolor en el sitio donante (la complicación más común), el aumento de la pérdida de sangre, aumento del tiempo operatorio y el potencial de infección de la zona donante<sup>179,180</sup>.

El hueso autólogo (autoinjerto) ha demostrado tener un mejor comportamiento biológico, pero su cantidad es limitada, la morbilidad en los sitios de extracción es

importante y se presentan dificultades para reconstruir grandes defectos con este tipo de injertos.

Los autoinjertos pueden ser:

- vascularizados (el más empleado es el de peroné con doble vascularización, endóstica y perióstica<sup>181</sup>)
- no vascularizados
- o una mezcla de ambos.

**Aloinjerto óseos.** Injerto óseo alopático se refiere a los huesos que se cosecha de donantes de la misma especie, procesado en condiciones estériles y trasplantados a un huésped. Aloinjerto viene en una variedad de formas, incluyendo osteocondral, cortical, esponjoso y derivados de hueso altamente procesados tales como matriz ósea desmineralizada (DBX). Dependiendo del proceso de preparación, el aloinjerto posee capacidad osteoconductiva y potencial osteoinductivo. En la mayoría de casos, los aloinjertos no incluyen células viables y por lo tanto no son osteogénico.

Todas las formas de aloinjerto mantienen la capacidad osteoconductora pero sólo los aloinjertos congelados y desmineralizados conservan además propiedades osteoinductoras<sup>182</sup>.

**Injertos de hueso sintético.** Injertos de calcio sintético sustitutos óseos a base de sales son una alternativa osteoconductiva a ambas opciones autólogos y alogénicos de injerto, dada su amplia disponibilidad, costo relativamente bajo y la ausencia de riesgos, como la morbilidad del sitio donante y la transmisión viral.

Debido a que son estrictamente osteoconductivos, su papel biológico en la curación de fracturas es limitado.

Los sustitutos óseos se presentan en una variedad de formas, incluyendo polvos, masilla, pellets, o como recubrimientos en implantes, tales como prótesis articulares recubiertos de hidroxiapatita etc.

Además, se pueden mezclar con aditivos tales como antibióticos, haciéndolos atractivos en la curación de defectos óseos con procesos infecciosos asociados. Se están realizando investigaciones para poner a prueba a la eficacia de la adición de colágeno, factores de crecimiento e incluso células mesenquimales a estos compuestos sintéticos<sup>180</sup>. Tales componentes biológicamente activos pueden otorgar propiedades osteoinductivas, o incluso osteogénicas a estos materiales.

### El sulfato de calcio.

Sulfato de calcio es un compuesto, ampliamente disponible como sustituto óseo sintético relativamente accesible económicamente. La ventaja obvia de aplicación de injerto líquido es que permite el relleno de huecos óseos de forma percutánea. Injertos de sulfato de calcio son rápidamente absorbibles. La reabsorción se produce normalmente en uno a tres meses<sup>183</sup>.

### El fosfato de calcio.

Los sustitutos sintéticos de fosfato de calcio son una familia de compuestos de sal de calcio que consisten en proporciones variables de los iones de calcio y fosfatos orgánicos. Compuestos de fosfato de calcio utilizados en el injerto óseo incluyen fosfato monocálcico, fosfato dicálcico, fosfato tricálcico, hidroxiapatita (ambas formas  $\alpha$  y  $\beta$  - cristalina) y fosfatos tetracálcico. Es de destacar que la hidroxiapatita ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ ) es un mineral natural que comprende casi el 50% de hueso en peso. Los sustitutos de hueso más utilizados son: fosfato  $\alpha$ -tricálcico (85%),  $\text{CaCO}_3$  (12%) dihidrato de fosfato monocálcico (3%)<sup>184</sup>.

Son de biodegradación lenta, con una fuerza superior en la compresión y la capacidad osteointegradora o la capacidad para hacer crecer hueso huésped<sup>140,185</sup>.

#### 1.7.3.2 Según su composición:

- **Cortical:** de gran resistencia biomecánica. El aloinjerto de hueso cortical se obtiene sólo de donantes cadáver, y se emplea fundamentalmente en una patología muy infrecuente (tumores óseos malignos).
- **Esponjoso:** se revasculariza rápidamente. El aloinjerto de hueso esponjoso fundamentalmente se obtiene de cabeza de fémur, es el tipo de injerto más empleado, con múltiples aplicaciones en cirugía ortopédica.
- **Cortico-esponjoso:** posee las dos propiedades anteriores unidas. Y puede presentarse además como:
  - Chips: hueso particulado
  - Papilla de hueso: es la mezcla de alguno de los anteriores injertos con sangre, colágeno entre otras sustancias.
- **Injerto compuesto:** autoinjertos mezclados con componentes orgánicos o inorgánicos.

### 1.7.3.3 Según el procesado:

**Fresco:** producen una reacción inmunológica que puede conducir a la reabsorción o rechazo del injerto y a la formación de anticuerpos que pueden sensibilizar al huésped contra múltiples antígenos del sistema HLA.

**Congelado:** la temperatura depende del tiempo que se vaya a almacenar, así a  $-4^{\circ}\text{C}$  una semana,  $-40^{\circ}\text{C}$  un mes, más de  $-80^{\circ}\text{C}$  para mucho más tiempo, en todos los casos produce una reducción de la respuesta inmunológica.

**Liofilizado:** a la vez que reducen significativamente la reacción inmunológica, deterioran otras cualidades, como las propiedades físicas y biológicas, reduciendo la capacidad osteoinductiva por degradación de las proteínas<sup>186</sup>.

**Desmineralizado:** Suelen estar formadas por hueso desmineralizado en proporción variable cercana al 30%, un portador biológico (hialuronato sódico) y fosfato salino. Habitualmente llevan mezcla de varias BMP extraídas por desmineralización. No contienen células osteoprogenitoras. Se preparan por extracción ácida del aloinjerto óseo, lo que origina la pérdida de la mayor parte del componente mineralizado, pero retiene proteínas colágenas y no colágenas, incluso factores de crecimiento<sup>187</sup>.

### 1.7.4 Inmunogenicidad.

El trasplante de aloinjerto, provoca una respuesta inflamatoria, originada sobre todo, por una respuesta inmunológica.

El responsable inmunogénico sigue siendo desconocido. Se piensa que son la médula ósea, las células y el suero, los responsables de la respuesta antigénica mientras que la matriz del trasplante puede ser o no.

Otros autores describen la inmunogenicidad como resultado de antígenos de la superficie de las células<sup>188</sup>.

Dependiendo de los métodos de preparación y limpieza, es recomendable que en el procesado del injerto se elimine completamente los restos de sangre o médula ósea. Las últimas investigaciones además informan que en muchas ocasiones, la inmunogenicidad del injerto también depende de la ubicación del implante y la proximidad a la membrana sinovial determinando así la posterior supervivencia de los implantes<sup>189</sup>.

### **1.7.5 Proceso de incorporación de los aloinjertos óseos.**

Histológicamente el seguimiento de la incorporación del aloinjerto, permite determinar si el injerto está incorporándose o no.

La secuencia biológica de incorporación del aloinjerto tras su implantación tiene las siguientes fases:

#### **1º Hemorragia**

Comienza con un periodo inespecífico de predominio inflamatorio y/o inmune provocado por la presencia del propio injerto. Se produce primero un hematoma con liberación de citoquinas y factores de crecimiento.

#### **2º Inflamación**

En la primera semana aparece una respuesta inflamatoria en la periferia del injerto, que persiste hasta la segunda semana; esta respuesta es mediada por linfocitos, formando una cápsula de tejido fibroso que rodea el aloinjerto tras lo cual el proceso inflamatorio empieza a disminuir, se produce una diferenciación de las células mesenquimales hacia condrocitos, los cuales producen matriz cartilaginosa que a su vez será mineralizada.

#### **3º Revascularización del tejido**

El injerto es recubierto por un estroma fibrovascular que proporciona vasos sanguíneos derivados del receptor (revascularización) así como precursores osteogénicos a partir de los cuales se produce una fase de remodelado óseo o sustitución. Se produce la invasión de vasos en el injerto, sobre todo a través de los canales Haversianos y de Volkmann existentes (en el caso del hueso trabecular), y la infiltración de precursores óseos por los cavernáculos del injerto (este fenómeno de revascularización empieza a producirse a partir del segundo día siguiente a la implantación)<sup>189</sup>.

#### **4º Sustitución**

Se caracteriza por la osteoconducción y por una sustitución progresiva del hueso viejo y necrosado por nuevo y funcional, denominándose a este proceso como "schleichender ersatz", "creeping substitution" o "sustitución por invasión"<sup>188,190</sup>.

Aparece la formación de hueso intramembranoso y/o encondral en la superficie del injerto<sup>188,191,192</sup>. De este modo, gracias a la acción destructora de hueso por parte de

los osteoclastos aumenta la accesibilidad al hueso de los precursores osteoblásticos, necesaria para la neoformación ósea y para proseguir la infiltración de vasos a través del injerto<sup>193</sup>.

### **5º Remodelación**

Esta fase de remodelado e integración del injerto en una estructura con capacidad de soporte mecánico generalmente se completa entre los 6 meses y un año después de la implantación del aloinjerto<sup>188,191,192</sup>, teniendo una gran importancia en ella el ambiente mecánico sobre la revascularización y diferenciación celular<sup>191</sup>, de modo que si el aloinjerto se revasculariza en un orden apropiado se conseguirá un balance resorción-formación correcto según las leyes de Wolff, el entramado trabecular se adapta a la distribución de las cargas y adquiere la orientación y dimensión trabecular adecuadas<sup>194</sup>.

El porcentaje de incorporación del injerto no nos puede indicar si está siendo rechazado o no; pues esto implica la formación del callo en la unión huésped-injerto, así como el remodelado interno del injerto, que se puede evidenciar en los controles radiológicos.

El promedio de revascularización de un aloinjerto es de ocho meses, mientras que el de un autoinjerto es de un mes. En otros casos puede durar incluso hasta 12 meses, el promedio de incorporación del injerto es de alrededor de once meses.

En resumen tres factores influyen en la incorporación del aloinjerto<sup>160</sup>.

- El suministro vascular
- El estímulo del proceso osteogénico
- La histocompatibilidad del aloinjerto.

En la utilización de autoinjertos frescos y congelados se observa radiográficamente formación de callo óseo en la unión proximal a los 15 días y en aloinjertos congelados a los 22 días, siendo los aloinjertos frescos este efecto más tardío, alrededor de 25 días. La consolidación global de los injertos es de 80,5% a las 8 semanas de evolución. Hay una revascularización de los injertos por vasos procedentes de las partes blandas. Los procesos de reabsorción y formación de hueso son más intensos en el extremo proximal<sup>9</sup>.

Una parte de las células de un injerto óseo se mantienen vivas, y con capacidad osteogénica. La incorporación de los injertos está favorecida por la fragmentación de las

---

piezas, ya que sobrevive un mayor número de células, y el aumento de superficie favorece su nutrición, es el denominado proceso de “sustitución por arrastre”<sup>10</sup>.

Las situaciones clínicas en las que existen grandes pérdidas de hueso, bien por su evolución o bien por el tratamiento efectuado, son cada vez más frecuentes y los objetivos de la cirugía cada vez más ambiciosos. En estas condiciones la utilización de injertos autólogos está restringida por la limitación de zonas donantes, sin olvidar la alta morbilidad en la extracción de los injertos; por su parte los aloinjertos tienen sus limitaciones, alto coste y no están totalmente exentos de riesgos biológicos. Son necesarias nuevas propuestas para la reparación de los defectos óseos.

Para nuestro estudio de consolidación, hemos utilizado aloinjerto 2,5 cc de masa córtico-esponjosa, no estructural en forma de chips tratado previamente con antibioticoterapia.



## 1.8 SEGUIMIENTO RADIOLÓGICO PROCESO CONSOLIDACION

La radiografía es un método tradicional para evaluar la curación de fracturas. Es fácil de realizar en los estudios experimentales, permite la evaluación del foco de fractura así como de la formación del callo. En cuanto a las mediciones de densidad ósea, la relación entre la imagen radiográfica y la imagen obtenida mediante TAC no se corresponden en la mayoría de los casos. La densidad óptica del callo como se define en las radiografías tiene sólo una débil correlación con los parámetros pQCT (Tomografía computarizada cuantitativa).

La densidad radiográfica está más estrechamente relacionada con el contenido mineral que con la densidad mineral.

El callo de fractura es tridimensional; asimétrico y heterogéneo, lo que hace difícil su cuantificación radiográfica<sup>195</sup>.

La relación entre el tamaño del callo y la DMO (Densidad Mineral Ósea) depende de si el tamaño volumétrico, área de proyección, área de sección transversal, o el diámetro exterior se utilizan o no como parámetros para definir el tamaño de callo<sup>196</sup>.

El callo se desarrolla como consecuencia de la curación de una fractura con cicatrización ósea secundaria<sup>197</sup>. La estabilidad de una fractura se ve reforzada por el callo perióstico, lo que disminuye la movilidad y la tensión en el tejido interfragmentaria al aumentar el área de la sección transversal y el momento de inercia. Experimentalmente, se ha determinado que el contenido mineral del callo de fractura aumenta en los primeros 3 meses después de la lesión. Por otra parte también se ha determinado que existe una correlación directa entre el contenido mineral del callo y su resistencia mecánica. Por lo tanto, existe un gran interés en la determinación del contenido mineral en el periodo de curación con el fin de predecir la resistencia ósea final<sup>198</sup>.

Se hace imprescindible el uso de la técnica de TAC cuantitativo para medir la densidad mineral ósea mediante la exploración simultánea utilizando estándares para una calibración óptima. Este es un paso irrenunciable<sup>197,199</sup>.

Los patrones de calibración más utilizados contienen  $\text{CaCO}_3$ <sup>199</sup> o hidroxiapatita de calcio ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ ) en una base de poliuretano o acuosa<sup>200,201</sup>.

El uso del mineral óseo (hidroxiapatita de calcio) incrustados en una sustancia equivalente en agua minimiza la dependencia de la densidad mineral ósea a las condiciones de exploración del TAC.

Por lo tanto, es de consenso común el uso de estos estándares en el TAC cuantitativo para la determinación de DMO de una manera más precisa, y más ajustada a la realidad.

El TAC cuantitativo ofrece la posibilidad de medir los valores de DMO de hueso cortical y esponjoso por separado<sup>206</sup>. El resultado depende de manera resolutive del método utilizado para discriminar estos dos compartimentos es decir del tamaño de la región de interés ROI. Los valores de DMO pueden variar localmente en un alto grado por tanto la medición de los valores medios de DMO referentes a la calidad ósea se deben realizar a nivel local o referente a un promedio correspondiente a una región de interés más pequeña<sup>202</sup>.

El uso de DXA (Dual-energy X-ray Absorptiometry) como una herramienta para la cuantificación de los cambios densitométricos que ocurren durante la curación de la fractura nos permite medir la densidad mineral ósea en pequeñas regiones de interés<sup>203,204,205</sup>. DXA una técnica sencilla que cuantifica la DMO; con una que precisión varía de 1 a 2% (22, 35). El contenido de mineral del callo y el volumen real de tejido de callo se incorporan en el cálculo de la DMO (g / cm<sup>2</sup>), proporciona una única medida de la densidad mineral ósea más precisa<sup>204</sup>.

En radiología volumétrica digital (3D), la densidad radiográfica (potencia = atenuación de rayos X) en cada voxel del volumen de interés se expresa por un número, denominado número de TAC.

La escala de números TAC es específico para cada equipo, e incluso para cada modalidad del mismo. La escala de unidades Hounsfield (HU) es una transformación lineal de la medición coeficiente de atenuación lineal en uno en el que la radiodensidad de agua destilada (a presión y temperatura estándar) se define como cero HU, mientras que la radiodensidad de aire en las mismas condiciones se define como - 1000 HU<sup>206</sup>. Para un material X el coeficiente de atenuación lineal sería  $\mu_X$ ,

$$HU = \frac{\mu_X - \mu_{water}}{\mu_{water} - \mu_{air}} \times 1000$$

Las Unidades Hounsfield (HU) no forman parte del sistema internacional de medida SI (Systeme Internationale des Unites de Mesure).

Las unidades Hounsfield dependen de la energía de los rayos X utilizados<sup>206</sup>.

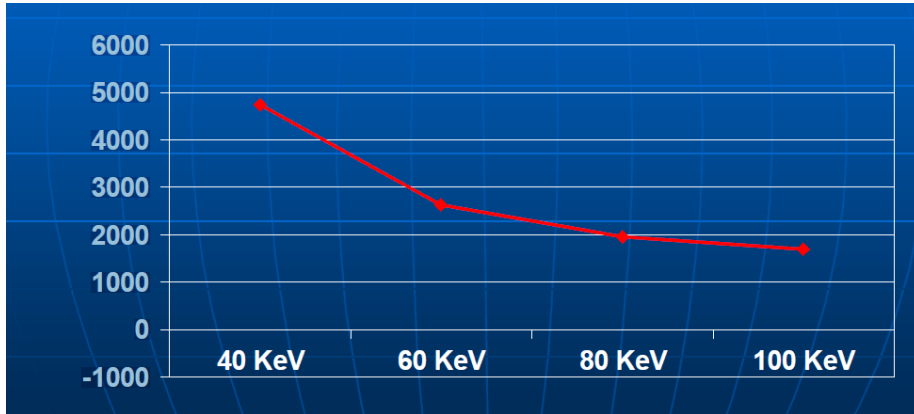


Figura 4. Valores HU dependiente de la energía en KeV de la radiación <sup>207</sup>

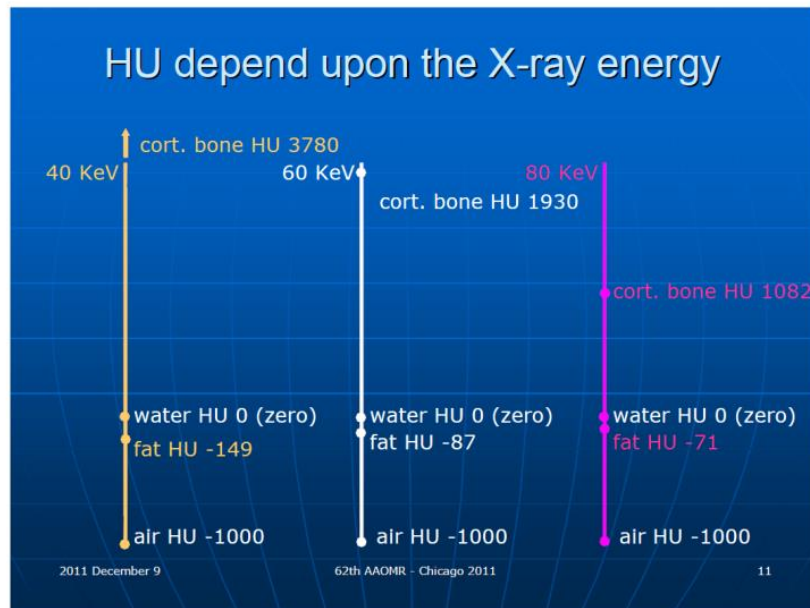


Figura 5. Valores HU dependiente de la energía en KeV de la radiación según el tipo de tejido a estudio<sup>207</sup>

La escala HU fue concebida para ser más eficaz en el rango de radiodensidades más bajas correspondiente a los tejidos blandos<sup>207</sup>.

Hoy en día el valor diagnóstico de los HU, depende del tipo de tejido. Así según la Clasificación de Misch para determinar la calidad del hueso, dependiendo del procedimiento y las características del TAC podría ser<sup>208</sup>:

\_D1: Hueso cortical compacto,  $\geq 1200$  HU.

\_D2: Hueso cortical crestal y el hueso trabecular grueso entre, 700-1.200 HU.

\_D3: Capa porosa crestal del hueso cortical y hueso trabecular fino, 350-700 HU.

\_D4: Hueso trabecular fino (en su mayoría maxilar posterior), 100-350 HU.

La fuerte dependencia de las unidades Hounsfield de la energía del haz de rayos X dio lugar a una amplia variación de valores en las poblaciones de pacientes, a estudio, por lo que es muy difícil distinguir los valores correspondientes a los diversos tejidos<sup>209</sup>.

Por tanto los problemas de conversión exacta de los números TAC en HU tienen mucha importancia en disciplinas como traumatología, implantología etc.

Varios autores han calculado los factores de conversión específicos de los números TAC a HU dependiendo del TAC utilizado. Sin embargo, sus resultados se ven afectados por la suposición subyacente (no expresada) de que los números TAC son consistentes en todo el volumen de interés.

Actualmente, los fabricantes de TAC han proporcionado niveles de gris que no son unidades Hounsfield reales que hacen que sea difícil evaluar la calidad ósea a partir de un conjunto de datos TAC. Un método que convierte los niveles de gris tomados de conjuntos de datos TAC en unidades Hounsfield sería estandarizar mediante curva de calibración y permitir la comparación de la calidad del hueso de máquina a máquina dentro de un rango de densidades equivalente a la escala de densidad mineral ósea<sup>209,210</sup>.

La falta de uniformidad en los niveles de gris en las imágenes TAC también es una limitación importante a tener en cuenta<sup>211</sup>.

El uso de phantoms con una concentración de hidroxapatita conocida (HA) permite una calibración HU vs. HA con respecto a la evaluación y determinación de la DMO de los huesos para cada escáner de TAC.

La tomografía computarizada (TC), también referido como una tomografía axial computarizada (TAC), implica el uso de equipos de rayos x de rotación, que combinado con un ordenador digital, para la adquisición de imágenes seriadas, permite la

determinación de características radiométricas y reconstrucción en 3D de las imágenes seccionadas de órganos y tejidos a estudio.

En nuestro estudio para determinar la densidad mineral ósea del callo de fractura hemos utilizado un ajuste de calibración mediante phantoms de hidroxiapatita con una concentración y densidad predeterminadas de antemano.

## 1.9 ANÁLISIS DE IMAGEN

Para la mayoría de tecnologías de adquisición de imagen tomográfica como Imagen de Resonancia Magnética (MRI), Tomografía Computarizada Axial (TAC) y todas sus variantes actuales, utilizan la tecnología de adquisición de imágenes en 2D de cortes trans-seccionales seriados tradicional. Estas técnicas han evolucionado hoy en día a adquisiciones de imagen de reconstrucción de volumen en 3D con tamaños de voxel isotrópico que proporcionan grandes conjuntos de datos.

La forma convencional de revisar estas imágenes corte a corte es demasiado engorrosa para la interpretación de los entre 800-1000 cortes que se pueden adquirir con equipos multidetectores de TAC. Estos grandes conjuntos de imágenes requieren procesamiento de imágenes adicionales y formatos para hacerlos adecuados para la navegación e interpretación de imágenes de forma eficiente y rápida.

La densidad mineral ósea (DMO) se define como la densidad volumétrica de hidroxiapatita de calcio (CaHA) en un tejido biológico en términos de  $\text{g/cm}^3$ . Se calibra por medio de fantasmas con densidad conocida de hidroxiapatita, CaHA.

La densidad mineral ósea se puede referir a dos mediciones diferentes:

(a) la densidad combinada de un volumen bien definido que contiene una mezcla de hueso y tejidos blandos, por ejemplo un volumen seleccionado de hueso trabecular medular de fémur o tibia. Se mide la "densidad mineral ósea", o DMO.

(b) la medición de la densidad restringida dentro del volumen a estudio al tejido de hueso calcificado, por ejemplo hueso cortical, con exclusión de tejido blando circundante, se llama "densidad mineral tejido" o DMT<sup>212</sup>.

Por contraste con la DMO, DMT nos da información sobre la densidad del material del propio hueso, e ignora el tejido blando circundante. Normalmente hueso trabecular se evalúa para la DMO, como un promedio de hueso y médula dentro del volumen medular de su interés.

Hay que tener en cuenta que en el caso de hueso trabecular, el efecto de volumen parcial compromete la medición de TMD excepto a resoluciones muy altas de micro-CT. Como regla general, la resolución debe ser tal que el espesor de una estructura ósea debe ser igual a 10 píxeles o más, con el fin de obtener valores de TMD precisos<sup>212</sup>.

Debido a los efectos del haz de rayos, el tamaño de un objeto puede verse afectado ligeramente por eso para obtener valores de densidad es importante utilizar una curva de calibración que aproximadamente coincide con el rango de tejido calcificado del hueso o muestra de tejido en el que se desea medir la densidad mineral ósea.

Las imágenes adquiridas según el software proporcionado por el propietario del fabricante del TAC, se pueden exportar en imagen digital en formato DICOM (Digital Imaging and Communications in Medicine) para el análisis de los datos a software específico de análisis de imagen.

Este software permite, extraer de la imagen DICOM, una selección de áreas correspondientes a una región de interés ROI sobre la cual, mediante la segmentación oportuna, se puede procesar la imagen, y determinar todos los parámetros radiométricos a estudio (área, volumen, longitud, número de partículas, escala de gris, valor de HU etc solo referidos a nuestra región de interés).

### **1.9.1 Software de Análisis de Imagen**

#### **1.9.1.1 Image J,**

El software de ImageJ está escrito en Java, que permite que se ejecute en Linux, Mac OS X y Windows, tanto en el modo de 32 bits y 64 bits. ImageJ y su código fuente de Java son de libre acceso y de dominio público. No requiere licencia.

Permite programación de macros: Automatizar tareas y crear herramientas personalizadas. Además es accesible para la programación específica de aplicaciones desarrolladas para ejecutarse en Image J.

Image J, ejecuta imágenes en escala de grises de 8 bits o de color indexado, de 16 bits entero sin signo de 32 bits en coma flotante y color RGB.

Abre y guarda todos los tipos de datos soportados como TIFF (sin comprimir) o como datos sin procesar. Abrir y guardar GIF, JPEG, BMP, PNG, PGM, FITS y ASCII. DICOM Abrir. TIFF Abiertas, GIFs, JPEG, DICOMs y datos brutos.

Crea selecciones de área rectangulares, elípticas o irregulares. Crear selecciones de línea y punto.

Analiza medidas de área, media, desviación estándar, mínimo y máximo de la selección o la totalidad de la imagen. Mide longitudes y ángulos. Utiliza las unidades del

sistema internacional. Calibra el uso de estándares de densidad. Genera histogramas y gráficos de perfil.

Divide una imagen en color de 32 bits en componentes RGB o HSV. Combina componentes de 8 bits una imagen en color en. Convierte una imagen RGB a 8 bits de color indexado. Aplica paletas de pseudo-color para imágenes en escala de grises.

### **Pilas de imágenes:**

Es capaz de mostrar una "pila" de imágenes relacionadas en una sola ventana. Procesa toda una pila utilizando un solo comando. Es capaz de abrir una carpeta de imágenes como una pila. Guarda las pilas de imágenes como archivos TIFF de múltiples imágenes.

ImageJ permite múltiples imágenes que se muestran en la pantalla al mismo tiempo. La ventana activa tiene su barra de título resaltado. Todas las operaciones se realizarán en la imagen activa. ImageJ soporta 8 bits, 16 bits y 32 bits (reales) escala de grises e imágenes a color de 8 bits y 32 bits. Imágenes de 8 bits se representan utilizando enteros sin signo en el rango de 0 a 255 tonalidades<sup>213,214,215</sup>.

#### **1.9.1.2 Bone J**

BoneJ es un plugin (aplicación) para el análisis de imágenes de hueso en ImageJ. Proporciona, herramientas de código abierto gratuitos para geometría trabecular y el análisis de toda forma de hueso.

El desarrollo sobre BoneJ comenzó a iniciarse ante la problemática común de procesar series de imágenes procedentes de tomografía axial computarizada ya que el número de imágenes era muy grande y de peso muy grande de varios gigabytes.

Bone J, utiliza Java de 32 y 64 bits, multiproceso y se ejecuta en una gran cantidad de sistemas operativos (Linux, Mac OS X, Windows, Solaris).

El proyecto original de Bone J fue financiado por el BBSRC (BBSRC es el organismo de financiación principal de la investigación académica y la formación en las ciencias biológicas en las universidades e institutos de todo el Reino Unido)<sup>216</sup>.

Para el estudio trabecular permite clasificar, contar y medir ramas del esqueleto e intersecciones trabeculares. Permite determinar el grado de anisotropía así como el parámetro conectividad (Conn.D), que se puede interpretar como el número trabéculas por mm<sup>3</sup>.



Crea y opcionalmente muestra una malla de superficie 3D y mide el área de la superficie, para calcular la superficie ósea (BS).

Permite determinar la longitud y la forma de las trabéculas por el método Hildebrand y Rüegsegger<sup>217</sup>. Calcula el espesor del grosor trabecular (Tb.Th) y el espaciado trabecular (Tb.Sp)<sup>218</sup>.

#### **1.9.1.3 Icy:**

Es una plataforma abierta para la comunidad informática Biolmage. Icy ha sido creado por la Unidad de Análisis de Imagen Cuantitativa en el Instituto Pasteur<sup>219</sup>.

Icy es libre y de código abierto, con licencia GPLv3. Derechos de Autor 2011 Institut Pasteur.

Utiliza aplicaciones desarrollados por instituciones educativas plugins

Utiliza guiones en javascript o python

Integración nativa ImageJ

Permite conectar Icy a Matlab y compartir datos<sup>220</sup>.

#### **1.9.1.4 CellProfiler**

Es un software libre de código abierto diseñado para permitir a los investigadores sin formación en la visión o la programación informática para medir cuantitativamente formatos de miles de imágenes de forma automática<sup>221</sup>.

#### **1.9.1.5 Leica LAS Image Analysis**

El módulo de software LAS Image Analysis dispone de un control secuencial fácil de usar que guía al usuario a través de todo el proceso de adquisición, detección y medición de características y partículas en imagen digital.

La medición de muestras como, secciones transversales se convierte en tarea fácil gracias a la amplia gama de parámetros que permite medir.

Con ayuda de herramientas de análisis como histogramas, gráficos circulares y estadísticas, pueden obtenerse resultados importantes y significativos que pueden ser exportadas y procesadas en Microsoft Excel.

#### **1.9.1.6 Leica QWin**

Leica QWin es un paquete de procesamiento de imágenes y análisis de software modular, diseñado para resolver exigentes tareas de análisis cuantitativos. La naturaleza modular de todo el sistema significa que puede ser personalizado con exactitud para satisfacer sus necesidades en cuanto a la resolución de la imagen, la memoria de imagen y potencia de los ordenadores.

Leica QWin ofrece varias clases de medición que van desde la medición manual interactiva de objetos para automatizado totalmente análisis "de no intervención". Algunos ejemplos son: Planimetría de la longitud, la distancia y el Área Fase, Fracción Área y fracción de volumen calibrado, Densitometría forma de partículas y análisis de tamaño, Perfiles de Gris<sup>222</sup>.

#### **1.9.1.7 Osirix, version 6.5 MD 6.5**

La imagen del software Osirix, verison 6,5 MD 6,5, Advanced Open PACS es un paquete informático de adquisición de imágenes de rendimiento ultrarrápido.

Técnica innovadora exclusiva para la navegación en 3D/ 4D / 5D.

Plataforma abierta para el desarrollo de herramientas de procesamiento

Es el visor DICOM más utilizado en el mundo<sup>223</sup>.

## 1.10 ESTUDIOS SOBRE REGENERACIÓN ÓSEA EN MODELOS EXPERIMENTALES

La hipótesis de trabajo de la mayor parte de los estudios de investigación sobre concentrados plaquetarios es que la adición de los distintos tipos de PRP a un defecto óseo con o sin material de injerto autógeno o alogénico, tiene un efecto positivo sobre la cicatrización ósea.

El PRP/PRF es considerado un biomaterial regenerativo que actúa mediante una matriz polimerizada de fibrina rica en plaquetas, leucocitos y citoquinas que favorecen la circulación de las células madres, proliferación de fibroblastos y síntesis de Colágeno tipo I<sup>43,53</sup>. Presenta capacidad osteopromotora y en varios trabajos experimentales no tiene ningún efecto osteoinductor o está muy cuestionado<sup>9</sup>.

Un aumento suprafisiológico de plaquetas autólogas tendría beneficios en la curación de las heridas. Actualmente existen una amplia metodología para obtener este fin, pero al mismo tiempo aparece un amplio abanico de productos ricos en plaquetas atendiendo tanto al uso de anticoagulantes, método de sedimentación, como los distintos procesos de activación de las plaquetas que hace inviable un uso clínico generalizado.

Hay una gran variabilidad de trabajos clínicos y ensayos experimentales que estudian el papel de PRP/PRF, y su efecto en la curación de fracturas en situaciones de gran interés clínico, tras una lesión traumática<sup>33,54,56</sup>, pero todas las investigaciones publicadas, se encuadran en todos los campos de la cirugía, Odontología y Cirugía Maxilofacial, Cirugía Plástica y Dermatología, Cirugía Ortopédica y Traumatología, Ingeniería tisular, e Investigación Básica etc.

He realizado una revisión de todos los trabajos relacionados con la consolidación y reparación ósea con terapia de factores de crecimiento, en modelos de experimentación, para tratar de determinar unas pautas comunes, y lo que encontramos es una enorme variabilidad, técnica, histológica, muy difícil de coordinar e integrar. Esto nos da un idea, de cuál es el estado de la investigación hasta hoy por un lado informes de una actividad positiva o favorecedora, y por otro estudios donde no consiguen establecer una relación, o bien no tiene ningún efecto.

El efecto para poder ser correctamente evaluado necesita ser evaluado con parámetros objetivos como son estudios radiológicos, histológicos e histomorfométricos

para tener una visión completa del proceso de consolidación y regeneración óseas. En la bibliografía, no todos los trabajos, presentan resultados que completen todos estos estudios a la vez, Así vemos que en dos estudios en cabras a las que se practicó una resección mandibular y posterior reconstrucción con hueso ilíaco particulado con y sin PRP, la evaluación radiológica, histológica e histomorfométrica reveló que el uso del PRP mejoraba considerablemente la curación ósea a las 6 y 12 semanas<sup>55,57</sup>. Así, la adición de PRF a aloinjertos reduce el periodo de curación de 8 a 4 meses en procesos regenerativos en la elevación del seno alveolar.

En un estudio sobre hueso parietal en conejo, injertando un defecto quirúrgico con hueso autógeno, PRP o una combinación de ambos. El análisis radiográfico, histológico e histomorfométrico permitió observar una ligera tendencia a mayor densidad de hueso con la adición de PRP que sin dicha adición. Sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas<sup>224</sup>.

Hatakeyama *et al.*<sup>47</sup> han realizado un estudio experimental mediante la adición de PRP a autoinjerto preparado mediante dos métodos distintos (una sola centrifugación o dos centrifugaciones), a los 15 días radiográficamente se observa la formación de hueso nuevo en los bordes de la lesión, primera fase de hueso nuevo con disposición trabecular delimitando pequeñas cavidades donde el tejido medular se está organizando, los fragmentos de hueso maduro del injerto son incorporados por el hueso nuevo, sin invasión del periostio. El análisis radiográfico, histológico e histomorfométrico permitió observar una ligera tendencia a mayor densidad de hueso con la adición de PRP que sin él. Pero de todas formas, no presenta diferencias significativas en cuanto a la densitometría y la cantidad de matriz ósea., entre el control, sin PRP y con el PRP.

La gran mayoría de trabajos publicados, consiste en relacionar el PRP, con determinados parámetros objetivos, de tal manera que el efecto se pueda evaluar atendiendo a las siguientes características:

- La neoformación ósea
- La osteointegración
- Reducción del tiempo de curación
- Densidad mineral ósea
- Síntesis de ADN
- Proliferación celular
- Factores de crecimiento

- Revascularización

Así encontramos:

La comparación de la curación ósea de un defecto de resección mandibular reconstruido con hueso autógeno aislado, o combinado con PRP en perros determinó en las biopsias a las 6 semanas y la microscopía por fluorescencia que el PRP no mejoró la neoformación ósea<sup>32</sup>.

En otro estudio experimental en perros, se colocaban implantes de titanio en la cresta iliaca, se rellenaba los defectos peri-implantarios con una combinación de dentina/yeso, en presencia y ausencia de PRP. Se observó que la osteointegración mejoraba en los perros tratados con PRP<sup>225</sup>.

Las plaquetas están implicadas en la aceleración de la regeneración ósea mediante la proliferación de los osteoblastos, aumentando hasta 50 veces la síntesis de DNA en cultivos de hueso humano. El aumento de la actividad mitogénica, aumenta la presencia de tejido mineralizado. Por el contrario la neutralización del PDGF, hace decrecer la proliferación celular<sup>91</sup>.

Zechner, en cambio, crea defectos mandibulares en doce cerdos enanos, aplica PRP e instala implantes, observando una mejor regeneración ósea peri-implantaria en las fases iniciales (6 semanas), igualándose a las 12 semanas, la estimulación de la proliferación celular osteogénica<sup>79</sup>.

En un estudio experimental en el hueso frontal de cerdos, la preparación del lecho del injerto con PRP no parece tener influencia sobre la osteointegración de implantes<sup>46</sup>.

Jakse *et al.*, sometió a 12 ovejas adultas a un procedimiento de elevación del hueso del seno bilateralmente con hueso de cresta ósea. Añadió PRP unilateralmente al injerto óseo, y observó que no había diferencias significativas tras 12 semanas de evolución<sup>38</sup>.

Fennis sugiere el efecto beneficioso del PRP cuando se añade a un injerto autólogo en cabras. En condiciones de trabajo comparables a las habituales del empleo de PRP en cirugía oral y maxilofacial<sup>82,226</sup>. Sus resultados no son concluyentes sobre la relación dosis-respuesta del PRP, así como del periodo de tiempo durante el que muestra actividad.

En un estudio experimental de los pocos realizados *in vitro* presentados<sup>16</sup> se estudió la estimulación de la proliferación celular en la médula ósea de ratas. No se pudo demostrar efectos comparables del PRP con el BMP.

En otro estudio similar, pero con hueso bovino desmineralizado, se observó una mejor densidad ósea en los casos injertados con hueso autógeno, que en aquellos injertados con hueso bovino desmineralizado y PRP<sup>227</sup>.

En un estudio en perros se compara la curación ósea de un defecto de resección mandibular reconstruido con hueso autógeno aislado, o combinado con PRP. Las biopsias a las 6 semanas y la microscopía por fluorescencia revelaron que el PRP no mejoraba la neoformación ósea<sup>228</sup> y mostró que altas concentraciones de PRP inhibían la proliferación y viabilidad de células alveolares por el contrario bajas concentraciones de PRP, tenían cierta estimulación.

En otro estudio sobre veintiocho ratas Wistar<sup>45</sup>, se observó que la aplicación de PRP no potenciaba la formación de hueso en hueso inorgánico bovino ni en injertos de hueso autógeno.

En el estudio de la condrogénesis en ratones inmunocomprometidos se observó que el PDGF retarda la reabsorción de hueso desmineralizado y reduce la osteoinducción, al mismo tiempo la concentración de cartílago aumenta hasta los 14 días, después del implante pero su concentración disminuye conforme aumenta la concentración de PDGF. De igual manera se ha constatado que la formación de hueso se reduce de forma dependiente de la concentración de PDGF<sup>229</sup>.

Por último Sarkar *et al.*<sup>230</sup> en un modelo experimental en ovejas, demostraron con su estudio, que el PRP/PRF no era un buen promotor de la regeneración ósea en defectos de tamaño crítico con muy baja capacidad regenerativa. De hecho, no creen que sea una alternativa para la reconstrucción de defectos diafisarios en huesos largos.

Choukron *et al.*<sup>231</sup> presentó su método de obtención del PRF como novedad, el PRP de segunda generación, con un procesado simplificado y sin manipulación bioquímica. Clínicamente es conocido que el PRF acelera la cicatrización tisular debido al desarrollo de la neovascularización, la remodelación del tejido cicatricial en ausencia total de infección.

Kanno *et al.*<sup>49</sup> observó que el PRP en humanos inhibía la actividad osteoblástica. En cambio las concentraciones moderadas de PRP estimulaban la diferenciación osteoblástica<sup>232</sup>.

La adición de gel plaquetario combinado con células madre de médula de hueso esponjoso (cresta iliaca) es utilizada como aloinjerto liofilizado incrementa el potencial osteogénicos y es una herramienta útil en el tratamiento de pacientes con pérdida ósea masiva. A las 6 semanas aparece un aumento de osteoblastos y una mayor revascularización. Al año la osteointegración es mayor en los grupos con aloinjerto +PRF, que en el grupo control sin PRF<sup>233</sup>.

Así el uso de injerto óseo enriquecido con PRP autólogo en fracturas de tibia y fémur de difícil consolidación recalcitrante consiguen la formación de unión sólida en un 91,7% de los pacientes a las 32 semanas<sup>234</sup>.

El seguimiento de la consolidación de las fracturas de fémur en ratas en otro trabajo, se analizó después de 1 y 4 semanas en un grupo control y otro a valorar con PRP. El análisis radiográfico demostró callo de mayor anchura de córtex a ( $P < 0,05$ ) en el grupo PRP (PRP: 1,65 +/- 0,06; frente al control: 1,48 +/- 0,05). La histología de la fractura mostró formación ósea mejorada en el grupo PRP. La inmunohistoquímica y Western blot demostraron cambios curativas asociadas en factor de crecimiento transformante (TGF  $\beta$ ), proteína morfogenética ósea y 1 (BMP) -2. Los resultados sugieren que PRP acelera la curación de fracturas a través de la modulación de la expresión del factor de crecimiento TGF  $\beta$ 1 y BMP-2<sup>235</sup>.

Los concentrados de plaquetas se ha visto que favorecen la proliferación de células endoteliales y la expresión de las funciones pro-osteogénicas. En los animales de experimentación y en la aplicación clínica, la eficacia de gel de plaquetas se incrementó por la combinación con aloinjertos óseos, actuando como andamios, y con células estromales de médula ósea<sup>237</sup>.

El uso de hidroxiapatita y colágeno como estructura de sustento mejora la reparación de una lesión osteocondral, pero la combinación con factores de crecimiento plaquetario no tuvieron un efecto aditivo; por el contrario, la administración de PRP tuvo un efecto negativo sobre los resultados obtenidos al perturbar el proceso regenerativo. En el grupo de hidroxiapatita y colágeno + PRP, se encontró tejido de reparación cartilaginoso altamente amorfo y tejido óseo subyacente mal organizado<sup>238</sup>.

Se ha estudiado el uso del PRP para el tratamiento de las lesiones del tendón, heridas crónicas, lesiones ligamentosas, lesiones de cartílago, lesiones musculares, etc. Los resultados obtenidos *in vitro* y los estudios *in vivo* en el uso de infiltrados para lesiones de pie y tobillo son prometedores<sup>72</sup>.

Las concentraciones de PDGR y TGF 1 en PRP obtenido de cordón umbilical UCB-PRP son comparables a las cantidades obtenidas en sangre periférica. En general, UCB-PRP tuvo efectos beneficiosos sobre la proliferación y diferenciación osteogénica de células madre dentales. Se necesita más estudios sobre la concentración óptima de uso del UCB-PRP<sup>239</sup>.

Murawski y Kennedy han desarrollado una estrategia de tratamiento que se basa en el tamaño de la lesión. Así lesiones menores de o igual a 8 mm de diámetro son tratados como microfractura mientras que las lesiones mayores de 8 mm de tamaño se tratan con trasplante osteocondral autólogo. Sugieren el uso de concentrados de médula ósea y plasma rico en plaquetas como un medio potencial de mejorar la osificación en lesiones osteocondrales<sup>240</sup>.

Plasma rico en plaquetas (PRP) se ha convertido en una modalidad fácilmente disponible para aumentar la cicatrización del tejido musculoesquelético. A pesar de la creciente popularidad de PRP para ayudar en el tratamiento de trastornos de los tejidos blandos, el beneficio total de PRP para ayudar con la cicatrización de los tejidos en el sistema músculo-esquelético no se ha explorado a fondo para ayudar con una de las condiciones más comunes, en estos casos la técnica percutánea de PRP para tratar fracturas puede ser una técnica aconsejable<sup>241</sup>.

Hay indicios de que un aumento sistémico en la concentración de (TGF1) interfiere en los efectos beneficiosos de las proteínas morfogenéticas. BMP. Así el TGF1 bloquea eficazmente la señalización de BMPs en osteoblastos. Como posible mecanismo, se postula la inducción de SnoN (proteína N) que aumenta la actividad de HDAC (histona desacetilasa) y de ese modo reduce la expresión de factores requeridos para la señalización eficiente de BMP. Por lo tanto, la inhibición de la actividad HDAC puede apoyar la cicatrización ósea durante la terapia de BMP en pacientes con niveles elevados de TGF en suero<sup>87</sup>.

El uso de PRP, presentó efectos positivos en la "revascularización", de un diente inmaduro asociado a una lesión periapical. El mejoramiento de la respuesta regenerativa fue debida al uso de plasma rico en plaquetas (PRP con citrato dextrosa, y activado con cloruro de calcio)<sup>242</sup>.

En comparación con solución salina normal o ácido hialurónico, múltiples inyecciones intraarticulares de plasma rico en plaquetas mejoran significativamente la



función de la rodilla, pero no reducen el dolor percibido o mejoran la satisfacción del paciente con osteoartritis sintomática de rodilla<sup>243</sup>.

La utilización de PRP en la cicatrización ósea con injerto óseo autólogo supuso diferencias significativas en la recuperación ósea a las 12 semanas para el grupo experimental y 18 semanas para el grupo control<sup>244</sup>.

Se ha estudiado el efecto de las plaquetas en un co-cultivo de condrocitos en la proliferación de los condrocitos. El trasplante de condrocitos tratados con plaquetas mostró mejor reparación del cartílago en el modelo osteoartritis. Este estudio ha identificado que el ADP derivado de plaquetas, y no el ATP, es el mediador clave para la proliferación de condrocitos tratados con plaquetas y reparación del cartílago en la osteoartritis<sup>245</sup>.

La utilización de PRP combinado con matriz de hueso desmineralizado, se utilizó en un defecto intraóseo en el diente 21. A los 6-meses de seguimiento los resultados mostraron una mejoría significativa en los parámetros clínicos. Se observó evidencia radiográfica de la formación de hueso a los 3 meses con relleno casi completa a los 6 meses después de la operación<sup>246</sup>.

La inyección de PRP con el factor básico de crecimiento de fibroblastos (PRP + b-FGF) diluida con solución salina normal. Es una terapia innovadora que causa complicaciones mínimas. Y esta lista para usarse en una gran variedad de tejidos<sup>247</sup>.

Estos resultados tan dispares son debidos a las diferencias entre las líneas celulares utilizadas, así como los diferentes procedimientos de producción del PRP, lo cual genera distintas liberaciones de factores de crecimiento.

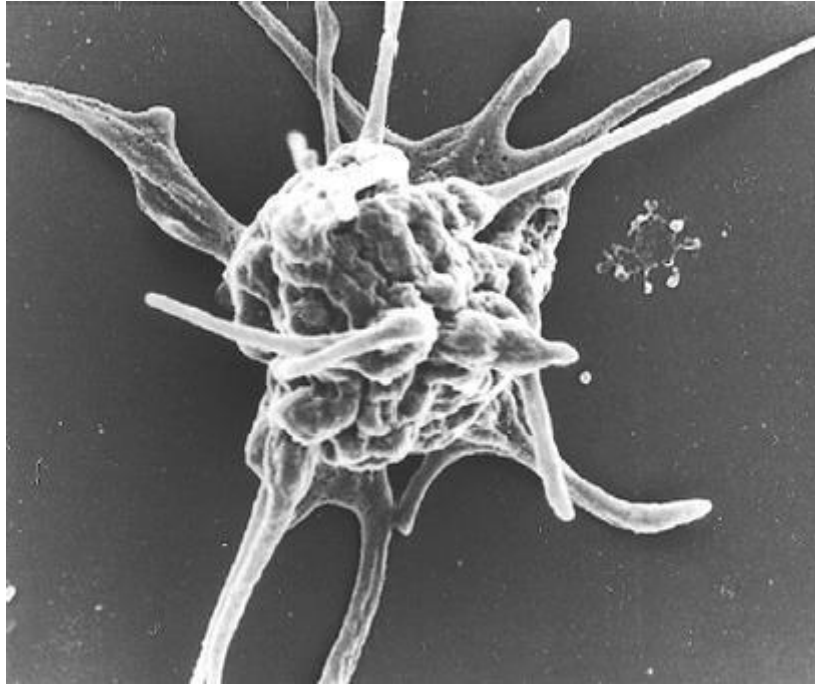
Estos estudios parecen proponer que el PRP puede tener efectos beneficiosos en la proliferación de las células madre de la medula sin promocionar la diferenciación osteoblástica. El PRP, parece estar relacionado con la liberación de factores de crecimiento sobre todo el TGF  $\beta$ 1, pero su modo de acción permanece todavía por confirmar, ya que hay trabajos tanto a favor como en contra, de la regeneración, y consolidación ósea. Además todos los trabajos parecen estar incompletos, cuando se conoce el nivel de concentración de plaquetas, no se conoce la liberación de factores de crecimiento. Cuando se hace una valoración radiológica, desconocemos los niveles de proteínas, y no sabemos que concentración se está utilizando. Se hace muy difícil, establecer pautas que tengan en cuenta todos los factores para poder implicar las condiciones del PRP con un efecto beneficioso.

---

Es necesario por tanto, realizar un estudio experimental en el que se incluya, la determinación y cuantificación de los factores de crecimiento *in situ* en la aplicación del PRP en la regeneración de las lesiones que nos permita profundizar en el conocimiento del comportamiento biológico de los factores de crecimiento plaquetarios en la reparación ósea.

La falta de consenso sobre la composición y la producción de los concentrados plasmáticos hace imposible el establecimiento de un estándar que integre a todos los trabajos de investigación.





## 2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO

**Ilustración 2.** *Estructura de una plaqueta activada. Micrografía electrónica.*

## 2.1 OBJETIVOS

Nuestro principal objetivo es estudiar el efecto de plasma rico en plaquetas puro en el proceso de consolidación ósea en un modelo de experimentación animal mediante la creación de un defecto óseo cortical crítico y su relación con la cantidad de factores de crecimiento liberados en el foco de fractura en presencia y ausencia de aloinjerto congelado.

Para ello vamos a diseñar el método óptimo de obtención de P-PRP para su posterior estudio en la consolidación ósea asegurando un defecto crítico sin regeneración espontánea mediante la resección masa cubital y el estudio de la consolidación en las siguientes condiciones:

1. Aplicación de plasma rico en plaquetas autólogo P-PRP y Determinación factores de crecimiento liberados, TGF  $\beta$  1 y PDGF AB
2. Aplicación de aloinjerto cortico esponjoso congelado.
3. Análisis consolidación ósea y características del callo de fractura mediante:
  - a. Histomorfometría (volumen callo, grosor trabecular, distancia entre bordes)
  - b. Estudio trabecular por análisis de imagen digital (conectividad, anisotropía, aplanamiento y dimensión fractal).
  - c. Densitometría ósea. (Determinación de DMO a partir “phantoms” de hidroxiapatita).

## 2.2 HIPÓTESIS DE TRABAJO

Para cumplir todos nuestros objetivos, partimos de la siguiente Hipótesis de Trabajo:

“La capacidad osteoinductora del P-PRP mediante la acción de los factores de crecimiento derivados de la plaquetas favorece la reparación de defectos óseos críticos corticales en presencia de aloinjerto córtico-esponjoso”.



### 3. MATERIAL Y MÉTODOS



**Ilustración 3.** Retrato europeo de Al-Razi, del compendio de tratados médicos de Gerardo Cremona, 1114-1187.

### 3.1 JUSTIFICACIÓN MÉTODO UTILIZADO

Para el estudio del efecto del PRP en la consolidación ósea se ha realizado un modelo experimental de fractura ósea, de hueso cortical crítica, comparativo entre distintos tratamientos con un grupo control.

El tamaño muestral utilizado, para este estudio, con un nivel de confianza (1—alfa) del 95%, y una precisión (d) del 5%, para una proporción del 1% en los parámetros determinados, ha sido de 15 animales.

ESTIMAR UNA PROPORCIÓN	
Total de la población (N) <small>(Si la población es infinita, dejar la casilla en blanco)</small>	
Nivel de confianza o seguridad (1- $\alpha$ )	95%
Precisión (d)	5%
Proporción <small>(valor aproximado del parámetro que queremos medir)</small> <small>(Si no tenemos dicha información p=0.5 que maximiza el tamaño muestral)</small>	1%
TAMAÑO MUESTRAL (n)	15
EL TAMAÑO MUESTRAL AJUSTADO A PÉRDIDAS	
Proporción esperada de pérdidas (R)	15%
MUESTRA AJUSTADA A LAS PERDIDAS	18

Beatriz López Calviño  
Salvador Pita Fernández  
Sonia Pértega Díaz  
Teresa Seoane Pillado  
Unidad de epidemiología clínica y bioestadística  
Complejo Hospitalario Universitario A Coruña

**Figura 6.** Determinación de tamaño muestral.

<https://www.fisterra.com/mbe/investiga/9muestras/9muestras2.asp#tamaño>

## 3.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

### 3.2.1 Manipulación animal:

La manipulación y la experimentación animal de este proyecto se ha adecuado a la normativa sobre los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos del 21 de octubre del 2005, **Real Decreto 1201/2005** (personal homologado nivel C), y **Ley 32 / 2007** de 7 Noviembre para el cuidado de los animales en su explotación, transporte y experimentación y sacrificio. Las instalaciones utilizadas en el desarrollo de la tesis doctoral del dpto. de Ciencia animal de la UPV están inscritas en el registro de Centros de cría, suministradores y usuarios de animales de experimentación de la comunidad Valenciana. **Decreto 13/2007** Conselleria de agricultura pesca y alimentación. El protocolo experimental fue aprobado por la comisión ética e investigación de la facultad de Medicina, así como el procedimiento fue notificado y autorizado por la dirección general de Investigación y desarrollo e Innovación Agropecuaria.

### 3.2.2. Animal de experimentación:

La selección del sujeto (animal) de experimentación se ha realizado teniendo en cuenta diversos factores;

A: Que tenga un comportamiento en la consolidación ósea equiparable al de los humanos

B: el tamaño del animal nos permita utilizar un modelo de fractura fácilmente reproducible en cuanto a tipo de fractura, tipo de osteosíntesis y modelo de rigidez.



Figura 7. Estabulario de la UPV

Se ha utilizado como animal de experimentación la oveja (*Ovis orientalis*) en su variedad valenciana. La raza ovina valenciana denominada guirra o sudat, forma un grupo de ovejas único propias de la comunidad valenciana que en la actualidad se encuentra en regresión y al borde de la extinción, habiéndose reducido paulatinamente los rebaños de raza pura, permaneciendo los mestizajes con la raza manchega y segureña principalmente<sup>248</sup>. Es un animal longevo que puede vivir hasta 13 o 14 años, siendo frecuente las de 10 años de vida media.

### 3.2.2.1 Estabulación de animales.

Los animales fueron estabulados en las instalaciones de la granja del Departamento de Ciencia Animal de la Universidad Politécnica de Valencia. Donde se les suministraba el alimento necesario y todos los cuidados por parte de personal especializado.

Para nuestro estudio se ha utilizado 20 ovejas de raza guirra esqueléticamente maduras.

### 3.2.2.2. Parámetros fisiológicos y bioquímicos

Tabla 1. Valores de parámetros sanguíneos <sup>249,250</sup>			
VALORES Sanguíneos	OVINO	VALORES Sanguíneos	OVINO
Hemoglobina G/L	100-120	Volumen sangre ml/Kg	60
Hematocrito %	29-38	Glucosa mMol/T	2,6-4,2
Eritrocitos 10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>	8-14	Tiempo Coagulación Min	4-8
Plaquetas 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>	354-620	Urea mMol/L	2,4-7,6
Leucocitos/mm <sup>3</sup>	<b>8000-10000</b>	Calcio mMol/L	1,9-3,0
Neutrófilos	3200	Fósforo mMol/L	1,6-2,75
Linfocitos	4200	Temperatura Corporal	38-40
Monocitos	400	Latidos Cardiacos /Min	70-80
Eosinófilos	400	Respiración /Min	12-20
Basófilos	100		

### 3.2.3 Modelo de Fractura

En los estudios de regeneración ósea, se pueden describir dos tipos de modelos quirúrgicos, por un lado, aquellos en los que falta la capacidad para la regeneración espontánea (defecto crítico) y los que regeneran espontáneamente (defecto no crítico).

En este estudio el modelo quirúrgico establecido es un defecto crítico cortical, de modo que el principal requisito es que no consoliden a largo de la vida del animal. Posiblemente el criterio de defecto crítico sea el más controvertido de todos, en cuanto a su definición y los tamaños considerados como críticos en cada animal de experimentación según los distintos autores<sup>143,146,148</sup>.

Nuestro modelo experimental requiere de un defecto óseo, que sea incapaz de regenerarse por sí mismo. Para ello utilizamos un tamaño de defecto en la proporción de más de 1,5 veces el tamaño medular. Hemos estudiado la consolidación del cubito en dos tamaños de gap correspondiente a una masa ósea de 1,4 y otro de 2,0 cm de longitud.

#### 3.2.3.1 Osteosíntesis

La osteosíntesis es un tratamiento quirúrgico, que reduce y fija de forma estable las fracturas mediante implantes de diferentes dispositivos tales como placas, clavos, tornillos, alambre, agujas y pines, entre otros aparatos mecánicos construidos principalmente de acero inoxidable, titanio o elementos biodegradables. Inicialmente estos implantes estaban fabricados de acero, pero al ir evolucionando se han sumado otros materiales más biocompatibles.

Además de la reducción y fijación estable de la fractura, las variables biomecánicas y la importancia fisiológica de los tejidos blandos (aquellos no óseos que se relacionan con el esqueleto). Para ello se han desarrollado técnicas de osteosíntesis mínimamente invasivas, permitiendo una recuperación precoz.

En nuestro caso, al utilizar la zona del espacio interóseo entre cubito y radio, para la realización del gap, aseguramos la reducción e inmovilidad, estimulando la formación de callo externo con recuperación precoz de la actividad muscular, del movimiento articular y la carga.

### 3.2.3.2 Modelo de rigidez

La rigidez de la parte media de los huesos largos del cuerpo humano, está determinada, fundamentalmente, por el hueso cortical. En el caso de la oveja, el cubito y radio son huesos soldados, con dos espacios interóseos. El radio posee un cuerpo rectilíneo, ensanchado en las extremidades con tuberosidad radial poco marcada, apófisis estiloides medial bien desarrollada y plano de la tróclea oblicuo. El cúbito se encuentra más desarrollado que en équidos, se observa hasta la extremidad distal, olécranon muy desarrollado, con escotadura transversal.

El defecto óseo cortical se ha llevado a cabo en el cubito, justo a nivel del espacio interóseo distal, de la fusión con radio de tal manera, que la fractura presenta un modelo de rigidez adecuado, permaneciendo el animal en libre movimiento y con carga, después de la intervención quirúrgica.

### 3.2.4. Técnica quirúrgica:

#### 3.2.4.1 Preoperatorio:

Selección de los animales. Todos los animales utilizados en la experimentación eran animales homogéneos con respecto a raza, peso y edad. Los animales presentaban un peso medio de  $60 \pm 4.8$  Kg y la edad era entre 6-8 años, final del máximo periodo reproductivo.



Figura 8. Técnica toma de muestra sangre periférica

#### 3.2.4.2 Extracción de sangre

La extracción de sangre periférica se realizó en todos los animales en la vena yugular, y siempre fue anterior a la anestesia, para no interferir en el proceso de coagulación del concentrado plaquetario. Se realizó mediante jeringas desechables de 10 ml y aguja de 21 G.

**3.2.4.3 Profilaxis y anestesia**

La relajación del animal se consigue mediante la inyección intramuscular de clorhidrato de xilacina marca comercial Rompum (Bayer) con una posología de 0.2 mg/Kg al 2%. La anestesia se completa con inyección subcutánea de 1 ampolla de isoprenalina (atropina) y 1 ampolla subcutánea de clorhidrato de mepivacaina. La profundidad anestésica se controla mediante el control de los reflejos.

Se procuró mantener dentro de los límites fisiológicos normales la circulación, la función respiratoria y la temperatura de cuerpo del sujeto anestesiado. La intubación endotraqueal aseguraba que las vías respiratorias queden libres y no obstruidas. Las intervenciones quirúrgicas se realizaron en el quirófano del Departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina y Odontología y los animales fueron estabulados en las condiciones que marca la ley en las instalaciones de estabulación animal de la Escuela de Ingenieros Agrónomos en la Universidad Politécnica de Valencia.

**3.2.4.4 Rasurado**

El rasurado se efectuó mediante maquina eléctrica, especial para ovinos, tanto la cara interna como externa del miembro torácico derecho. Una vez rasuradas se desinfectaban mediante una solución de 10.0 % de povidona yodada y se procedía a la cirugía con las máximas condiciones de esterilidad



**Figura 9.** Detalle del rasurado del miembro torácico

### 3.2.4.5 Intervención quirúrgica.

Se procedió con el animal en decúbito lateral activo sobre una tabla quirúrgica,



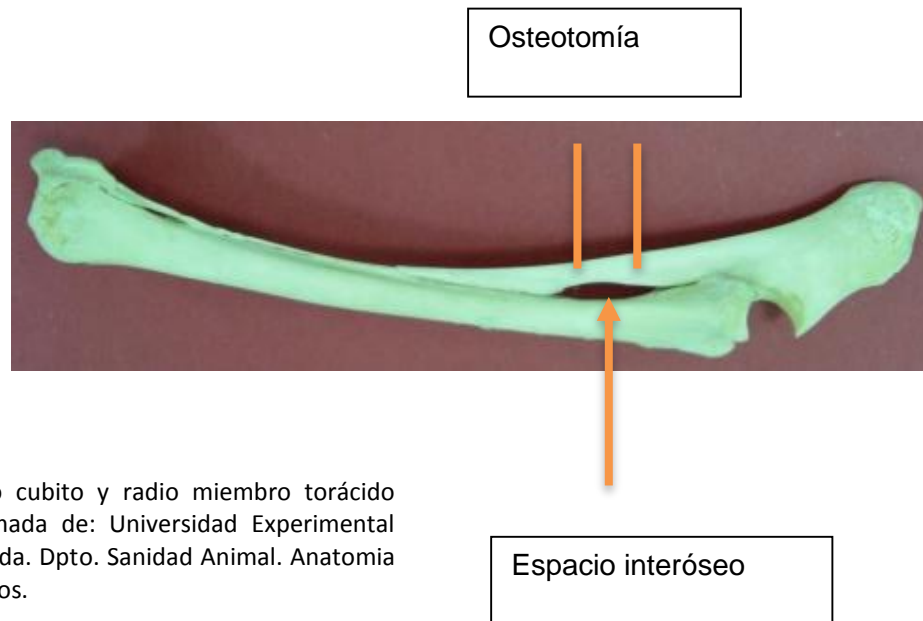
**Figura 10.** Detalle de la incisión

con el campo quirúrgico delimitado por paños estériles, perforados y material desechable. Todo el instrumental y el material que se utilizó en la intervención quirúrgica fueron esterilizados previamente con horno de alta temperatura marca PSelecta modelo Digiheat (40°-250°C) para esterilización a calor seco a 180° C durante 90 min con testigo de esterilidad.

Se realizó la incisión posterior directa sobre cubito de 4 cm aproximadamente. Se abrió la fascia muscular para acceder a la región diafisaria del cubito<sup>251,252</sup>.

En óvidos, el cubito y el radio se fusionan dejando un espacio interóseo máximo de 3-4 cm.

El cúbito se expone sub-periósticamente. Los puntos de la osteotomía se marcaban con un punzón y se realizaba una osteotomía transversa en la zona media de la diáfisis mediante una sierra oscilante, generando un gap de masa crítica en el espacio interóseo.



**Figura 11.** Modelo cubito y radio miembro torácico ovino. Imagen tomada de: Universidad Experimental Francisco de Miranda. Dpto. Sanidad Animal. Anatomía Animales Domésticos.





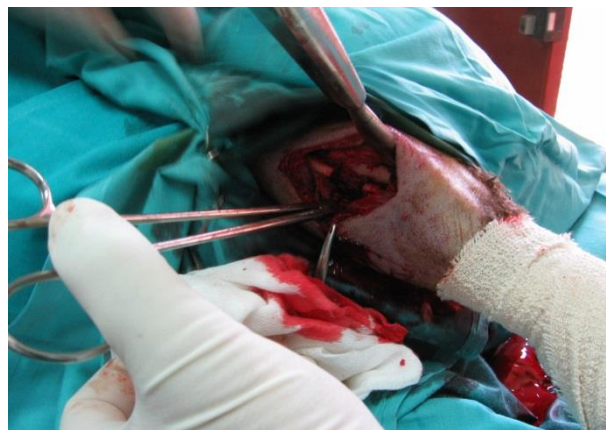
**Figura 12.** Detalle de la exposición del cúbito

Tras la osteotomía completa del cúbito se extrajo el hueso



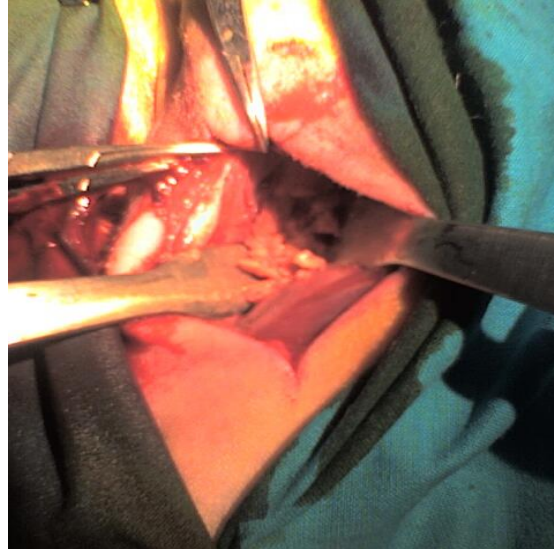
**Figura 13.** Detalle de la extracción del hueso

Dejando el defecto óseo cortical preparado para la inserción del biomaterial regenerativo a estudio (aloinjerto, aloinjerto+ PRP etc).



**Figura 14.** Detalle del defecto óseo creado

El gap se rellena con aloinjerto de cresta ilíaca en un volumen de 3,5 cc de masa esponjosa-cortical, descrito en apartado 3.2.5 de este capítulo.



**Figura 15.** Detalle relleno con aloinjerto 2,5 cc.

Posteriormente se suturó la fascia muscular con puntos separados de Dexon 3/0 y la piel con grapas, sin dejar drenajes ni apósitos



**Figura 16.** Sutura de la herida

### 3.2.4.6 Postoperatorio

#### **Profilaxis y analgesia**

En el postoperatorio se administra antibioticoterapia mediante inyección intramuscular de Amoxicilina + Ácido clavulánico 15 mg/kg (dosis recomendada en ruminantes) y una inyección intramuscular de metamizol magnésico (Lasain) a dosis de 0,2mg/kg. durante 72 horas.

Los animales son estabulados en las condiciones que marca la ley en las instalaciones de estabulación animal de la Escuela de Ingenieros Agrónomos en la Universidad Politécnica de Valencia.

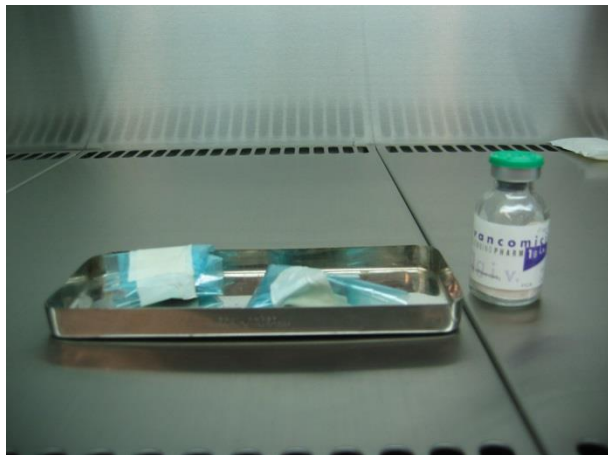
A las ovejas se les permite andar sin restricción en sus jaulas después de recuperarse de la anestesia, y se vigilan diariamente la actividad, ingestión de alimento y agua, la herida quirúrgica y si se desarrolla una infección del trayecto de la herida.

#### **Eutanasia**

A las ocho semanas tras la intervención quirúrgica se sacrifican los animales tras la inducción de anestesia general, con la administración intravenosa de pentobarbital sódico y cloruro potásico al 14.9 % Los tejidos blandos se disecan de ambos cubitos de cada animal y se realizan los estudios radiográficos.

### 3.2.5 Obtención de aloinjerto

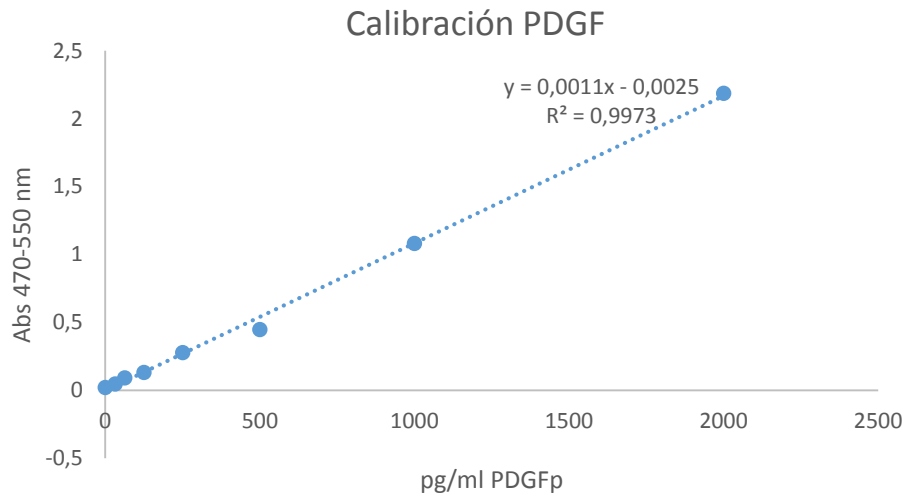
El aloinjerto se obtuvo, mediante incisión de piel sobre cresta iliaca, disección del celular subcutáneo de dos animales. Elevación roma del periostio y toma con escoplos o sierra de fragmentos óseos corticales y esponjosos. Sellado del área ósea con hemostático, sutura del perióstico, resto de estructuras por planos y piel con agrafes<sup>253</sup>.



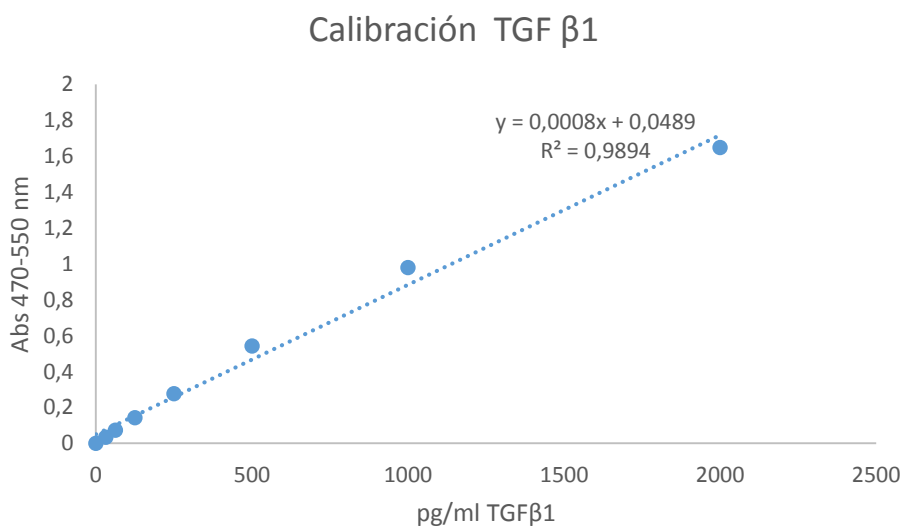
**Figura 17.** Aloinjerto congelado a -70 °C

El aloinjerto de la cresta iliaca de la misma especie obtenido fue congelado a

-70° C en condiciones de esterilidad standard y antibioticoterapia con vancomicina 1 g/ml tamaño de aloinjerto 3.5 cc de masa córtico esponjosa, no estructural en forma de chips empaquetados individualmente, para un solo uso.



**Gráfica 1.** Regresión lineal pg/ml PDGF vs Abs 450-570



**Gráfica 2.** Regresión lineal pg/ml PDGF vs Abs 450-570

### 3.3 MODELO PRP

El desarrollo de concentrados plaquetarios ha generado una gran expectativa en la cirugía de los huesos. Estos concentrados de uso quirúrgico, reciben diferentes nombres dependiendo de la composición tanto en series celulares como en factores de crecimiento.

- P-PRP, plasma rico en plaquetas puro, también se denomina PRF o PRGF; contiene solo plaquetas
- L-PRP plasma rico en plaquetas con leucocitos
- P-PRF, plasma rico en fibrina
- L-PRF plasma rico en fibrina y leucocitos<sup>19</sup>.

Todos estos compuestos están diseñados para liberar factores de crecimiento y ofrece una manera fácil y rentable para obtener una alta concentración de factores de crecimiento autólogos para la cicatrización de los tejidos y su regeneración.

#### 3.3.1 Caracterización y determinación de plasma rico en plaquetas.

##### 3.3.1.1 Concentrados plaquetarios

La disparidad de productos plaquetarios y la gran variabilidad en la preparación de concentrados, con distintos valores de plaquetas y factores de crecimiento ha dificultado el uso en la práctica clínica sin unas pautas standard claras<sup>33</sup>.

Por lo tanto previamente al estudio del efecto del PRP, hemos caracterizado el método de preparación para que el proceso fuese reproducible, y estandarizado en todos los animales de experimentación, de forma que en nuestro estudio vamos a utilizar P-PRP (plasma rico en plaquetas puro). La preparación del P-PRP autólogo se realizó mediante, la extracción de sangre periférica 4 ml con 0.32 ml de anticoagulante citrato dextrosa fosfato (ACD-A Citra N clot 50 Biomet biologics Braintree Massachusetts USA) que tiene un pH de 7.46 muy cercano al fisiológico característica que garantiza la mayor conservación de las células sanguíneas y de los factores de la coagulación. Los tubos se agitaron y se enfriaron en hielo<sup>254,255</sup>.

La sangre fue almacenada en tubos estériles, 2 tubos para medir el número de plaquetas y 4 tubos para obtener concentrado plaquetario mediante centrifugación.

Conforme a la bibliografía más actualizada, para determinar el mejor método de concentración plaquetaria, definimos 3 métodos distintos de obtención de plaquetas, con una simple centrifugación y doble centrifugación.

El P-PRP plasma rico en plaquetas se realizó en las siguientes condiciones:

- Método 1- 1ª centrifugación 500 g 10 min
- Método 2- 1ª centrifugación 600 g 10 min
- Método 3- 1ª centrifugación 750 g 10 min

con lo que se separó la fase con plaquetas y se descartó las series roja y blanca.

Posteriormente se realizó una 2ª centrifugación a 1900 g durante 8 min, a 4 ° C en una centrífuga marca Eppendorf modelo 5415 de Eppendorf AG 22331 Hamburg Germany.

Plasma Rico en Plaquetas autólogo, obtenido se activa posteriormente con la adición de 1000 u de trombina y CaCl<sub>2</sub> 10 %. El concentrado plaquetario se forma entre 2-5 min y ya está listo para usarse.

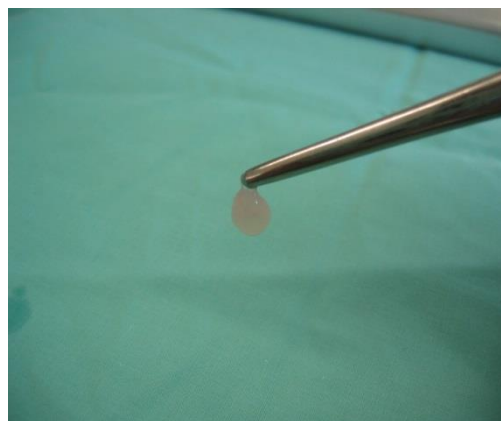


Figura 18. Detalle de Plasma Rico en Plaquetas activado

#### 3.3.1.2 Recuento de plaquetas:

El recuento de plaquetas se realizó en contador automatizado de células Abbot modelo Celdyn-3700 Abbott Laboratories. Abbott Park, Illinois, U.S.A.

#### 3.3.1.3 Recuento basal

Se determinó el número de plaquetas en sangre periférica.

### 3.3.1.4 Recuento de plaquetas en el PRP

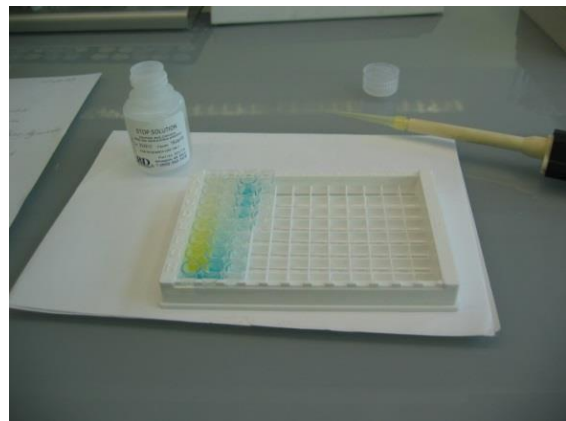
Se determinó el número de plaquetas en el P-PRP plasma rico en plaquetas preparado en las condiciones anteriormente descritas, mediante doble centrifugación plaquetaria para obtener máxima concentración de plaquetas.

### 3.3.2. Caracterización y determinación de factores de crecimiento

#### 3.3.2.1 Determinación de factores de crecimiento

La cuantificación de los factores de crecimiento a estudio se llevó a cabo mediante la determinación antigénica en ELISA biopack para los antígenos de PDGF AB y TGF beta 1 ya que son los factores más estudiados y más representativos de la degranulación plaquetaria<sup>75</sup>.

Se ha utilizado la técnica de Elisa en kit, (R&D system Inc 614 McKinley Place NE Minneapolis, MN 55413 USA). Técnica que nos permite de forma colorimétrica determinar concentraciones muy bajas del orden de pgr/ml. de los factores de crecimiento PDGF (factor derivado de las plaquetas) y TGF $\beta$ 1 (factor transformante).



**Figura 19.** Detalle placa determinación factores crecimiento Elisa.

La lectura de la placa se realizó en VICTOR X3 multilabel 2030 reader de Perkin Elmer Houston, Texas 77055 USA.

Se realizaron al menos 5 determinaciones de cada una de las muestras preparadas a partir de plasma (sangre periférica), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

#### 3.3.2.2 Niveles basales de PDGF y TGF- $\beta$ 1

Para determinar los valores basales de PDGF y TGF $\beta$ 1 por la técnica de ELISA, se extrajo plasma a partir de la sangre periférica mantenida en hielo con EDTA como anticoagulante. Las muestras fueron centrifugadas a 1000 g durante 30 minutos y con posterioridad se efectuó una segunda centrifugación a 10000 g durante 10 minutos a 2-8 ° C en una centrífuga Eppendorf 5415.



**3.3.2.3 Nivel de factores de crecimiento en el PRP**

Para determinar los factores de crecimiento en el PRP a partir de sangre periférica con ACD A como anticoagulante, se procedió a la activación con 1000 unidades de trombina y de CaCl<sub>2</sub> al 10% por ml. Una vez formado el gel, que tarda menos de 5 minutos, se procedió a la activación mediante centrifugación a 1500 g durante 5' y se tomaron muestras alícuotas a los 10', 60' y 180'. Se obtuvo el sobrenadante y las muestras fueron congeladas a -70°C. La determinación de TGFβ<sub>1</sub> en ELISA requiere de la activación por medio ácido (1 N HCl) y una incubación de 24 horas a 2-8 °C.

Se calculó la regresión lineal de la curva de calibración para ambos factores de crecimiento. Obteniendo ajustes con coeficiente prácticamente equivalentes a la unidad Gráfica 1 y 2.



### 3.4 GRUPOS DE ESTUDIO

El procedimiento quirúrgico se realizó en todos los animales de experimentación en el miembro torácico derecho, dividiéndose estos en tres grupos de estudio:

#### 3.4.1 Grupo 1 Control, Osteotomía cubital. Defecto óseo crítico.

1a) El tamaño del defecto creado Grupo Control de 1,4 cm

1b) El tamaño del defecto creado Grupo Control de 2,0 cm.



Figura 20. Gap Grupo Control 1 a)



Figura 21. Gap Grupo Control 1 b)

#### 3.4.2 Grupo 2 Aloinjerto

Osteotomía cubital tamaño 2.0 cm y aplicación aloinjerto congelado  $-70^{\circ}\text{C}$  de 3,5 cc incubado con vancomicina.

#### 3.4.3 Grupo 3 Aloinjerto + PRP.

Osteotomía cubital tamaño 2,0 cm y aplicación aloinjerto congelado  $-70^{\circ}\text{C}$  de 3,5 cc incubado con vancomicina + P-PRP

### 3.5. ESTUDIO RADIOLÓGICO DE LA CONSOLIDACIÓN

#### 3.5.1 Evaluación radiológica RX .Mamografía



**Figura 22.** Duo Diagnos de Philips

El proceso de osteogénesis se estudió mediante evaluación radiológica Rx AP y lateral del miembro intervenido a las 8 semanas, en Unidad de Radiología del Servicio de Radiodiagnóstico del Hospital Clínico

Cada cubito y radio correspondiente a un animal de experimentación útil era sometida a un estudio radiológico frontal en un equipo Duo Diagnos de Philips ® (Figura 22).

Para mejorar la calidad de las imágenes, las radiografías se realizaban con una distancia focal de 100 cm, 32 KV, 80 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.

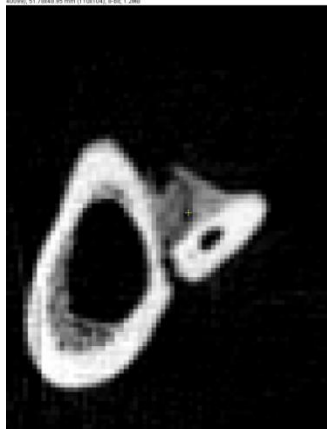
#### 3.5.2 Tomografía Axial Computarizada.

Características de la sesión tomografía: Las imágenes de tomografía axial computarizada (TAC) del cubito y radio, se realizaron en el Hospital Virgen del Consuelo. Las secuencias de imágenes se obtuvieron en formato DICOM tanto de la extremidad intervenida (defecto crítico cortical) como en las no operadas. Las imágenes fueron obtenidas con el equipo de TAC (estación CTCC01, ProSpeed, General Electric), en modo helicoidal, en varias sesiones con los siguientes parámetros:

DFOV 20,4 cm corte de 1,25 mm a intervalos de 0,8 mm Kv 120 y ma 50

DFOV 25,9 cm corte de 0,625 mm a intervalos de 0,625 mm KV 120 y ma 50

DFOV 24,01 cm corte de 0,625 mm a intervalos de 0,6 mm KV 120 y ma 215



**Figura 23.** Sistema TAC estación CTCC01, ProSpeed, General Electric



### 3.5.2.1 Calibración del equipo TAC

El equipo estaba calibrado presentando las siguientes características:

Tabla 2. Resolución de alto contraste

Alto contraste		Recon Mode
1,6 mm	40,36	standard
1,3 mm	52,93	Bone
1,0 mm	47,97	Bone
0,8 mm	43,75	Bone
0,6 mm	35,32	Bone

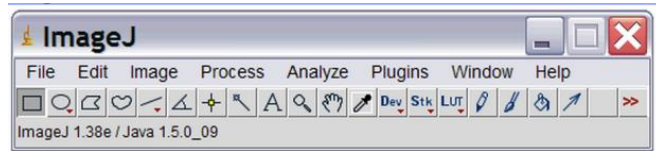
### 3.5.3 Análisis de imagen

Las secuencias de imágenes fueron procesadas mediante programa de tratamiento de imágenes en formato Dicom, **Image J**, mediante pluggins de **Bone J** que permite el análisis de secuencias de imágenes, facilitando la reconstrucción tridimensional de las muestras y su posterior análisis tanto de variables geométricas como densitométricas. Las medidas fueron realizadas, en: Department of

Bioengineering, Imperial College London, South Kensington Campus, London SW7 2AZ, bajo la supervisión de Dra. Sandra Sheffellbine y el Dr. Michael Daube.

### 3.5.3.1 Image J

Image J (versión 1.49H) es un programa de procesamiento de imágenes de formato Java Presenta una velocidad de



procesamiento para una imagen de 2048x2048 en 0,1 segundos. Lo cual supone el procesamiento de 40 millones de píxeles por segundo.

*Image J* y su código fuente de Java están disponibles gratuitamente y es de dominio público. Es ejecutable en todos los sistemas operativos: Linux, Mac OS X y Windows, tanto en el modo de 32 bits y de 64 bits.

Para automatizar tareas y crear herramientas personalizadas utiliza macros, con la grabadora de comandos. Hay más de 300 macros desarrolladas, por numerosas universidades de todo el mundo y están disponibles en el sitio Web **Image J** (<http://imagej.nih.gov/ij/>).

Es capaz de analizar una amplia gama de imágenes de distinta fuente tales como en escala de grises de 8 bits o de color indexado, entero de 16 bits sin signo de 32 bits en coma flotante y color RGB.

#### Visualización de imagen:

Permite seleccionar áreas de interés (Region of interest, ROI) y aplicar el cálculo numérico sobre la misma.

### 3.5.3.2 Bone J

Bone J ( versión 1.4.1), es un plug-in (complemento de aplicación) para el análisis de imágenes de hueso en **Image J**. Proporciona, herramientas de código abierto para la geometría trabecular y el análisis conjunto de la forma del hueso.

*Bone J*, es un proyecto original financiado por el BBSRC, Biotechnology and Biology Science Research Council.

### 3.5.4 Variables a estudio:

Para la reconstrucción en 3D del callo de fractura, hemos determinado:

#### 3.5.4.1. Variables histomorfométricas

- **Volumen del callo.**

Determina la proporción del volumen trabecular (BV / TV).

- **Distancia entre los bordes.**

Distancia del tejido recién formado. Nos permite determinar la distancia longitudinal entre dos puntos cualesquiera de la compilación de imágenes.

- **Grosor Trabecular.**

Calidad de callo. Determinado como grosor trabecular o Thickness. Calcula el espesor de primer plano y de fondo para las trabéculas (Tb.Th) y su separación (Tb.Sp).

#### 3.5.4.2 Variables Geométricas del estudio trabecular

Para caracterizar el callo de fractura

##### **Análisis esqueleto trabecular**

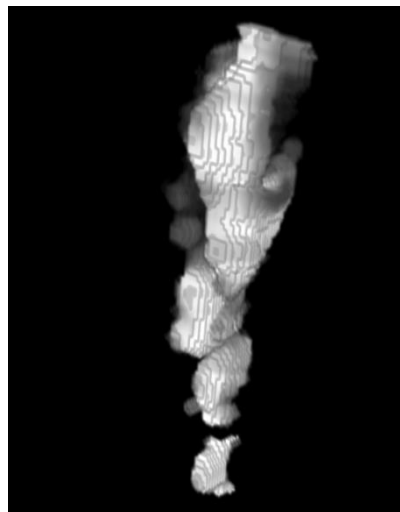
Nos permite Clasificar, contar y medir las ramas esqueléticas y uniones trabeculares. Plug-in de Ignacio Arganda Carreras<sup>256</sup>.

##### **Anisotropía**

Nos permite determinar el grado de anisotropía utilizando la longitud media de intercepción trabecular (MIL)

##### **Conectividad**

Calcula la característica de Euler, y se relaciona con el número total de trabéculas en el área de interés. Determina la densidad de conectividad (Conn.D), que se puede interpretar como el número de trabéculas por mm<sup>3</sup>.



**Figura 24.** Callo de fractura. Reconstrucción 3D

---

#### **Aplanamiento. Plateness**

Estudio, de la forma de las trabéculas (medida del aplanamiento trabecular), según la forma de varilla o forma de disco.

#### **Esqueleto 3D Skeletonise**

Encuentra el esqueleto de una estructura utilizando un algoritmo de adelgazamiento medial eje topología de mantenimiento.

#### **Structure Model Index SMI**

Calcula el índice de la estructura del modelo (SMI), una medida de cómo son las trabéculas, esféricas o aplanadas.

#### **Dimensión Fractal**

Caracterización fractal para una representación de la geometría trabecular excelente.

### 3.6. FORMACIÓN DEL CALLO DE FRACTURA:

#### 3.6.1 Estudio de la consolidación del callo de fractura:

Mediante, las variables histomorfométricas, se puede reconstruir el callo de fractura. Así, mediante la aplicación Bone J y el visor 3D:

##### 3.6.1.1. Reconstrucción 3D

En el visor 3D, podemos comprobar las áreas de hueso cortical sano y la disposición del callo de fractura *in situ*.

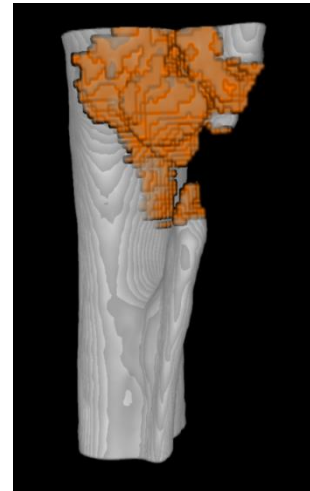
##### 3.6.1.2 Volumen callo de fractura

Para calcular el volumen del callo de fractura:

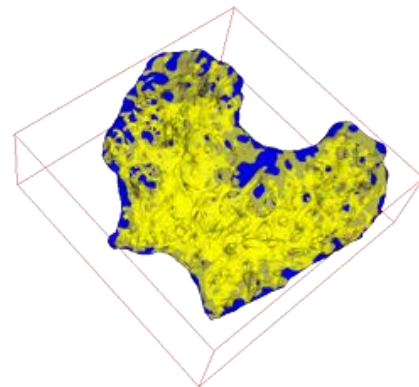
- BV: volumen hueso
- TV: volumen total
- BV/TV: relación de volúmenes
- Representación 3D opcional de la superficie del hueso

Volumen callo de fractura: mediante el estudio, restringido a nuestra área de interés (ROI) podemos extraer la imagen del callo de fractura mediante segmentación de imagen, y calcular el volumen en  $\text{mm}^2$  así como la forma y extensión del mismo.

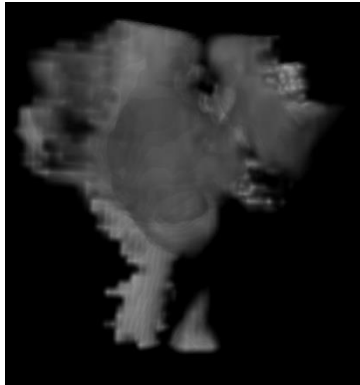
A mayor grosor de trabécula color blanco (consolidación hueso cortical) frente a las áreas de menor grosor de color gris, hueso más inmaduro, o en formación.



**Figura 25.** Hueso cortical sano color gris, y callo de fractura, de color naranja.



**Figura 26** Volumen callo fractura. Algoritmo calculo<sup>224</sup>.



**Figura 27.** Representación callo de fractura mediante segmentación de la imagen digitalizada.

### 3.6.1.3 Grosor trabecular, thickness

A través de la información de cada pixel valora el mapa de espesor resultante asumiendo la información de pixels de una imagen binarizada como representación del grosor trabecular.

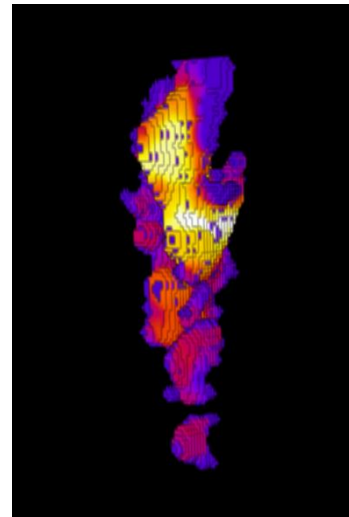
El plug-in calcula la desviación media y estándar:

- espesor trabecular (Tb.Th)
- separación trabecular (Tb.Sp)

En el visor 3D, podemos elegir una selección de imagen tipo RGB (256 colores)

Maximun thickness (áreas mayor consolidación)  
blanco

Minimun thickness, (areas menor consolidación)  
rojo azul



**Figura 28.** Representación callo de fractura mediante segmentación de la imagen digitalizada Thickness.



### Thickness

Este plugin es una aplicación especializada de BoneJ de espesor local de Bob Dougherty, que define el espesor en un punto como el diámetro de la mayor esfera que encaja dentro de la estructura y que contiene el punto.

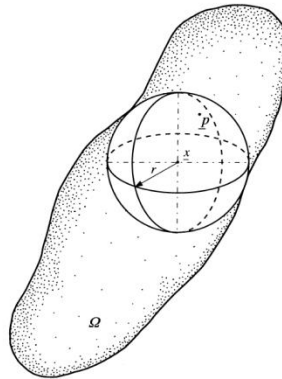


Fig. 1. Local thickness  $r$  of a structure  $\Omega$  determined by fitting

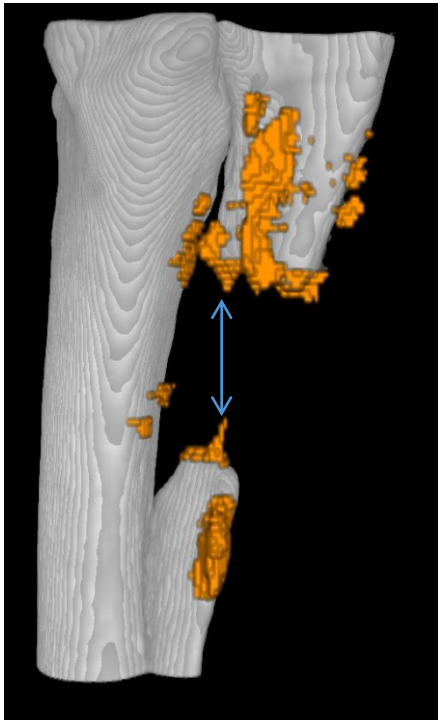
**Figura 29.** Algoritmo calculo grosor trabecular<sup>218</sup>

El plug-in calcula la desviación media y estándar del grosor trabecular (Tb.Th) y la separación trabecular (Tb.Sp) directamente de los valores de píxel en el mapa espesor resultante. Esta aplicación obtiene el valor trabecular de cada píxel a partir de una imagen binarizada y con “voxels” de igual tamaño en todas las direcciones. En nuestro caso, al no ser un  $\mu$ TAC, hemos interpolado la imagen binarizada para obtener “voxels” con profundidad igual a la altura y la anchura del “voxel”. De modo que nos permita poder comparar la calidad trabecular en todos los casos en las mismas condiciones<sup>217,218</sup>.

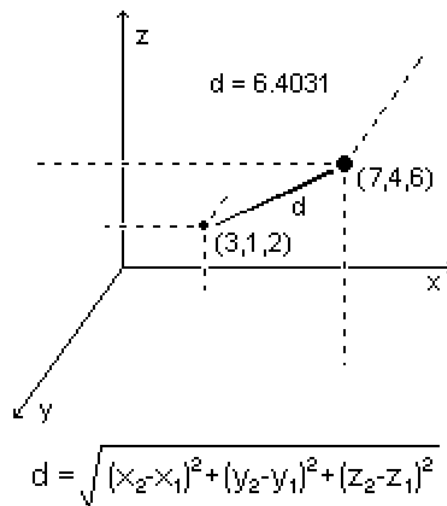
#### 3.6.1.4. Distancia en planos 3D,

Hemos utilizado, el algoritmo de distancia entre apilamiento de imágenes, generada con editor de texto de “Michael Doube” macro para Image J.

Nos permite determinar la distancia longitudinal entre dos puntos cualesquiera de la compilación de imágenes.



**Figura 30.** Representación distancia 3D. plug-in Michael Daube. Bone J.



### 3.6.2 Estudio de la calidad del callo fractura en consolidación:

Mediante las siguientes aplicaciones o plug-in de Bone J, podemos determinar:

#### 3.6.2.1 Connectivity. Conectividad.

El número de estructuras conectadas en una red puede ser determinada mediante el cálculo de la característica de Euler. El hueso trabecular es una red de este tipo, y su densidad de conectividad (Conn.D) se puede calcular dividiendo la estimación de la conectividad por el volumen de la muestra. El algoritmo en la conectividad de

BoneJ utiliza “voxels” vecinos para calcular la característica de Euler del volumen y lo ajusta para dar la contribución por volumen de la estructura.

Se asume que sólo hay una partícula en el primer plano; Para lograr esto, hay que ejecutar, Purificar

De modo que la pila de imágenes solo tiene dos fases, fase ósea conectada y matriz ósea, y de

ahí, interpolar a través de la pila de imágenes, el cálculo de Euler característico para cada “voxel” óseo ( $\delta\chi$ ) y sumando para dar una característica de Euler para el hueso ( $\chi$ )

Se obtiene la característica de Euler de la muestra de hueso como si estuviera flotando en el espacio ( $\chi = \sum \delta\chi$ )

Siendo  $\Delta(\chi)$ : la contribución de la muestra de hueso para la característica de Euler del hueso a la que estaba conectado.

Conectividad: La conectividad de la imagen (~ número de trabéculas)

Conn.D: densidad de Conectividad (~ número de trabéculas por unidad de volumen)<sup>257,258</sup>.

### 3.6.2.2 Analyze Skeleton.

Este plugin etiqueta todos los píxeles/“voxels” en la imagen de un esqueleto y cuenta a continuación sus cruces, puntos y ramas triples y cuádruples, y mide su longitud media y máxima. De esta manera podemos hacernos una idea del entramado trabecular del callo de fractura<sup>216,256,259</sup>.

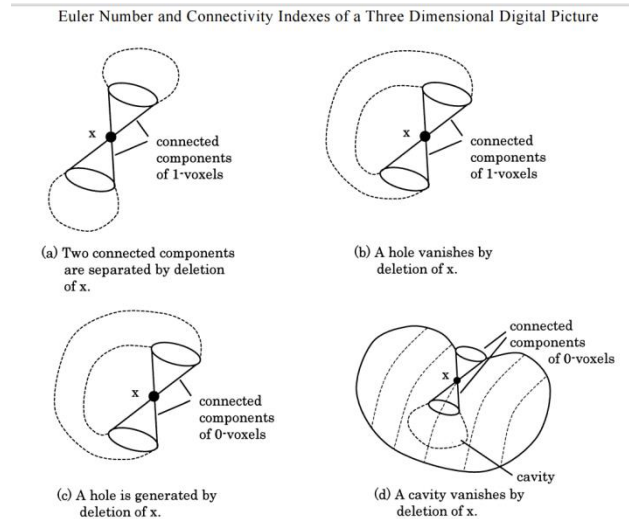


Figura 31. Calculo número de Euler

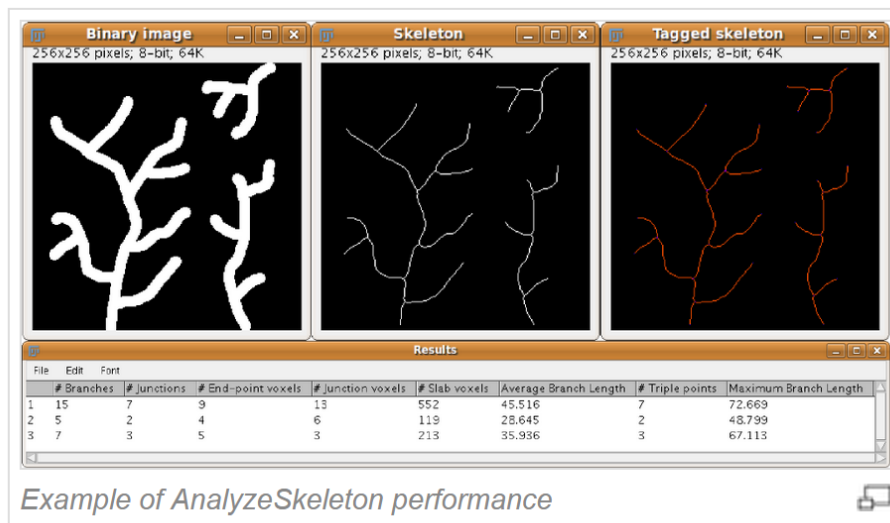


Figura 32. Representación Analyze Skeleton Bone J.

### 3.6.2.3 Sketeletonize 3D Modelo de esqueleto trabecular en 3D

Este plugin de Ignacio Arganda Carreras incluido en BoneJ proporciona la topología de esqueletos preservando el eje medial de la estructura trabecular del callo de fractura, en todas las ramas e intersecciones trabeculares<sup>260</sup>.

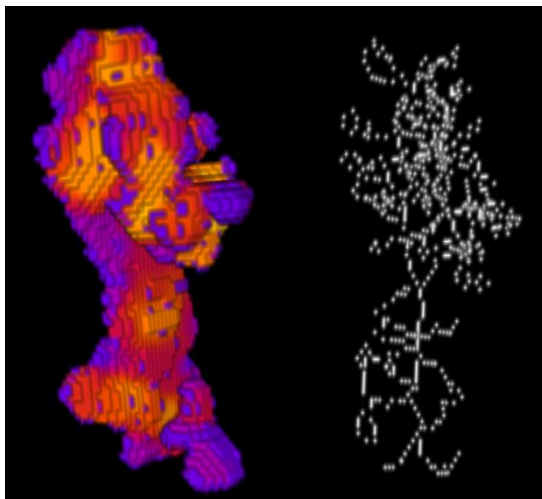


Figura 33. Representación Analyze Skeleton y Thickness Bone J. Muestra control 47

### 3.6.2.4 Aplanamiento Plateness

El índice del modelo de estructura SMI, tiene algunos defectos conocidos, incluyendo no tener en cuenta las superficies cóncavas. Plateness es un reemplazo experimental para el índice del modelo de estructura. Utiliza las longitudes de los ejes

de esferoides alargados y achatados para determinar la forma alargada o Achatada del espacio trabecular alrededor de un punto en particular.

Altamente alargada (forma de Jabalina, forma de varilla) esferoides tienen un solo eje largo ( $a$ ) y dos ejes cortos ( $b$ ,  $c$ ) de tal manera que  $a \gg b > c$ , mientras que la forma muy achatada (en forma de disco, o placa) esferoides tienen dos ejes más largos ( $a$ ,  $b$ ) y un eje mucho más cortos ( $c$ ) de manera que  $a > b \gg c$ .

Así, el cociente  $b/a$  está más cerca de 0 para esferoides alargados y cerca de 1 de esferoides achatados, mientras que  $c/a$  es normalmente cerca de 0, excepto en esferoides más esféricas ( $a \sim b \sim c$ ), entonces los cociente  $b/a$  y  $c/a$  están más cerca de 1.

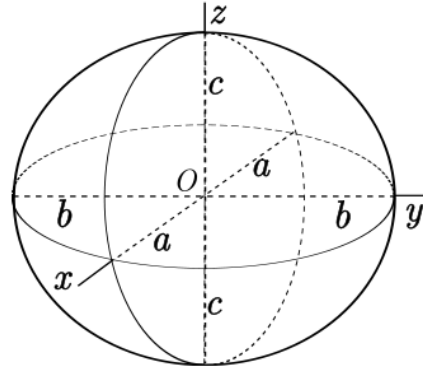


Figura 34. Representación esferoide.

Plateness ejecuta Skeletonise 3D, para obtener el eje medial de las trabéculas, que se utiliza como preselección para el muestreo. Vectores aleatorios se preseleccionan de cada "voxel" en el eje medial hasta que cada vector ha llegado a un límite plano-fondo.

Para cada "voxel" preseleccionado, se construye una matriz de covarianza a partir de los vectores. Resultados de descomposición de valores propios de una lista ordenada de tres longitudes de eje. Las tres longitudes se suman en todos los puntos preseleccionados para dar  $\Sigma a$ ,  $\Sigma b$  y  $\Sigma c$ , de la cual se pueden inferir las proporciones relativas de las estructuras tipo bastón y tipo placa<sup>217</sup>.

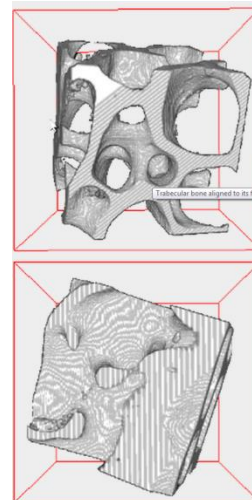
Results						
File Edit Font Results						
	Image	$\Sigma ev1$	$\Sigma ev2$	$\Sigma ev3$	$\Sigma ev2/\Sigma ev1$	$\Sigma ev3/\Sigma ev1$
1	stackcallus47maskvortexremodelaed.tif	4475.728	2821.827	1650.538	0.630	0.369
2	stackcallus63mask63remodelated.tif	418.125	273.432	201.274	0.654	0.481
3	stackcallus501mask501remodelated.tif	2385.008	1549.807	1016.343	0.650	0.426
4	stackcallus95mask95remodelated.tif	8203.209	5199.803	3543.112	0.634	0.432
5	stackcallus506bismaskremodelated.tif	3275.577	1864.498	1214.367	0.569	0.371
6	stackcallus535maskremodelated.tif	166.423	118.265	82.357	0.711	0.495

Figura 35. Ejemplo de datos obtenidos para los ejes  $a$ ,  $b$ ,  $c$ , en el estudio del aplanamiento trabecular. Bone J plugin plateness.

### 3.6.2.5 Anisotropía

Grado de anisotropía (DA) es una medida de cómo y cuánto las subestructuras se orientan dentro de un volumen determinado. El hueso trabecular varía su orientación dependiendo de la carga mecánica y puede llegar a ser anisotrópica. Este plugin utiliza

el método de longitud media de intercepción (MIL) para determinar la anisotropía. En pocas palabras, se determina un gran número de vectores de la misma longitud procedentes de un punto aleatorio dentro de la muestra. Cuando un vector atraviesa el límite entre el primer plano y el fondo, se cuenta una intercepción. La longitud de intercepción media en ese vector es entonces la longitud del vector dividido por el número de intercepciones. De esta manera se construye una nube de puntos, donde cada punto representa el número de intercepciones del vector siendo su longitud media de intercepción. DA se calcula como  $1 - \text{longitud del eje más corto eje} / \text{longitud del eje más largo}$ .

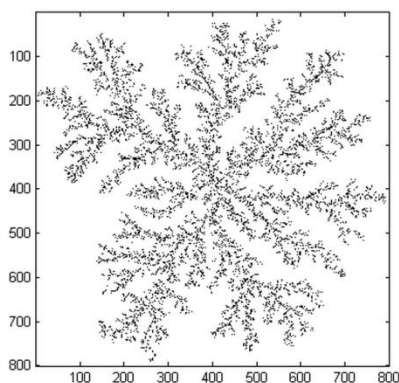


Resultados de DA: 1 anisotropía, 0 isotropía<sup>257,1261</sup>.

### 3.6.2.6 Dimensión fractal.

La descripción histomorfométrica del hueso trabecular ha dependido tradicionalmente de parámetros basados en figuras euclidianas. En muchos casos, esta descripción proporciona una excelente representación de la geometría trabecular sin embargo, en estados de enfermedad la arquitectura ósea puede ser transformada drásticamente, haciendo que el modelo euclideo inicial sea inapropiado. En estos casos, la aproximación a un modelo fractal tiene una gran importancia.

Para determinar la dimensión fractal de hueso, se puede utilizar diferentes técnicas, de ajuste a objetos reales. Sin embargo, las estructuras naturales o los objetos tienen un límite a su estimación de la



Calling boxcount without output arguments simply displays N (the number of boxes needed to cover the set) as a function of R (the size of the boxes). If the set is a fractal, then a power-law  $N = N_0 * R^{(-DF)}$  should appear, with DF the fractal dimension (Kolmogorov capacity).

**Figura 36.** DF se conoce como la dimensión de Minkowski-Bouligand, o la capacidad de Kolmogorov, o dimensión Kolmogorov, o simplemente dimensión fractal

Una posible caracterización de un conjunto fractal es proporcionada por el método de la "caja de conteo": El número N de cajas de tamaño R necesaria para cubrir un conjunto fractal sigue una ley de potencias,  $N = N_0 * R^{(-DF)}$ , con  $DF \leq D$  (D es la dimensión del espacio, por lo general  $D = 1, 2, 3$ ).

dimensión a utilizar, el valor final no cambia siempre que se utilice un tamaño de cuadro mayor que cero.

Computacionalmente el más sencillo de implementar es el conteo de celdas (box counting) y la dimensión de correlación (basada en generar un número de puntos aleatorios en un entorno del fractal y medir cuántos de ellos caen sobre el conjunto fractal). Es la dimensión de conteo de cajas o de dimensión Minkowski-Bouligand, por su fácil implementación algorítmica<sup>262,263</sup>.

### **3.6.4 Densitometría**

#### **3.6.4.1 Densidad mineral ósea. Estudio mediante Phantoms de hidroxiapatita**

Dado que la medida de densidad mineral ósea mediante unidades Hounsfield, es muy arbitraria, y depende del calibrado del aparato TAC utilizado así como las condiciones de medida, hace muy difícil comparar y determinar valores de densidad mineral ósea absolutos<sup>264</sup>.

Para la determinación y caracterización de la densidad mineral ósea, del callo de fractura de nuestras muestras, ha sido necesario, realizar una curva patrón mediante “phantoms” de densidad mineral de hidroxiapatita conocida. Se ha realizado una batería de “phantoms” de hidroxiapatita (calcium phosphate tribasic 34-40 % Ca) de la casa cymit, Cymit química SL España, con un rango de concentración (0-1000 mg /ml HA) equivalente a la formación de hueso nuevo, en el callo de fractura, para ello, hemos generado una mezcla de hidroxiapatita con resina epoxy de Elan-tech Elantas comattini spa 43044 Collecchio Italy de las siguientes características:

Densidad resina 1,1, densidad endurecedor 0,90, en una proporción: 100:50 de la base/endurecedor. Todos los especímenes tienen 10 ml de base, y 5 ml de endurecedor, más la cantidad de HA necesaria para cada concentración.

Tabla 3. Especificaciones phantoms

peso HA gr	mg HA/ml	Densidad (g/cm <sup>3</sup> )
0	0	1,0
1,5	100	1,1
5	333	1,33
7,5	500	1,5
10,5	700	1,7
15	1000	2,0

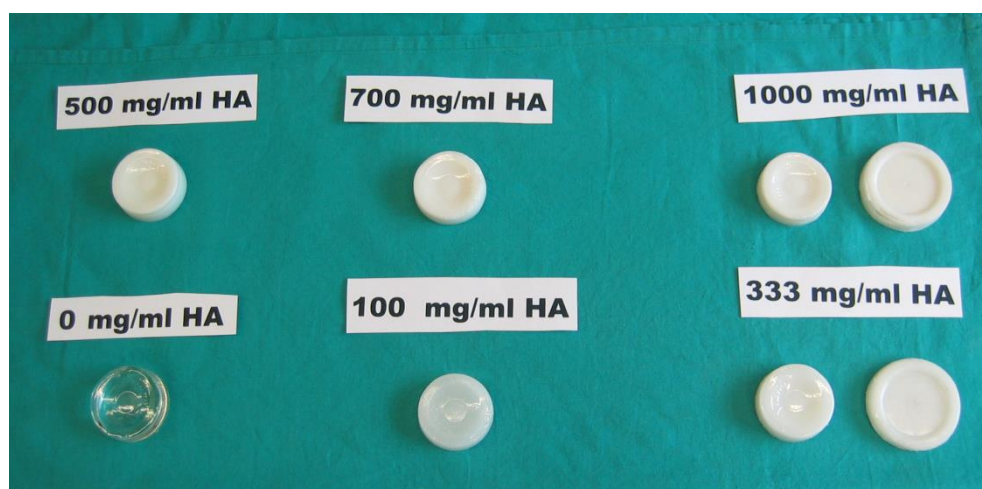


Figura 37. Phantoms de Hidroxiapatita vs Concentración.

Las características de los phantoms nos han permitido generar moldes homogéneos, con todos los espacios ocupados por la misma matriz sintética. Variando únicamente la densidad dependiente de HA en cada muestra de un tamaño de 4,5 cm de diámetro por 1,2 cm de grosor.

Los moldes de HA, han sido estudiados radiológicamente mediante TAC en las mismas condiciones en la que se estudió la regeneración ósea de todas las consolidaciones estudiadas, obteniendo valores de densidad ósea, para cada uno de los callos de fractura.





Figura 38. Imagen de TAC de los Phantoms de hidroxiapatita

La relación entre los mg/ml de hidroxiapatita, y la intensidad de gris, se llevó a cabo mediante ajuste lineal tanto para 8 bits como para 16 bits obteniéndose el siguiente resultado con tamaño de pixel 0,6 mm.

Tabla 4. Ajuste intensidad de gris vs mg de hidroxiapatita escala de gris de 8 bits

8 bits	Media intensidad gris (unidades Hounsfield)	Desviación standard
0 mg/cm <sup>3</sup>	45,90	11,04
100 mg/cm <sup>3</sup>	90,30	11,8
333 mg/cm <sup>3</sup>	137,4	6,0
500 mg/cm <sup>3</sup>	141,1	7,5
700 mg/cm <sup>3</sup>	187,66	13,9
1000 mg/cm <sup>3</sup>	228,42	13,42

Tabla 5. Ajuste intensidad de gris vs mg de hidroxiapatita escala de gris de 16 bits

16 bits	Media intensidad gris (unidades Hounsfield)	Desviación standard
0 mg/cm <sup>3</sup>	72,5	12,9
100 mg/cm <sup>3</sup>	217,7	17,8
333 mg/cm <sup>3</sup>	459,04	18,1
500 mg/cm <sup>3</sup>	466,07	47,8
700 mg/cm <sup>3</sup>	654,8	43,3
1000 mg/cm <sup>3</sup>	991,12	77,98

Los ajustes lineales nos permitieron determinar y validar los valores de DMO (densidad mineral ósea) mediante el uso del algoritmo densitometer de Image J utilizando la pendiente y la ordenada en el origen para los valores obtenidos de intensidad de gris, frente a los  $\text{mg/cm}^3$  de hidroxiapatita. Se utilizó la herramienta de calibración con los siguientes ajustes<sup>265</sup>:

$$\text{DMO} = 5,8823 * \text{int gris} - 373,35$$

$$\text{Int gris} = 0,170 * \text{DMO} + 63,47$$

$$R^2 = 0,972 *$$

### 3.7 ESTUDIO HISTOLÓGICO

Tras completar el estudio radiológico (Rx y TAC) se prepararon las piezas para su estudio histológico, para ello se procedió a descarnar los cubitos operados y contralaterales que servirán como control, posteriormente se recortaron hasta un tamaño de un segmento óseo de aproximadamente 3 x 3 cm. de ancho que incluía las área del defecto óseo crítico para proceder a la descalcificación y posterior procesado.



Figura 39. Imagen de las muestras descalcificadas en fresco.

#### 3.7.1 Descalcificación

El proceso de descalcificación se llevó a cabo mediante la inmersión de todas las piezas debidamente identificadas en solución de ácido nítrico de 15-30 días cambiando la solución a intervalos de 3-6 días.

El estado de descalcificación de las piezas a estudio se determinó mediante evaluación radiológica Rx AP y lateral del miembro intervenido a los 20 días, en Unidad de Radiología del Servicio de Radiodiagnóstico del Hospital Clínico de Valencia.

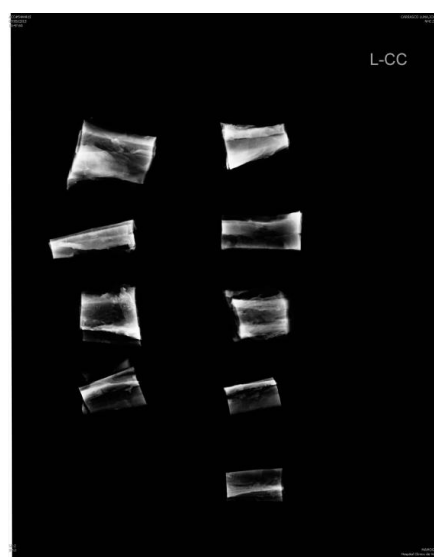


Figura 40. Control radiológico de la descalcificación.

Cada cúbito y radio correspondiente a un animal de experimentación útil era sometida a un estudio radiológico frontal en un equipo Duo Diagnos de Philips idéntico al estudio realizado para la observación de la consolidación.

### 3.7.2 Procesado de las piezas

El procesado de las piezas se realizó de forma automatizada, siendo por tanto un procesado genérico para todas las piezas por igual, mediante Histoquined, con un protocolo de procesado para piezas de hueso que consiste en varias etapas de deshidratación e inclusión en parafina que constaba de varias fases:



Figura 41. Procesador de Tejidos Histoquined.

1 - Lavado de la pieza en agua destilada

2 - Deshidratación

- 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

3- Aclaración

- Benceno 1 2-3 hrs
- Benceno 2 2-3 hrs
- Benceno 3 2-3 hrs

4-Inclusión

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

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



**Figura 42.** Unidad de parafina, montaje de bloques.

### **3.7.3 Cortes histológicos**

Los cortes histológicos de las muestras óseas útiles se realizaron con un micrótopo de tipo Minot marca Anglia Scientific y se obtuvieron cortes seriados de 5  $\mu\text{m}$ . de espesor, listos para su posterior tinción.

### **3.7.4 Tinciones**

Se realizaron dos tipos de tinción, una dicrómica hematoxilina eosina de control, y un Tricrómico de Masson.

#### **3.7.4.1 Tinción de HEMATOXILINA-EOSINA**

Se teñirán los núcleos de azul, (hematoxilina, colorante catiónico de origen vegetal) citoplasmas en rosa (eosina colorante sintético aniónico, derivado hidroxixanténico), músculo en tonos rojizos a rosados fucsia, glóbulos rojos en naranja o rojo y la fibrina en rosa intenso.

Protocolo de tinción:

- Secar cortes en la Estufa
- Desparafinar en xilol 20 min
- Deshidratar en alcohol absoluto
- Lavar agua
- Hematoxilina 8-10 min
- Lavar exceso colorante
- Alcohol clorhídrico 15 s
- Lavar
- Hidróxido amónico 15 s
- Lavar
- Eosina 5 min
- Lavar
- Deshidratar alcohol absoluto. Xilol

#### 3.7.4.2 Tinción TRICRÓMICO DE MASSON

El Tricrómico de Masson consta de Fucsina, Ac. fosfomolibdico, azul anilina. Se tiñe:

- Núcleos azul –negro
- Citoplasma y fibras musculares de color rojo
- Colágeno y reticulina azul o verde

Protocolo de tinción:

- Secar cortes en. Estufa durante 30 min. a 60°.
- Desparafinado inmersión en xilol durante 10 o 15 min.
- Hidratación. Alcohol absoluto-5min. Alcohol 96°-5min. Alcohol 70°-5min.
- Lavar en H2O destilada.
- azul de anilina 5 min.
- Lavar con agua corriente 10 min.
- Fucsina de Ponceau 5 min.
- Ácido fosfomolibdico 5 min.
- -Deshidratar. Alcohol de 70° Alcohol de 96°. Xilol.

### 3.7.5 Montaje

Para el montaje se limpió el portaobjeto alrededor del corte y se deposita sobre el mismo una gota de Entellan disuelto en xilol

### 3.7.6 Análisis histológico

El análisis histológico consistió en el estudio de los diferentes elementos que integran el tejido óseo, es decir, células y sustancia intercelular.

Con especial relevancia:

1. fase de formación de hueso nuevo desarrollada por los osteoblastos que son los encargados de la síntesis de la fracción orgánica de la matriz ósea.
2. 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.
3. 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 hidroxiapatita a nivel de un plano que recibe el nombre de frente de mineralización.
4. 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.



**Figura 43.** Estación de trabajo, acoplada a Microscopio Leica. Para la toma de imágenes digitales.

El estudio histológico se ha realizado en el Laboratorio de Microscopía del Departamento de Cirugía de la Universidad de Valencia, utilizando un microscopio óptico Leica modelo DM LB2, conectado a una cámara digital Canon modelo powershot S45 de 5.0 megapixels.

Este equipo permite la visualización y obtención directa de las imágenes



### 3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico de los resultados tanto bioquímicos, como radiológicos, y TAC obtenidos en el tratamiento de P-PRP en comparación con el grupo control correspondiente a fractura cortical crítica no tratada, se ha realizado mediante programa estadístico IBM (SPSS ) statistics 22 IBM Corp. Released 2013. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. Armonk, NY: IBM Corp. y análisis gráfico GRAPH PAD y Excel.

Los análisis que se han realizado son:

#### 3.8.1 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 métodos de extracción. El grado de significación utilizado fue del 95% ( $p < 0,05$ ).

Las variables cuantitativas se describieron utilizando la media aritmética, mediana, la desviación estándar y los valores mínimo y máximo y con tamaño muestral de  $n=5$ .

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).

El análisis de la varianza permite contrastar la hipótesis nula de que las medias de más de 2 poblaciones son iguales, frente a la hipótesis alternativa de que por lo menos una de las poblaciones difiere de las demás en cuanto a su valor esperado.

En este caso se va a contrastar el análisis de resultados experimentales, en los que nos interesa comparar los resultados de 3 'tratamientos' denominados control, aloinjerto y aloinjerto+PRP con respecto a la variable dependiente. El Anova requiere del cumplimiento de los siguientes supuestos:

- Las poblaciones (distribuciones de probabilidad de la variable dependiente correspondiente a cada factor) son normales.
- Las K muestras sobre las que se aplican los tratamientos son independientes.
- Las poblaciones tienen todas igual varianza (homoscedasticidad).

Para ello hemos realizado el análisis de varianza, con p de significación  $P < 0.05$  y hemos determinado el factor Levene para contrastar la homogeneidad de varianzas  $s > 0,05$  en cada tratamiento y en cada caso.

### 3.8.2 Estudios de correlación

El coeficiente de Pearson se fundamenta en:

$$r_{xy} = \frac{\sum z_x z_y}{N}$$

Zx valor variable 1

Zy valor variable 2

N tamaño muestral a estudio.

Cuanto más intensa sea la concordancia (en sentido directo o inverso) de las posiciones relativas de los datos de dos variables a estudio, el producto del numerador toma mayor valor (en sentido absoluto). Si la concordancia es exacta, el numerador es igual a N (o a -N), y el índice toma un valor igual a 1 (o -1).

El parámetro  $D = r^2$  supone el porcentaje de datos que se ajustan a la correlación

Cuando las variables respuesta y estudio fueron cuantitativas se utilizó el coeficiente de Correlación de Pearson como medida de asociación lineal entre los parámetros a estudio y se determinó el valor de r y D.





## 4. RESULTADOS

**Ilustración 4.** Cuadro de los detalles anatómicos delineados por el célebre pintor Peter Berrettini Cortona

## 4.1 DEFECTO ÓSEO CORTICAL CRÍTICO. MODELO DE FRACTURA

Nuestro modelo experimental requiere de un defecto óseo, que sea incapaz de regenerarse por sí mismo. Para ello utilizamos un tamaño de defecto en la proporción de más de 1,5 veces el tamaño medular. Hemos utilizado 20 animales esqueléticamente maduros, hembras, en el final de su periodo de reproducción con un peso medio de  $60 \pm 4,8$  kg.

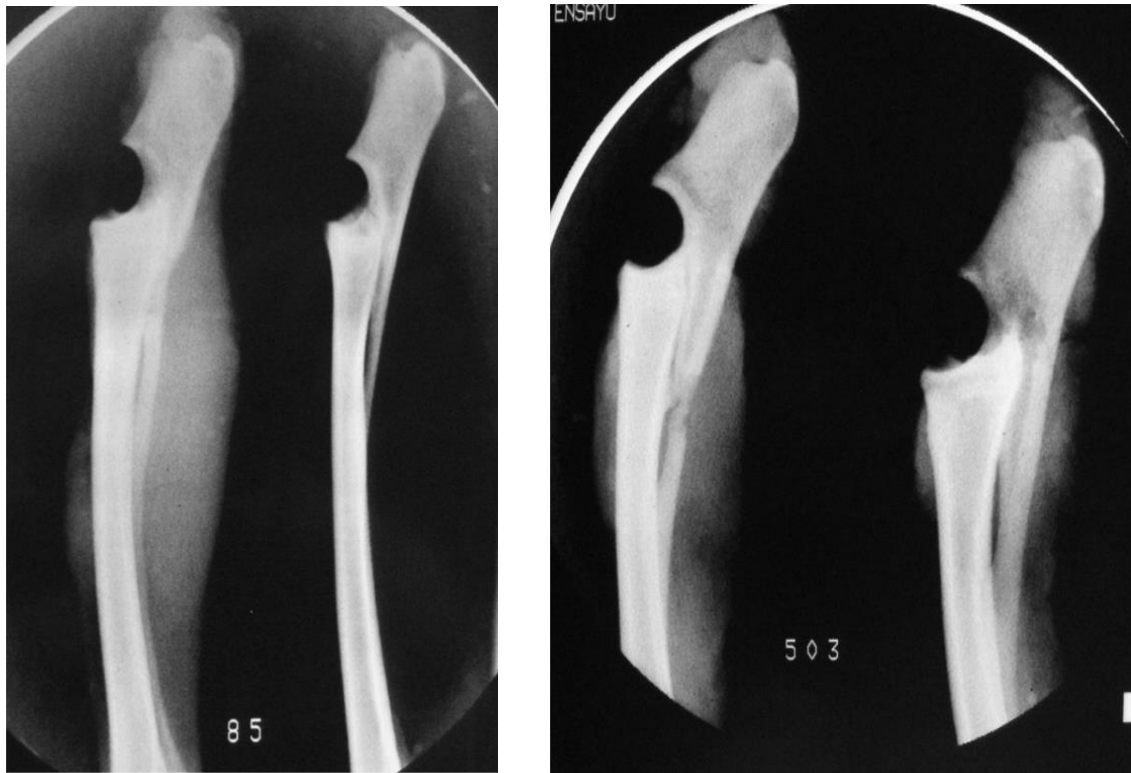
Hemos estudiado mediante evaluación radiológica Rx AP y lateral del miembro intervenido a las 8 semanas en todos los animales, la consolidación del cúbito en dos tamaños de gap correspondiente a una masa ósea de 1,4 y 2,0 cm de longitud.

Así, en la figura 44 se observa que cuando el tamaño de gap corresponde a 1,4 cm, aparece reparación completa y espontánea en el 100 % de los casos. El defecto queda consolidado a las 8 semanas. Por el contrario, cuando el defecto es de 2 cm (Figura 46), observamos que en el defecto óseo, no ha habido reparación en el 100% de los casos a las 8 semanas de evolución. Es por tanto, un defecto crítico no consolidado.

El gap de 2 cm por tanto, se comporta como defecto crítico en todos los casos, no aparece consolidación espontánea en ninguno de los estudios.

### 4.1.1 Grupo control defecto 1,4 cm

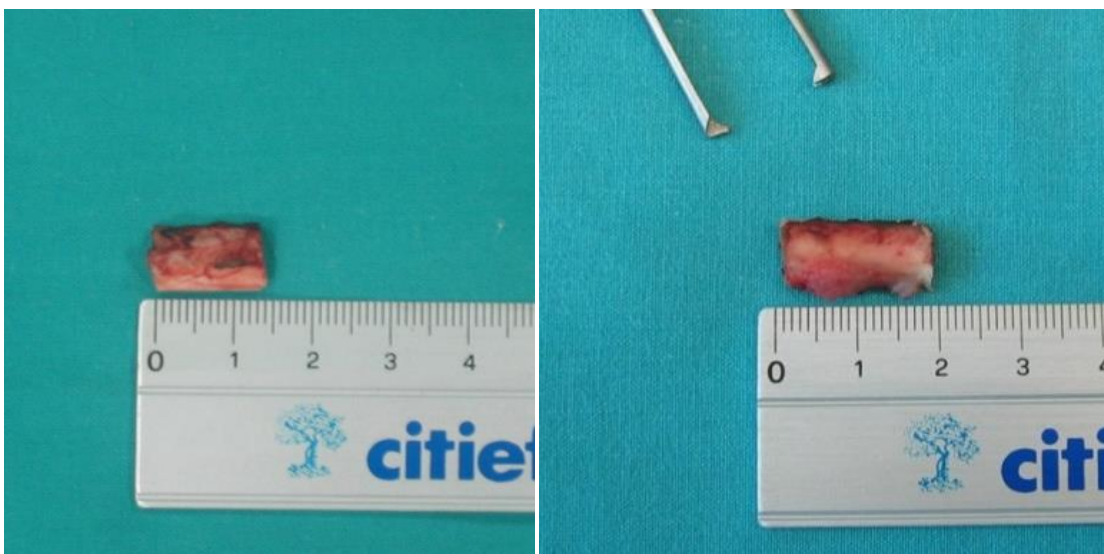
El defecto de 1,4 cm no se comporta como defecto crítico. Hubo reparación completa en el 100 % de los casos.



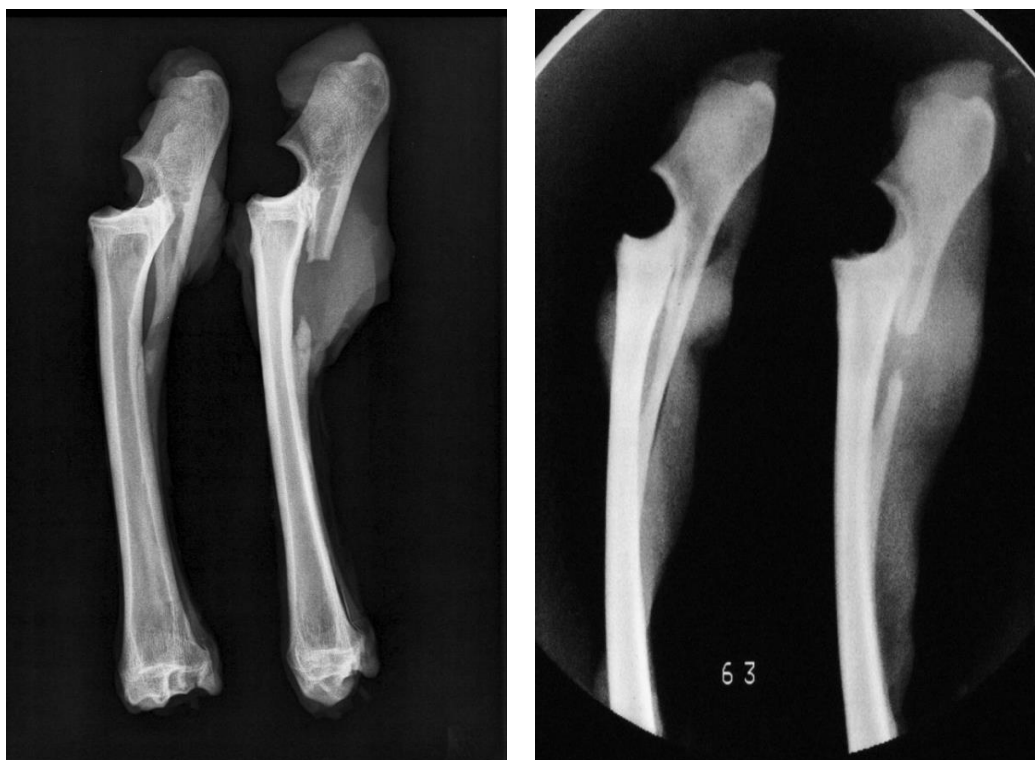
**Figura 44.** Reparación completa y espontánea en el 100 % de los casos. Defecto consolidado a las 8 semanas. Defecto de 1,4 cm observamos que no se comporta como defecto crítico

#### 4.1.2 Grupo Control defecto 2 cm

Defecto crítico no consolidado. Defecto 2 cm se comporta como defecto crítico, no ha habido reparación ósea en el 100% de los casos.



**Figura 45.** Defecto de 1,4 y 2,0 cm. Osteotomía



**Figura 46.** No hay reparación en el 100 % de los casos. Defecto no consolidado a las 8 semanas. Defecto de 2,0 cm, observamos que se comporta como defecto crítico.

Nuestro modelo de fractura para el estudio del efecto de los factores de crecimiento en la consolidación ósea, por tanto se va a basar en un defecto crítico consistente en un gap de 2 cm.

**Tabla 6.** Defecto cortical crítico

N=5 /grupo	Nº consolidaciones	% porcentaje
Grupo control gap 1,4	5	100
Grupo control gap 2,0	0	0



## 4.2 CARACTERIZACIÓN DEL PLASMA RICO EN PLAQUETAS

Como paso previo al estudio del efecto del plasma rico en plaquetas, es necesario caracterizar exactamente las condiciones experimentales del preparado plaquetario.

**Tabla 7.** Valor medio del n° de plaquetas/ $\mu$ l determinadas en sangre periférica

	muestras sangre periférica	N=5
media		$428,75 \times 10^3$
std		$41,7 \times 10^3$
c.v.		0,095

### 4.2.1 Recuento basal de plaquetas en sangre periférica

El nivel basal de plaquetas en sangre periférica según método descrito en apartado Materiales y Métodos es el siguiente: En la Tabla 7 observamos que el valor medio es de  $428,75 \times 10^3/\mu$ l con un coeficiente de variación de 9,4 % en todas la muestras analizadas.

### 4.2.2 Recuento de plaquetas en plasma rico en plaquetas

El recuento de plaquetas en PRP depende del método utilizado en su elaboración así:

La concentración de plaquetas en el plasma rico en plaquetas mediante una sola centrifugación, a partir de sangre periférica con CDA como anticoagulante, nos proporcionó valores menores al basal. Se obtuvo un mayor número de plaquetas centrifugando a 1800 rpm  
Tabla 8:

**Tabla 8.** Valor medio del n° de plaquetas/ $\mu$ l determinadas en PRP mediante una sola centrifugación

Centrifugado a	500 g	600 g	750 g
media	$123 \times 10^3$	$81 \times 10^3$	$36,5 \times 10^3$
std	$12,7 \times 10^3$	$2,8 \times 10^3$	$4,95 \times 10^3$
c.v.	0,1034	0,0349	0,135

Se hace necesario por tanto, una segunda centrifugación para concentrar las plaquetas. Así, centrifugando seguidamente a 1000 g durante 8 minutos, obtenemos valores de plaquetas hasta 300 veces el nivel basal. Tabla 9:

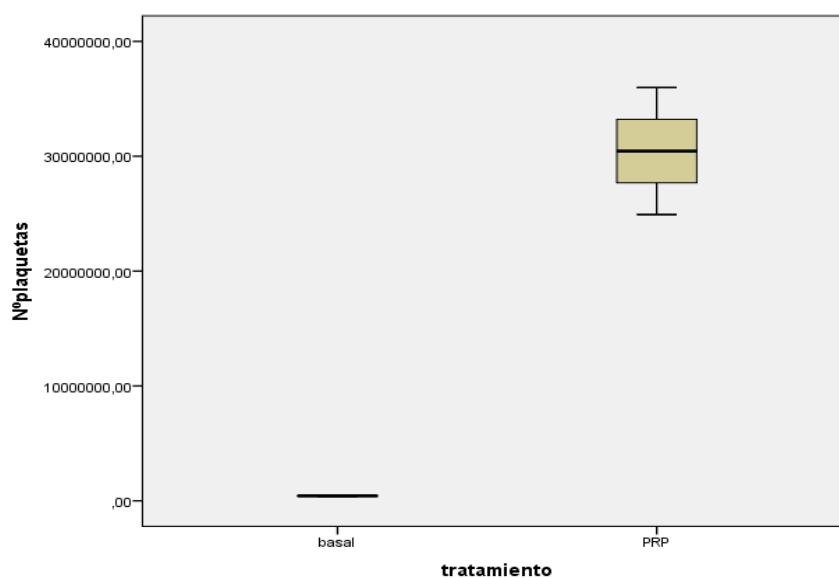
Tabla 9. Valor medio nº de plaquetas/ml con una 2ª centrifugación a 3500 rpm 8´

Primera centrifugación	500 g	600 g	750 g
Media	167,5 x 10 <sup>6</sup>	149,5 x 10 <sup>6</sup>	142,0 x 10 <sup>6</sup>
Std	30,4 x 10 <sup>6</sup>	24,7 x 10 <sup>6</sup>	19,8 x 10 <sup>6</sup>
c.v.	0,18	0,16	0,13

Claramente la segunda centrifugación sí que concentra las plaquetas de forma continua y reproducible en nuestras muestras.

Por tanto, es posible concentrar las plaquetas a niveles muy superiores al nivel fisiológico, lo cual nos permitirá aumentar la liberación de factores de crecimiento.

Teniendo en cuenta el volumen total de aplicación del PRP ( $1058,33 \pm 41,66$  cv. 3,9 % + aloinjerto (3,5 cc), proporciona una concentración final de aplicación de PRP de  $30,45 \times 10^6/\text{ml}$  en todos los animales del grupo 3. Lo que supone una ampliación de 7,1 veces el nivel basal.



Gráfica 3. Diagrama cajas para la variable número de plaquetas

La concentración de plaquetas mediante una segunda centrifugación es estadísticamente significativa con respecto al valor basal inicial con  $p < 0,05$ .

### 4.3 DETERMINACIÓN DE FACTORES DE CRECIMIENTO

En nuestro estudio, utilizamos los dos factores más directamente relacionados con el número de plaquetas PDGF y TGF  $\beta$ 1 con efectos conocidos y publicados. En un primer lugar, el **PDGF** como promotor de la quimiotaxis, importante efecto mitogénico sobre los osteoblastos como reflejo de su acción primaria en el hueso y en segundo lugar, el **TGF –  $\beta$** , que 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. Estos factores se determinaron mediante la “técnica de Elisa”.

#### 4.3.1 Determinación curva calibración: PDGF y TGF $\beta$ 1, mediante curva standard, con factores de crecimiento.

En las gráficas 1 y 2 del apartado de materiales y métodos, podemos observar como la curva de calibración para ambos factores se ajusta a una recta con un valor para el coeficiente de correlación de 0,999 para el PDGF y de 0,992 para TGF $\beta$ 1. Esto nos permite correlacionar los valores de absorción de las muestras con la concentración en plasma.

En el caso de PDGF, la relación es:

$$\text{Pgr/ml PDGF} = \text{Abs}_{450\text{nm}}/0,0011 + 16,5 \quad r^2=0,999$$

En el caso de TGF  $\beta$  la relación es:

$$\text{Pgr/ml TGF}\beta = \text{Abs}_{450\text{nm}}/0,0007 + 80,4 \quad r^2=0,9928$$

Los valores basales obtenidos en sangre periférica para el PDGF y TGF  $\beta$ 1 se corresponden con valores de 281,312 pgr/ml y 785,48 pgr/ml respectivamente. Siendo casi 3 veces más abundante el TGF $\beta$ 1. Valores extraídos de la Tabla 10.

Tabla 10. Contenido basal factores crecimiento en sangre periférica

	media	std	c.v.
PDGF pgr/ml	281,31	12,79	0,045
TGF $\beta$ 1 pgr/ml	785,48	96,94	0,123

#### 4.4 DETERMINACIÓN DE FACTORES DE CRECIMIENTO EN PRP ACTIVADO CON TROMBINA Y CLORURO CÁLCICO

La liberación de los factores de crecimiento por parte de las plaquetas en el plasma rico en plaquetas, se realiza mediante la activación del plasma ante la presencia del ion Calcio. Para producir una textura estable, en nuestro trabajo hemos utilizado  $\text{CaCl}_2$  10 % + 1000 U Trombina exógena para activar las plaquetas y los residuos de fibrina. Un exceso de trombina genera la degranulación irreversible de las plaquetas con la pérdida de integridad de las plaquetas y la consecuente liberación de factores de crecimiento de forma inmediata. Así, en la Tabla 11 observamos que la liberación de PDGF supera los niveles basales en un rango de 1,5-1,9 veces dependiendo de la velocidad de centrifugación. Obteniendo el mejor resultado cuando centrifugamos a 500 g. Gráfica 12.

Tabla 11. Cinética de Liberación de PDGF

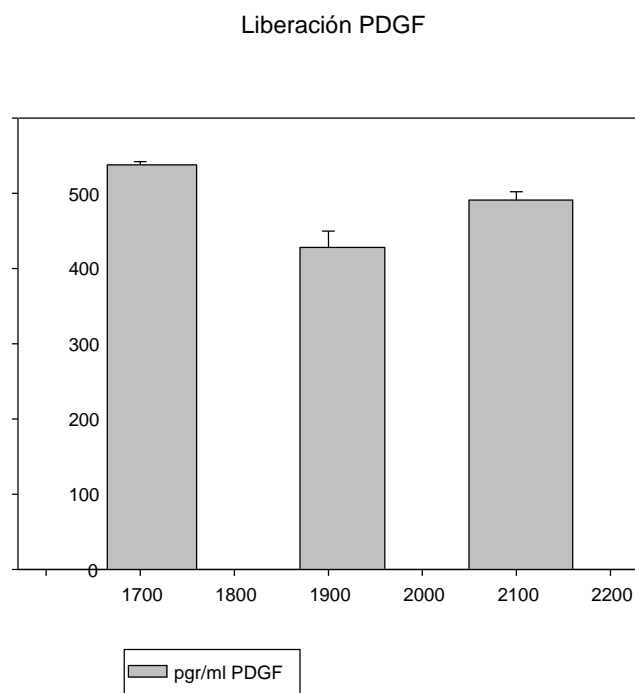
500 g	media	std	c,v,	pgr/ml liberados	%
10 min	505,0	27,0	5,49	256,0	93,88
60 min	518,4	27,0	5,3		96,37
180 min	537,9	4,3	0,8	1,9 veces	100,0
<b>600 g</b>					
10 min	470,7	2,01	0,42	189,39	100,0
60 min	454,06	19,7	4,3		96,46
180 min	427,82	21,69	5,06	1,5 veces	91,02
<b>750 g</b>					
10 min	449,77	30,5	6,78	209,58	91,62
60 min	489,88	22,7	4,63		99,79
180 min	490,89	11,09	2,26	1,7 veces	100,0

La liberación del PDGF no se realiza de forma homogénea y sostenida en el tiempo de forma que en los primeros 10 minutos, aparece la descarga de más de 90 %, completándose hasta el 100 % liberado a las 3 horas de la activación. Tabla 11 y Gráfica 14.

De igual manera al PDGF, el factor TGF  $\beta$ 1 aumenta hasta 8 veces el valor basal determinado en sangre periférica cuando centrifugamos a 1800 rpm. Tabla 12

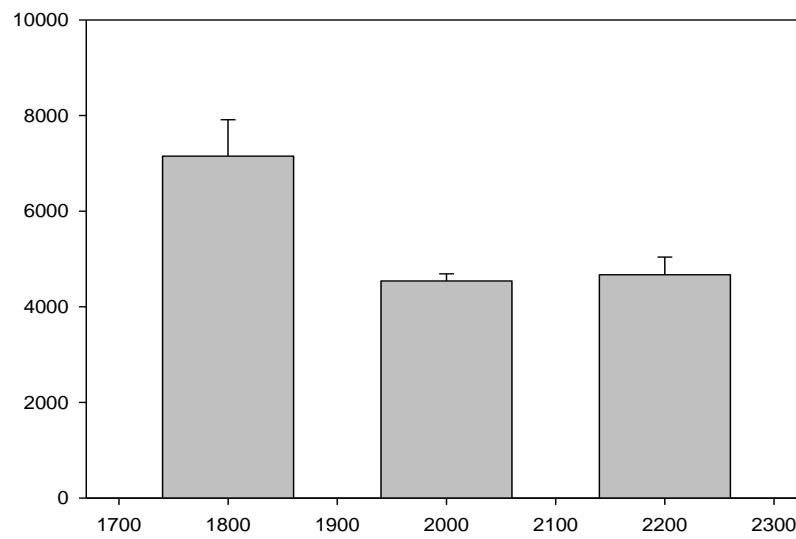
La máxima liberación de TGF  $\beta$ 1 se produce cuando centrifugamos a 500 g., Gráfica 5

La liberación de TGF  $\beta$ 1 con respecto al tiempo tras la activación, se produce de forma más lenta liberándose a los 10 minutos más de un 65 % hasta completar el 100 % a las tres horas Tabla 12.

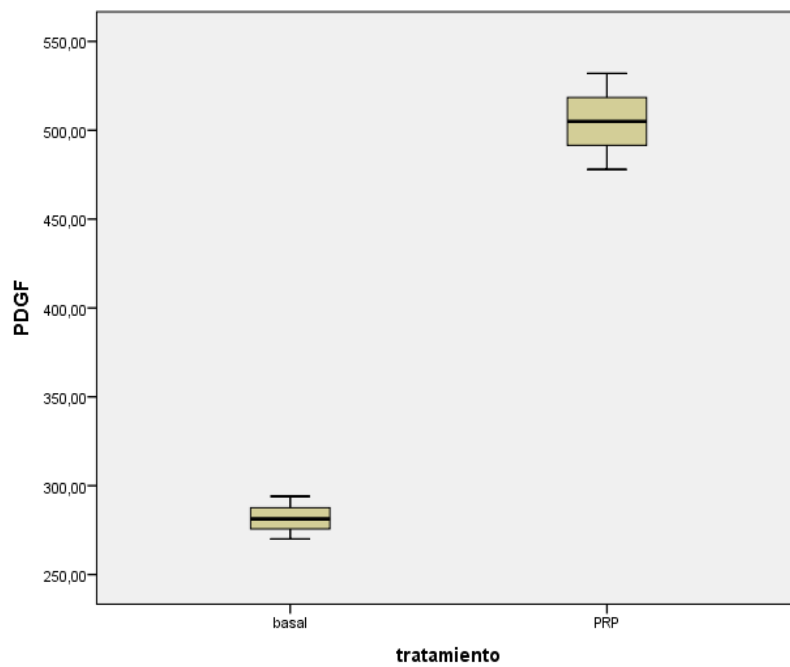


**Gráfica 4.** Liberación total de PDGF según velocidad de sedimentación

<b>Tabla 12.</b> Cinética de liberación de TGF $\beta$ 1					
<b>500 g</b>	<b>media</b>	<b>std</b>	<b>c.v.</b>	<b>Pgr/ml liberados</b>	<b>% liberado</b>
10 min	4697	900	19,0	6365	65,69
60 min	4944	49	0,9	8 veces	69,14
180 min	7150	762	10,0		100,0
<b>600 g</b>					
10 min	3724	200,0	5,3	3754	82,04
60 min	3935	65,5	1,6	4,7 veces	86,69
180 min	4539	150	3,3		100,0
<b>750 g</b>					
10 min	4324	198,0	4,5	3886	92,57
60 min	4772	250,0	5,2	4,9 veces	102,1
180 min	4671	368	7,8		100,0

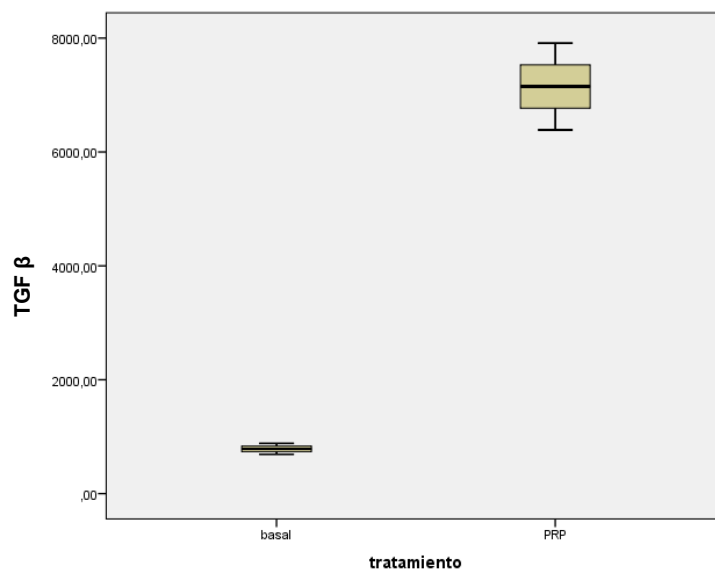


Gráfica 5. Liberación total de TGF  $\beta$ 1 según velocidad de sedimentación



Gráfica 6. Diagrama cajas para la variable cantidad PDGF

La liberación de PDGF, tras la activación es estadísticamente significativa con respecto al valor basal inicial con  $p < 0,05$



Gráfica 7. Diagrama cajas para la variable cantidad TGF  $\beta$ 1

La liberación de TGF  $\beta$ 1 tras la activación es también estadísticamente significativa con respecto al valor basal inicial con  $p < 0,05$

Tabla 13. Análisis Anova  $\alpha = 0,05$

Parámetro	F	p
Nº plaquetas	88,41	0,001*
PDGF	171,21	0,000197*
TGF $\beta$ 1	205,95	0,000137*

Tabla 14. Homogeneidad varianzas  $\alpha = 0,05$

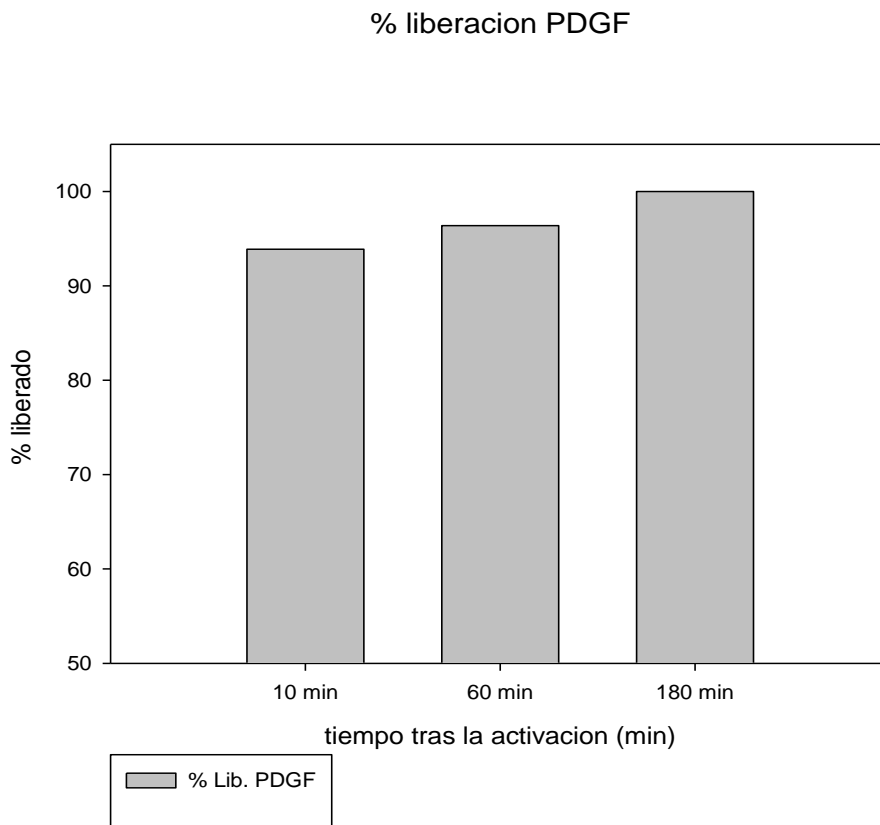
Parámetro	F	p
Nº plaquetas	3,939*	0,118*
PDGF	1,012*	0,371*
TGF $\beta$ 1	2,998*	0,158*

#### 4.4.1 Cinética de liberación de los factores de crecimiento

Se estudia la liberación de factores de crecimiento tras la activación durante un periodo de tiempo de hasta 3 horas. Observándose una descarga de factores de crecimiento diferente para el PDGF y TGF.

##### 4.4.1.2 PDGF

La descarga de PDGF se produce mayoritariamente en los primeros 10 minutos, alcanzándose más de un 90 % de todos los factores liberados en 180 min.



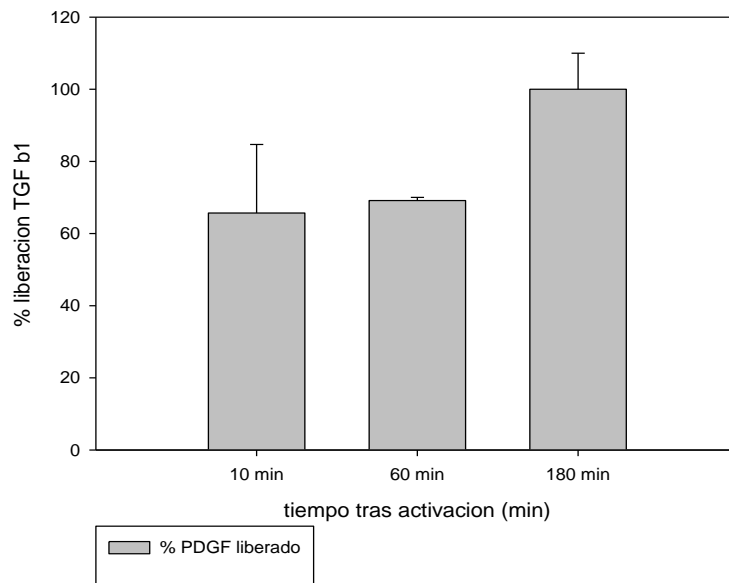
**Gráfica 8.** Liberación PDGF tras la activación con trombina y CaCl<sub>2</sub> 10%

A intervalos de tiempo superiores no se observó más liberación de factores de crecimiento.

##### 4.4.1.3 TGF

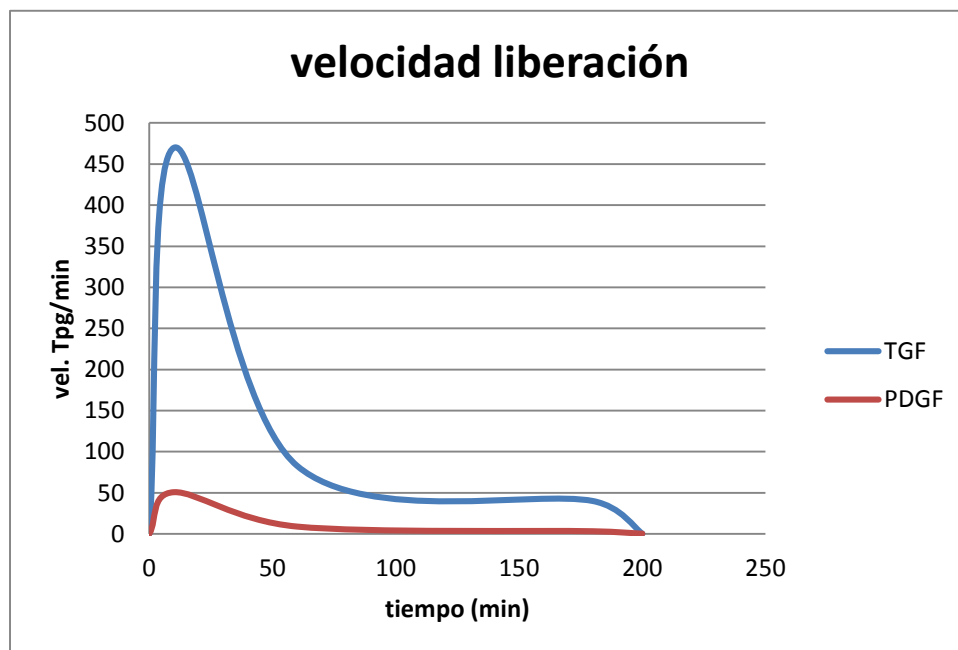
La liberación de TGF, presenta una cinética más sostenida en el tiempo, alcanzándose el máximo a las 180 min.





**Gráfica 9.** Liberación TGF  $\beta$ 1 tras la activación con trombina y  $\text{CaCl}_2$

La velocidad de liberación de factores de crecimiento se puede observar como la descarga inicial en los primeros 10 minutos. Alcanzando el máximo del proceso de liberación.



## 4.5. ESTUDIO DE LA CORRELACIÓN ENTRE EL NÚMERO PLAQUETAS Y FACTORES DE CRECIMIENTO LIBERADOS

Como podemos observar en la Tabla 15, a mayor cantidad de plaquetas, mayor cantidad de factores de crecimiento liberados. Pero ¿esta relación es lineal, es decir, es dependiente de la concentración?

El ajuste lineal nos indica que parece existir una correlación no lineal, con un valor de coeficiente de correlación de: 0,8845 para PDGF y de -0,8855 para TGF  $\beta$ 1. (Tabla 16). En ambos casos, podemos afirmar, que la liberación de factores de crecimiento es dependiente del aumento de la concentración de plaquetas en el plasma rico en plaquetas.

Tabla 15. Contenido total

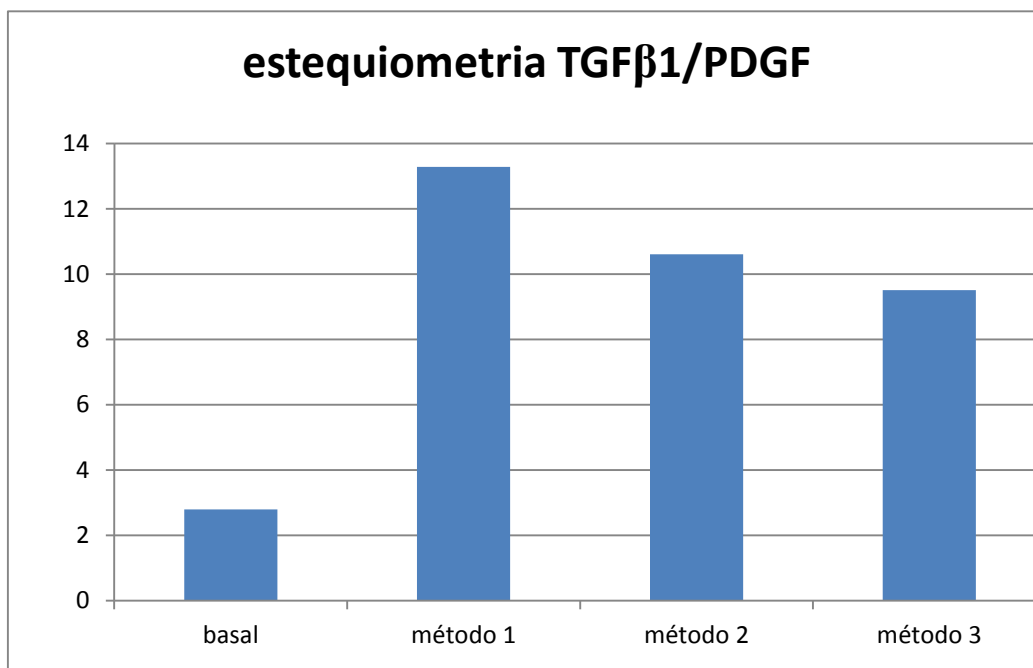
	Nº plaquetas totales	Pgr/ml PDGF	Pgr/ml TGF $\beta$ 1
basal	428,75	281	785,48
método 1	1675000	537,9	7150
método 2	1495000	427,82	4539
método 3	1420000	490,89	4671

### 4.5.1 Estequiometría TGF $\beta$ 1/PDGF

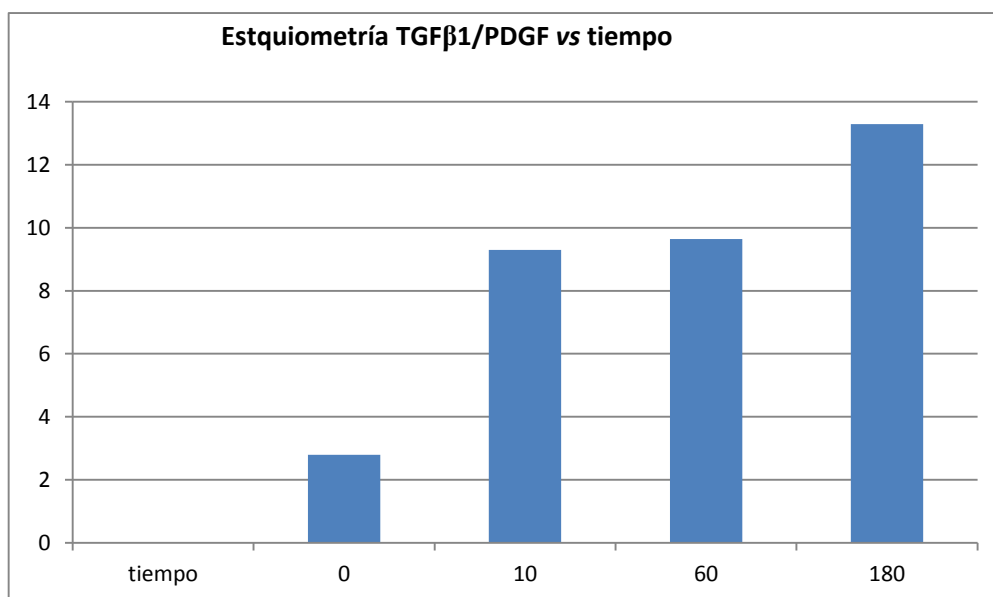
Si estudiamos en cambio la relación entre los picogramos (Pgr) liberados de factores de crecimiento entre sí, vemos que depende del método de concentración de plaquetas que se ha utilizado.

La estequiometría entre los factores de crecimiento con respecto al método de concentración de plaquetas utilizado no es constante, como se puede observar si centrifugamos a 500g, el rendimiento en la liberación de factores de crecimiento es mayor.

La estequiometría entre TGF  $\beta$ 1/PDGF incrementa constantemente en los primeros 180 min TGF  $\beta$ 1 es liberado en mayor proporción hasta 13 veces más que el PDGF, en el mismo periodo de tiempo tras la activación del PRP (Gráfica 12).



**Gráfica 11.** Estequiometría TGF  $\beta$  1 vs PDGF. Relación de factores de crecimiento



**Gráfica 12.** Variación de la estequiometría de factores vs tiempo

#### 4.5.2 Estudio de correlación estadístico.

La liberación de factores de crecimiento está relacionada con el número de plaquetas, (Coeficiente. Pearson 0,9244 y 0,933 respectivamente) y la liberación de PDGF está relacionada con la liberación de TGF- $\beta$ 1-de forma dependiente (Coeficiente de Pearson R = 0,9605).

La regresión lineal ente número de plaquetas vs factores de crecimiento liberados se acerca a la unidad ( $r^2 = 0,8845$  y  $0,8847$ ).

**Tabla 16.** Estudio de Correlación plaquetas vs factores crecimiento

	X(plaquetas)	Y1(PDGF)	Y2(TGFb1)
	Rx,y1	Rx,y2	Ry1,y2
<b>Coeficiente de Pearson</b>	<b>0,9244*</b>	<b>0,933*</b>	<b>0,9605*</b>
<b>Significación T student test P&lt;0,05</b>	0,26	0,2535	0,1959
<b>Significación T student test P&lt;0,01</b>	0,33	0,3145	0,2431
<b>Regresión lineal</b>		R <sup>2</sup> =0,8845	R <sup>2</sup> =0,8847

## 4.6 ESTUDIO DEL EFECTO DEL PRP EN LA CONSOLIDACIÓN DE FRACTURA DEFECTO ÓSEO CRÍTICO.

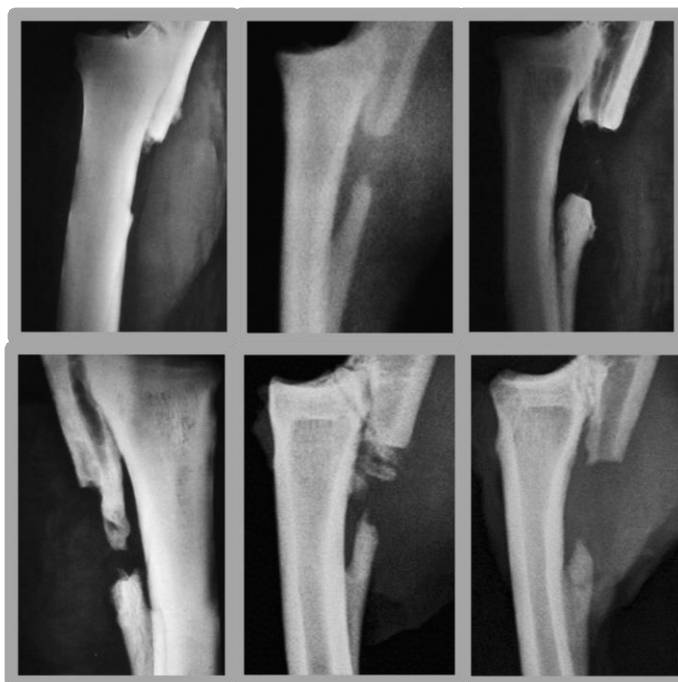
En este apartado se ha estudiado el efecto que tiene el P-PRP en la consolidación ósea, en las condiciones de nuestro estudio mediante, la valoración radiológica Rx, TAC, y parámetros histomorfométricos, como son volumen callo fractura, distancia entre bordes de fractura, calidad trabecular, (grosor trabecular thickness) en todos los grupos a estudio y parámetros geometría trabecular (conectividad, aplanamiento anisotropía, esqueleto trabecular y dimensión fractal),

### 4.6.1 Evaluación radiológica de la consolidación defecto cortical crítico.

Para la evaluación radiológica de la consolidación, se realizará una Rx AP y lateral del miembro torácico intervenido, a las 8 semanas en todos los animales para evaluar la consolidación del cubito.

#### 4.6.1.1 Grupo control

Las imágenes radiográficas, presentan distinto grado de consolidación parcial, sin llegar a la regeneración total en ninguno de los casos estudiados. El modelo de

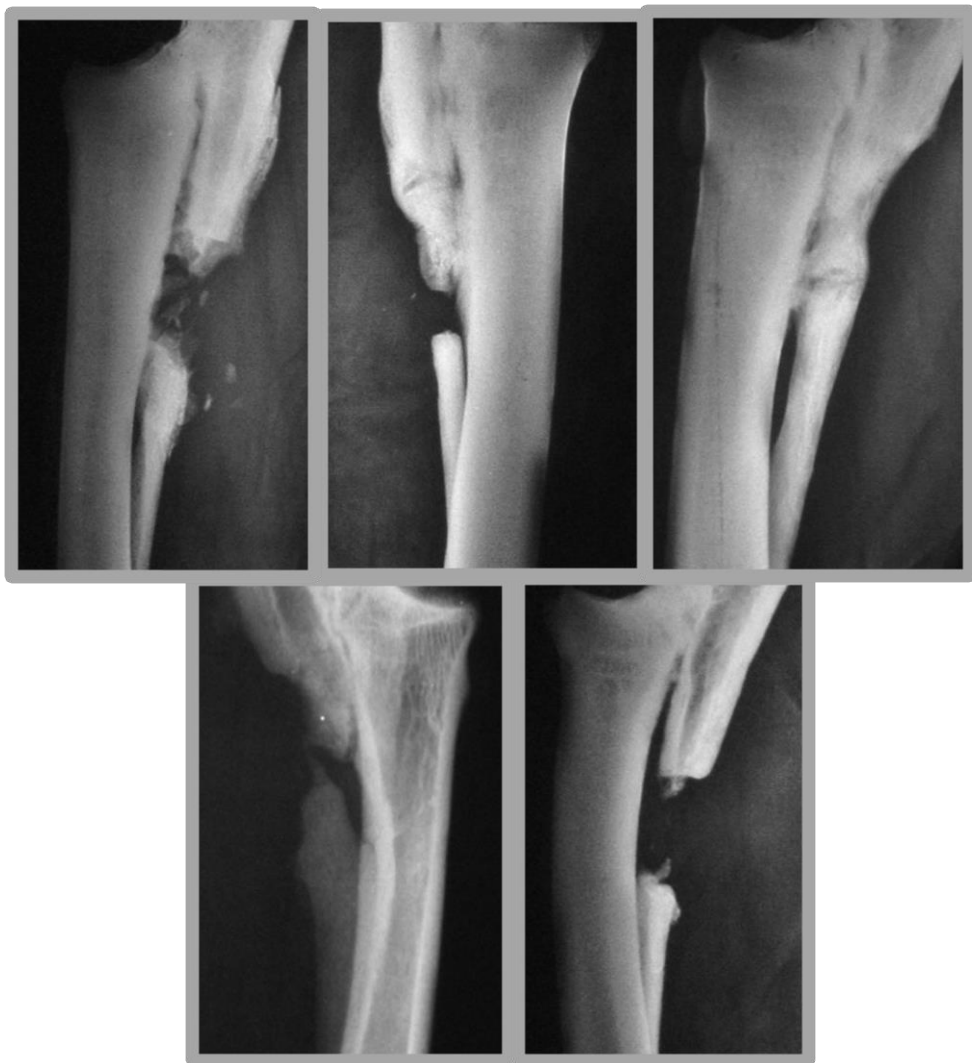


**Figura 47.** No hay reparación en el 100% de los casos a las 8 semanas de evolución. Es por tanto un defecto crítico no consolidado.

fractura de defecto óseo crítico, fue funcional en todos los animales del grupo control estudiados.

#### 4.6.1.2 Grupo aloinjerto

En el grupo aloinjerto, se observa una mayor consolidación y regeneración del callo de fractura en todos los casos estudiados, incluso se alcanzó consolidación total en uno de los animales estudiados. Obsérvese como algunas de las esquirlas del injerto, están integradas en el callo de fractura.



**Figura 48.** Se observa que al añadir al defecto óseo masa de hueso córtico-esponjoso, aparece consolidación parcial, con regeneración de hueso nuevo.

#### 4.6.1.3 Grupo aloinjerto+ PRP

En el grupo aloinjerto+ PRP, se observa también una mayor consolidación que en el grupo control y aparece regeneración del callo de fractura en todos los casos estudiados, incluso se alcanzó también consolidación total en uno de los animales estudiados. Obsérvese como algunas de las esquirlas del injerto, están integradas en el callo de fractura. De forma visual no se observan diferencias con respecto a la evolución del grupo de aloinjerto.



**Figura 49.** Se observa que al añadir al defecto óseo masa de hueso córtico esponjoso, PRP aparece también consolidación parcial, con regeneración de hueso nuevo, pero no modifica el efecto del aloinjerto.

#### 4.6.2 Evaluación TAC de la consolidación del defecto cortical crítico de 2 cm

Tabla 17. Estudio consolidación de fractura						
N=5 grupo	consolidación total	% porcentaje	consolidación parcial	% porcentaje	No consolidación	% porcentaje
Grupo control	0	0	0	0	5	100
Aloinjerto	1	20	4	80	0	0
Aloinjerto +P-PRP	1	20	4	80	0	0

La consolidación total se produce en un 20 % de los casos, mediante la adición de aloinjerto, como aditivo, no mejorando en nada la adición de PRP.

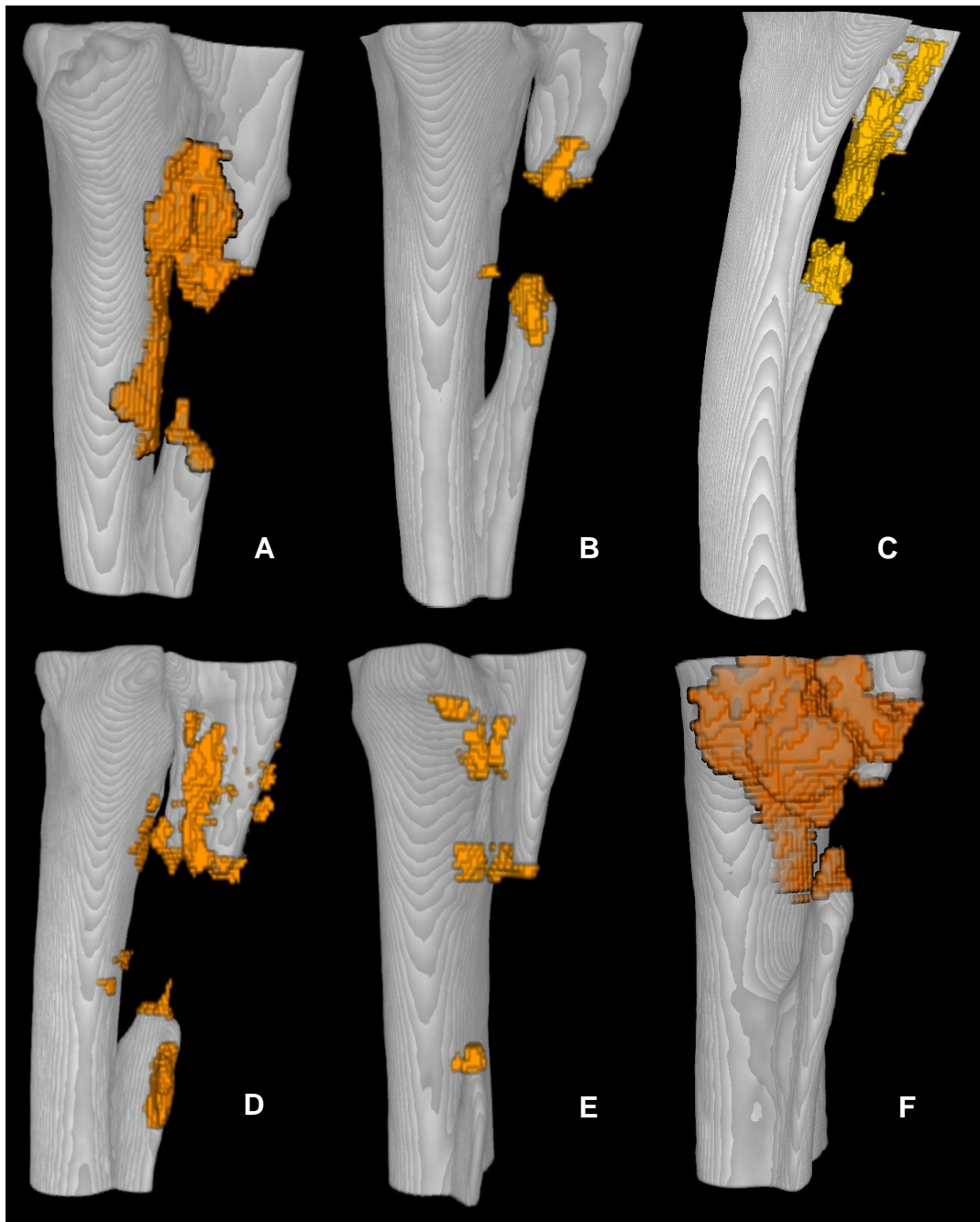
Tabla 18. Criterios de consolidación	
No consolidación distancia entre bordes de fractura	> 10 mm
Consolidación parcial distancia entre bordes de fractura	1>x>10 mm
Consolidación total distancia entre bordes de fractura	< 1 mm



#### 4.6.2.1 RECONSTRUCCIÓN 3D DEL CALLO DE FRACTURA.

##### *Grupo Control:*

En todos los casos se observa la aparición de callo de fractura en estadio temprano con consolidación muy débil. Sin alcanzar en ningún caso la consolidación completa. En cualquier caso obtenemos un callo primario. El intento de regeneración

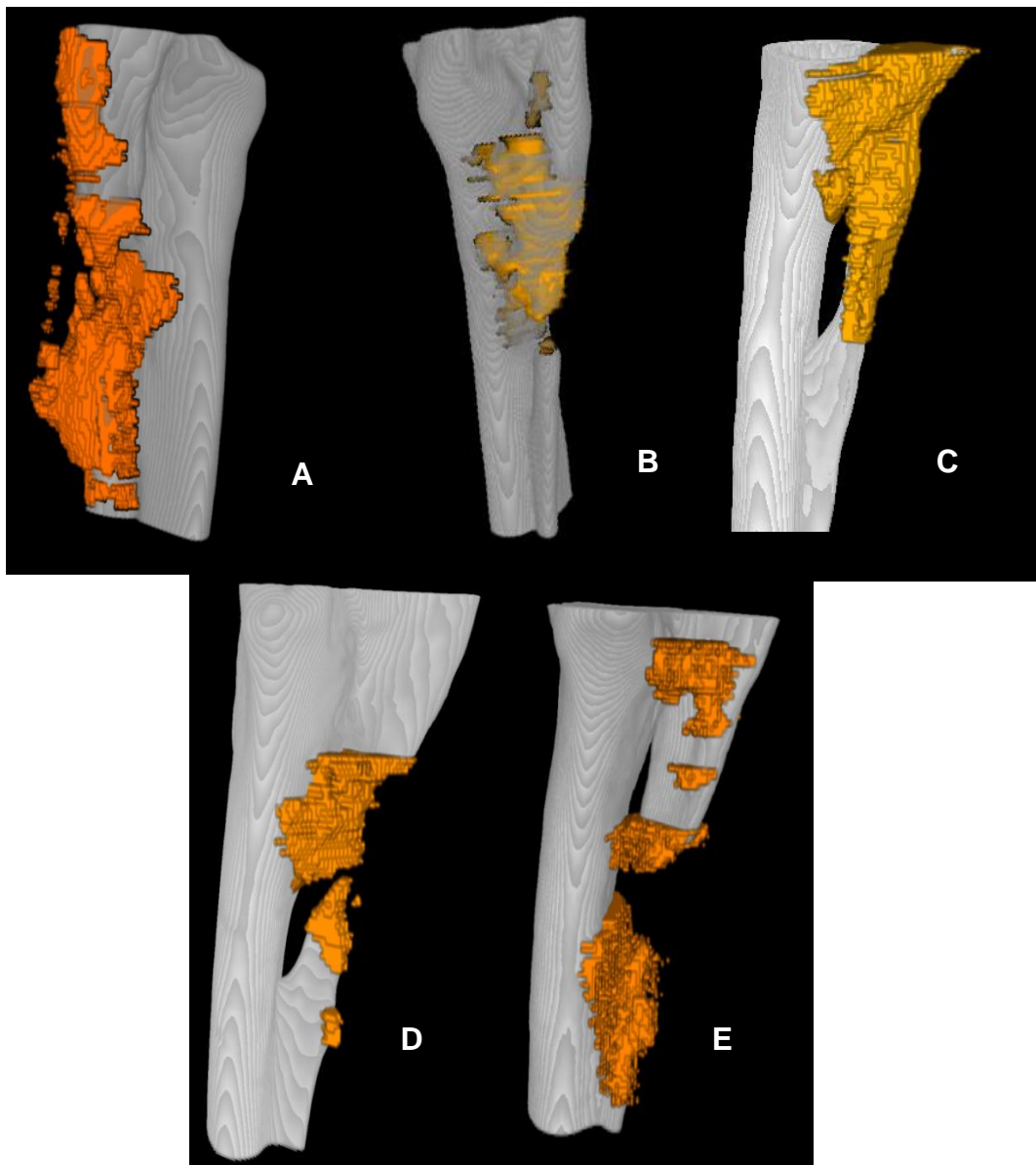


**Figura 50.** Reconstrucción 3D del callo de fractura. A 47, B 63, C 501, D 95, E 506, F 535

ósea resultará en la formación de tejido fibroso, en vez de hueso, aunque siempre existe cierta cantidad de regeneración ósea desde los bordes del defecto.

### ***Grupo aloinjerto***

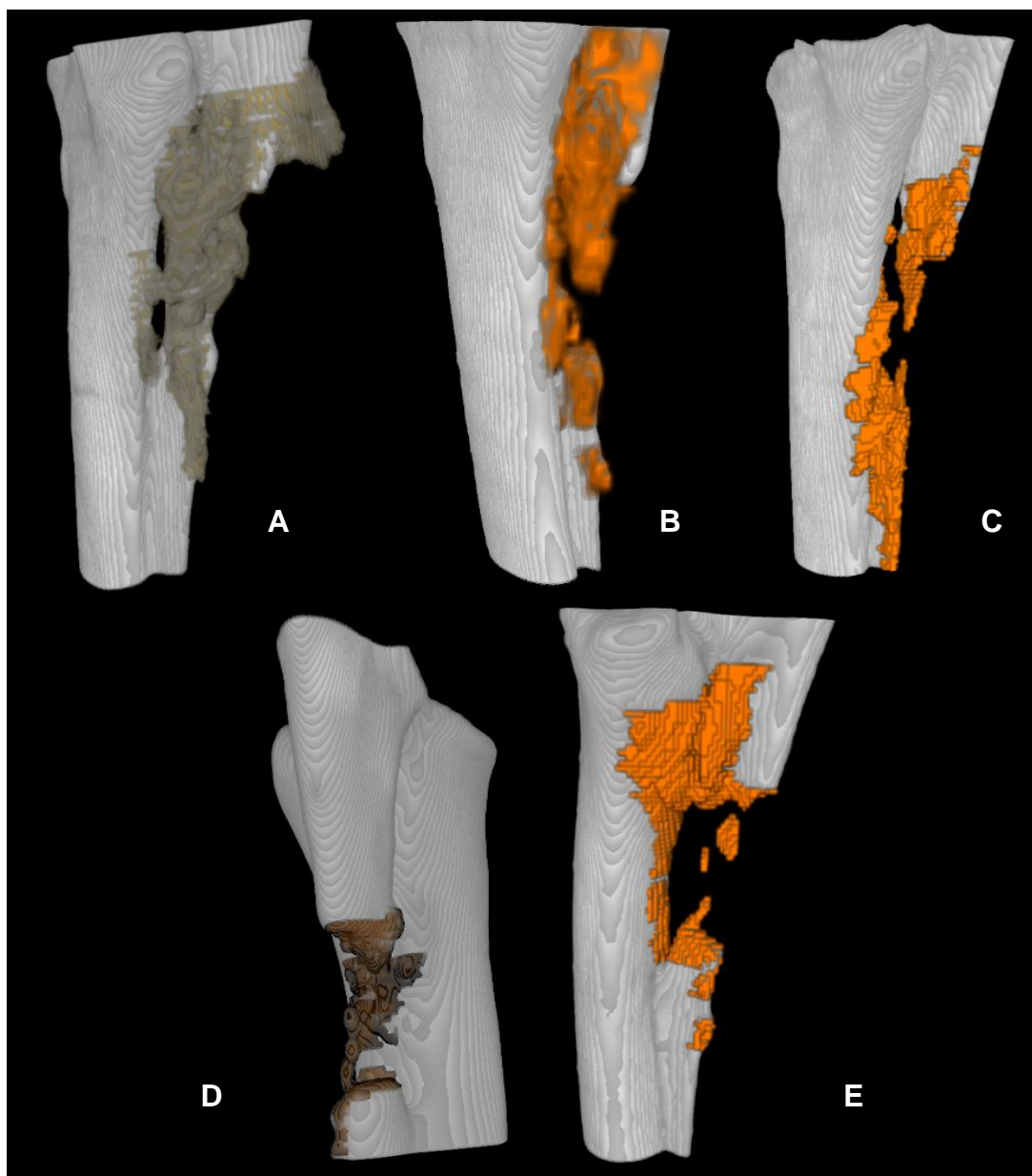
Se observa una mayor consolidación, en cuanto al tamaño y volumen del callo de fractura, obteniéndose una consolidación total en uno de los casos. Los callos tienen mayor volumen y presentan un estadio de consolidación con callo secundario.



**Figura 51.** Reconstrucción 3D del callo de fractura. A 97, B 118, C 75, D 508, E 520

**Grupo Aoinjerto+P-PRP**

Como en el caso interior, también se observa una mayor consolidación, en cuanto al tamaño y volumen del callo de fractura, obteniéndose una consolidación total en uno de los casos. Los callos tienen mayor volumen y presentan un estadio de consolidación secundaria. No se observa, un comportamiento distinto al grupo de aloinjerto, aunque el volumen del callo es menor.



**Figura 52.** Reconstrucción 3D del callo de fractura A 73, B 88, C 102, D 519, E 524

## 4.6.2.2 VARIABLES HISTOMORFOMETRICOS

## VOLUMEN CALLO DE FRACTURA

El volumen del callo de fractura, se obtuvo mediante la segmentación del callo de fractura, seleccionando ROI (región of interes) correspondientes al callo de fractura, las unidades de medida han sido  $\text{mm}^3$ . Y los parámetros determinados son BV (volumen callo fractura), TV (volumen total área de estudio) y BV/TV, fracción callo fractura en volumen de estudio.

Tabla 19. Muestras Control	BV ( $\text{mm}^3$ )	TV ( $\text{mm}^3$ )	BV/TV
stackcallus47	841,729	185394,8	0,005
stackcallus63f	123,149	199450,5	6,17E-04
stackcallus501	382,332	176923,8	2,00E-03
stackcallus95	789,591	274646,3	3,00E-03
stackcallus535	120,59	1,56E+05	7,75E-04
stackcallus506	1371,269	188231,4	7,00E-03

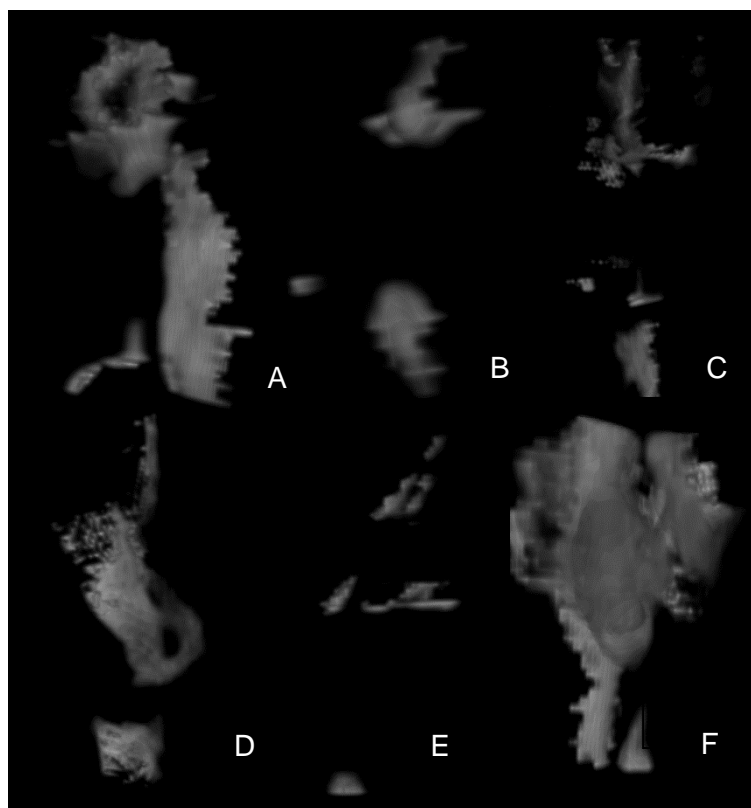
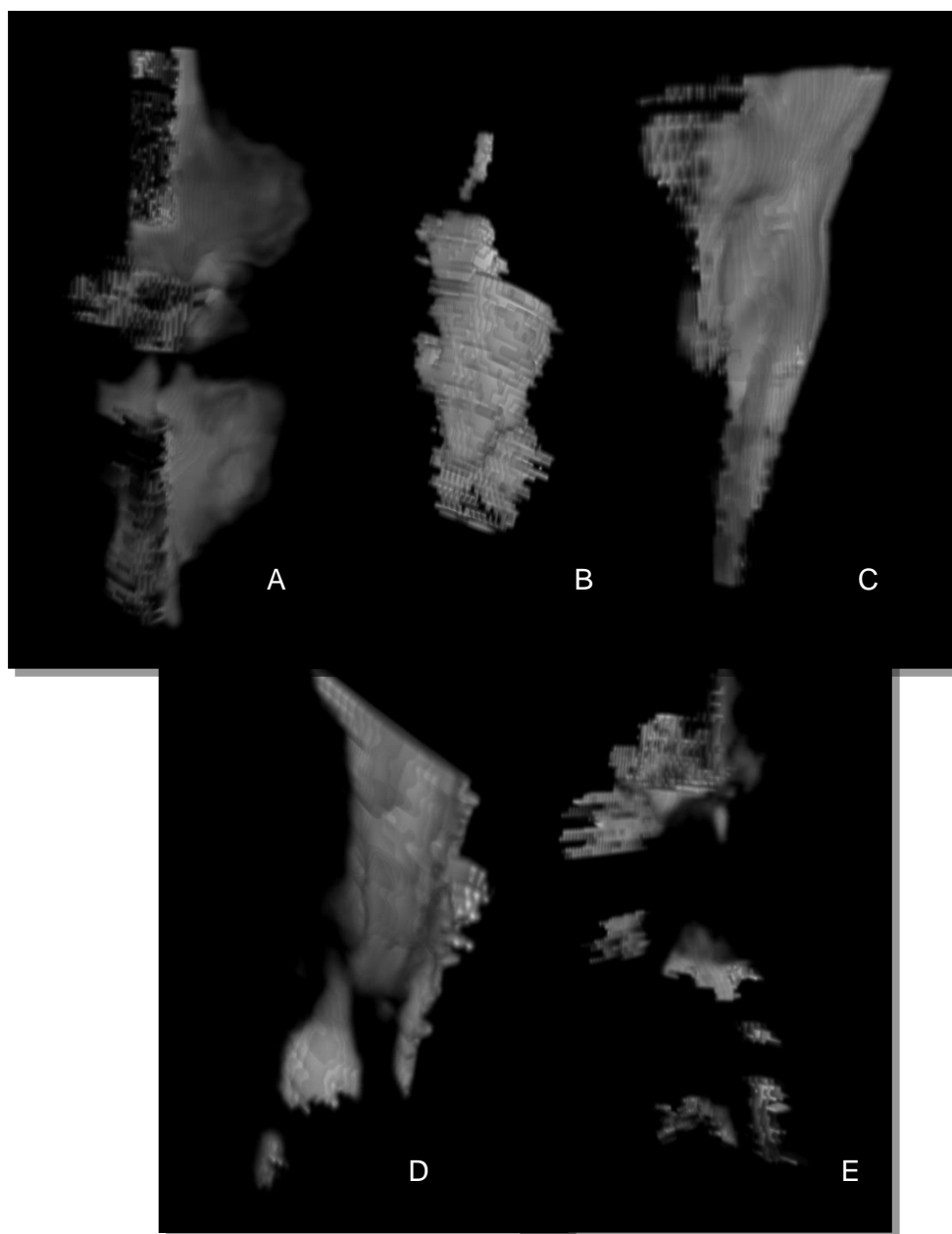
*Grupo control*

Figura 53. Callos de fractura control. A 47, B 63, C 501, D 95, E 535, F 506

*Grupo Aloinjerto*

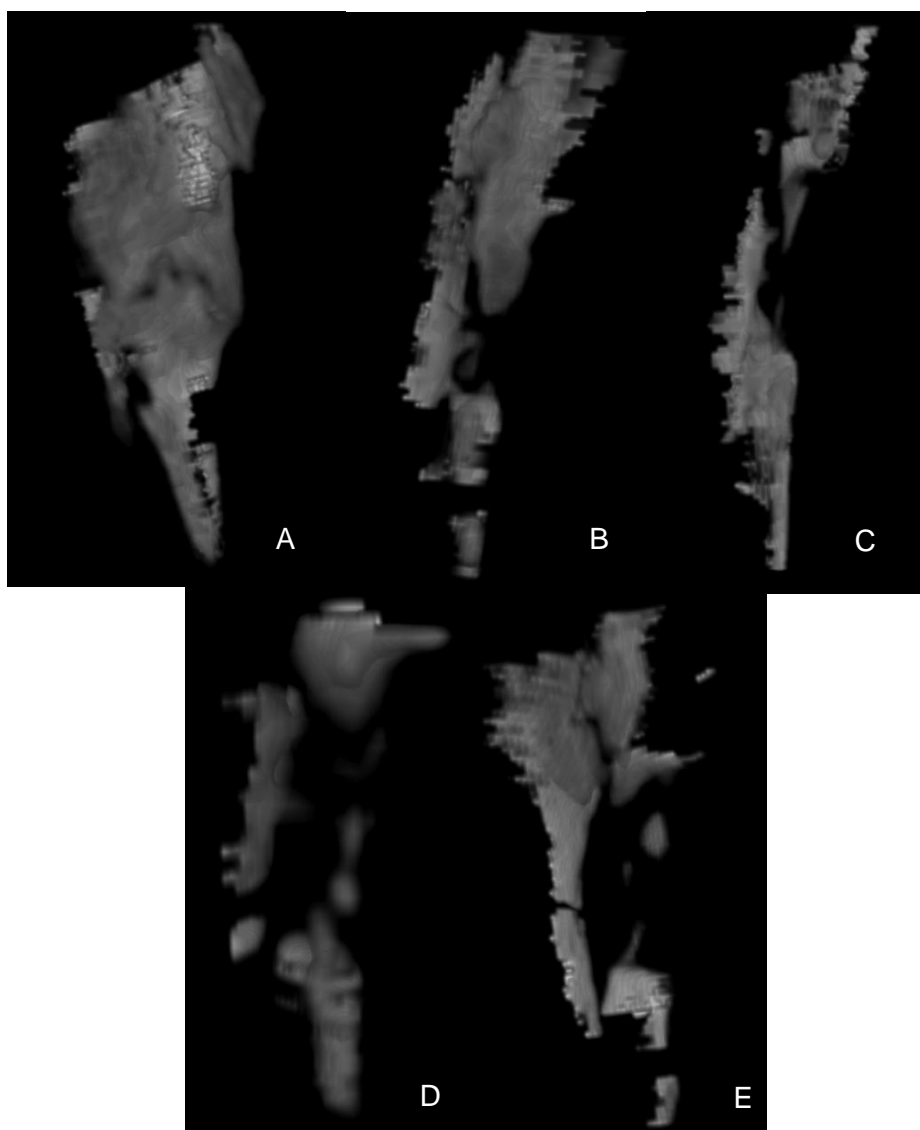
Tabla 20: Aloinjerto	BV (mm <sup>3</sup> )	TV (mm <sup>3</sup> )	BV/TV
stackcallus97	4918,804	240124,8	0,02
stackcallus118	1707,27	185154	0,009
stackcallus75	2440,264	354985	0,007
stackcallus508	1324,661	172867,8	0,008
stackcallus520	947,729	167413,3	0,006



**Figura 54.** Callos de fractura. Aloinjerto. A 97, B 118, C 75, D 508, E 520

*Grupo Aloinjerto+Prp*

Tabla 21. aloinjerto + PRP	BV (mm <sup>3</sup> )	TV (mm <sup>3</sup> )	BV/TV
stackcallus75	4092.934	253478,5	0,016
stackcallus88	1612.414	179010,6	0,009
stackcallus102	1094,999	201067,1	0,005
stackcallus519	605.992	325776,3	0,002
stackcallus524	1115,285	185741,1	0,006

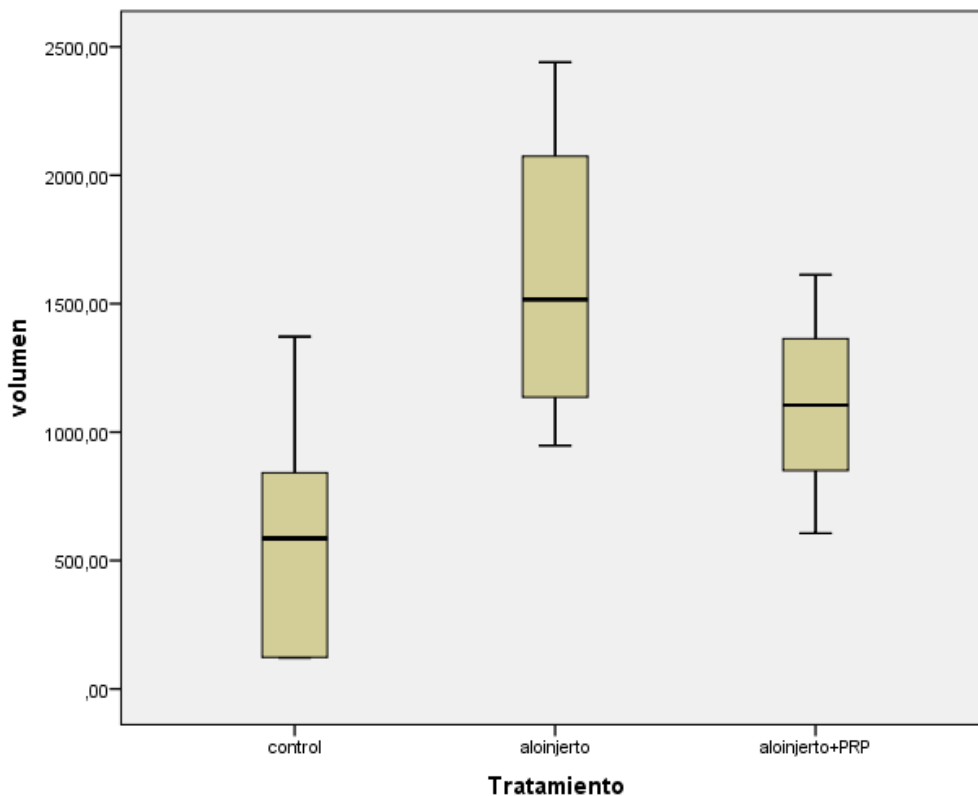


**Figura 55.** Callos de fractura. Aloinjerto + PRP. A 75, B 88, C 102 D 519 E 524

Tabla 22. Volumen del callo de fractura consolidación parcial

grupos	Media BV (mm <sup>3</sup> )	Desv std	Media BV/TV	Desv std
control	604,77	343,48	0,003	0,002
aloinjerto	1452,09	559,54	0,01	0,005
aloinjerto+ PRP	1108,07	357,53	0,007	0,005

Se puede observar que el volumen del callo de fractura, depende del tratamiento, aumentando mucho en el caso de aloinjerto, y perdiendo volumen con la adición de P-PRP.



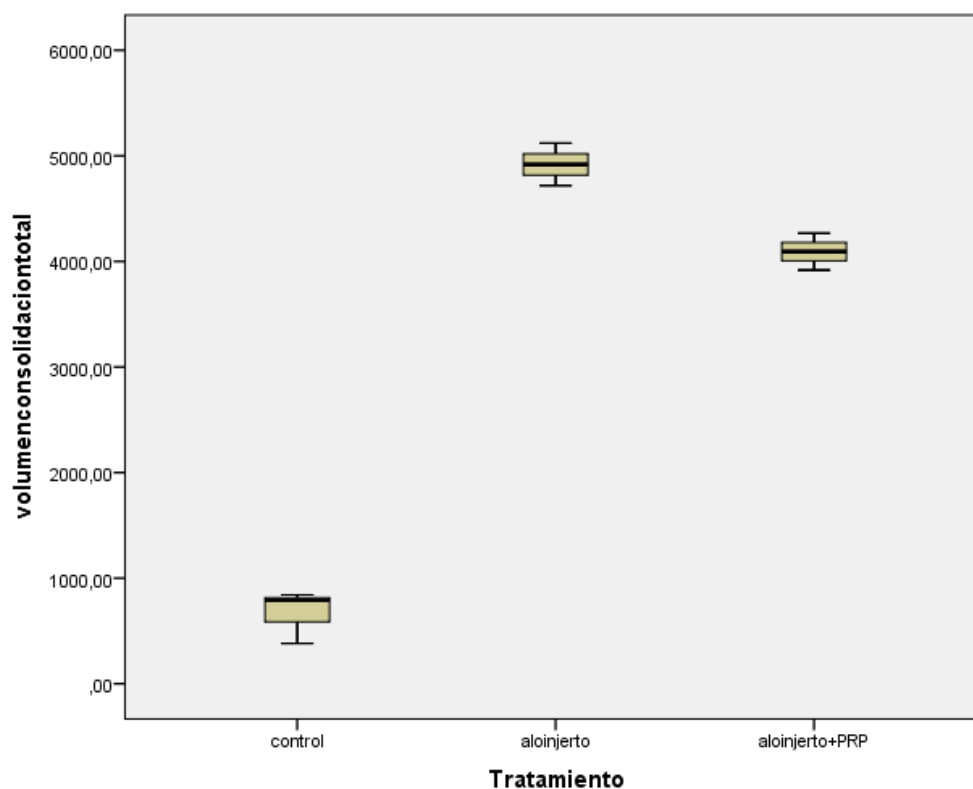
Gráfica 13. Diagrama cajas para la variable volumen de callo

Se observa, la representación de 3 poblaciones distintas los volúmenes del callo de fractura depende del tratamiento.

Tabla 23. Volumen del callo de fractura consolidación total

grupos	Media (mm <sup>3</sup> )	Desv std
control	*	*
aloinjerto	4918.804	201.5
aloinjerto+ PRP	4092.934	174,5

El volumen del callo en consolidación total es mucho mayor en el grupo de aloinjerto, observándose un efecto inhibitor en cuanto a la presencia de PRP



Gráfica 14. Diagrama cajas para la variable volumen de callo consolidación total

En el diagrama de cajas se observa que en la consolidación total, también depende del tratamiento, la adición de PRP, supone callos de menor volumen.



**DISTANCIA ENTRE BORDES DE FRACTURA.**

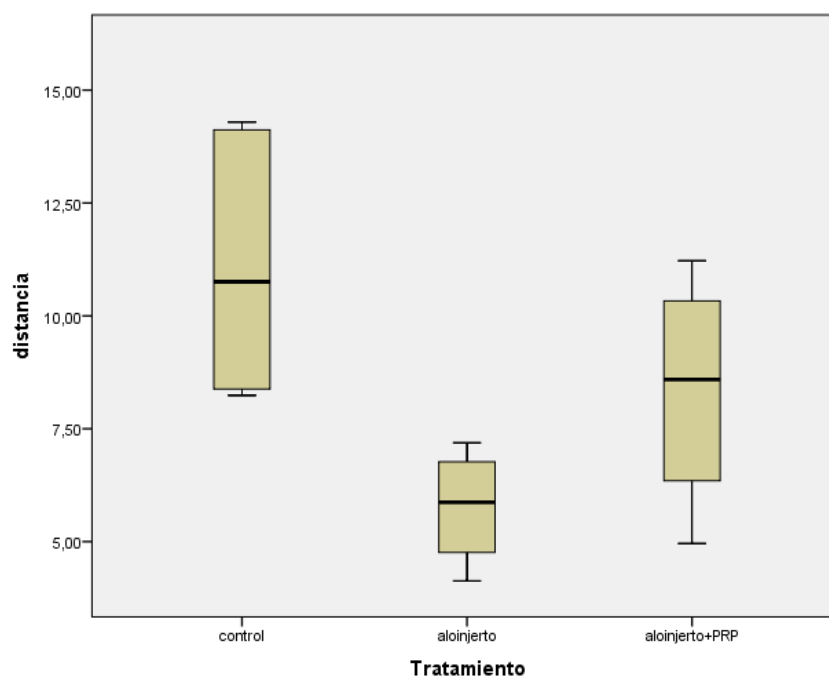
La medida de la distancia entre bordes está en escala de mm determinándose mediante algoritmo en 3D. Los valores obtenidos en cada caso han sido:

<b>Tabla 24. Distancia entre bordes de fractura</b>				
<b>control</b>	<b>d</b>	<b>media</b>	<b>std</b>	<b>coef. Var (%)</b>
47	8,8922	8,8922	0	0
	8,8922			
	8,8922			
63	8,3735	8,239433	0,116105	1,40914
	8,1724			
	8,1724			
501	14,9147	14,11943	0,977952	6,926281
	13,0275			
	14,4161			
95	13,5075	12,62283	0,80024	6,33962
	12,4116			
	11,9494			
506	9,9771	8,379767	1,420019	16,94581
	7,9018			
	7,2604			
535	14,4236	14,2882	0,273782	1,916141
	14,4679			
	13,9731			
<b>aloinjerto</b>				
97	7,5018	6,350233	0,9977	15,71124
	5,8032			
	5,7457			
118	5,4488	5,387333	0,335154	6,221154
	5,6875			
	5,0257			
75	0	consolidado		0
508	4,3651	4,1285	0,366524	8,877899
	4,3141			
	3,7063			
520	7,185	7,1884	0,192623	2,67963
	7,3827			
	6,9975			
<b>aloinjerto+P-PRP</b>				
73	0	consolidado		
88	3,8815	4,963267	0,967476	19,49
	5,2626			
	5,7457			
102	11,6825	11,21553	0,445401	3,97
	11,1687			
	10,7954			
519	6,6194	7,737467	1,062773	13,73
	7,8584			
	8,7346			
524	10,4088	9,4401	0,96163	10,18
	8,4857			
	9,4258			

Los valores obtenidos se resumen a continuación:

Tabla 25. Distancia 3D		
grupos	Media (mm)	Desv std
control	11,09	2,90
aloinjerto	5,76	1,31
aloinjerto+ PRP	8,349	2,66

La distancia entre bordes es claramente menor en el caso del grupo de aloinjerto, debido al mayor volumen del callo de fractura, en el caso de la adición de PRP se observa que al ser el volumen de callo menor, la distancia entre bordes aumenta. Observándose un efecto perjudicial, de la aplicación de plasma rico en plaquetas en la consolidación ósea en las mismas condiciones que el grupo de aloinjerto.

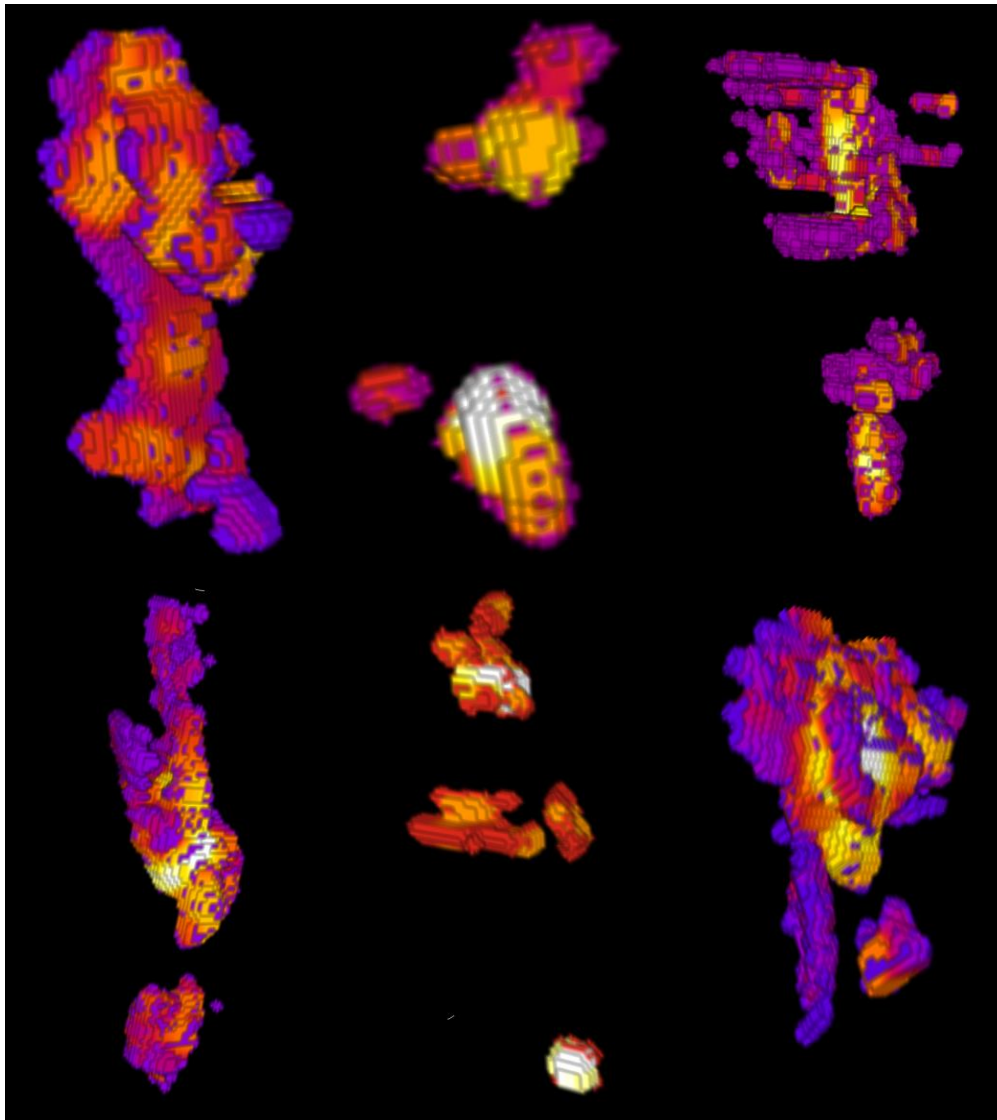


**Gráfica 15.** Diagrama cajas para la variable distancia entre bordes de fractura

Se observa también tres poblaciones distintas, la distancia también depende del tipo de tratamiento en la consolidación ósea.

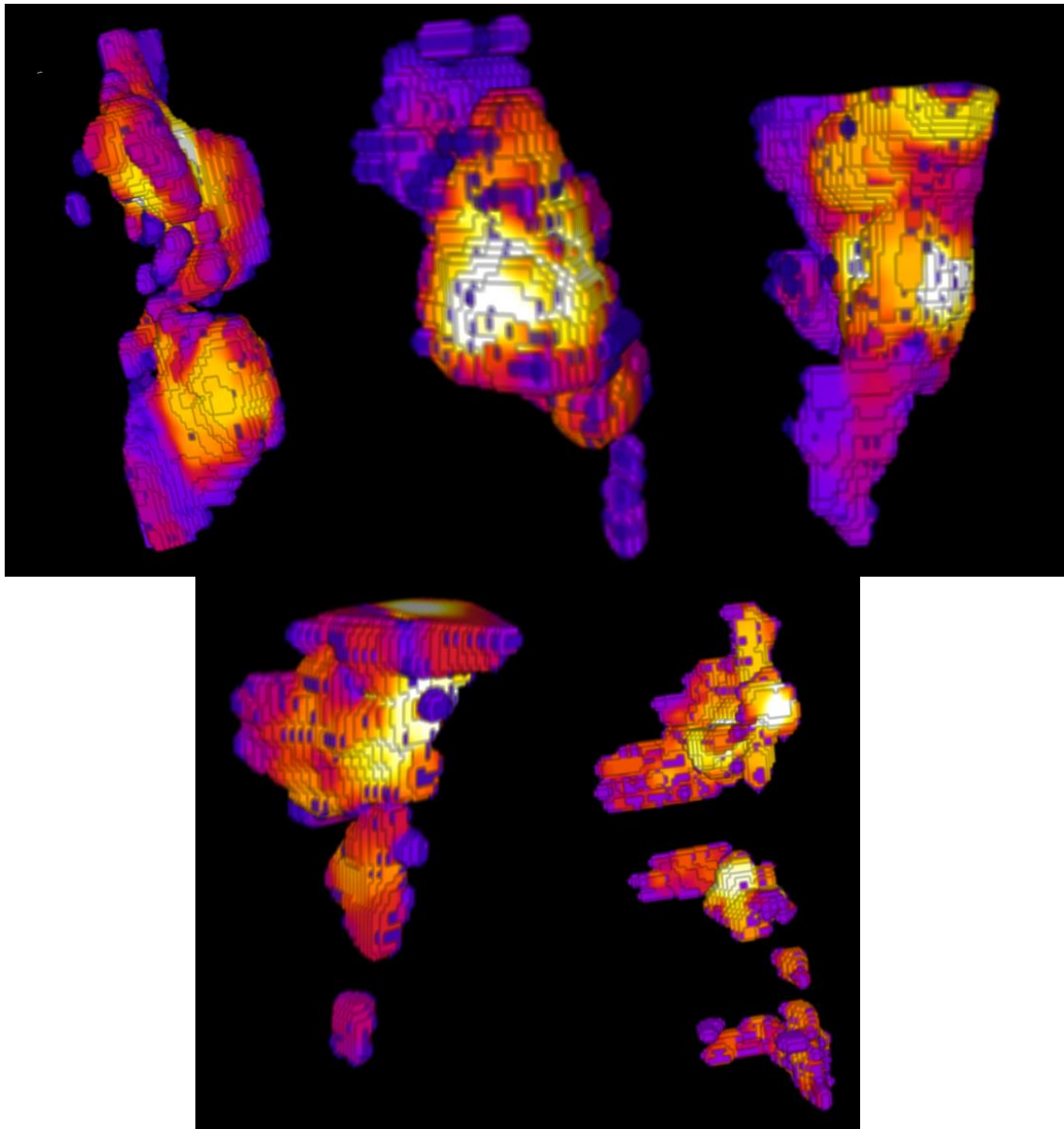
**GROSOR TRABECULAR (THICKNESS):**

La aplicación que determina el valor del grosor de las trabéculas en el callo de fractura obtiene reconstrucciones 3D, donde podemos apreciar que a mayor grosor, se corresponde a gama de colores de amarillos y blancos, mientras que zonas trabeculares con menor grosor, se corresponde con áreas de rojo azulados.

***Grupo Control***

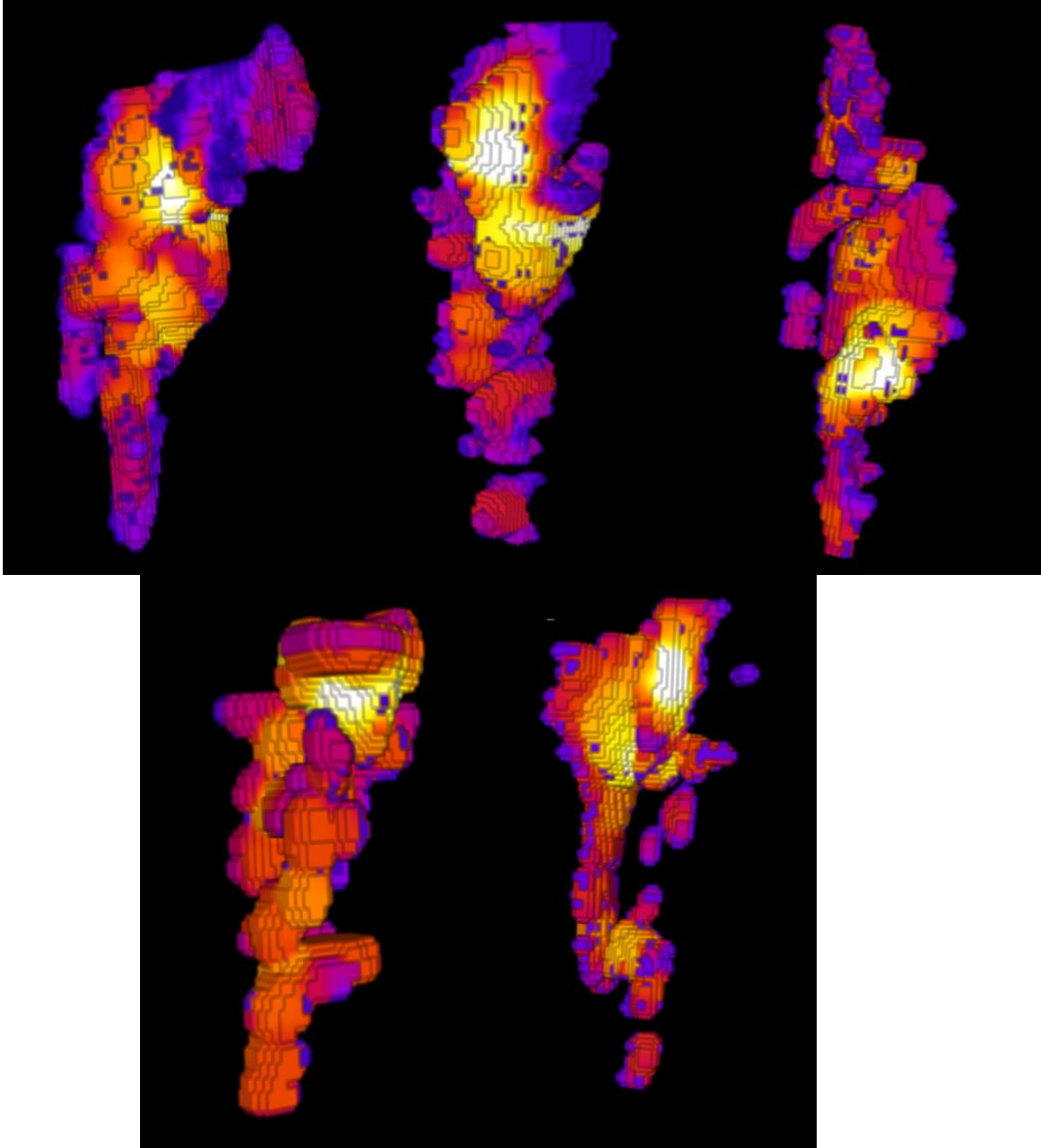
**Figura 56.** Representación grosor trabecular en el callo de fractura. Control.

Áreas predominantes, rojo azuladas que se corresponden con trabéculas de menor grosor y calidad de callo de fractura, más comprometido. Predomina más el tejido fibrótico.

*Grupo Aloinjerto*

**Figura 57.** Representación grosor trabecular en el callo de fractura. Aloinjerto

Áreas predominantes: amarillo y blancas que se corresponden con trabéculas de mayor grosor y mayor calidad de callo de fractura, consolidación secundaria.

**Grupo Aloinjerto + PRP**

**Figura 58.** Representación grosor trabecular en el callo de fractura. Aloinjerto+ P-PRP

Áreas predominantes: amarillo y blancas que se corresponden con trabéculas de mayor grosor y mayor calidad de callo de fractura, consolidación secundaria.

La cuantificación, del grosor de las trabéculas en el callo de fractura:

Tabla 26. Grosor Trabecular (Thickness)

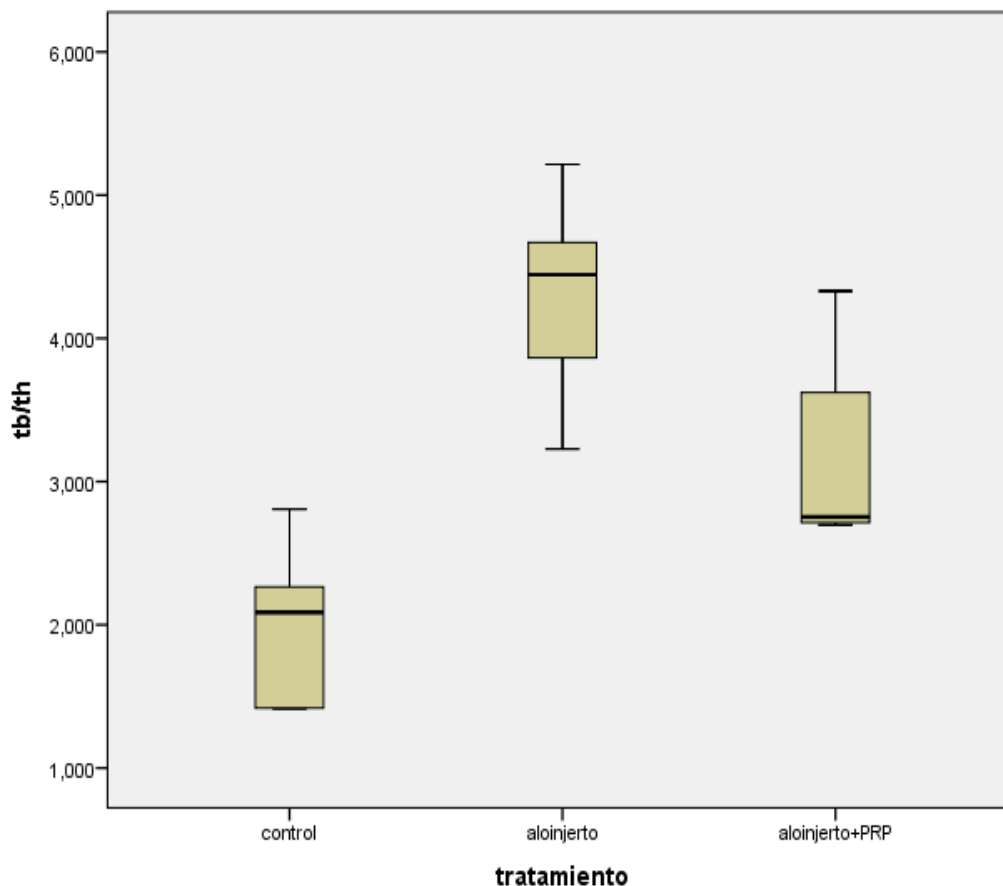
muestra	tb/th	desv. Std	Tb/sp
<b>control</b>			
47	2,265	0,758	3,648
63	2,031	0,703	3,199
501	1,416	0,628	3,261
95	2,141	0,919	4,171
506	2,807	1,29	5,448
535	1,419	0,455	2,262
<b>aloinjerto</b>			
97	4,669	2,416	9,367
118	4,444	2,623	8,473
75	5,215	2,681	9,382
508	3,864	1,742	6,59
520	3,228	0,812	4,994
<b>aloinjerto+prp</b>			
73	4,33	2,125	8,473
88	3,622	1,892	6,723
102	2,753	1,215	5,489
519	2,714	1,019	4,912
524	2,698	1,024	4,8

**Tabla resumen del grosor trabecular**

Tabla 27. Grosor Trabecular Thickness Resumen

grupos	Media espesor trabecular	Desv. std
<b>control</b>	2,013	0,53
<b>aloinjerto</b>	4,284	0,76
<b>aloinjerto+ PRP</b>	3,223	0,73

Podemos observar, que la calidad trabecular es mejor en el grupo con aloinjerto, siendo en este caso, el volumen de mayor tamaño con mayor consolidación ósea, El P-PRP, afecta, disminuyendo el volumen de callo y la calidad trabecular.



Gráfica 16. Diagrama cajas para la variable grosor trabecular.

Se observa también tres poblaciones distintas, la distancia también depende del tipo de tratamiento en la consolidación ósea.

#### ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LAS VARIABLES HISTOMORFOMÉTRICAS:

El análisis de la varianza permite contrastar la hipótesis nula de que las medias de más de 2 poblaciones son iguales, frente a la hipótesis alternativa de que por lo menos una de las poblaciones difiere de las demás en cuanto a su valor esperado.

Este contraste es fundamental en el análisis de resultados experimentales, en los que nos interesa comparar los resultados de 3 'tratamientos' denominados: control, aloinjerto y aloinjerto+PRP; con respecto a la variable dependiente o magnitud determinada en cada caso. El Anova requiere el cumplimiento de los siguientes supuestos:

- Las poblaciones (distribuciones de probabilidad de la variable dependiente correspondiente a cada factor) son normales.
- Las K muestras sobre las que se aplican los tratamientos son independientes.
- Las poblaciones tienen todas igual varianza (homoscedasticidad).

Para ello hemos realizado el análisis de varianza, con p de significación  $P < 0,05$  y homogeneidad de varianzas  $s > 0,05$  en cada tratamiento y en cada caso.

Tabla 28. Análisis de Anova $\alpha = 0,05$		
grupos	F	p
Volumen callo	4,580	0,036*
thickness	15,634	0,000348*
Distancia 3D	5,549	0,022*

Test de anova, el nivel de significación, implica diferencias significativas en el volumen, el grosor trabecular y la distancia entre bordes, para los tratamientos control, aloinjerto y aloinjerto+ PRP

Tabla 29. Homogeneidad varianzas $\alpha = 0,05$		
grupos	F	p
Volumen callo	0,618	0,557*
thickness	0,697	0,516*
Distancia 3D	3,90*	0,052

Tabla 30. Coeficiente de Pearson			
Grupos	R		
Volumen callo X1	X1/x2 0,96*	X2/x3 -0,995*	X1/x3 -0,997*
Thickness X2	D		
Distancia 3 D X3	92,16*	99,0*	99,4*

Hay diferencia significativa, en cuando al tamaño del volumen del callo, distancia entre bordes, y thicknes (grosor trabecular) por tanto la adición de PRP no



mejora la consolidación ósea cuando se añade a aloinjerto como osteopromotor, y afecta a la calidad del callo consolidado.

El volumen del callo y el grosor trabecular están relacionados positivamente, mientras que a mayor volumen de callo, menor distancia entre bordes de fractura.

## 4.6.2.3 Variables Geometría Trabecular

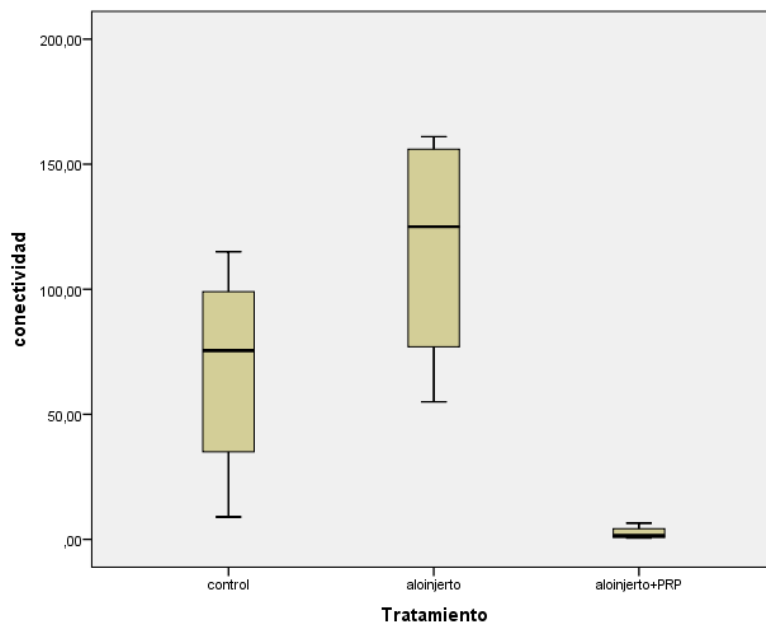
## CONECTIVIDAD

El hueso trabecular es una red de estructuras conectadas, y su densidad de conectividad (Conn.D) se puede calcular dividiendo la estimación de la conectividad por el volumen de la muestra. Así mismo la conectividad, está relacionada con el número de trabéculas, que aparece en una zona de estudio (ROI) en este caso con el callo de fractura en su conjunto mediante la segmentación.

Tabla 31. Valores Conectividad. Trabéculas conectadas.

muestra	Euler	$\Delta X$	Conectividad	Conn D
<b>control</b>				
47	-71	-71	72	0,0003884
63	-8	-8	9	0,0000451
501	-98	-98	99	0,000559
95	-78	-78	79	0,000287
506	-32	-32	35	0,0001859
535	-112	-112	115	0,000611
<b>aloinjerto</b>				
97	-318	-318,5	319,5	0,001
118	-160	-160	161	0,000869
75	-150	-150	151	0,000425
508	-98	-98	99	0,000572
520	-54	-54	55	0,000328
<b>aloinjerto+PRP</b>				
75	-23	-23	24	0,000946
88	-5	-5,5	6,5	0,0000365
102	1	0,5	0,5	0,000002487
519	0	0	1	0,00000307
524	-1	-1	2	0,00001077

## Conectividad (número de trabéculas conectadas)



Gráfica 17. Diagrama cajas para la variable conectividad trabéculas conectadas.

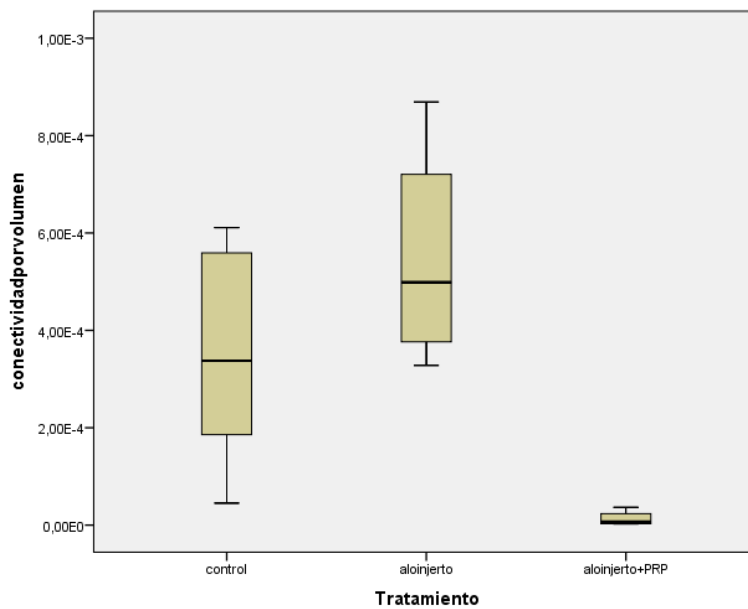
Conectividad / mm<sup>3</sup>Gráfica 18. Diagrama cajas para la variable conectividad trabéculas conectadas/mm<sup>3</sup>

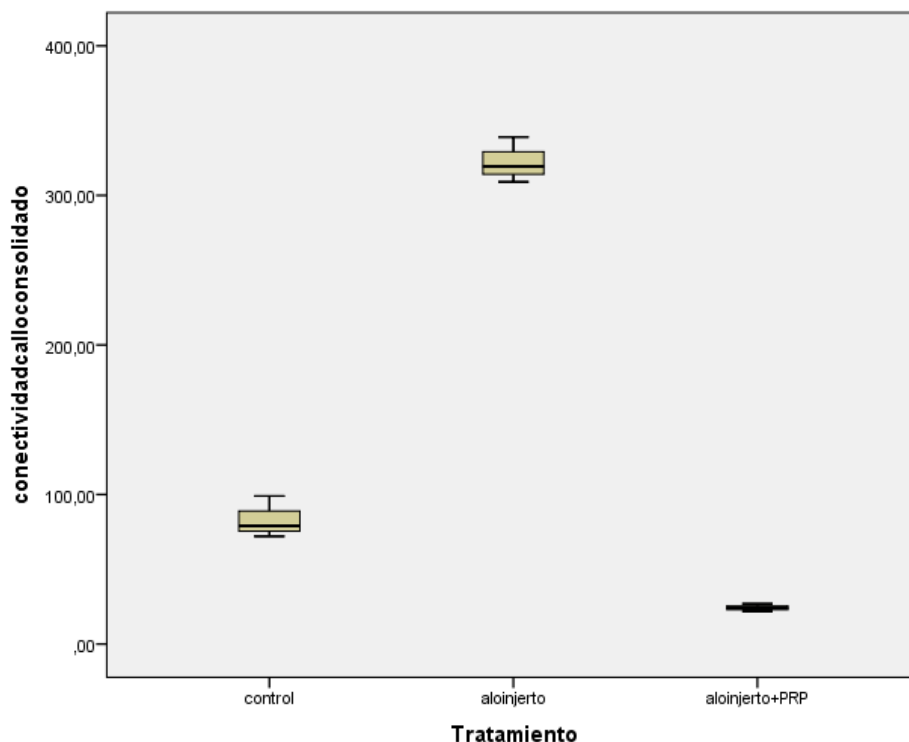
Diagrama de cajas, representa 3 poblaciones distintas, los valores obtenidos dependen del grupo de tratamiento.

Tabla 32. Tabla Resumen Conectividad

grupo	nº de trabéculas conectadas	desv.std	nºtrabéculas conectadas/mm <sup>3</sup>	desv. Std
Control	68,1666667	39,690889	0,00034607	0,00021774
Aloinjerto	157,1	100,282351	0,0006388	0,00028733
Aloinjerto + PRP	6,8	9,90328228	0,00019977	0,00041739

Como podemos observar, hay una gran diferencia entre los tratamientos seguidos, de forma que la adición de aloinjerto, supone la formación de callo de hueso nuevo en formación con un aumento considerable en el entramado trabecular, aumentando significativamente el número de trabéculas conectadas por unidad de volumen. La adición de PRP supone un descenso notable en el número de trabéculas conectadas lo que supone un callo mucho más pobre, en un estadio anterior de consolidación.

#### CONECTIVIDAD CONSOLIDACIÓN



Gráfica 19. Diagrama cajas para la variable conectividad trabéculas callo consolidado

Diagrama de cajas, representa 3 poblaciones distintas dependiendo del tratamiento

### ANÁLISIS ESQUELETO TRABECULAR

Para estudiar el entramado trabecular del callo de fractura. Determinamos una serie de parámetros como:

El número de intersecciones, puntos y ramas triples y cuádruples, y medimos la longitud media y máxima de las ramas más largas y más cortas.

Los valores obtenidos son los siguientes:

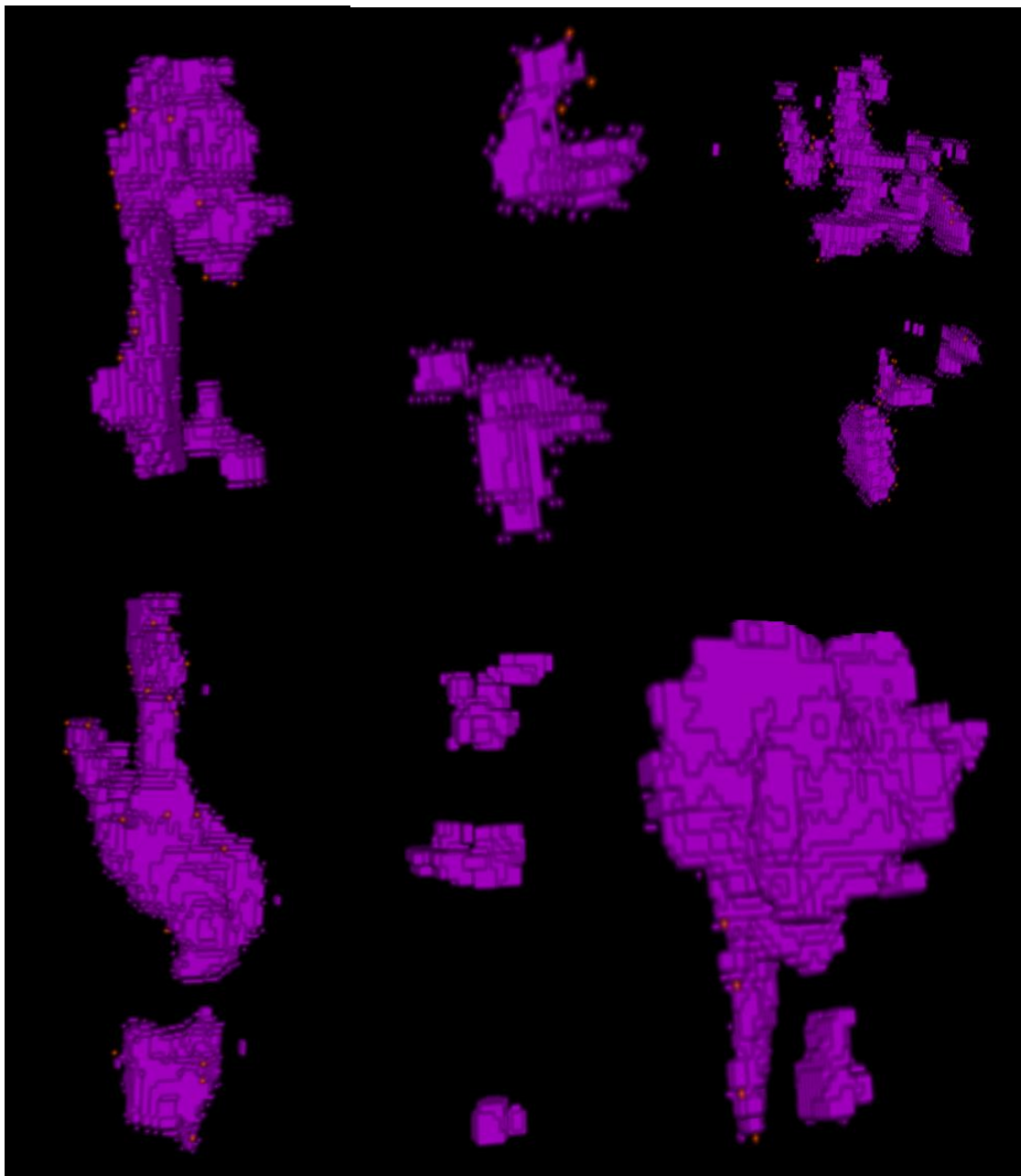
Tabla 33. Esqueleto Trabecular					
muestra	ramificaciones	Voxels de unión	Media longitud ramificaciones	Máxima longitud ramificaciones largas	Máxima longitud ramificaciones cortas
<b>control</b>					
47	17	8781	1,134	1,595	0,718
63	3	913	0,956	1,433	1,433
501	0	0	0	0	0
95	39	7048	1,007	2,395	1,594
506	17	15261	0,937	1,597	0,879
535	0	0	0	0	0
<b>aloinjerto</b>					
97	52	56726	0,932	2,354	3,295
118	30	22093	0,785	1,335	1,335
75	15	23488	0,929	1,594	1,433
508	8	16959	1,086	2,228	1,332
520	30	7957	0,874	1,483	2,816
<b>aloinjerto+ PRP</b>					
73	0	48490	0	0	0
88	0	20710	0	0	0
102	0	10332	0	0	0
519	0	12868	0	0	0
524	0	14611	0	0	0

Tabla 34. Esqueleto Trabecular resumen.					
ramificaciones		Voxels de unión	Media longitud ramificaciones	Máxima longitud ramificaciones largas	Máxima longitud ramificaciones cortas
control					
media	19	8000,75	1,0085	1,755	1,156
desv. Std	14,8772757	5900,9590	0,08873368	0,433531237	0,42314143
aloinjerto					
media	27	25444,6	0,9212	1,7988	2,0422
desv. Std	16,9410743	18516,2702	0,10967543	0,460771852	0,94126442
aloinjerto + PRP					
media	0	21402,2	0	0	0
desv. Std	0	15618,3413	0	0	0

Como se puede observar, hay diferencias entre los distintos tratamientos muy notables, la adición de PRP al aloinjerto, implica un callo con un entramado trabecular mucho más pobre, que incluso, el callo formado sin ninguna ayuda osteopromotora, o osteoinductora.

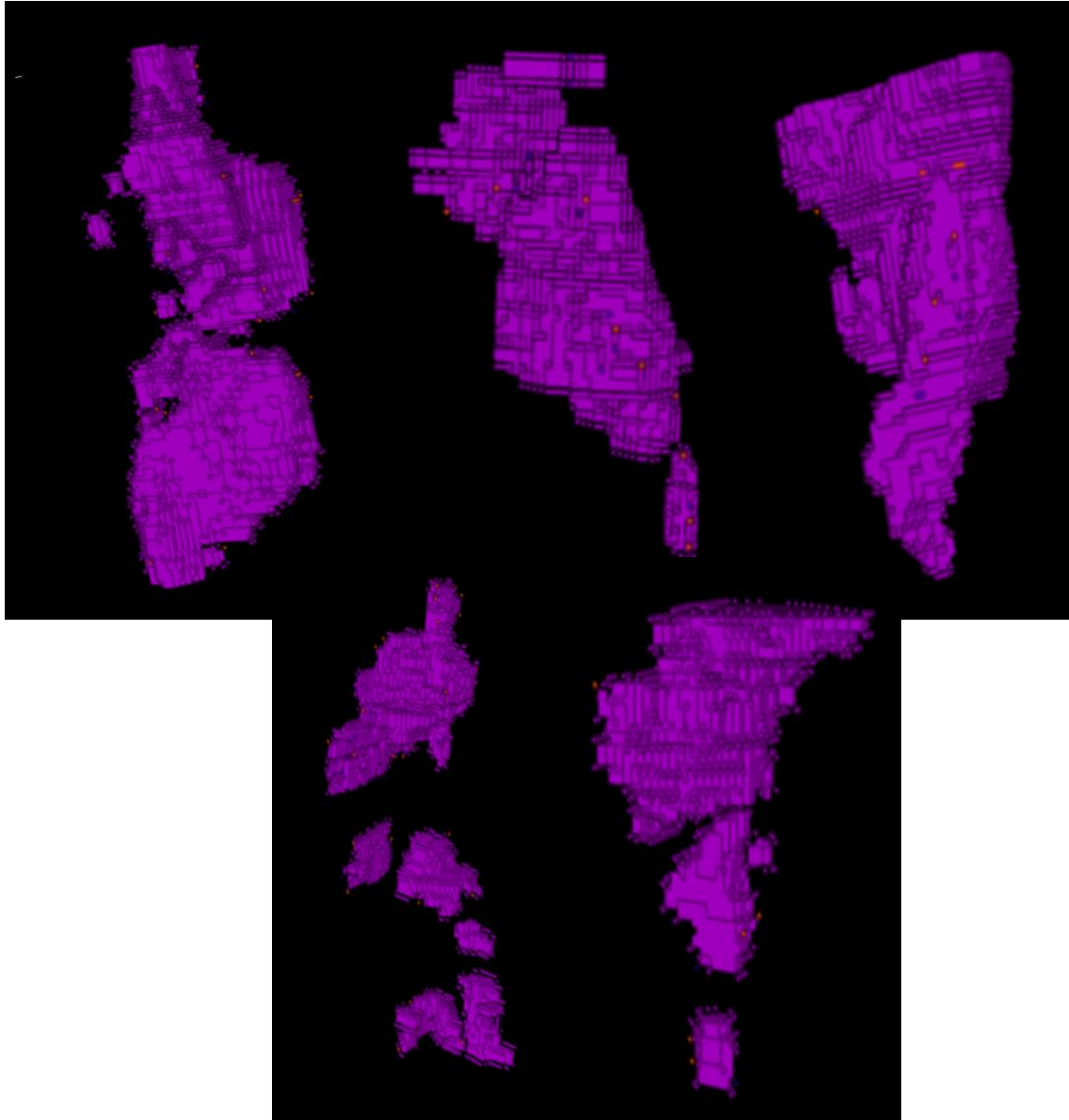
La representación siguiente se obtiene mediante el número de trabéculas conectadas por unidad de volumen en el entramado del callo de fractura.

***Grupo control***



**Figura 58.** Representación esqueleto trabecular con inserción trabecular. Control

Diagrama representativo del callo de fractura, frente a la calidad trabecular, representa los puntos de inserción trabecular.

*Grupo aloinjerto*

**Figura 59.** Representación esqueleto trabecular con inserción trabecular. Aloinjerto

Diagrama representativo del callo de fractura, frente a la calidad trabecular, representa los puntos de inserción trabecular

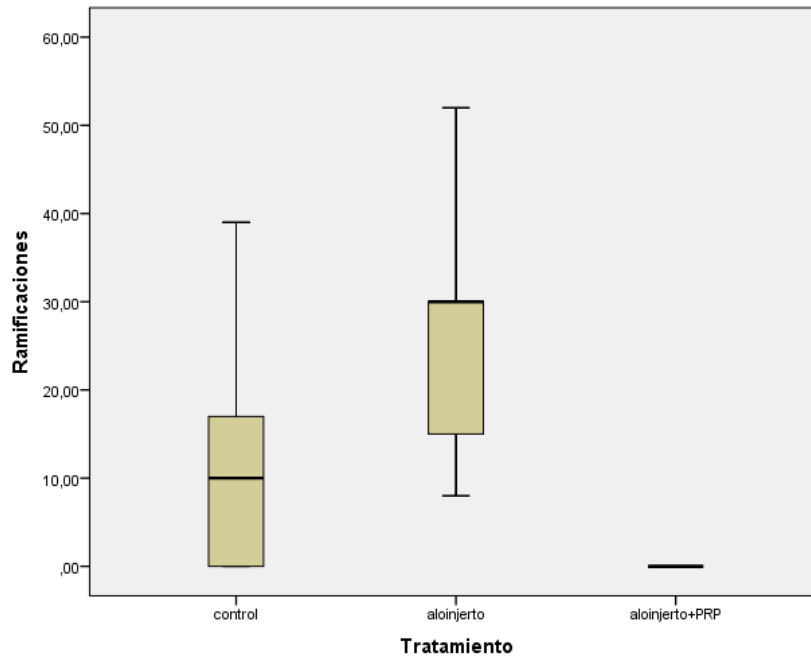


*Grupo aloinjerto + PRP*

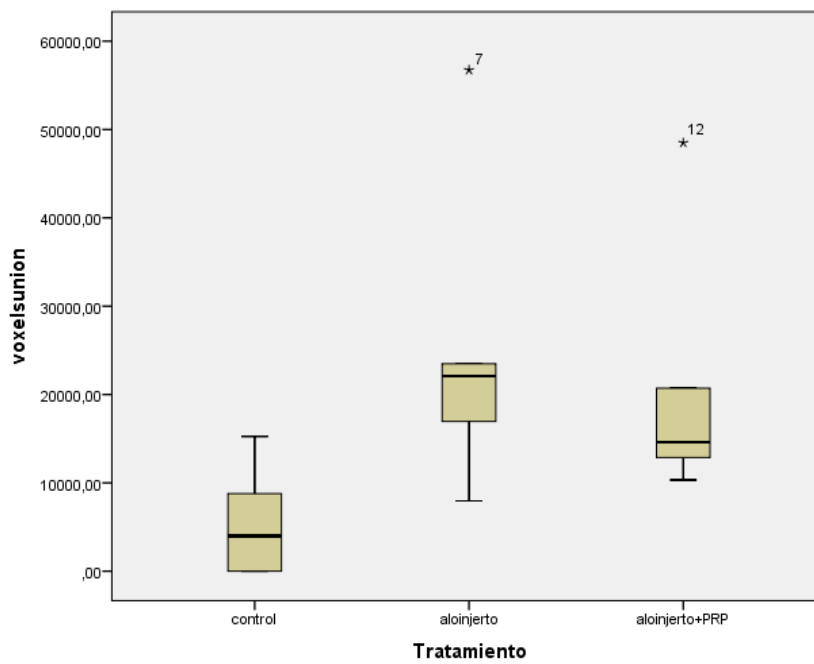
**Figura 60,** Representación esqueleto trabecular con inserción trabecular. Aloinjerto+P-PRP

Diagrama representativo del callo de fractura, frente a la calidad trabecular, representa los puntos de inserción trabecular

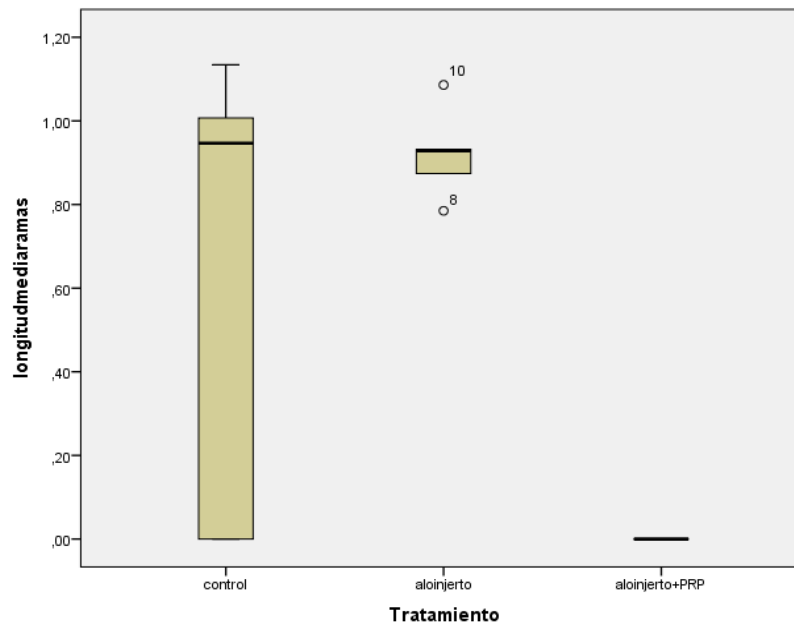
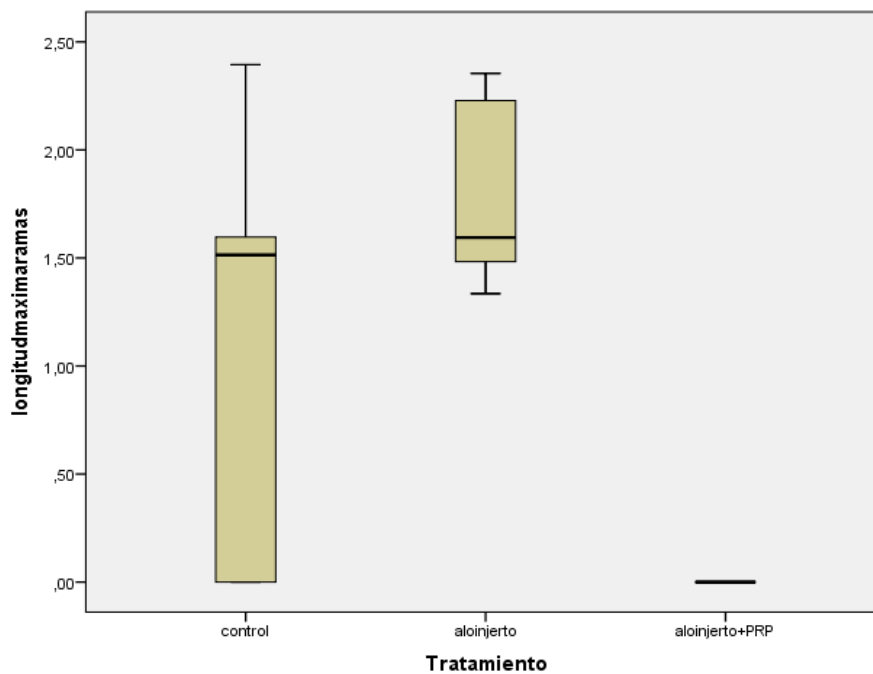
## ANÁLISIS ESQUELETO TRABECULAR

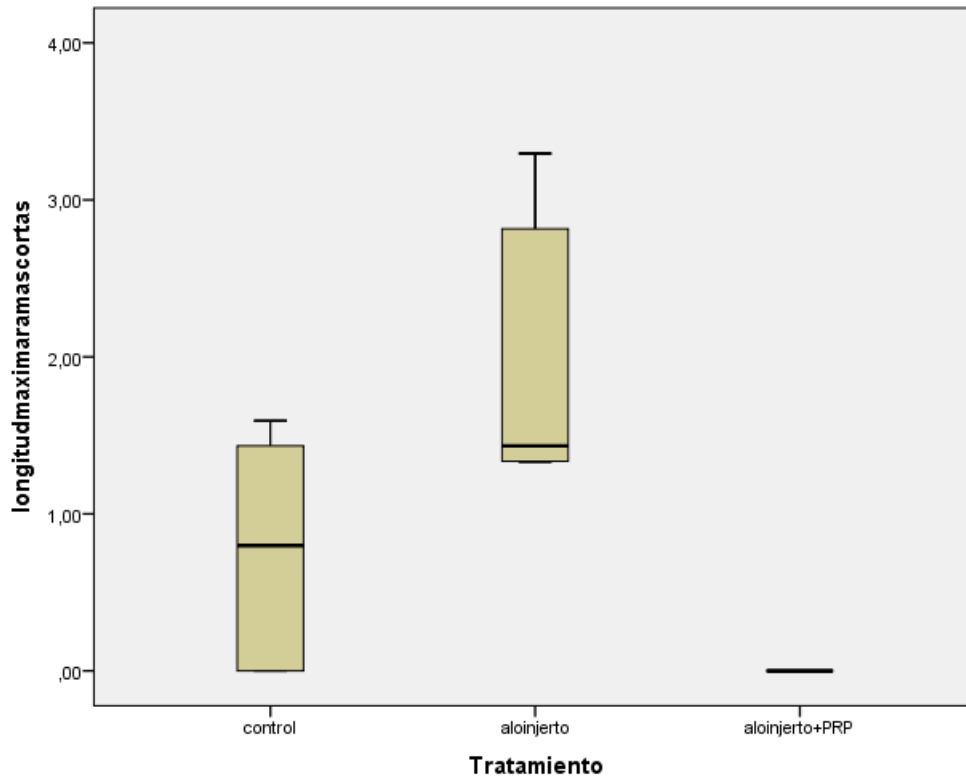
*Número de ramificaciones*

Gráfica 20. Diagrama cajas para la variable numero ramificaciones

*Voxels de unión*

Gráfica 21. Diagrama cajas para la variable número voxels de unión

**Longitud media de las ramas****Gráfica 22.** Diagrama caías para la variable longitud media de ramas**Longitud máxima ramas largas****Gráfica 23.** Diagrama cajas para la variable longitud máxima de ramas

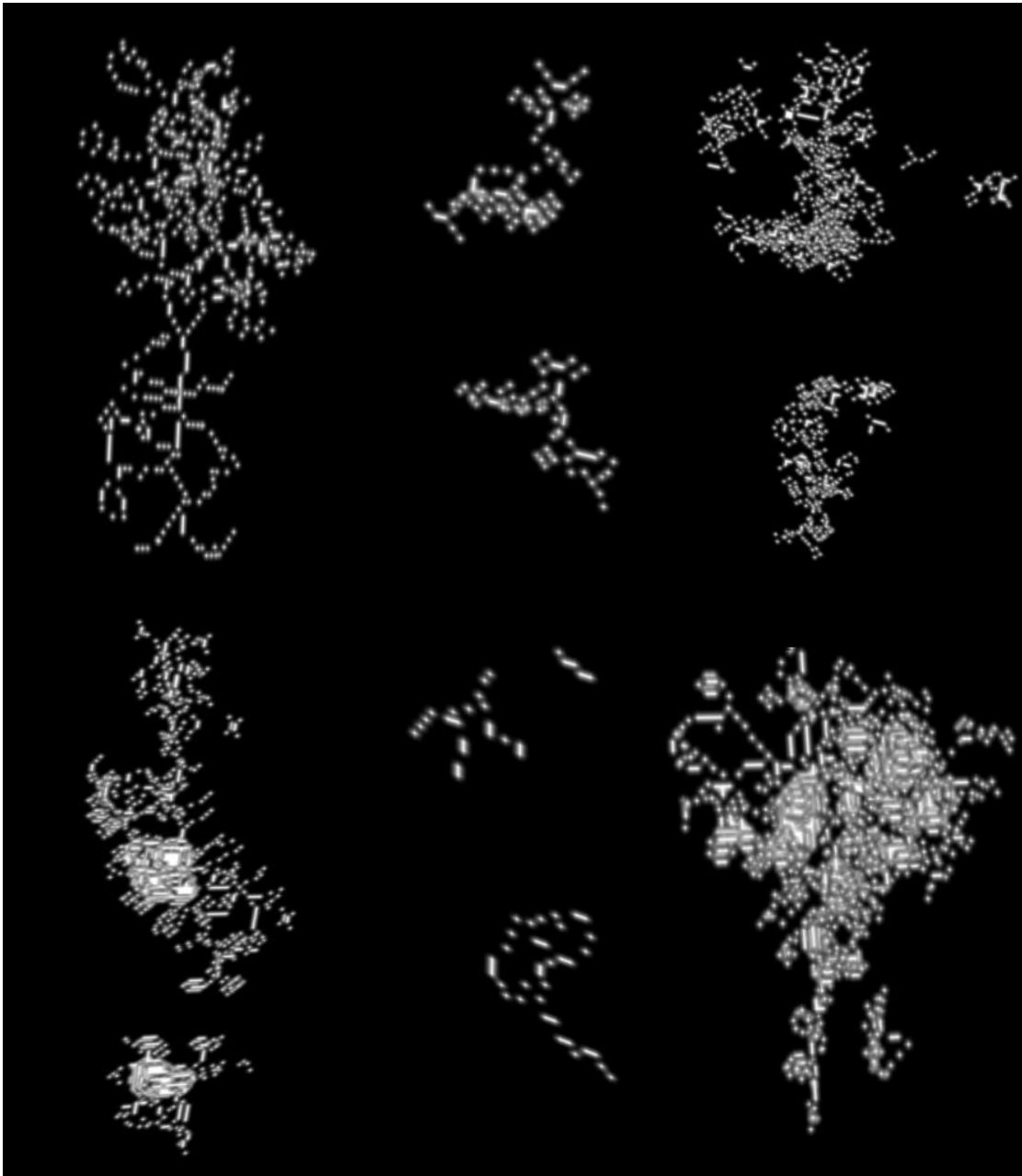
**Longitud máxima ramas cortas**

**Gráfica 24.** Diagrama cajas para la variable longitud mínima de ramas

Se observa diferencias significativas en cuanto a la adición de aloinjerto y aloinjerto + PRP, frente al control, en todos los casos se observa que la adición de PRP, perjudica, la consolidación del callo de fractura, afectando a todos los parámetros de calidad trabecular disminuyendo significativamente, el número de ramas, y la longitud de las mismas.

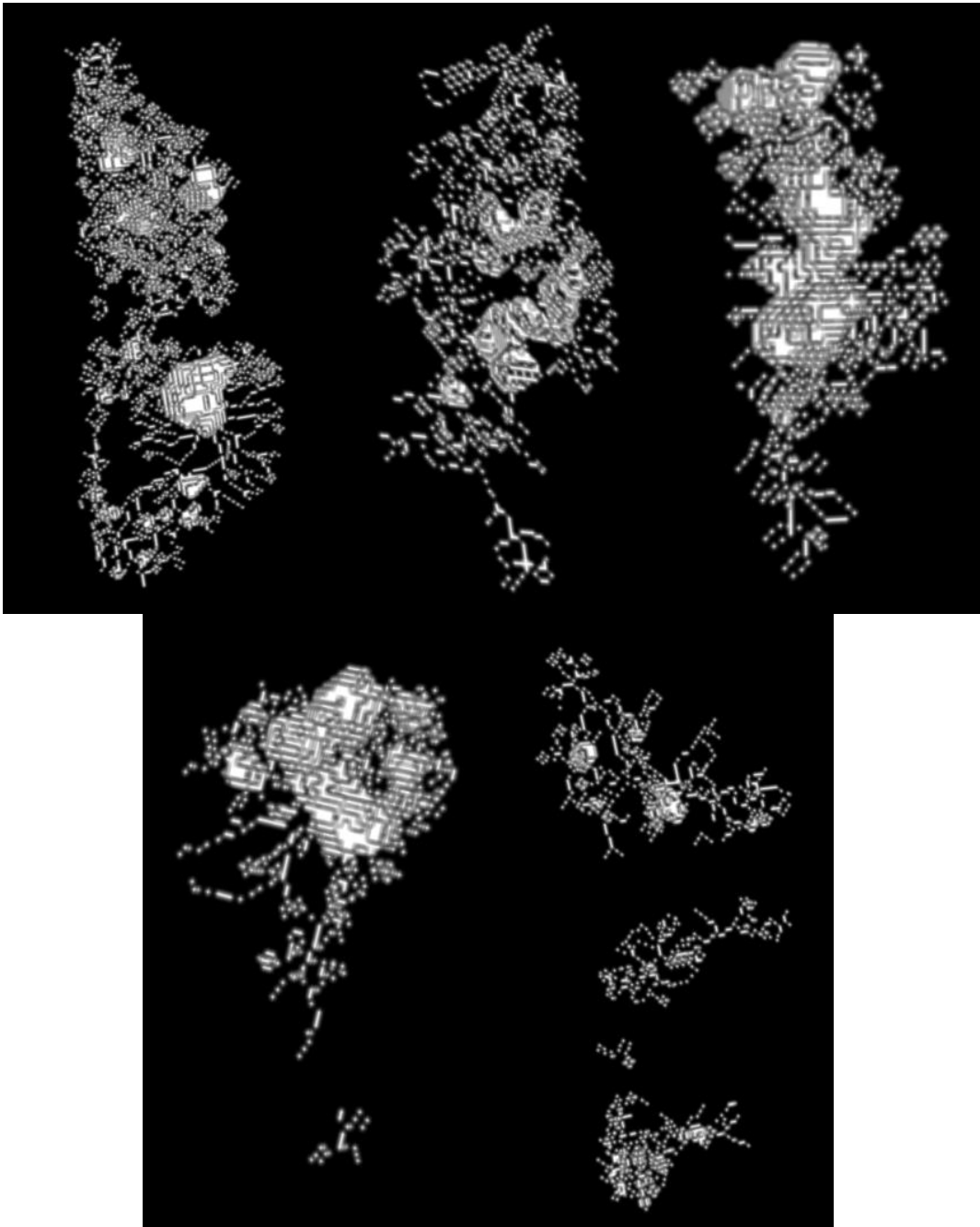
**ESQUELETO TRABECULAR 3D**

Representación de los grupos trabeculares interconectados, en el volumen del callo de fractura.

***Grupo control***

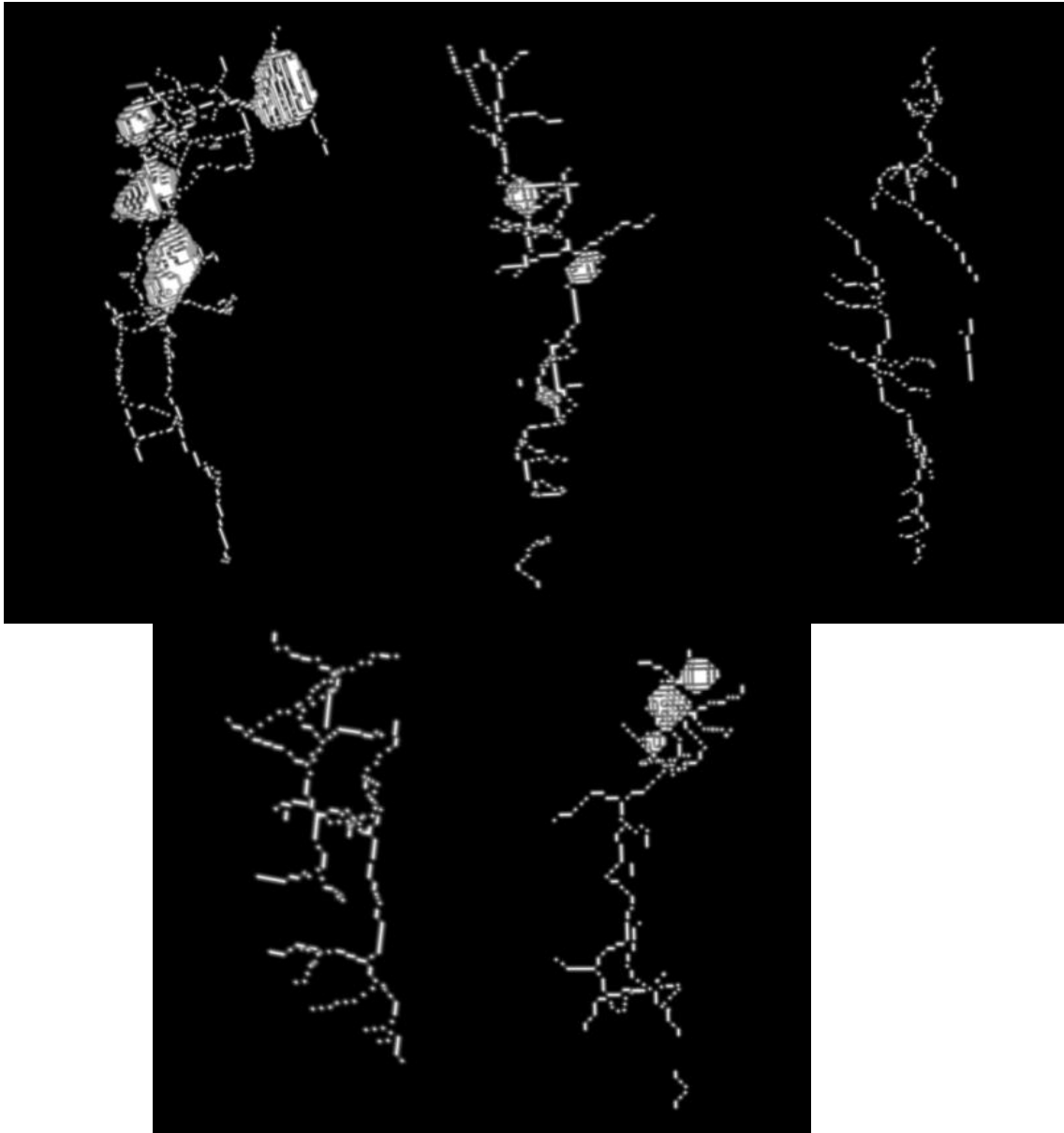
**Figura 61.** Representación esqueleto trabecular atendiendo características de las trabéculas. Control trabecular. Aloinjerto+P-PRP

Representación esqueleto trabecular, según los voxels del callo de fractura

*Grupo aloinjerto*

**Figura 62.** Representación esqueleto trabecular atendiendo características de las trabéculas. Aloinjerto control trabecular. Aloinjerto+P-PRP

Representación esqueleto trabecular, según los voxels del callo de fractura. Se puede observar claramente como el esqueleto en el grupo aloinjerto es mucho más rico, con más ramificaciones, y áreas de esqueleto casi maduro.

**Grupo aloinjerto + PRP**

**Figura 63.** Representación esqueleto trabecular atendiendo características de las trabéculas. Aloinjerto + P-PRP

Representación esqueleto trabecular, según los voxels del callo de fractura, se puede observar, que el esqueleto en aloinjerto+PRP, es mucho más pobre, menos ramificaciones y las áreas de hueso maduro se reducen mucho.

**Aplanamiento trabecular, Plateness:**

Estudio, de la forma de las trabéculas (medida del aplanamiento trabecular), según la forma de varilla o forma de disco. Los valores b/a son los ejes geométricos de forma que el cociente puede valer: (varilla 0, disco 1), el valor medio del callo de fractura en cada grupo nos muestra que no hay diferencias en cuanto a la forma trabecular, siendo en todos los casos, una forma intermedia, entre un disco y una varilla, valor aproximado 0,6.

Tabla 35. Estudio Aplanamiento. Plateness

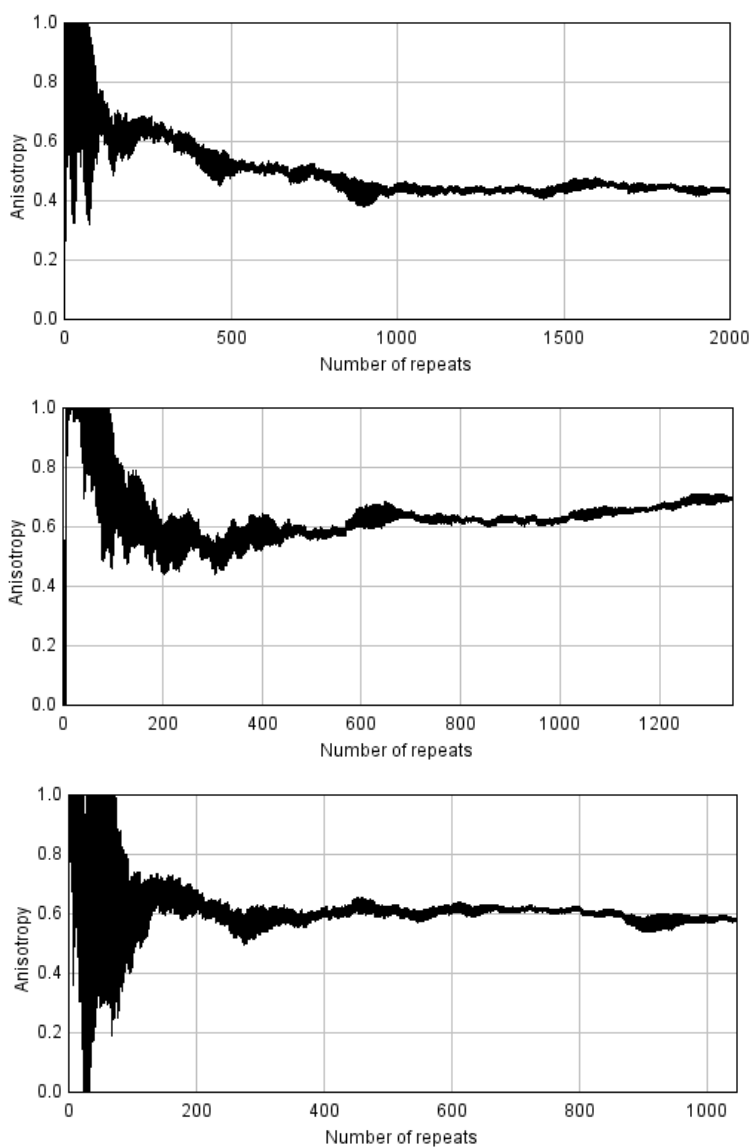
control	a	B	c	b/a	c/a	media	Desv std
47	4475,728	2,821,827	1,650,538	0,63	0,369		
63	418,125	273,432	201,274	0,654	0,481		
501	2385,008	1549,807	1016,343	0,65	0,426		
95	8203,209	5199,803	3543,112	0,634	0,432	0,641	0,0458
506	3275,577	1864,498	1214,367	0,569	0,371		
535	166,423	118,265	82,357	0,711	0,495		
aloinjerto	a	b	c	b/a	c/a	media	Desv std
97	77303,564	49579,463	28420,600	0,641	0,368		
118	31304,535	19497,189	14967,968	0,623	0,478		
75	2550,022	939,810	585,111	0,369	0,229	0,6012	0,135
508	26378,294	18935,824	12856,280	0,718	0,487		
520	6698,061	4388,110	2686,838	0,655	0,401		
aloinjerto + PRP	a	b	c	b/a	c/a	media	Desv std
73	50674,799	32323,970	18563,387	0,638	0,366		
88	2783,951	1634,202	951,212	0,587	0,342	0,639	0,04533762
102	2206,206	1328,132	689,459	0,602	0,313		
519	1250,267	864,494	554,164	0,691	0,443		
524	5917,141	4008,846	2276,987	0,677	0,385		

En cuanto al aplanamiento trabecular, se observa que la forma de las trabéculas no se ve influenciada por el tratamiento experimental. Siendo prácticamente iguales en los tres casos.



## ANISOTROPÍA

El hueso trabecular varía su orientación dependiendo de diferentes factores como la carga mecánica y puede llegar a ser anisotrópica (no uniforme) o isotrópica (uniforme). Este plug-in de Bone J calcula longitud media de intercepción trabecular (MIL) para determinar el estado de anisotropía de la red tubular.



**Gráfica 25.** Representación intercepción trabecular MIL (anisotropía). Valores entre 0,4 y 0,6.

Valores de DA: 1 anisotropía, 0 isotropía, los valores intermedios, muestran situaciones en que la anisotropía disminuye, mostrando valores más isotrópicos cuando el tratamiento se hace con aloinjerto, recuperándose la anisotropía en presencia de PRP.

Tabla 36. Determinación Anisotropía

muestra	DA	DA media	desv. std
stackcallus47	0,697		
stackcallus63	0,421		
stackcallus95	0,463	<b>0,6056</b>	<b>0,1519105</b>
stackcallus506	0,694		
stackcallus535	0,753		
muestra	DA		
stackcallus97	0,293		
stackcallus118	0,343		
stackcallus75	0,649	<b>0,4028</b>	<b>0,14812225</b>
stackcallus508	0,299		
stackcallus520	0,43		
muestra	DA		
stackcallus73	0,632		
stackcallus88	0,576		
stackcallus102	0,611	<b>0,6102</b>	<b>0,02913246</b>
stackcallus519	0,587		
stackcallus524	0,645		

El callo de fractura obtenida mediante aloinjerto presenta mayor isotropía que el grupo control, volviéndose más anisótropo cuando se le añade PRP. La orientación trabecular es más homogénea, cuando el número de trabéculas es mucho mayor, así como el volumen trabecular. El callo de fractura, en el caso de aloinjerto + PRP, tiene valores de anisotropía iguales al control.

**DIMENSIÓN FRACTAL**

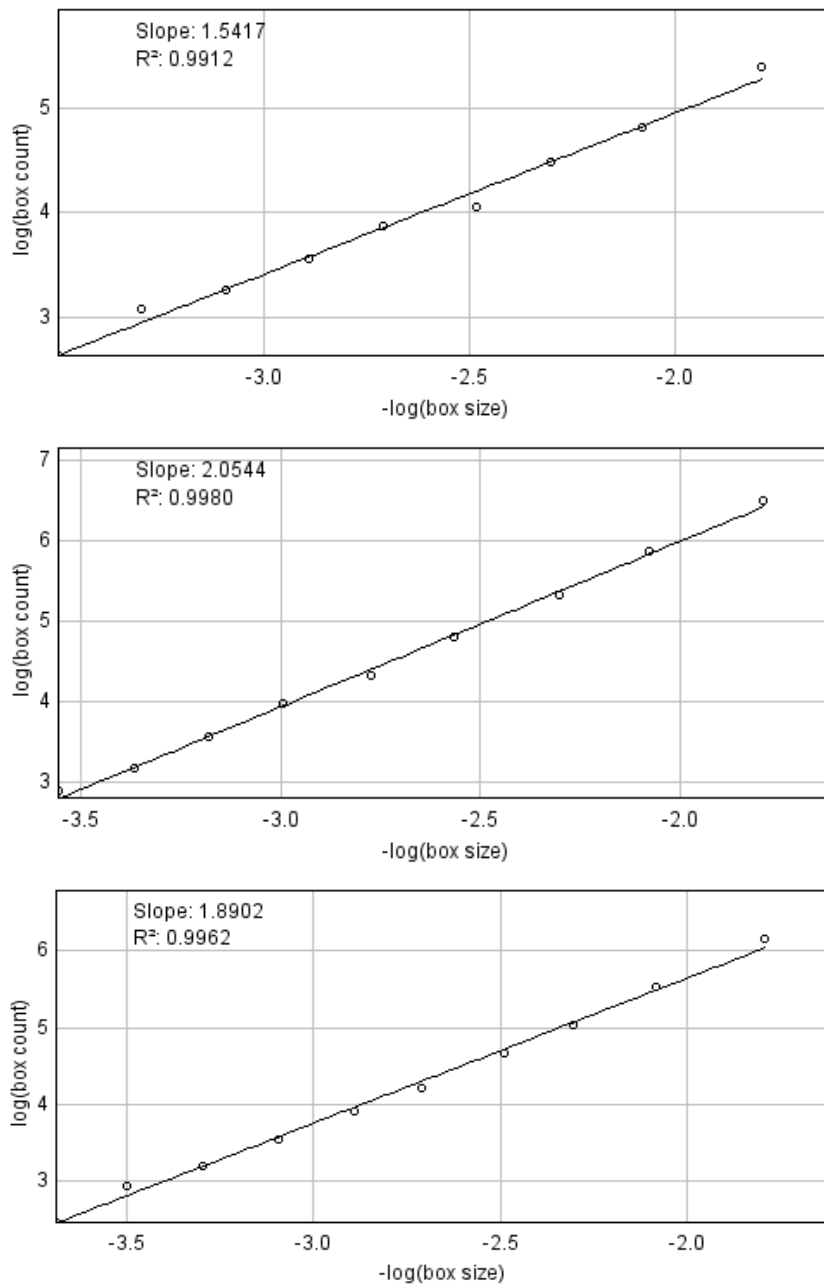
El valor de la dimensión fractal, aumenta en el callo de fractura, tras la aplicación de aloinjerto y aloinjerto + PRP, pasando de un valor control de 1,43 a 1,8 y 1,77 respectivamente. En los modelos matemáticos utilizados para describir la estructura trabecular, cambios en la superficie del hueso puede determinar independientemente cambios en el espesor trabecular, espaciamiento y número trabecular. Por lo tanto, la medición precisa de la medida de mineral óseo en la superficie es fundamental para una descripción espacial fiable de la estructura ósea trabecular.

**Tabla 37. Dimensión -fractal**

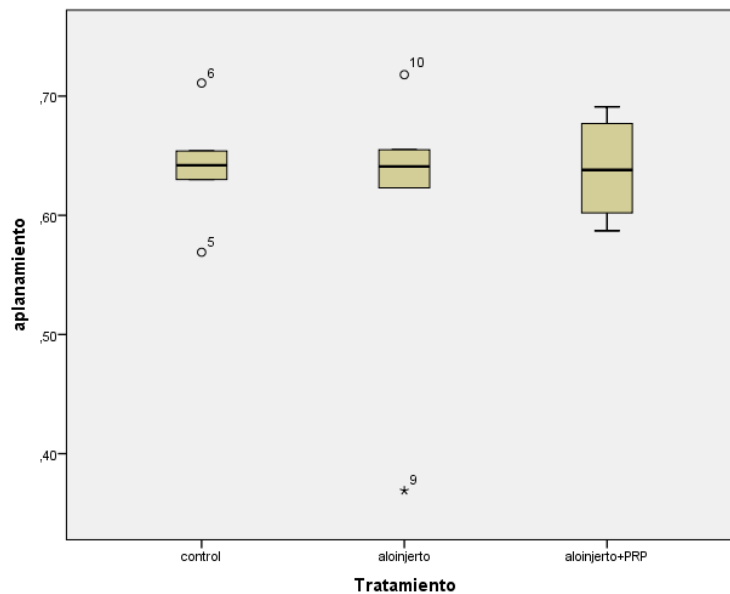
Control	Dimensión Fractal	R <sup>2</sup>	media	Desv std
47	1,690	0,988		
63	1,103	0,850		
501	1,542	0,991	<b>1,433</b>	<b>0,238</b>
95	1,555	0,938		
535	1,275	0,826		
<b>Aloinjerto</b>				
97	2,054	0,998		
118	1,836	0,987		
75	1,740	0,935	<b>1,808</b>	<b>0,147</b>
508	1,699	0,961		
520	1,709	0,998		
<b>Aloinjerto + PRP</b>				
73	1,890	0,996		
88	1,824	0,951		
102	1,803	0,976	<b>1,777</b>	<b>0,092</b>
519	1,658	0,951		
524	1,712	0,983		

Se observa diferencias en cuanto al tratamiento, obteniéndose mejor resultado en el caso de aloinjerto.

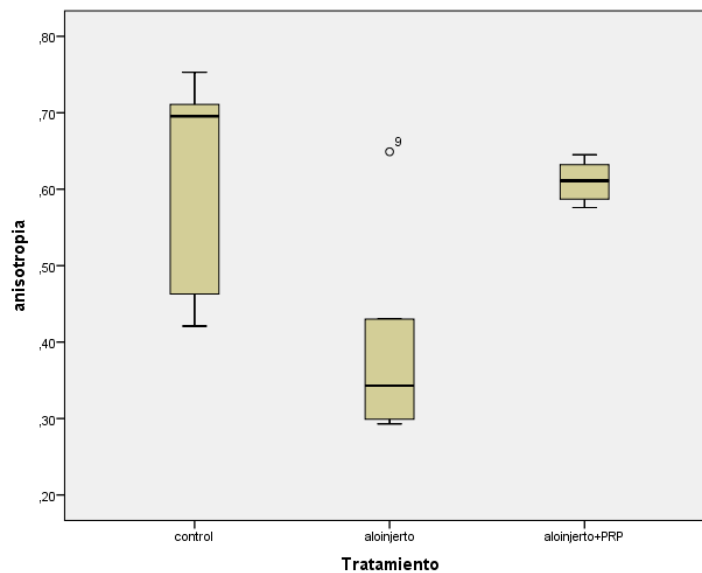
El ajuste lineal, obtenido en cada caso sugiere que nuestro modelo fractal encaja perfectamente en la variación producida en la superficie del hueso trabecular de nueva formación.



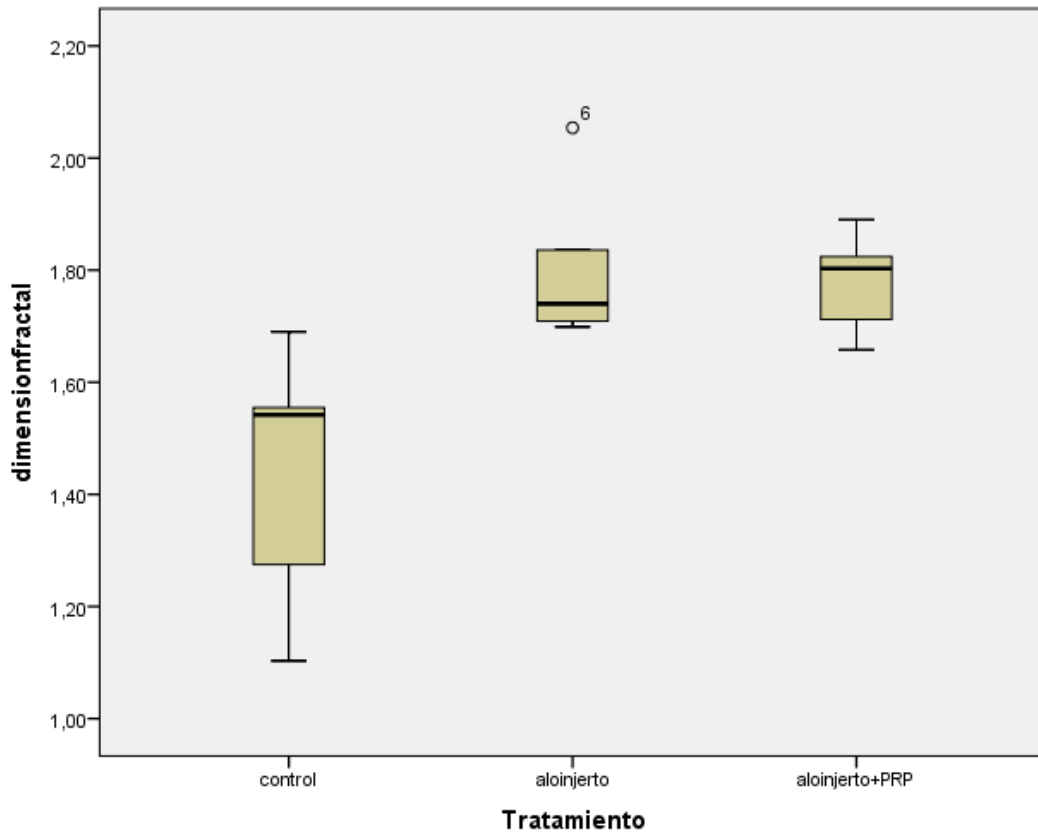
**Gráfica 26.** Representación ajuste lineal recuento de cajas superficie trabecular

**Plateness****Gráfica 27.** Diagrama de cajas para la variable aplanamiento.

No se observan diferencias significativas en cuanto a la forma de las trabéculas

**Anisotropía****Gráfica 28.** Diagrama de cajas para la variable anisotropía.

Se observan diferencias significativas en cuanto a la anisotropía, (homogeneidad estructuras).

**Dimensión fractal**

**Gráfica 29.** Diagrama de cajas para la variable dimensión fractal

No se observan diferencias significativas en cuanto al tratamiento experimental, se observa dos poblaciones de datos, el grupo control, frente a tratamientos osteoinductivos, la adición de PRP, no mejora en absoluto el efecto del aloinjerto

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO VARIABLES GEOMETRÍA TRABECULAR

El análisis de la varianza permite contrastar la hipótesis nula de que las medias de más de 2 poblaciones son iguales, frente a la hipótesis alternativa de que por lo menos una de las poblaciones difiere de las demás en cuanto a su valor esperado.

Este contraste es fundamental en el análisis de resultados experimentales, en los que nos interesa comparar los resultados de 3 'tratamientos' denominados control, aloinjerto y aloinjerto + PRP con respecto a la variable dependiente o magnitud determinada en cada caso.

Para ello hemos realizado el análisis de varianza, con una significación estadística  $P < 0,05$  y homogeneidad de varianzas en cada tratamiento y en cada caso.

### Análisis Varianza

Tabla 38. Análisis Anova $\alpha = 0,05$		
Parámetro	F	p
Conectividad (nº trabéculas conectadas)	9,524	0,004*
Conectividad (nº trabéculas/mm <sup>3</sup> )	7,981	0,007*
Conectividad consolidación completa	516,019	1,93x10 <sup>-7</sup> *

Se observa una clara variación entre en el número de trabéculas conectadas y el tratamiento utilizado. Las diferencias son estadísticamente significativas, por lo que podemos determinar que la adición de PRP en el tratamiento de la consolidación ósea, supone la formación de un callo, en un estadio de consolidación más inmaduro, revertiendo completamente la mejoría obtenida en el caso de la adición de un osteopromotor como aloinjerto.

Tabla 39. Homogeneidad varianzas  $\alpha = 0,05$ 

Parámetro	F	p
Conectividad (n° trabéculas conectadas)	5,357*	0,053*
Conectividad (n° trabéculas/mm <sup>3</sup> )	7,981*	0,054*
Conectividad consolidación completa	0,03*	0,961*

Tabla 40, Coeficiente de Pearson

grupos	R		
	X1/x2	X2/x3	X1/x3
X1 Conectividad (n° trabéculas conectadas)	0,963*	0,502	0,498
X2 Conectividad (n° trabéculas/mm <sup>3</sup> )	D		
	92,7*	25,2	24,8

El número de trabéculas conectadas, está correlacionada con la densidad trabecular en el 92,7 % de los datos obtenidos.

### **Análisis del esqueleto trabecular**

Tabla 41. Análisis Anova  $\alpha = 0,05$ 

parámetro	F	p
N° ramificaciones)	5,17	0,022*
Voxels de unión	3,249	0,072
Longitud media ramas	10,423	0,002*
Longitud máxima ramas largas	9,849	0,002*
Longitud máxima ramas cortas	11,820	0,001*

Los datos experimentales son estadísticamente significativos los parámetros observados son muestras independientes y diferentes según el tratamiento experimental.



Tabla 42. Homogeneidad varianzas  $\alpha = 0,05$ 

Parámetro	F	p
Nº ramificaciones)	4,559*	0,032
Voxels de union	1,105*	0,360*
Longitud media ramas	21,565*	0,000074
Longitud máxima ramas largas	9,878*	0,002
Longitud máxima ramas cortas	12,528*	0,001

Tabla 43. Coeficiente de Pearson

parámetro	R									
	X1 Nº ramificaciones)									
X2 Voxels de union	x1x2	x1x3	x1x4	x1x5	x2x3	x2x4	x2x5	x3x4	x3x5	x4x5
X3 Longitud media ramas	0,602	0,660	0,862*	0,680	0,661	0,642	0,362	0,932*	0,840*	0,914*
X4 Longitud máxima ramas largas	D									
X5 Longitud máxima ramas cortas	36,3	43,6	74,3	46,2	43,8	41,2*	13,1*	869*	70,7*	83,6*

Se observa correlación directa entre el número de ramificaciones y la longitud máxima así como hay correlación entre las longitudes de las ramas más largas, y más cortas. Así se desprende que a mayor número de ramificaciones trabeculares, la longitud de las ramas es mayor tanto en las ramas largas como en las cortas. Proporcionando una idea de entramado trabecular

**Análisis Estadístico, Aplanamiento, Anisotropía y Dimensión Fractal****Tabla 44.** Análisis Anova  $\alpha = 0,05$ 

Parámetro	F	p
Aplanamiento)	0,375	0,695
Anisotropía	5,348	<b>0,020*</b>
Anisotropía grupos aloinjerto	0,039	0,847
Dimensión fractal	7,460	<b>0,008*</b>
Dimensión fractal grupos aloinjerto	0,150	0,709

Hay diferencias significativas con respecto al tratamiento en el caso de la anisotropía y la dimensión fractal, en ambos casos, la adición de aloinjerto mejora el callo de fractura, aunque la adición de PRP no lo mejora en ningún caso.

**Tabla 45.** Homogeneidad varianzas  $\alpha = 0,05$ 

Parámetro	F. Levene	s
Aplanamiento	<b>1.514*</b>	<b>0,146*</b>
Anisotropía	<b>4.537*</b>	<b>0,052*</b>
Anisotropía grupos aloinjerto	<b>15.869*</b>	0,003
Dimensión fractal	<b>3.322*</b>	<b>0,071*</b>
Dimensión fractal grupos aloinjerto	<b>0,764*</b>	<b>0,407*</b>

Tabla 46. Coeficiente de Pearson

Parámetro	R									
X1 aplanamiento										
X2 anisotropía	x1x2	x1x3	x1x4	x1x5	x2x3	x2x4	x2x5	x3x4	x3x5	x4x5
X3 anisotropía consolidación	-0,511	0,165	0,089	0,027	-0,642	0,389	-0,097	<b>-0,871*</b>	0,5	-0,651
X4 dimensión fractal	D									
X5 dimensión fractal consolidación	26,1	2,7	0,80	0,07	41,2	15,1	0,09	<b>76,0*</b>	25	42,5

La única correlación indirecta se obtiene en el caso de la anisotropía del callo consolidado con la dimensión fractal. Las ramificaciones trabeculares isotrópicas en el callo consolidado, aumentan la dimensión fractal. Los cambios en la superficie del hueso consolidado pueden determinar independientemente cambios en el espesor trabecular, espaciamiento y número trabecular en más del 76 % de los casos.

#### 4.7. ESTUDIO DENSIDAD MINERAL ÓSEA

Se ha analizado la densidad mineral ósea (DMO, en mg de Hidroxiapatita/ ml y g/cm<sup>3</sup>) en los callos de fractura con tejido regenerado dependiendo del tratamiento realizado (grupo control, aloinjerto y aloinjerto + PRP, así como en el hueso cortical intacto. La DMO de tejido regenerado se ha estimado a partir de los parámetros de calibración obtenidos, según nuestro método puesto a punto para las muestras estudiadas, mediante la utilización de phantoms de hidroxiapatita con una concentración y densidad conocidas y su correlación con valores de intensidad de gris obtenida en los TAC realizados en las áreas de interés ROI, mediante el algoritmo utilizado en el software Image J plugin densitometer.

Se obtuvo una correlación lineal entre el número de Hounsfield (NH intensidad de gris) y la DMO, siguiendo la siguiente ecuación para imágenes de 8 bits segmentadas:

$$DMO \text{ (expresado en mg/ml)} = a * NH + b$$

$$\text{Siendo } a = 5.8813$$

$$\text{y } b = -373.35$$

obtenidos a partir de la interpolación del ajuste lineal plugg-in densitometer

$$\text{Int gris} = 0,170 * DMO + 63.47$$

$$R^2 = 0,972$$

## 4.7.1 DMO en el callo de fractura

*Grupo control*

Determinación densidad mineral ósea a partir de los phantoms de hidroxiapatita para cada uno de los grupos de estudio.

Tabla 47. DMO control					
47	63	95	501	506	535
74,754	99,758	107,136	58,511	109,828	84,659
104,115	95,387	118,368	52,385	101,898	41,7
142,97	80,435	91,434	60,972	95,68	61,406
120,794	50,762	96,107	67,542	95,711	81,528
108,493	74,412	89,137	59,745	89,394	82,576
99,27	82,429	90,331	59	87,75	79,818
108,3993	80,5305	98,75217	59,6925	96,71017	71,94783
22,72653	17,42197	11,65324	4,868872	8,183662	17,05469
		<b>Int. gris</b>	<b>DMO (mg/ml HA)</b>	<b>DMO (g/cm<sup>3</sup>)</b>	
	<b>media</b>	<b>86,00542</b>	<b>132,5339</b>	<b>1,131</b>	
	<b>Desv std</b>	<b>18,43105</b>	<b>108,4</b>	<b>0,186</b>	

*Grupo aloinjerto:*

Tabla 48. DMO aloinjerto				
97	75	118	508	520
102,8	112,781	160,879	138,959	95,335
100,877	112,066	160,479	114,083	100,51
91,194	105,418	162,311	136,352	122,947
109,823	105,76	156,315	130,369	118,26
111,975	111,76	150,352	125,376	148,95
102,87	111,995	149,891	122,097	127,188
103,2565	109,557	156,7045	127,8727	118,865
7,357375	3,643178	5,477881	9,28207	19,4009
		<b>Int. gris</b>	<b>DMO (mg/ml HA)</b>	<b>DMO (g/cm<sup>3</sup>)</b>
	<b>media</b>	<b>123,2511</b>	<b>351,6501</b>	<b>1,350</b>
	<b>Desv. std</b>	<b>20,8988</b>	<b>122,9</b>	<b>0,122</b>

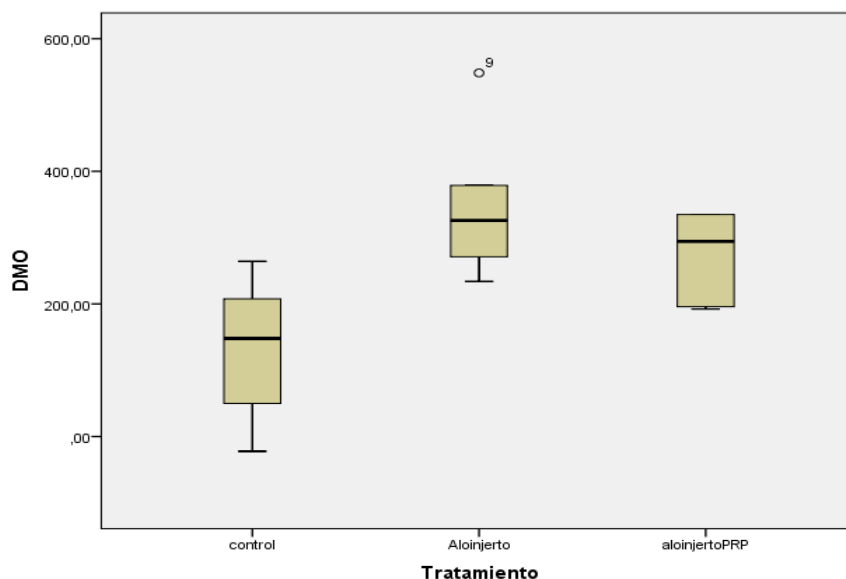
**Grupo Aloiinjerto + PRP**

<b>Tabla 49. DMO aloinjerto + PRP</b>				
73	88	102	524	519
90,065	112,991	114,252	133,735	82,568
87,61	103,438	122,815	124,838	72,016
95,785	98,78	119,793	126,4	51,653
100,793	85,197	108,594	85,059	57,25
117,925	84,942	91,609	115,667	47,927
88,391	91,655	124,03	136,66	66,225
96,7615	96,16717	113,5155	120,3932	62,93983
11,52179	11,04031	12,17457	18,81113	13,14219
		<b>Int. gris</b>	<b>DMO (mg/ml HA)</b>	<b>DMO (g/cm<sup>3</sup>)</b>
	<b>media</b>	<b>106,7093</b>	<b>254,3463</b>	<b>1,269</b>
	<b>Desv. std</b>	<b>12,16097</b>	<b>71,64</b>	<b>0,071</b>

**Tabla resumen:**

<b>Tabla 50. Determinación DMO, en el callo de fractura</b>			
<b>Grupos</b>	<b>DMO (mg HA/cm<sup>3</sup>)</b>	<b>std</b>	<b>c.v.</b>
<b>Control</b>	<b>132,53</b>	<b>108,4</b>	<b>0,81</b>
<b>Aloiinjerto</b>	<b>351,65</b>	<b>122,9</b>	<b>0,34</b>
<b>Aloiinjerto + PRP</b>	<b>254,34</b>	<b>71,64</b>	<b>0,28</b>

Como se puede observar la densidad mineral ósea, como indicativo del proceso de mineralización del callo de fractura, presenta una mayor calidad de callo de fractura en el grupo de aloinjerto, mejorando cuantitativamente el callo de fractura del grupo control. Como en otros apartados obtenemos que la incorporación en el tratamiento del PRP, supone una pérdida del potencial mineralizador en el proceso de cura en el callo.



**Gráfica 30.** Diagrama de cajas para la variable densidad mineral ósea.

Diagrama de cajas, la adición de PRP, no mejora la consolidación inducida por aloinjerto.

#### 4.7.2 DMO en el hueso cortical

##### **Grupo control:**

Igual que en el caso anterior la determinación de la densidad mineral ósea se ha realizado a partir de los phantoms de hidroxapatita para cada uno de los grupos de estudio.

**Tabla 51. DMO cortical control**

47	63	95	501	506	535
216,612	230	226,109	214,138	232,247	232,042
213,825	232	225,723	222,913	230,263	224,403
211,299	221	226,56	224,459	226,359	228,291
209,56	228	225,577	223,64	230,531	232,613
208,209	232	227,536	223,346	232,247	232,546
206,444	219	228,33	222,921	232,075	231,608
210,9915	227	226,6392	221,9028	230,6203	230,2505
3,746587	5,656854	1,087946	3,846666	2,267279	3,284384
		<b>Int. gris</b>	<b>DMO (mg/mlHA)</b>	<b>DMO (g/cm<sup>3</sup>)</b>	
	<b>media</b>	<b>224,5674</b>	<b>947,5554</b>	<b>1,9468</b>	
	<b>Desv. std</b>	<b>7,355955</b>	<b>43,48154</b>	<b>0,0434</b>	

**Grupo Aloinjerto:**

Tabla 52. DMO Aloinjerto				
97	75	118	508	520
232,933	235,299	232,959	224,312	218,973
232,43	235,029	253	223,793	223,221
232,743	234,613	244	224,236	223,054
233,572	232,955	241	224,799	222,66
218,517	234,355	253	225,147	220,874
216,663	233,128	246	226,049	221,954
227,8097	234,2298	244,9932	224,7227	221,7893
7,946573	0,978111	7,628701	0,80185	1,625041
	<b>Int. gris</b>	<b>DMO (mg/mlHA)</b>	<b>DMO (g/cm<sup>3</sup>)</b>	
<b>media</b>	<b>230,7089</b>	<b>983,7492</b>	<b>1,9830</b>	
<b>Desv. std</b>	<b>9,22275</b>	<b>54,25577</b>	<b>0,0542</b>	

**Grupo Aloinjerto+ PRP**

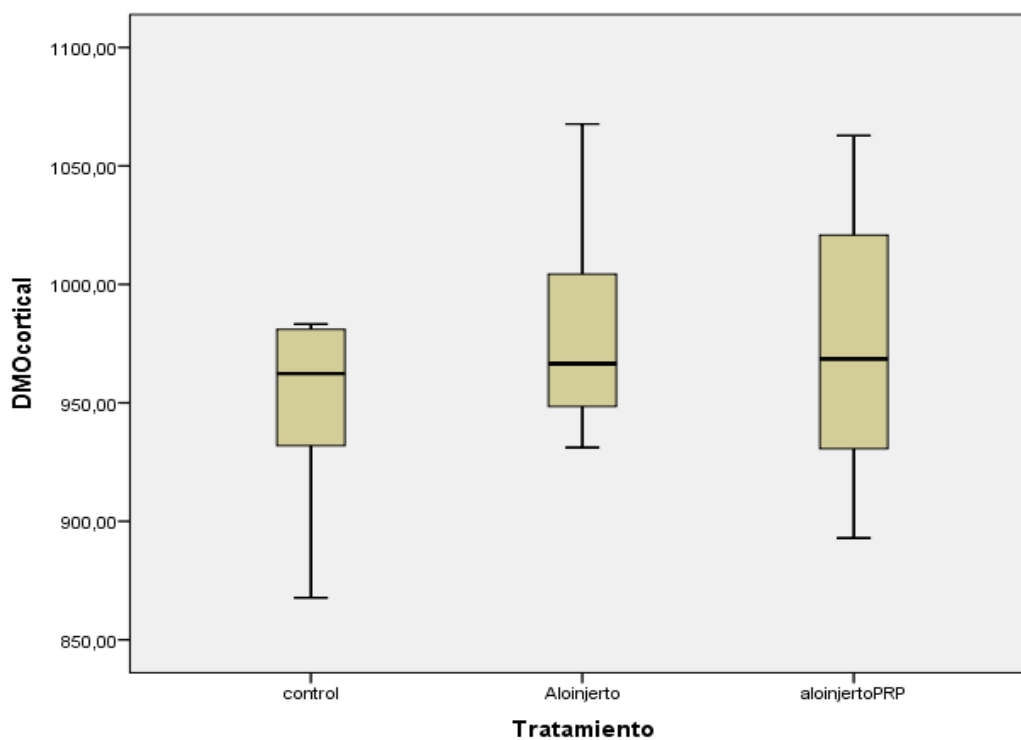
Tabla 53. DMO aloinjerto + PRP				
73	88	102	524	519
222,134	228,528	217,53	234,689	250
222,255	228,477	217,042	236,697	250
222,067	227,373	215,975	236,711	232
222,206	227,61	213,99	237,525	250
221,251	228,52	213,976	238,898	231
220,232	228,36	213,204	237,642	252
221,6908	228,1447	215,2862	237,027	244,1667
0,805385	0,51497	1,806889	1,400134	9,847165
	<b>Int. gris</b>	<b>DMO (mg/mlHA)</b>	<b>DMO (g/cm<sup>3</sup>)</b>	
<b>media</b>	<b>229,2631</b>	<b>975,2441</b>	<b>1,9745</b>	
<b>Desv. std</b>	<b>11,5795</b>	<b>68,10351</b>	<b>0,0681</b>	

Los valores obtenidos de densidad mineral ósea para el hueso cortical son homogéneos y similares en todos los casos.



Tabla resumen DMO hueso cortical

Tabla 54. Determinación DMO, en el hueso cortical			
Grupos	DMO (mg HA/cm <sup>3</sup> )	std	c.v.
Control	947,55	43,48	0,045
Aloinjerto	983,74	54,25	0,055
Aloinjerto + PRP	975,24	68,10	0,069



Gráfica 31. Diagrama de cajas para la variable densidad mineral ósea cortical.

Diagrama de cajas, donde se observa que no hay diferencias significativas en el hueso cortical sano en cualquiera de los tratamientos.

### 4.7.3 Análisis estadístico DMO.

Como en casos anteriores el análisis de la varianza permite contrastar la hipótesis nula de que las medias de más de 2 poblaciones son iguales, frente a la hipótesis alternativa de que por lo menos una de las poblaciones difiere de las demás en cuanto a su valor esperado.

En este caso se va a contrastar el análisis de resultados experimentales, en los que nos interesa comparar los resultados de 3 'tratamientos' denominados control, aloinjerto y aloinjerto + PRP con respecto a la variable dependiente o magnitud determinada Densidad Mineral Ósea.

El Anova requiere el cumplimiento de los siguientes supuestos:

- Las poblaciones (distribuciones de probabilidad de la variable dependiente correspondiente a cada factor) son normales.
- Las K muestras sobre las que se aplican los tratamientos son independientes.
- Las poblaciones tienen todas igual varianza (homoscedasticidad).
- El intervalo de confianza para la media se calcula por defecto al 95% de confianza.

Para ello hemos realizado el análisis de varianza, con p de significación  $P < 0,05$  y homogeneidad de varianzas  $s > 0,05$  en cada tratamiento y en cada caso.

**Tabla 55.** Análisis Anova  $\alpha = 0,05$

Parámetro	F	p
DMO callo fractura	6,322	0,012*
DMO hueso cortical	0,629	0,549

Hay diferencias significativas en cuanto al tratamiento en la densidad mineral ósea del callo de fractura. En el caso del hueso cortical sano, no hay diferencias significativas en la mineralización del hueso siendo esta igual en todos los casos.

Tabla 56. Homogeneidad Varianza  $\alpha = 0,05$ 

Parámetro	Factor Levene	S
DMO callo fractura	0,565*	0,582*
DMO hueso cortical	0,629*	0,492*

Tabla 57. Coeficiente de Pearson

parámetro	R		
	x1x2	x1x3	x2x3
X1 DMO control callo fractura)	-0,066	-0,329	0,563
X2 DMO aloinjerto callo fractura)	D		
X3 DMO aloinjerto + PRP callo fractura)	0,4	10,8	31,6

No hay correlación alguna entre los valores de densidad mineral ósea entre el grupo control y los grupos experimentales, siendo las variaciones de densidad producidas y generadas por el tipo de tratamiento experimental, la adición de aloinjerto y aloinjerto + PRP.

#### 4.7.4 Correlación de la Densidad mineral ósea del callo de fractura y las variables histomorfométricas.

Tabla 58. Coeficiente de Pearson

Parámetro	R		
	x1x2	x1x3	x2x3
X1 DMO callo fractura)	0,941*	0,980*	0,989*
X2 Volumen callo fractura)	D		
X3 Thickness callo fractura)	88.5*	96.04*	97.8*

Como se observa en el coeficiente de Pearson hay correlación directa entre los valores de densidad mineral y volumen de callo de fractura así como con el grosor de las trabéculas en más del 90 % de los casos obtenidos. Así, a mayor volumen de callo, mayor grosor de las trabéculas, y mayor mineralización.

#### 4.7.5 Correlación de la Densidad mineral ósea del callo de fractura y las variables geométricas de las trabéculas.

Tabla 59. Coeficiente de Pearson				
Parámetro	R			
X1 DMO callo fractura)				
X2 conectividad	x1x2	x1x3	x1x4	x1x5
X3 aplanamiento	0,709*	-0,949*	-0,927*	0,820*
X4 anisotropía	D			
X5 dimensión fractal	50,26*	90,06*	85,9*	67,2*

En este caso se observa una clara correlación indirecta entre la densidad mineral ósea y el aplanamiento trabecular y la anisotropía del callo de fractura. De modo que a mayor densidad mineral ósea, supone un descenso claro en la anisotropía del entramado trabecular en más del 60 % de los casos, en cambio la correlación con el aplanamiento de las trabéculas es muy discreta.

La correlación directa entre la DMO del callo de fractura y el número de trabéculas conectadas y el valor de dimensión fractal, supone que a mayor densidad mineral ósea, tenemos cambios en la superficie del callo de fractura y en la estructura trabecular, de modo que aumentan el número de trabéculas conectadas entre sí en prácticamente un 90 % de los casos estudiados.

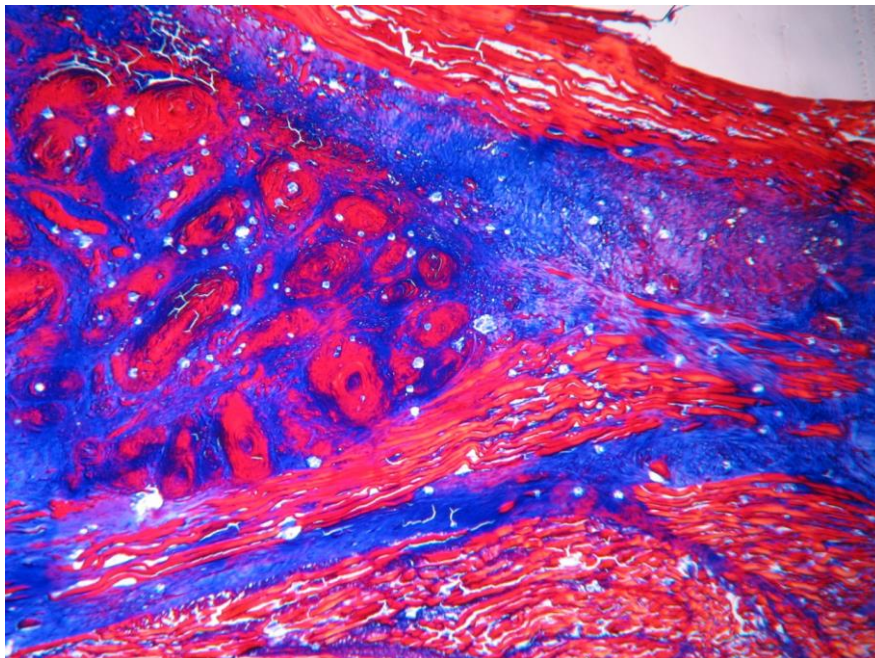
## 4.8 HISTOLOGÍA

En nuestro trabajo experimental, la histología ha sido una herramienta de confirmación de los datos obtenidos tanto en las imágenes de reconstrucción tridimensional, como los parámetros histomorfométricos realizados. De esta manera el estudio histológico simple nos sirve para valorar de forma cualitativa el tipo de neoformación ósea y las características del callo de fractura en los tres grupos estudiados.

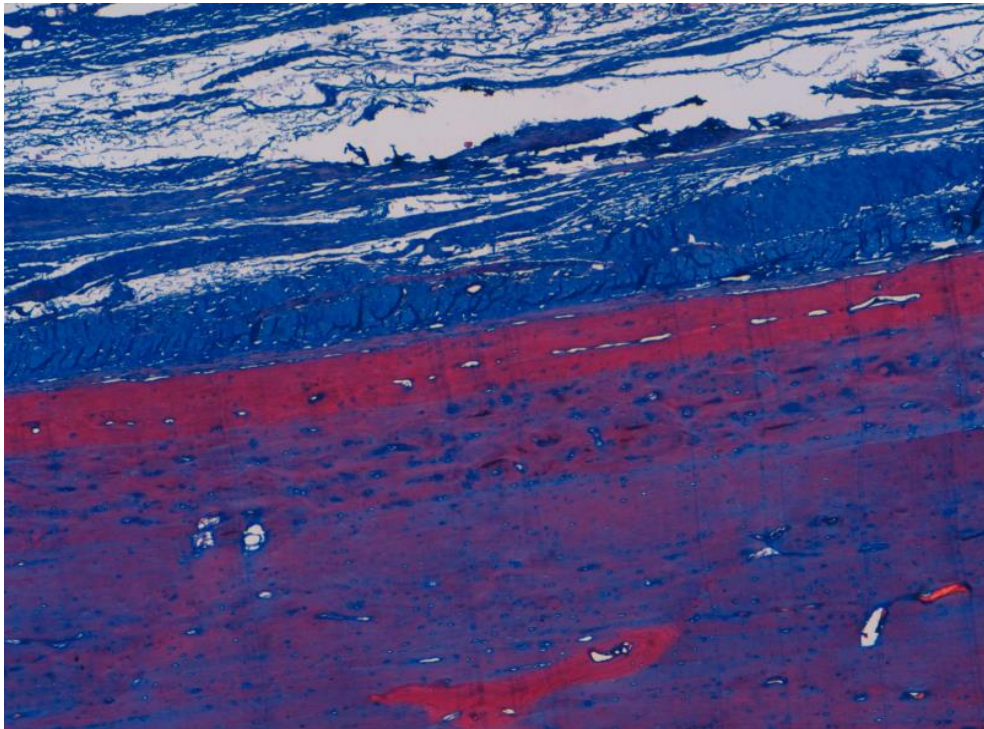
En primer lugar decir que en los tres grupos de estudio se observa distintos estadios de madurez ósea y un patrón de osificación mixta.

### ***Grupo Control***

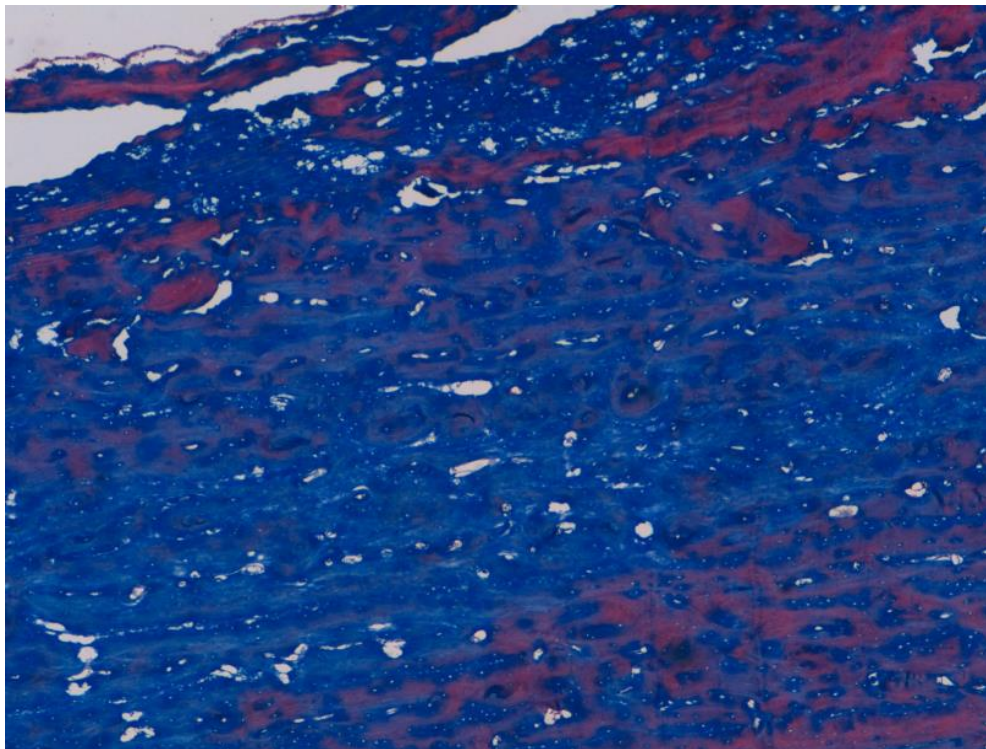
En el grupo control, encontramos una osificación membranosa, con actividad perióstica generando callos alrededor del borde de fractura, hueso muy inmaduro desorganizado.



**Figura 64.** Tricrómico de Masson (4x) .Observamos punta de osificación con patrón de osificación mixta, actividad perióstica y hueso neoformado inmaduro. Proceso de osificación membranosa.



**Figura 65** Tricrómico de Masson. 4x .Intención de osificación por aposición, osificación membranosa. Hueso nuevo, bien orientado



**Figura 66** Tricrómico de masson (4X). Creación de callo primario, irregular inmaduro, con poca vascularización.

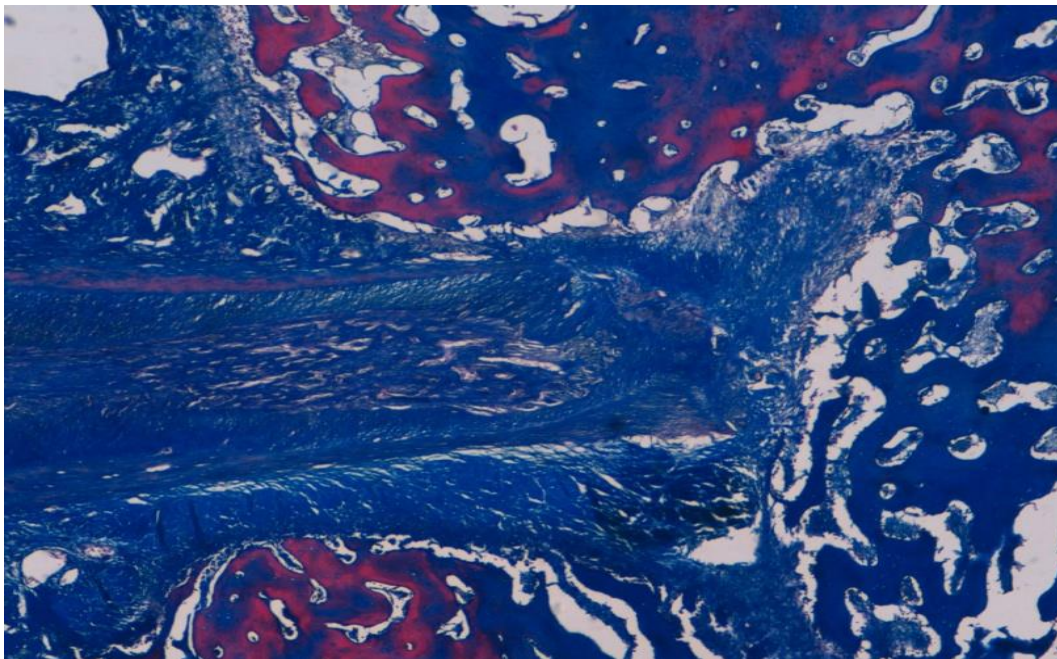


### **Grupo Aloinjerto**

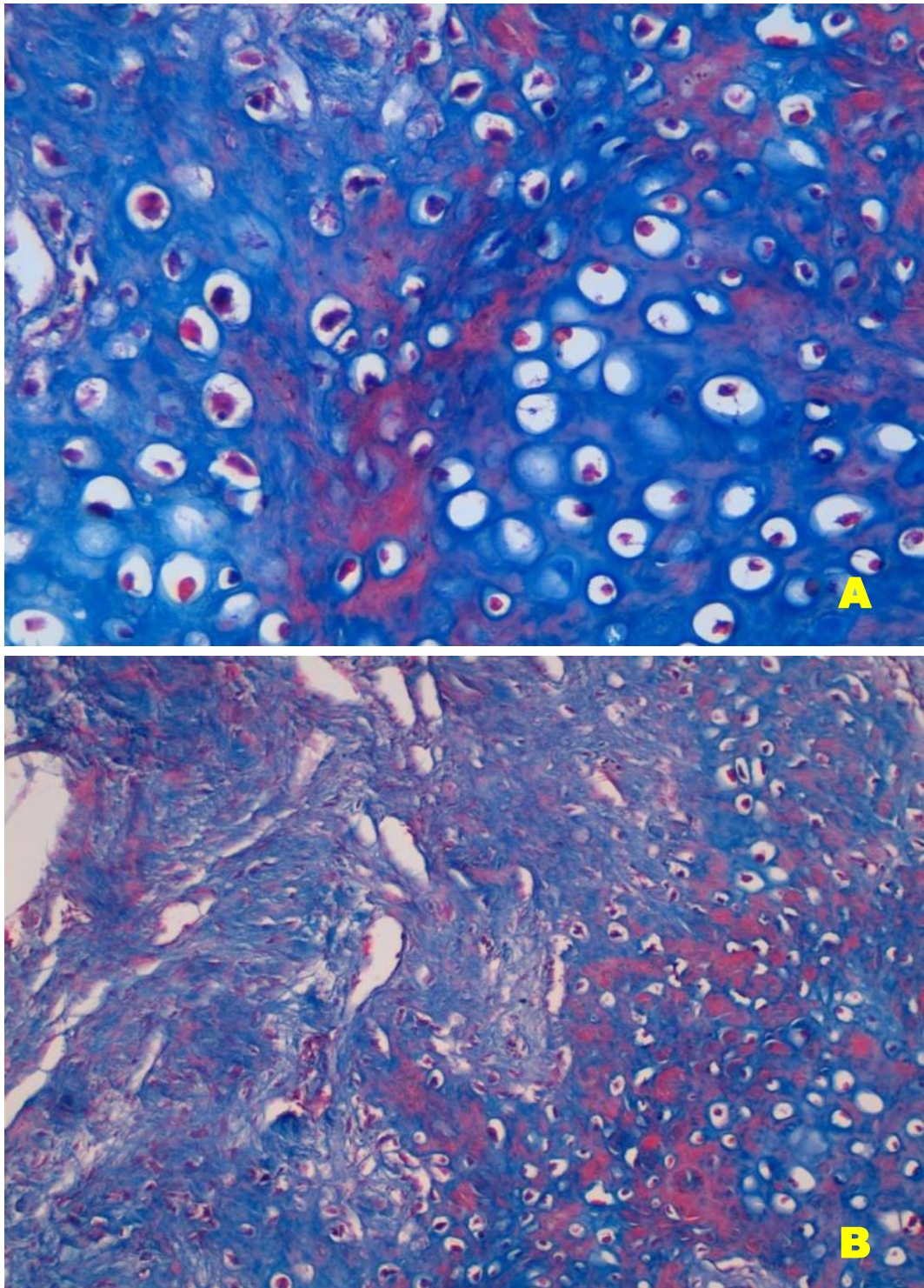
La reparación que se observa en los cortes histológicos es una reparación secundaria con la formación de un tejido interfragmentario fibroso y / o conectivo que progresivamente y de forma secundaria termina osificándose. Encontramos áreas de actividad celular, proceso de neoformación y calcificación con osificación de patrón mixto tanto membranosa como endocondral dependiendo de las zonas de osificación.

El aumento de la vascularidad con respecto al callo del control casi avascular. 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. También se observa procesos de osteointegración de los chips corticales procedentes de aloinjerto con amplias zonas de osificación y reabsorción

En general 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.

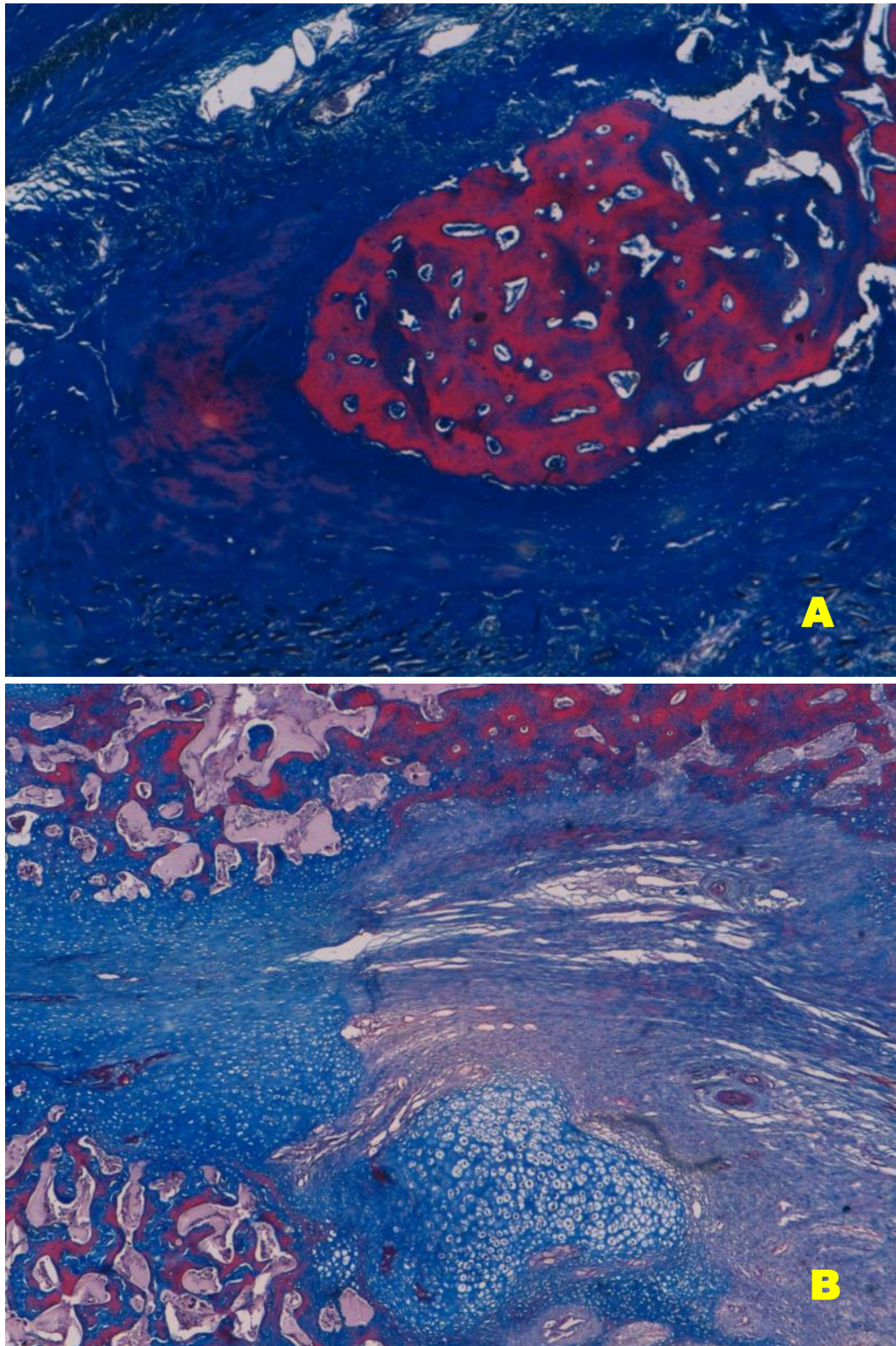


**Figura 67** .Tricrómico de Masson (4X) Gap óseo, entre extremos, con gran actividad de osificación de tejido perióstico. Tejido hipercelular con actividad osteoblástica y osteoclástica.



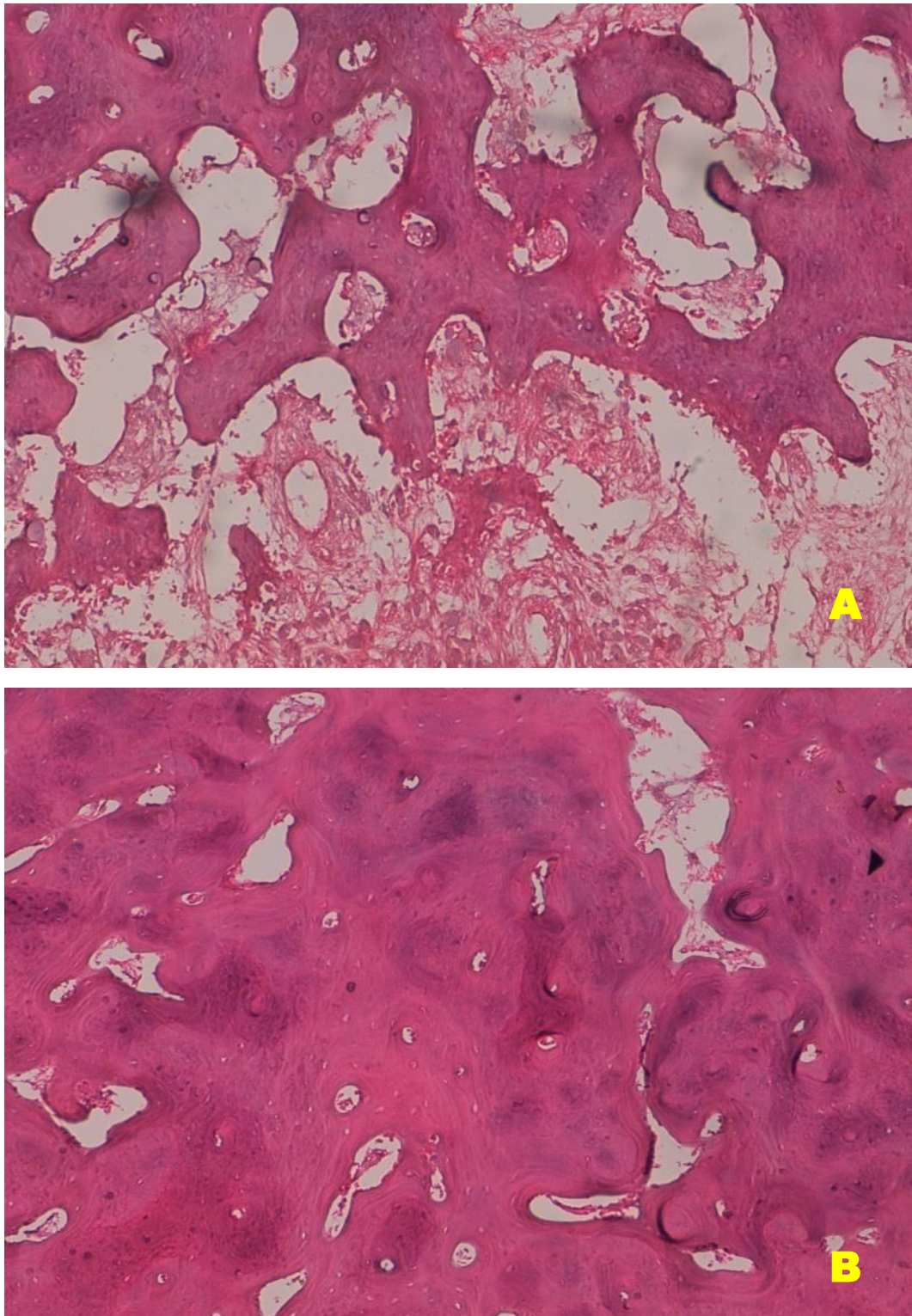
**Figura 68** Tricómico de Masson. A(40X) fibroblastos totipotentes, callo más conectivo. B. (20X) Hiper celularidad





**Figura 69** Tricrómico de Masson (4X) A Osteointegración. Gran actividad osificación, chips de aloinjerto en resorción/calcificación. B Hipercelularidad. Osificación, Matriz osteoblástica con vascularización endocondral células pluripotenciales osteoprogenitoras.

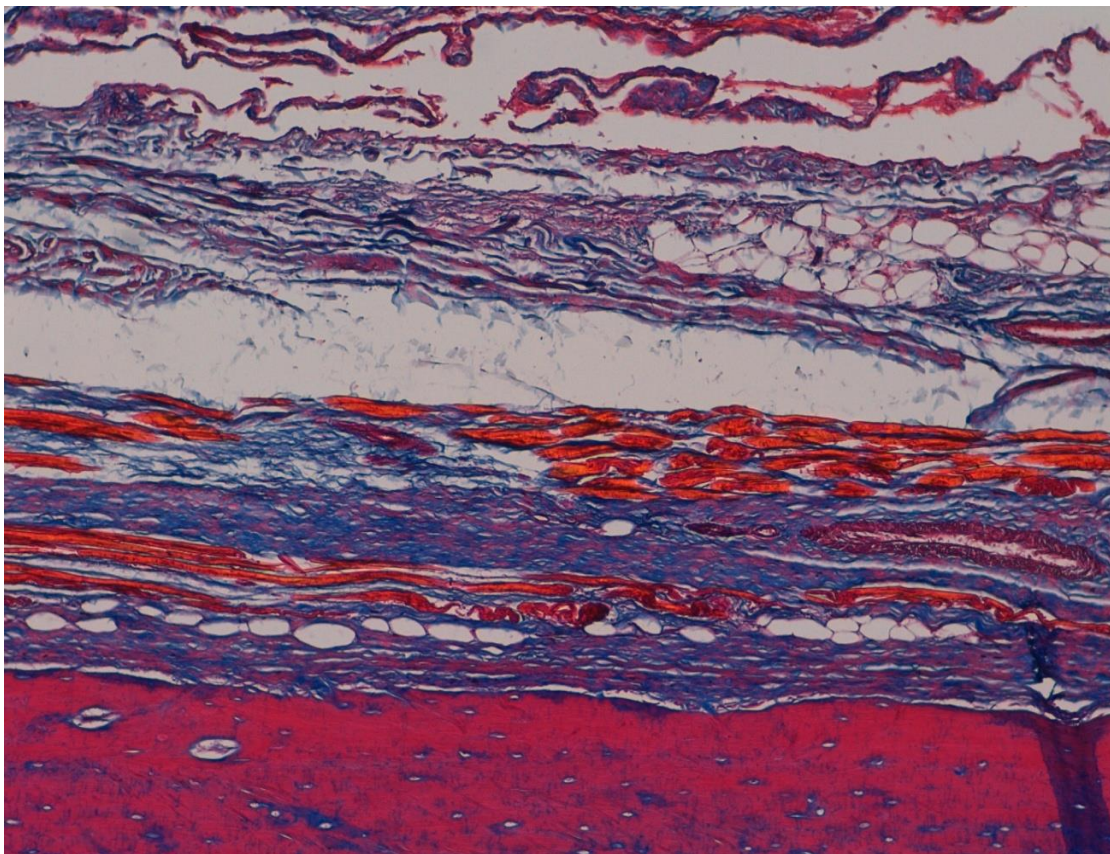




**Figura 70** Hematoxilina Eosina (10x), A. proceso de osificación. Lagunas rellenas de matriz formadora de hueso B. Callo duro Este tipo de hueso se asemeja más a un hueso laminar, maduro vascularizado.

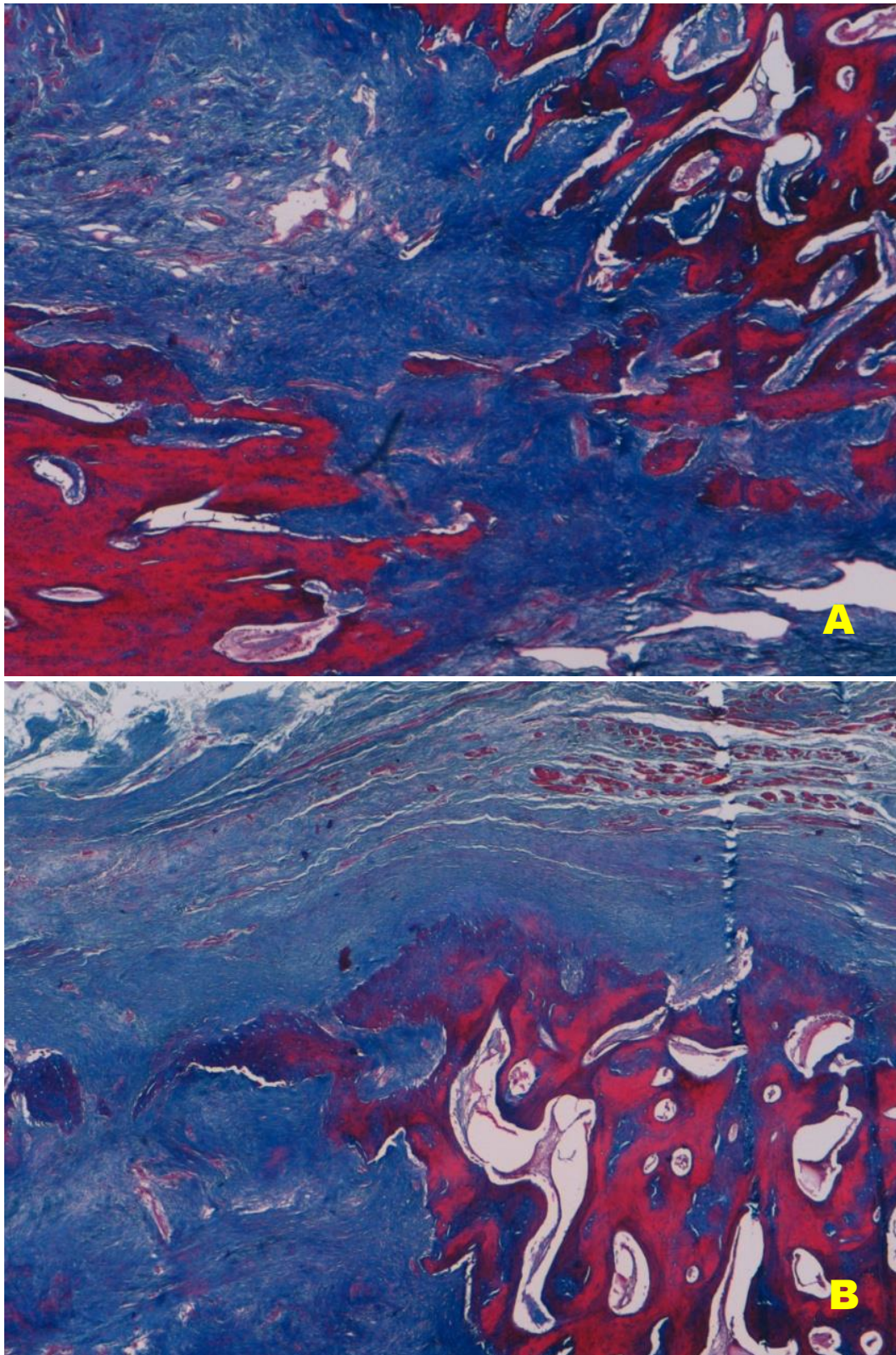
**Grupo Aloinjerto + PRP**

En cuanto al grupo de aloinjerto + PRP, Se observa callo muy fibrótico, desorganizado, con menor calcificación, con osteointegración de los chips, pero de forma menos reactiva (Ilustraciones 71-73). Aumento de la vascularidad con respecto al callo del control casi avascular al igual que el grupo de aloinjerto. La consolidación secundaria presenta osificación membranosa por aposición y mucha menos reacción endocondral que en el caso de aloinjerto solo. El hueso formado por este proceso es un hueso perióstico formado por osificación membranosa (Figura 74). Encontramos un tejido inmaduro, con áreas de osteoide con material extracelular desorganizado se observa como los osteoblastos depositan o entretajan el colágeno desorganizado, este es un tipo de hueso reticular no laminar.



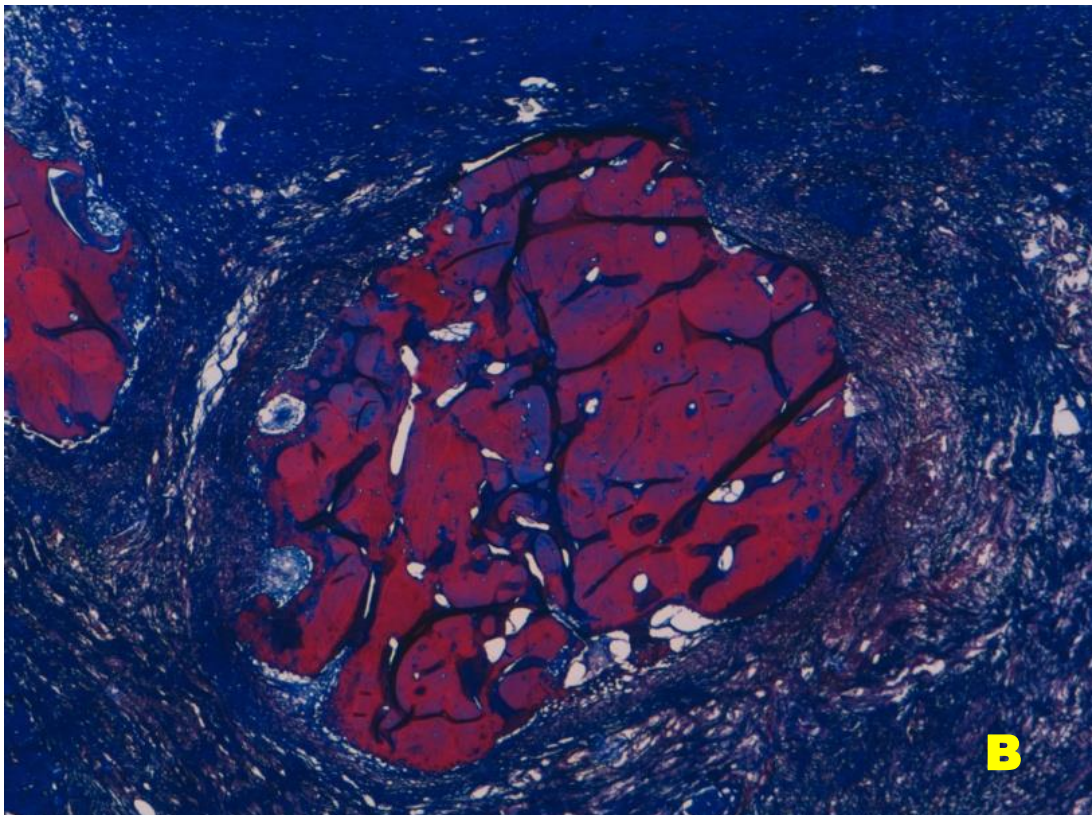
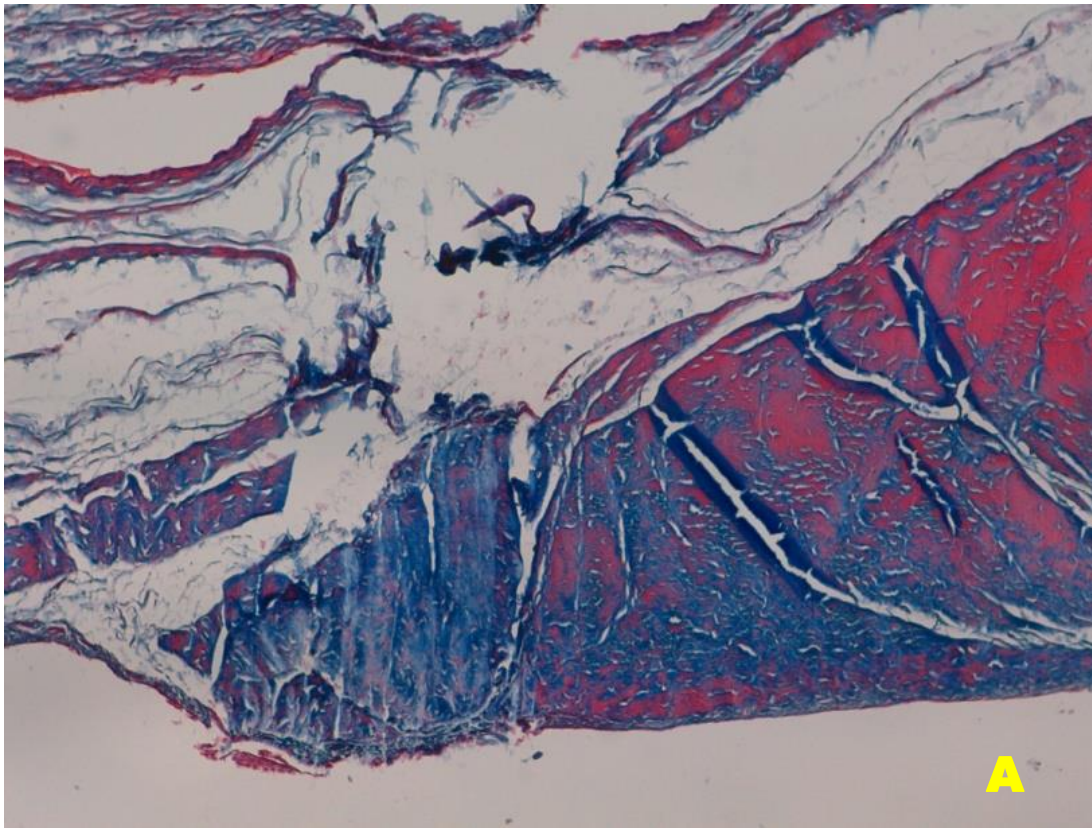
**Figura 71** Tricrómico de Masson, (10 x), osificación membranosa, por aposición perióstica





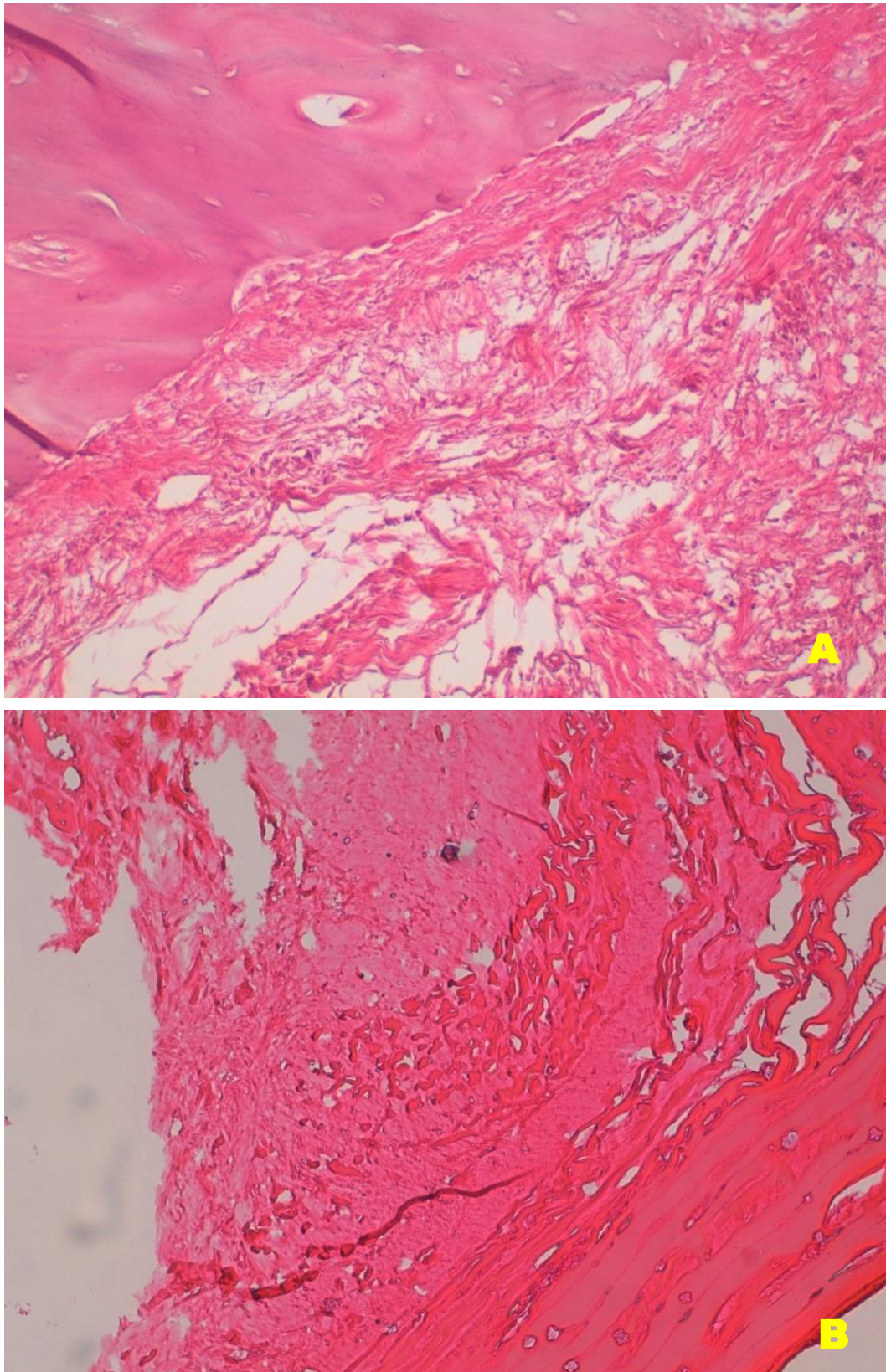
**Figura 72.** Tricrómico de Masson (4X) A Proceso osificación entre bordes, se obtiene proceso con menor celularidad que el caso anterior. B Osificación con menos potencia, zonas, vascularizadas.





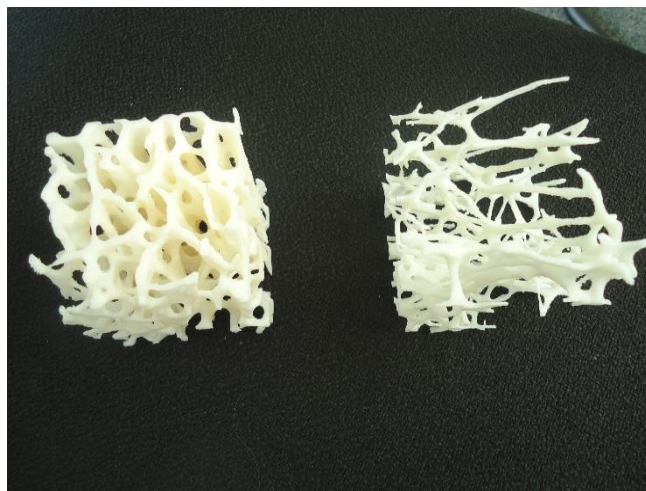
**Figura 73** Tricrómico de Masson A (10x) La consolidación secundaria presenta osificación membranosa por aposición y mucha menos reacción endocondral que en el caso de aloinjerto solo. El hueso formado por este proceso es un hueso perióstico. B (4X), Proceso osteointegración chips, con menor actividad que en el caso de aloinjerto.





**Figura 74** Hematoxilina eosina (10 X) A. Encontramos un tejido inmaduro, con áreas de osteoide con material extracelular desorganizado. B. se observa como los osteoblastos depositan o entretejen el colágeno desorganizado, este es un tipo de hueso reticular no laminar.





## 5. DISCUSIÓN



*Ilustración 5. Modelos de estructura trabecular*

El Plasma Rico en Plaquetas Puro (P-PRP), es una modalidad de concentrado plaquetario fácilmente disponible para, posiblemente; mejorar la cicatrización del tejido musculo-esquelético. A pesar de la creciente popularidad de los PRP para ayudar en el tratamiento de trastornos de los tejidos blandos, el beneficio total de PRP para favorecer la cicatrización de los tejidos en el sistema músculo-esquelético no se ha explorado a fondo, sobre todo para la mejora en la curación de fracturas óseas, una de las mayores preocupaciones de gran parte de los cirujanos ortopédicos<sup>241</sup>.

Esta tecnología, no está exenta de controversia, ya que numerosos autores presentan resultados donde el PRP no presenta ningún efecto beneficioso sobre la consolidación ósea, reparación de fracturas o regeneración tisular<sup>33, 50-56</sup>. El riesgo de realizar un uso incorrecto o no apropiado es muy alto<sup>30</sup>, dada la gran variabilidad de métodos de preparación así como de condiciones distintas de uso, debida seguramente, en muchos casos, a la escasez de información rigurosa de su manipulación, disponibilidad y efectividad<sup>33, 118</sup>.

La aplicación de concentrados plaquetarios para liberar factores de crecimiento a partir de las plaquetas es especialmente importante en condiciones patológicas como la curación de fracturas comprometidas como consecuencia de un ambiente biológico inadecuado con concentraciones muy reducidas de TGF, IGF e PDGF<sup>31</sup>, o bien fracturas de difícil consolidación o recalcitrantes.

La combinación de concentrados plaquetarios con distintos materiales, en todo tipo de defectos óseos ha sido ampliamente utilizada en diversas situaciones, con resultados muy heterogéneos y dispares.

Hasta la fecha, ha sido muy difícil llegar a un acuerdo sobre el potencial del plasma rico en plaquetas en la osteogénesis y la osteoinducción de la consolidación ósea, y su papel está todavía por dilucidar. La falta de consenso sobre la composición y la producción de los concentrados plasmáticos, hace imposible el establecimiento de un estándar que integre a todos los trabajos de investigación. Esta disparidad de resultados es debida probablemente a:

- Las diferencias entre las líneas celulares utilizadas.
- Los diferentes procedimientos de producción del PRP, distinto número de plaquetas, distinto número de factores de crecimiento.

Nos encontramos ante una situación en la que los preparados, las soluciones y los efectos en la consolidación ósea son tan dispares, que es imposible catalogar un producto, para obtener resultados satisfactorios en el uso clínico.

Por ello, nuestro trabajo experimental pretende el diseño de un protocolo de obtención del plasma rico en plaquetas, que sea eficaz, efectivo y sobre todo reproducible; para ello es necesario:

- cuantificar el número de plaquetas.
- cuantificar la concentración de factores de crecimiento.

De forma estándar, mediante la utilización de una metodología optimizada con el mismo anticoagulante, e igual formula activadora, de este modo, siempre utilizaremos el mismo producto y podremos estudiar su efecto.

Para valorar el efecto de este concentrado estándar, es muy interesante relacionarlo con sustancias osteopromotoras conocidas, como sustitutos óseos capaces de aportar capacidad osteoconectiva en la consolidación ósea y de esta manera dar solución a situaciones comprometidas en la curación ósea que nos permita extrapolar los resultados a la clínica para que los cirujanos puedan utilizarlo con toda seguridad.

Conocer de antemano todas las características bioquímicas, citológicas del PRP nos permitiría valorar adecuadamente su eficacia así como comparación de distintas aplicaciones.

Para cumplir con el objetivo de nuestro estudio, hemos realizado un P-PRP estandarizado con citrato dextrosa, sin leucocitos y activado con trombina y calcio, según revisión bibliográfica. Mediante diferentes métodos de concentración plaquetaria, hemos caracterizado la concentración de plaquetas y de factores de crecimiento así como hemos determinado la cinética de liberación en las tres primeras horas después de la lesión.

El modelo de fractura, utilizado en el estudio de la consolidación y reparación ósea, ha sido un defecto crítico cubital en ovejas incapaz de regenerarse por sí mismo. Para ello hemos utilizado un tamaño de defecto en la proporción de más de 1.5 veces el tamaño medular. Para asegurar una fractura de no unión hemos estudiado la consolidación del cúbito en dos tamaños de gap correspondientes a una masa ósea de 14 mm y 20 mm de longitud en un periodo de 8 semanas de evolución.

Para dotar al P-PRP de capacidad osteoconectiva, en nuestro estudio de consolidación, hemos utilizado aloinjerto 3,5 cc de masa córtico-esponjosa, no estructural, en forma de chips tratado previamente con antibioticoterapia. La densidad mineral ósea DMO del callo de fractura se ha determinado utilizando un ajuste de calibración mediante phantoms de hidroxiapatita con una concentración y densidad predeterminadas de antemano. Esto nos ha permitido relacionar la DMO con los valores de TAC obtenidos en cada callo de fractura. El seguimiento de la consolidación ósea, se ha realizado mediante análisis de imagen, de este modo se ha podido determinar los parámetros histomorfométricos como son el volumen del callo de fractura, grosor de las trabéculas y la distancia entre bordes de fractura. Además, mediante el plugg-in Bone J, hemos podido relacionar los parámetros de la geometría trabecular con la calidad del callo de fractura, a partir del estudio de las características de las trabéculas, número de trabéculas, entramado reticular, forma y disposición (anisotropía) así como la relación con la dimensión fractal relacionada con la densidad mineral ósea y variaciones a nivel de superficie ósea.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio, nos muestran que:

- La concentración plaquetaria, nos permite obtener una concentración de factores de crecimiento conocida de antemano.
- La aplicación sobre un defecto cortical crítico, provoca, la consolidación completa en un 20 % de los casos, con un callo de fractura, distinto si se utiliza aloinjerto o aloinjerto + P-PRP,
- El efecto estimulador del P-PRP está muy cuestionado ya que en la mayoría de parámetros estudiados, no solo no estimula si no que la adición de P-PRP, supone una clara pérdida de potencial mineralizador en el proceso de consolidación del callo.

En nuestro modelo experimental la adición de P-PRP genera callos de fractura, de peor calidad ósea, con un esqueleto trabecular más laxo, y un entramado mucho más fino que el obtenido con el aloinjerto. Estos resultados, se han visto corroborados por el estudio histológico con grandes diferencias en cuanto a celularidad, mineralización y tipo de osificación.

## CONCENTRADOS PLAQUETARIOS

La hipótesis de trabajo que ha conducido al desarrollo del PRP es que en un producto con mayor concentración de plaquetas, entre 4 o 7 veces el valor basal, éste presenta unos niveles de factores de crecimiento que aumentan en relación lineal con el número de plaquetas<sup>79</sup> en el foco de fractura. Para otros autores, en cambio, la liberación de factores de crecimiento no está relacionada con el número de plaquetas del concentrado<sup>104, 266, 267</sup>.

Se hace necesario, diseñar un protocolo de preparación de PRP que sea reproducible, en cuanto a cantidad de PRP disponible, concentración plaquetaria, concentración de factores de crecimiento liberados, anticoagulante utilizado, y proceso de activación de las plaquetas donde se pueda determinar qué factores de crecimiento se liberan, como se liberan y durante cuánto tiempo.

Nuestro protocolo consiste en P-PRP abierto que se corresponde con PRP puro, (sin leucocitos ni hematíes, para evitar las posibles interacciones de la serie blanca en la liberación de factores de crecimiento, así como modificar el proceso inflamatorio durante el hematoma), con citrato dextrosa como anticoagulante, ya que el anticoagulante mayoritario utilizado en estos concentrados es el citrato sódico<sup>33</sup> y le hemos añadido dextrosa, ya que aumenta la estabilidad y reduce el volumen de estos preparados<sup>51,105</sup>.

La concentración plaquetaria la hemos preparado atendiendo a los métodos de sedimentación publicados para obtener el mejor número de plaquetas del producto final.

Debido a la gran variedad de métodos de preparación de concentrados plaquetarios, nuestro primer objetivo fue cuantificar el nivel basal de las plaquetas en sangre periférica (Tabla 7). Cuantificamos también el nivel plaquetario atendiendo al método de concentración, con una sola centrifugación, (método Anitua) la concentración plaquetaria no es tal, porque se pierden muchas plaquetas por arrastre (drag effect) de la fase celular tanto roja como blanca (Tabla 8).

Hay autores que consideran que el PRP óptimo se consigue mediante una sola centrifugación, en cambio, Max *et al.*<sup>26</sup> aseguran que el PRP obtenido con una sola centrifugación no es un PRP, sino una mezcla de PRP y PPP (plasma pobre en plaquetas). Valores de PRP por debajo de 4 veces el nivel basal es un PRP diluido.

En nuestro modelo, confirmamos estos resultados ya que el nivel de plaquetas con una sola centrifugación está por debajo del nivel basal (Tabla 8).

Se hace por tanto necesario centrifugar una segunda vez con el fin de conseguir una mayor concentración plaquetaria.

En nuestro caso estudiamos tres velocidades distintas de centrifugación atendiendo a la bibliografía<sup>33, 266</sup>. Así, de los tres métodos utilizados, el que posee mayor concentración de plaquetas es el método de dos centrifugaciones: una primera a 500 g 10 min. y una segunda a 1000 g 8 min. (Tabla 9).

A la hora de aplicar nuestro P-PRP en el modelo experimental el concentrado plaquetario se ha añadido a aloinjerto de cresta ilíaca (3,5 cc) más las unidades de trombina y cloruro de calcio al 10%, en total el número de plaquetas aplicado en nuestro modelo ha sido,  $30,45 \times 10^6/\mu\text{l}$ . Lo cual supone un aumento estadísticamente significativo con un valor de significación  $s = 0,01$   $p < 0,05$ . (Gráfica 1), (Tabla 13).

Los resultados obtenidos reflejan un aumento de concentración plaquetaria de 7,1 veces el nivel basal. Esto proporciona un nivel suprafisiológico de plaquetas comparable a los obtenidos en otros experimentos también en ovejas<sup>38, 250</sup>, con aumentos entre 6-8 veces los valores basales y en la misma proporción que PRP utilizado en humanos<sup>21, 35, 69, 268</sup>.

Este nivel de plaquetas permite aumentar la concentración de factores de crecimiento en el foco de fractura. Aunque hay autores que determinan que plasmas muy concentrados podrían tener un efecto inhibitorio, existen muchas otras variables en la preparación de PRP y su uso que influyen también en su eficacia como son la concentración de factores de crecimiento, volumen PRP, la presencia de aditivos, el tamaño del defecto etc<sup>118, 233, 266, 269, 270</sup>.

Kawasumi *et al.*<sup>80</sup> estudió el efecto del PRP, dependiente de la concentración de plaquetas, clasificó el PRP en cuatro tipos denominados H (1000%), M (350%), L (117%) y P (pobre menos que el basal), observando que el PRP H con 9 veces más plaquetas que el nivel basal, es el único que incrementaba la proliferación celular, mientras que los PRP M, L y P, no tenían efecto alguno.

Los estudios que utilizan modelos celulares *in vitro*, permiten la evaluación de los efectos de los diferentes productos de PRP en condiciones muy controladas y reproducibles. La principal conclusión de estos estudios es que existen muchos

productos PRP diferentes y los investigadores tienen que informar sobre la composición de los componentes celulares y proteicos de cada producto.

Estos diferentes productos pueden tener efectos distintos según las diferentes estirpes celulares tratadas en las lesiones del aparato locomotor. Estos estudios pueden construir la base para entender los resultados tan variables de los estudios clínicos sobre el uso de PRP<sup>271, 272</sup>.

Cuando se habla de PRP, hay que considerar un gran número de variables<sup>273</sup>. Estas variables se relacionan principalmente con:

- Los métodos de preparación de PRP.
- El tipo de activadores.
- Inter e intra variabilidad entre especies.
- Tipos de patología a tratar.
- Los modos y tiempos de administración.
- La asociación de PRP con otros tratamientos o sustitutos óseos.

Se hace por tanto indispensable, determinar qué número de factores de crecimiento se están liberando en relación con el número de plaquetas concentradas que se aplican.

### **ACTIVACION PRP**

Varios parámetros influyen en la relación entre la concentración de plaquetas y los factores de crecimiento, determinados en el PRP. Entre ellos, la suficiente activación de las plaquetas para iniciar la liberación de factores, la presencia de glóbulos blancos, la presencia de factores de crecimiento a partir del coágulo de fibrina etc<sup>75</sup>.

En nuestro modelo experimental hemos utilizado un modelo P-PRP, que consiste en: concentración plaquetaria mediante doble centrifugación que nos asegura la concentración real de plaquetas, sin glóbulos blancos, ni hematíes para evitar cualquier interferencia en la liberación de factores de crecimiento ajenos a las plaquetas, anticoagulante citrato dextrosa, el método más eficaz clínicamente conveniente y fácil de usar para el proceso de preparación.

La activación de las plaquetas se ha llevado a cabo con la adición de cloruro de calcio al 10% el cual por sí solo produce agregación y secreción plaquetaria<sup>86, 92</sup>,

aunque en estudios de cultivos celulares parece ser que la adición de  $\text{CaCl}_2$  solo, no activaba las plaquetas, necesitaba de agonistas plaquetarios para obtener la degranulación y por tanto, no se liberaban factores de crecimiento<sup>81, 83</sup>.

Para asegurar una correcta activación de las plaquetas, se hace necesario la utilización del  $\text{CaCl}_2$  con otros activadores. En nuestro estudio hemos utilizado trombina bovina (agonista plaquetario más potente que también facilita la producción de fibrina desde el fibrinógeno) ampliamente utilizada en la bibliografía<sup>38, 69, 105, 234</sup> y que genera la degranulación irreversible de las plaquetas.

La degranulación de la plaquetas con calcio y trombina activa una inmediata liberación de VEGF, PDGF-AB, BB y TGF  $\beta$ 1 y una liberación retardada de IL-1 en los sobrenadantes de PRP<sup>110, 116</sup>.

En nuestro modelo experimental, la determinación de los factores de crecimiento liberados tras la activación con calcio y trombina, nos confirmó la degranulación plaquetaria en las condiciones de nuestro PRP con un aumento estadísticamente significativo  $p < 0,05$  con un  $s = 0,000197$  para PDGF y un  $s = 0,000137$  para TGF  $\beta$ 1. (Gráficas 6 y 7) y (Tabla 13).

La determinación de los factores de crecimiento en los preparados plasmáticos autólogos es un paso muy importante en la comprensión del efecto terapéutico de los mismos y así mismo, la constatación del aumento de concentración por el proceso de activación del preparado, determina la reproducibilidad de la metodología y de esta manera poder estandarizar su uso clínico.

## **FACTORES DE CRECIMIENTO**

El Plasma Rico Plaquetas/Plasma Rico en Factores de crecimiento es un grupo de preparados plasmáticos que actúa como biomaterial regenerativo con alto contenido en fibrina, con plaquetas, y citoquinas (Gráfica 6). Estimulan la circulación de las células madres, proliferación de fibroblastos y síntesis de Colágeno<sup>53</sup>. Presenta actividad osteopromotora<sup>9</sup> y su efecto en la curación de las fracturas tras una lesión traumática<sup>36, 42, 43</sup> es objeto de estudio por diferentes trabajos clínicos y ensayos experimentales.

En nuestro estudio, hemos determinado los factores de crecimiento TGF  $\beta$ 1 y PDGF (AB), porque son dos de los factores de crecimiento más importantes por su



función en la consolidación ósea y que se encuentran en mayor concentración en las plaquetas. El factor de crecimiento derivado de las plaquetas PDGF se encuentra en elevadas concentraciones en las plaquetas, en una proporción de 60-70% del isómero PDGF-AB, y la expresión de B-receptores es mayor que los A-receptores, por eso los dímeros PDGF-AB y PDGF-BB son los más importantes y/o abundantes frente a PDGF-AA<sup>118</sup>.

La síntesis de PDGF se ve favorecida como respuesta a estímulos externos, tensión de oxígeno baja, trombina o la estimulación por otros factores de crecimiento. Está secretado por las plaquetas en el callo de fractura y en lugar de la lesión, este factor puede producir el reclutamiento de células mesenquimales y otras células reparadora<sup>45</sup>. El efecto mitogénico sobre los osteoblastos es el reflejo de su acción primaria en el hueso<sup>86, 274</sup>.

El TGF  $\beta$ 1 se encuentra en el hematoma fracturario en las primeras 24 horas tras el traumatismo y es el factor de crecimiento mayormente implicado en la regulación de la formación ósea y cartilaginosa tras una lesión, así como en los procesos de remodelación<sup>28, 87</sup>. El TGF  $\beta$ 1 promueve la condrogénesis durante la osificación endocondral<sup>118</sup>.

En nuestro modelo experimental la técnica de Elisa nos permitió interpolar colorimétricamente la concentración de PDGF AB y TGF  $\beta$ 1 mediante el uso de anticuerpos. El ajuste lineal en ambos casos es mayor de 0,99 (Gráficas 1 y 2).

El nivel basal de referencia nosotros lo hemos determinado en sangre periférica en las mismas condiciones en que hemos determinado el nivel basal de plaquetas. El resultado ha sido de **281 pgr/ml** de PDGF y **787 pgr/ml de TGF  $\beta$ 1** respectivamente. (Tabla 10). Los datos son del mismo orden de magnitud que los publicados en otros modelos experimentales<sup>38, 69, 105</sup>.

Una vez concentradas las plaquetas, éstas han sido activadas mediante la adición de 1000 u de trombina y CaCl<sub>2</sub> al 10% por ml de plasma. Para determinar si la liberación se producía de forma instantánea o bien se liberaban poco a poco, hemos realizado una cinética de liberación, determinando los niveles de factores de crecimiento a los 10 min., 60 min. y 180 min. (Tablas 11 y 12) y (Gráficas 8 y 9) Obteniéndose la máxima liberación de factores a los 180 min mediante método 1:

Método 1 doble centrifugado (500 g 10' y 1000 g 8') el valor de PDGF **537,48 pgr/ml** frente a los **281,31 basales** (Tabla 11 y Gráfica 4) y el valor de TGF  $\beta$ 1 de **7150 pgr/ml** frente a los **785,48 basales** (Tabla 12 y Gráfica 5)

Estos datos son de igual magnitud a los trabajos publicados por Eppley en modelos experimentales en ovejas<sup>75</sup>.

La liberación de PDGF se produce en los primeros 10 min, alcanzando el 96 % del total (Gráfica 6), en cambio la liberación de TGF  $\beta$ 1 se produce más lentamente alcanzando sólo el 60 % a los 10 min., (Gráfica 9) el máximo nivel se obtiene transcurridos 180 min. (Tablas 11 y 12).

El rendimiento de liberación de factores de crecimiento es muy rápido alcanzando ratios de más de 450 pgr de TGF  $\beta$ 1/min en los primeros 10 minutos siendo alrededor de 50 pgr/min para el caso de PDGF (Gráfica 10). La explicación de esta diferencia debe estar relacionada en el efecto terapéutico de los mismos en el hematoma fracturario donde la concentración de TGF  $\beta$ 1 necesaria parece ser mucho mayor que la del PDGF que produce el reclutamiento de células mesenquimales y otras células reparadoras<sup>90</sup>, y su efecto mitogénico actúa sobre los osteoblastos.

La importancia de PDGF es la capacidad para iniciar la formación de callo a través de la quimiotaxis de las células madre mesenquimales y la mitogénesis de las células del tejido conectivo. Además hay que tener en cuenta, la participación de PDGF en la angiogénesis a través de la promoción de la proliferación de células endoteliales y la quimiotaxis de neutrófilos y macrófagos que puede proporcionar una etapa secundaria de la liberación de este factor de crecimiento<sup>125</sup>, de ahí que los requerimientos iniciales del PDGF, no sean tan mayoritarios como en el caso del TGF Beta 1 que se liberan en mayor medida y más rápidamente ya que el TGF  $\beta$ 1 está implicado en la regulación de la formación ósea y cartilaginosa tras una lesión y la estimulación de la síntesis proteica en condrocitos y osteoblastos durante la remodelación<sup>85, 86</sup>.

Para poder interpolar la concentración de factores de crecimiento a partir del número de plaquetas, hemos estudiado la relación entre el número de plaquetas con la liberación de los factores de crecimiento. Se ha tenido en cuenta los valores obtenidos en los tres métodos distintos de centrifugación.

La estequiometría entre TGF  $\beta$ 1/PDGF en los niveles basales está alrededor de 2,8. Esta ratio aumenta considerablemente después de la activación con calcio y trombina, llegando a alcanzar un valor de hasta 11 veces a los 180 min. (Gráfica 11).

Estos datos concuerdan con los estudios más recientes de Schär *et al.*<sup>274</sup>, en 2015 que estudiaron la liberación de factores de crecimiento en preparados plaquetarios en cinéticas de 8 horas, y 1, 3, 7, 14 días, y obtienen una liberación de TGF  $\beta$ 1 que superan los niveles basales en 10 veces a las 8 horas de aplicación mientras que no encuentran variación con respecto a los valores basales de PDGF AB en todo el periodo estudiado.

Los requerimientos de TGF  $\beta$ 1 en la célula parecen ser mayores con un aumento polinomial, triplicando valores iniciales en los primeras 3 horas después de la activación (Gráfica 10). El grupo de citoquinas TGF, es necesario para iniciar la señalización a través de receptores para la histogénesis después de una lesión<sup>275</sup>.

La liberación de factores de crecimiento específicos en nuestras muestras están de acuerdo con los del grupo Fufa *et al.*<sup>276</sup>, que observaron que los factores de crecimiento se liberan con niveles significativos tras la activación tanto con colágeno, como la activación con trombina<sup>117</sup>. Estos resultados parecen sugerir que el PRP puede tener efectos beneficiosos sobre la proliferación de las células madre de la médula ósea sin la promoción de la diferenciación de osteoblastos<sup>277</sup>.

Cabe señalar que la liberación de los factores de crecimiento en nuestro modelo se produce en ausencia de eritrocitos y leucocitos, así que podemos descartar cualquier posible interferencia que pueda distorsionar la composición de nuestro PRP en el uso clínico.

La principal limitación de nuestro estudio es precisamente haber determinado dos únicos factores de crecimiento, los más utilizados en los trabajos publicados, pero no sabemos cuál es la respuesta de otras citoquinas como el VEGF y IGF<sup>33</sup>.

Por otra parte, el estudio de la cinética de liberación de factores de crecimiento en periodos tan cortos de tiempo es novedosa, ya que la mayoría de los estudios de factores presentan datos relativos a varios días de implantación en los que además de las plaquetas, existen otras estirpes celulares como son las poblaciones de leucocitos del proceso inflamatorio que pueden estar contribuyendo a la liberación de factores, sobre todo citoquinas TGF  $\beta$ 1<sup>110</sup>. En cambio, en cinéticas tan cortas reflejan la

liberación de factores tras la activación de las plaquetas, y su efecto está directamente relacionado con la degranulación plaquetaria<sup>26, 117</sup>.

En nuestro estudio, el máximo de factores liberados se obtiene en los concentrados con mayor número de plaquetas, aunque no en la misma proporción, lo que indica que la liberación no es un simple hecho mecánico y por tanto pueden estimular directamente las vías de señalización que son importantes para la osteogénesis.

La caracterización de las propiedades biológicas de diferentes componentes de concentrados de plaquetas, nos permite profundizar en una mejor comprensión de sus efectos clínicos y desarrollar directrices para futuras aplicaciones específicas.

### **RELACIÓN PLAQUETAS FACTORES DE CRECIMIENTO**

La relación entre el número de plaquetas y los factores de crecimiento liberados tras la activación se ha estudiado mediante regresión lineal y correlación de Pearson para corroborar la hipótesis de que a mayor número de plaquetas mayor número de factores de crecimiento liberados. Nuestros datos indican que con un factor de correlación de  $r^2 = 0,88$  para ambos factores de crecimiento, no se puede considerar lineal (Tabla 16).

La correlación de Pearson en cambio, obtiene una relación estadísticamente positiva entre el número de factores de crecimiento y las plaquetas valores próximo a 1 (0,9244 y 0,933 respectivamente) por tanto, sí que podemos asegurar que a mayor cantidad de plaquetas, mayor número de factores de crecimiento aunque este aumento no sea lineal (Tabla 16). Resultados que coinciden con los publicados hasta la fecha con valores de correlación entre 0,66 y 0,88<sup>274, 278</sup>.

Por otro lado, ¿la liberación de TGF  $\beta$ 1 depende de los niveles de PDGF? Para contestar a esta pregunta, realizamos también la correlación de Pearson y la liberación de citoquinas, está estadísticamente relacionada con la liberación de PDGF con un coeficiente de Pearson de 0,96 (Tabla 16). Por lo que la liberación de factores de crecimiento se produce en ambos casos a la vez pero de forma diferenciada.

Estas correlaciones se confirman con el hecho de que el aumento de plaquetas en el concentrado no se corresponde en cambio con el mismo aumento de factores de crecimiento. Así, obtenemos un aumento de factores de crecimiento de >8 veces frente

a los valores basales en el caso del TGF  $\beta$ 1 y, solo duplicamos la concentración de PDGF AB, en el sitio de la lesión, en cambio, el aumento suprafisiológico plaquetario en el foco de fractura, ha sido de alrededor un 7,1 veces el nivel basal.

Una vez hemos caracterizado nuestro P-PRP, y conocidas todas las características biológicas del mismo, tenemos un producto valido para estudiar y valorar su efecto en la consolidación ósea cortical.

### DEFECTO CRÍTICO

A la hora de decidir un modelo animal adecuado para el tipo de estudio a realizar hay que tener varios factores en cuenta:

- Que tenga un comportamiento en la consolidación ósea equiparable al de los humanos.
- Que el tamaño del animal nos permita utilizar un modelo de fractura fácilmente reproducible en cuanto a tipo de fractura, tipo de osteosíntesis y modelo de rigidez.

En nuestro caso, la oveja cumplía todos los requisitos frente a otros animales, quizás más asequibles, pero de manipulación más compleja o difícilmente extrapolable<sup>139, 279</sup>.

Para conseguir nuestro objetivo de valorar la consolidación ósea cortical, hemos intentado crear un defecto crítico, que simule las condiciones de las fracturas de no consolidación o recalcitrantes (Figura 21). Para ello, siguiendo la bibliografía, el defecto diseñado debe tener como mínimo 1,5 veces el tamaño medular<sup>137, 138</sup>. El modelo experimental consiste en osteotomía en el cúbito de la oveja y para asegurar un ambiente de no unión recalcitrante hemos realizado dos tamaños de defecto de 1,4 cm y 2,0 cm de longitud (Figura 45), observando que en el 100 % de los casos del defecto de 1,4 cm, había consolidación espontánea presentando un modelo de unión en la curación de la fractura (Figura 44), mientras que el defecto de 2,0 cm se mantuvo en estado de no unión en el 100 % de los casos estudiados durante un periodo de 8 semanas (Figura 46).

Estos resultados nos permiten afrontar el objetivo de nuestro trabajo que asume el estudio de defectos críticos como buenos candidatos para determinar el efecto de

sustitutivos óseos en la consolidación y creación de hueso nuevo en fracturas de hueso cortical<sup>143, 154, 240</sup>.

Teniendo cuenta que en el modelo experimental de la oveja, se considera como periodo de curación ósea un periodo alrededor de 8-9 semanas<sup>149, 150</sup>, para fracturas de unión en primera intención. Nuestros resultados experimentales concuerdan con la definición de fractura de no unión tanto en características anatómicas, tamaño, localización, como en el periodo de estudio de nuestro modelo experimental animal<sup>147-150</sup>.

El defecto utilizado en nuestro estudio de consolidación ósea, debe tener por tanto una longitud de 2,0 cm para poder relacionar el efecto del PRP en un defecto cortical crítico que no presenta reconstrucción ósea durante al menos 8 semanas, estas condiciones son las que hemos descrito en nuestro trabajo experimental como grupo control.

El defecto óseo cortical se ha llevado a cabo en el cúbito, justo a nivel del espacio interóseo distal, de la fusión con radio de tal manera, que la fractura presenta un modelo de rigidez adecuado, permaneciendo el animal en libre movimiento y con carga, después de la intervención quirúrgica. Condiciones favorables para la recuperación y consolidación ósea.

### **ESTUDIO PRP+ALOINJERTO**

La hipótesis de trabajo de la mayor parte de los estudios presentados en la bibliografía es que la adición de PRP a un material de injerto autógeno o alogénico tendría un efecto positivo sobre la cicatrización ósea.

Para comprobar ésta hipótesis, en nuestro estudio, hemos utilizado como sustituto óseo, aloinjerto de cresta iliaca, mediante técnica quirúrgica standard<sup>258</sup>, en un volumen de 3,5 cc y la obtención de fragmentos corticales y esponjoso fue tratada con antibioticoterapia con vancomicina y posteriormente fue congelado a -70°C para evitar reacciones inmunológicas<sup>9</sup>. La aplicación de aloinjerto + P-PRP se realizó en el defecto crítico creado en el miembro torácico derecho, siendo el izquierdo como control histológico. Este defecto no precisa de ninguna osteosíntesis y permite al animal moverse libremente tras la intervención quirúrgica.

El P-PRP utilizado se obtuvo según la metodología descrita y discutida anteriormente por tanto nuestro P-PRP objeto de estudio aumenta la concentración plaquetaria en 7,1 veces y tras la activación con calcio y trombina, libera una cantidad significativa de factores de crecimiento en los primeros 10 minutos después de su aplicación con un aumento de TGF final de 7150 pg/μl es decir 8 veces el valor basal y PDGF 535,9 pg/μl el doble del valor basal. En esta condiciones, la adición de aloinjertos al defecto crítico, hace que se produzca una consolidación parcial visible radiográficamente a las 8 semanas de la intervención (Figuras 48 y 49) en los grupos de aloinjerto y aloinjerto + PRP, en el callo de fractura. En el grupo control, en cambio, se aprecia una muy discreta reacción, con prácticamente muy pocos restos de callo de fractura alrededor de los bordes del defecto (Figura 47).

También, radiográficamente es muy visible la disposición de los chips corticales de hueso del aloinjerto y como están integrados en el callo de fractura. La disposición del aloinjerto por tanto se mantuvo estable durante todo el proceso como se aprecia radiográficamente (Figuras 48 y 49). Tan solo un 20 % de los casos presenta consolidación completa en ambos grupos aloinjerto y aloinjerto + PRP (Tabla 17). Esto representa un avance, con respecto al grupo control (no unión), donde no existe ninguna reacción que se aproxime a una consolidación parcial mínima, tan solo en los bordes del defecto crítico, aparece una mínima reacción comportándose como un defecto crítico recalcitrante. Además aparentemente no se aprecian diferencias significativas relevantes entre el grupo de aloinjerto y aloinjerto + PRP (Tabla 17).

Estos resultados concuerdan con los publicados muy recientemente por Yong *et al.*<sup>244</sup>, que sugieren que el plasma rico en plaquetas autólogo e injerto óseo autólogo en fracturas conminutas pueden facilitar y acelerar la cicatrización ósea de forma significativa, favoreciendo la aparición de consolidación ósea frente al control y coinciden con los resultados de numerosos trabajos publicados donde la falta de mineralización del callo de fractura es muy evidente y la aplicación de PRP al sustituto óseo no mejora los resultados obtenidos frente al uso del injerto solo. El PRP por sí solo no mejora los resultados de neoformación ósea<sup>38, 45, 46, 48, 233, 237, 280</sup> y se confirmaría la falta de capacidad osteoinductiva de PRP.

Por otro lado, Anitúa *et al.*<sup>21, 55</sup>, obtienen que la adición de gel plaquetario rico en fibrina combinado con células madre de medula de hueso esponjoso (cresta iliaca) utilizado como aloinjerto liofilizado, incrementa el potencial osteogénicos y es una herramienta útil en el tratamiento de pacientes con pérdida ósea masiva en hueso

maxilar. A las 6 semanas aparece un aumento de osteoblastos y una mayor revascularización. Al año la osteointegración es mayor en los grupos con aloinjerto +PRF, que en el grupo control sin PRF. En este caso, es muy posible que al tratarse de hueso maxilar, y no cortical y ser un preparado plaquetario muy rico en fibrina, no se comporta de igual manera, siendo éste un modelo poco extrapolable al uso de PRP convencional en fracturas óseas corticales.

También en cirugía maxilar se obtienen resultados positivos, así Zechner, crea defectos mandibulares en doce cerdos enanos, aplica PRP e instala implantes dentales, observando una mejor regeneración ósea peri-implantaria en las fases iniciales (6 semanas), igualándose a las 12 semanas, la estimulación de la proliferación celular osteogénica<sup>79</sup>.

También los trabajos de Fennis<sup>24, 25</sup> en condiciones similares a las habituales del empleo de PRP en cirugía oral y maxilofacial, presentan resultados que sugieren el supuesto efecto beneficioso del PRP cuando se añade a un injerto autólogo en cabras. Los autores reconocen que les falta información sobre la relación dosis-efecto del PRP, así como del periodo de tiempo durante el que muestra actividad.

Es evidente que no se utiliza el mismo preparado en todos los casos, la falta de información sobre el concentrado plaquetario hace que no presente los mismos resultados según el tipo de hueso estudiado y el tipo de injerto utilizado.

## **SEGUIMIENTO RADIOLOGICO TAC. VARIABLES HISTOMORFOMÉTRICAS y RECONSTRUCCIÓN EN 3D DEL CALLO DE FRACTURA**

La Radiografía es útil para valorar la incorporación del injerto, si se complementa con su correlación histológica, pero en un estudio cualitativo de la incorporación de los injertos óseos, no nos permite distinguir la unión fibrosa o cartilaginosa, ni nos permite valorar la DMO (densidad mineral ósea)<sup>9</sup>.

Para valorar de forma cuantitativa el efecto del uso de concentrados plaquetarios PRP/PRF en la consolidación ósea, las propiedades del callo de fractura se deben evaluar además, mediante un estudio radiológico (Tomografía Axial Computarizada), e histológico y complementarlo con el análisis de parámetros



cuantitativos histomorfométricos. De esta forma podremos determinar características como la mineralización del injerto, y las propiedades trabeculares del callo óseo en la fractura.

En nuestro estudio, el seguimiento radiológico se llevó a cabo mediante control por RX AP y TAC, del miembro torácico derecho (intervención defecto óseo) como del izquierdo (control) a las 8 semanas de la intervención, lo cual nos ha permitido valorar la formación del callo tanto desde un punto de vista cualitativo como cuantitativo. Hemos estudiado las características del callo de fractura, no solo con las variables histomorfométricas (grosor trabecular, volumen del callo, y distancia entre bordes de fractura), sino también de forma novedosa, mediante las aplicaciones de Bone J sobre las variables geométricas trabeculares (características del esqueleto trabecular, anisotropía, conectividad, aplanamiento, SMI, y dimensión fractal) que nos dan una visión más amplia tanto de la calidad del callo con respecto a su proceso de osificación, como del efecto de la adición del PRP o no en su capacidad osteogénica.

Este estudio lo he realizado en el grupo de investigación musculoesquelética del Department of Bioengineering del Imperial College de Londres bajo la supervisión del Dr. Michael Daube, y Dra. Sandra Sheffeline.

En la reconstrucción en 3D del callo de fractura, se observa que la disposición del mismo en el grupo control (Figura 50) es muy pequeña y limitada sobre los bordes de la fractura, sin alcanzar en ningún caso un tamaño o volumen que permita valorarlo como consolidación parcial con distancia entre bordes  $<10$  mm obteniéndose un valor medio de  $11,09 \pm 2,9$  mm (tabla 25). Este comportamiento es el esperable en un defecto crítico con intención de formación hueso nuevo sólo en los bordes de la lesión<sup>47</sup>. El volumen de callo obtenido es de  $604,77 \pm 343,48$  mm<sup>3</sup> (Tabla 22).

En el grupo tratado con aloinjerto (Figura 51), se observa una mayor consolidación siendo total o completa en un 20 % y parcial en el resto de los casos a las 8 semanas. Desconocemos si en periodos más largos de 8 semanas la consolidación y la curación de la fractura serían completan en todos los casos.

La distancia entre bordes es de  $5,76 \pm 1,31$ , muy inferior estadísticamente significativa a los grupos control y aloinjerto + PRP con un  $P < 0,05$  (Tabla 25 y Gráfica 15). Se aprecia, un callo de fractura bien distribuido donde el tamaño y el volumen del callo superan al callo del grupo control. El volumen de callo de fractura es de  $1452,09 \pm 559,54$  mm<sup>3</sup>, muy superior al grupo control (Tabla 22 y Figuras 53-55).

En el grupo con aloinjerto y P-PRP, en la reconstrucción 3D, aparentemente no se observa diferencia con el grupo de aloinjerto (Figura 52). El tamaño del callo es muy superior al control en ambos grupos, la consolidación total y parcial parece ser muy parecida en ambos casos. Pero el volumen del callo de fractura es menor significativamente al del grupo aloinjerto  $P < 0,05$  (Gráfica 13 y Tabla 28), siendo de  $1108,07 \pm 357,53$  (Tabla 22). Por otro lado, la distancia entre bordes, aun siendo menor significativamente al grupo control; también lo es con respecto al grupo de aloinjerto con un valor de  $8,349 \pm 2,66$  (Tabla 25). Incluso el volumen del callo de la consolidación total, en el grupo de aloinjerto es significativamente mayor que en el grupo aloinjerto + P-PRP, con  $P < 0,05$  (Tabla 28).

Estos parámetros nos indican que las características del callo de fractura utilizando aloinjerto o aloinjerto + PRP, son mucho mejores que en el control  $P < 0,05$ . En este caso los resultados concuerdan con los publicados, en los que se ha estudiado la sinergia del uso del PRP, e injerto en el punto de la lesión y no se ha visto diferencias significativas<sup>268, 281</sup>.

Pero debemos remarcar que las características del callo del grupo de aloinjerto en cuanto a formación de hueso nuevo son mejores y difieren a las del grupo de aloinjerto + PRP.

Así el efecto de la adición de PRP al aloinjerto, perjudica la formación del callo de fractura. En el estudio del grosor trabecular (thickness) se obtienen resultados análogos a los obtenidos en cuanto al volumen del callo y la distancia entre bordes. Las áreas de mayor consolidación ósea (mayor grosor trabecular) aparecen más extendidas en los grupos con aloinjerto siendo importante la aportación del aloinjerto en las trabéculas de estos grupos (áreas blancas en la reconstrucción de los callos de fractura) (Figuras 56-58).

El mayor grosor trabecular se obtiene para el grupo aloinjerto con un valor de  $4,287 \pm 0,76$  siendo este valor mayor estadísticamente significativo frente a  $3,223 \pm 0,73$  del grupo aloinjerto + PRP y  $3,013 \pm 0,73$  del grupo control (Tabla 27).

Por lo que concluimos, que la adición del PRP al aloinjerto no solo no mejora la capacidad osteogénica, sino que podríamos advertir que la perjudica.

Estos resultados contradicen los efectos supuestamente beneficiosos de la adición de PRP a injertos liofilizados con o sin células madre de medula ósea de los trabajos de Dallari *et al.*<sup>233</sup>, donde sus resultados del análisis histomorfométrico

confirmaron un proceso osteogénico más activo, con mayor vascularización y aposición ósea cuando añadía gel de plaquetas. Aunque no encontraba diferencias significativas en cuanto a la actividad osteoblástica y número de osteonas.

Por el contrario, Zhu *et al.*<sup>282</sup>, en un análisis histomorfométrico de formación ósea en el uso de PRP o plasma rico en fibrina, concluyeron que sus resultados indicaban que las características osteogénicas de la cola de fibrina enriquecida con plaquetas son superiores a la adición de PRP.

En otro estudio similar pero con hueso bovino desmineralizado se observó una mejor densidad ósea en los casos injertados con hueso autógeno, que en aquellos injertados con hueso bovino desmineralizado y PRP<sup>224</sup>.

También en otro estudio experimental (cerdos domésticos) se examinó la formación de hueso después de rellenar defectos del hueso frontal del cráneo con hueso autógeno o una matriz ósea desmineralizada bovina (DBBM) en combinación con plasma rico en plaquetas (PRP). Después de 4 semanas, los valores de mineralización tras el uso de hueso autógeno fueron significativamente menores si se añadía PRP al hueso autógeno ( $P = 0,002$ ). Lo cual demostraría la falta de capacidad osteoinductiva del PRP al añadirlo a injerto óseo<sup>280</sup>.

En nuestro caso, los resultados obtenidos nos indican por primera vez que en las condiciones de nuestro modelo experimental el uso de PRP, afecta a la capacidad osteogénica, y osteoinductiva del injerto, lo cual nos hace proponer que el uso del PRP parece que no está indicado para mejorar la curación y la consolidación ósea en defectos críticos ya que proporciona, callos de fractura con menor grosor trabecular menor tamaño, y menor formación ósea (Tabla 23).

## VARIABLES GEOMETRIA TRABECULAR

### Conectividad

Siguiendo con el estudio radiológico TAC, se determinó la conectividad. Uno de los parámetros imprescindibles para cuantificar las propiedades estructurales del hueso trabecular se basa en los parámetros morfométricos obtenidos a partir de imágenes TAC y microTAC, que nos permite evaluar de manera más fiable las propiedades del hueso en tres dimensiones<sup>283, 284</sup>. Así la medida de la conectividad para el hueso trabecular mediante el uso de la representación de las ramificaciones en

imágenes binarias, nos proporciona información precisa del número de trabéculas, que aparece en una zona de estudio (ROI), la red de estructuras conectadas entre sí y su densidad de conectividad (Conn.D=número de trabéculas por volumen de muestra). Este parámetro está íntimamente asociado a la calidad ósea, y en nuestro caso la aplicación a la neoformación ósea, nos da una idea de la capacidad de osteogénesis en el callo de fractura así como supone la mejor herramienta de predicción de la resistencia ósea máxima y el grado de anisotropía<sup>283</sup>.

Un aumento del valor de la conectividad del hueso trabecular, es fisiológicamente beneficioso en términos de la calidad del hueso. Nuestros datos experimentales, muestran diferencias significativas en cuanto al número de trabéculas conectadas,  $p < 0,05$  (Tablas 30, 31 y Gráfica 17) obteniendo un aumento considerable en el caso del grupo de aloinjerto, pasando de 68,1 para el control a 157,1 en el grupo de aloinjerto. Lo realmente sorprendente es el efecto del PRP, donde la adición de este compuesto provoca que el número de trabéculas conectadas entre sí disminuya más de 90 % alcanzando solo 6,8 de índice de conectividad, estos mismos datos se corroboran de igual manera, si determinamos el número de trabéculas conectadas por unidad de volumen (Tablas 32, 38).

El aumento en el número, el espesor y las conexiones de las trabéculas se traduce en un aumento de la resistencia ósea<sup>285</sup>.

Estos datos concuerdan con otros trabajos donde se siguió la pérdida de masa ósea en procesos osteoporóticos mediante el parámetro histomorfométrico de la conectividad, así tras el tratamiento con estrógenos y hormona paratiroidea, la recuperación ósea fue efectiva, y el parámetro conectividad trabecular aumentó más de 300%<sup>286</sup>.

La conectividad (determinada como número de Euler), está relacionada directamente con la cantidad de hueso nuevo formado y la microarquitectura trabecular. Por tanto en un modelo animal, el seguimiento de las terapias para curar los defectos esqueléticos puede ser completado mediante el análisis de conectividad trabecular obtenido a partir del seguimiento radiológico TAC<sup>277, 287</sup>.

En nuestro caso los resultados indican que la calidad de hueso neoformado, en el caso de aloinjerto es mucho mejor, con trabéculas más gruesas, mayor número de trabéculas formadas y conectadas, lo que indicaría que el proceso de osificación

proporciona un callo mucho más duro, que el callo generado a partir de la terapia con P-PRP.

### **Esqueleto Trabecular**

El análisis del esqueleto trabecular juega un papel importante para proporcionar una representación compacta de la red trabecular ósea que permite el cálculo de varios parámetros cuantitativos relacionados con la micro-arquitectura trabecular<sup>288</sup>.

La esqueletización tridimensional ósea es una técnica que a partir de objetos digitales binarios, es capaz de determinar parámetros que nos permite relacionar la calidad de micro-arquitectura trabecular ósea (TB) con la resistencia ósea y el riesgo de fractura.

Específicamente, el algoritmo de esqueletización se aplica para calcular en el entramado trabecular, el número de ramificaciones, los “*voxels*” de unión (pixels en 3D que forman parte de cruce trabecular), la longitud de las ramas principales y secundarias así como el aplanamiento (TB plateness) la relación geométrica de la forma disco/varilla, el grosor y el espaciado.

Nuestros datos experimentales obtenidos a partir de la segmentación del callo de fractura en la reconstrucción en 3D, nos proporciona la siguiente información:

El entramado trabecular del esqueleto del callo de fractura del grupo de aloinjerto es mucho mayor y mejora claramente al obtenido en el grupo control (Tablas 33, 34). En cambio, el grupo con aloinjerto + P PRP, muestra un entramado trabecular mucho más pobre, incluso es mucho más laxo, y menos complejo que el grupo control. (Tabla 34). Así, en cuanto al número de ramificaciones, “*voxels*” de unión, longitudes medias de las ramificaciones se observan diferencias estadísticamente significativas  $p < 0,05$ . (Tabla 34 y Gráficas 20-24).

El número de ramificaciones es mucho mayor en el grupo de aloinjerto que en el grupo control,  $27 \pm 16,9$  frente a  $19,0 \pm 14,0$ . En relación con el descenso de trabéculas conectadas, el número de ramificaciones en aloinjerto + PRP, son indetectables, corroborando los datos obtenidos anteriormente, aunque en el caso de los “*voxels*” de unión (representación de los cruces entre trabéculas) el grupo aloinjerto + PRP, tiene un valor de 21402 frente a los 25444 del grupo aloinjerto y solo 8000 del grupo control (Tabla 34).

Por otro lado observamos que la longitud de las ramas principales no presenta diferencias entre el grupo control y el grupo aloinjerto, la longitud de las ramas secundarias del callo de fractura es muy superior en el caso del grupo aloinjerto frente al control. (Tabla. 34). Los valores de este parámetro fueron por debajo del nivel de detección para el grupo de aloinjerto + PRP. Luego el callo de fractura para el grupo con PRP, presenta todos los parámetros de peor calidad ósea incluso que el propio grupo control. La adición de PRP al aloinjerto, implica un callo con un entramado trabecular mucho más pobre, que incluso, el callo formado sin ninguna ayuda osteopromotora u osteoinductora, forma un callo blando (Figuras 62-64).

En cuanto al factor geométrico del aplanamiento trabecular, el valor medio del callo de fractura en cada grupo nos muestra que no hay diferencias en cuanto a la forma trabecular, siendo en todos los casos, una forma intermedia, entre un disco y una varilla, valor aproximado 0,6 (Tabla 35). Lo cual nos indica, que la forma de las nuevas trabéculas no se ve influenciada por ningún tratamiento aplicado  $P < 0,05$  (Gráfica 27).

Estos resultados, podrían indicar una relación entre la calidad y resistencia del callo de fractura en los tres grupos estudiados, mejorando notablemente este parámetro en el grupo con aloinjerto. Estos datos concuerdan con los publicados por Ni *et al.*<sup>282</sup> donde la adición de PRP a matriz ósea desmineralizada (DBM), presenta diferencias significativas frente al uso del PRP, o DBM individualmente.

Además, la eficacia de estas medidas (microestructura trabecular) para predecir la resistencia ósea experimental fue corroborada en una investigación biomecánica sobre doce especímenes de hueso de cadáver y se obtuvo correlación lineal positiva con la resistencia ósea presentando valores 0,93, 0,88, 0,85 y 0,86<sup>288</sup>.

### **Anisotropía**

El hueso es un material compuesto, natural, heterogéneo y anisotrópico. Varios estudios sobre las propiedades elásticas del hueso cortical en humanos en diferentes direcciones anatómicas han encontrado que este parámetro es diferente dependiendo del sentido longitudinal, tangencial o radial de las medidas<sup>289</sup>.

El hueso trabecular varía su orientación dependiendo de diferentes factores entre ellos la carga mecánica y puede llegar a orientación anisotrópica (no uniforme) o isotrópica (uniforme). En este estudio, los datos implican que el tejido óseo cortical bovino en los huesos largos, está diseñado para soportar cargas más altas en las

direcciones longitudinales y tangenciales que en la radial. Una posible explicación de la anisotropía en los parámetros mecánicos derivados aquí podría ser la estructura de los tejidos en las tres direcciones.

En otro estudio en vértebras lumbares, se relacionó la disminución del grado de anisotropía con el aumento de la densidad ósea<sup>290</sup>.

Así, es esperable que callos de fractura, inmaduros y desorganizados tengan una anisotropía mayor que los callos organizados y mineralizados.

Nuestros datos experimentales demuestran, que el callo en el grupo de aloinjerto presenta más isotropía 0,4 frente a la anisotropía del callo del grupo control 0,6 y aloinjerto + PRP 0,61 (Tabla 36). En cambio la anisotropía del grupo control y aloinjerto + PRP, no muestran diferencias significativas entre sí,  $p < 0,05$  (Gráfica 28 y Tabla 38).

La anisotropía de hueso cortical es una propiedad conocida y mecánicamente relevante determina el riesgo de fractura, porque está relacionada con la densidad mineral ósea<sup>291</sup>.

Así en el hueso trabecular humano, tiene relevancia potencial tanto para el estudio de condiciones de caída y como de carga durante la marcha. Los huesos con baja densidad mineral, muestran una considerable anisotropía mecánica. Estos resultados indican que el papel de la fracción de volumen del hueso, la microarquitectura, y la anisotropía mecánica están relacionados con la resistencia uniaxial<sup>292</sup>.

Los valores de anisotropía obtenidos en nuestros grupos de estudio, nos permiten valorar que el callo de fractura, en el grupo aloinjerto, además, de tener más volumen de callo, mayor entramado trabecular, y mayor grosor trabecular, es más isotrópico, y por lo tanto sería un callo con mayor mineralización y resistencia ósea.

### **Dimensión fractal**

El análisis fractal es un método para la descripción de formas complejas, incluyendo por ejemplo la estructura del hueso cortico-esponjoso. Describe la textura de la superficie y la forma de los perfiles trabeculares individuales así como la estructura esponjosa en general.

El hueso trabecular presenta características fractales de dos dimensiones (2D) y a nivel histológico están correlacionadas con las propiedades biomecánicas.

Las características histomorfométricas de la arquitectura trabecular, tales como: Volumen óseo (BV / TV), características trabeculares (Tb.N, Tb.Sp, Tb.Th), índice de conectividad, plateness y el número de Euler se pueden relacionar con el cálculo fractal mediante diferentes algoritmos como Kolmogorov, Minkowski-Bouligand y la relación fractal masa-radio<sup>293</sup>.

El número fractal, presenta correlación positiva con todos los parámetros histomorfométricos proporcionando una estructura con tres grupos de descriptores:

- de calidad trabécular (Tb.Th, thickness)
- para cavidad medular (Euler, Tb.Sp, volumen callo)
- y para la complejidad de la red (Tb.N)

Nuestros datos experimentales nos proporcionan información sobre la dimensión fractal de los callos de fractura objeto de nuestro estudio. La determinación de la dimensión fractal se ha llevado a cabo mediante el algoritmo de cajas de Minkowski-Bouligand (Gráfica 26). En la Tabla 37 podemos ver que el valor fractal para el grupo control es menor significativamente que la de los grupos tratados con aloinjerto. Valor de  $1,433 \pm 0,233$  frente a  $1,808 \pm 0,14$  sin PRP y  $1,770 \pm 0,09$ .  $p < 0,05$  con PRP.

La adición de PRP no tiene diferencias significativas con respecto al grupo de aloinjerto, aunque en valores absolutos sea menor  $p < 0,05$  (Tabla 44).

En el estudio de correlación entre las variables histomorfométricas, obtenemos una correlación positiva de 0.871 de coeficiente de Pearson en el 76 % de los casos, entre el valor de dimensión fractal y la anisotropía. Ambos parámetros determinan las características del callo de fractura frente a la resistencia ósea y la mineralización (Tabla 46). De forma que podemos entender que tanto el valor fractal como la anisotropía del grupo de aloinjerto + PRP, se debe más al aporte osteogénico e osteoinductivo de las células del aloinjerto congelado, que las propias del P-PRP.

Estos datos se correlacionan con otros estudios experimentales en los que se ha determinado la dimensión fractal como parámetro relacionado con la histomorfometría, así, la médula ósea (BM) presenta una organización espacial particular, que permite la interacción entre sus diversos componentes. La caracterización de los patrones espaciales en la médula ósea mediante análisis morfométricos fueron realizados en muestras de biopsia por el grupo de investigación de Naeim *et al.*<sup>294</sup>, que midieron tres parámetros diferentes, pero estructuralmente



relacionados entre sí: (A) área celular, (B) área nuclear, y (c) el número de células. Los tres métodos, en todos los casos, mostraron que la estructura espacial de la BM es fractal, y concluyeron que dimensiones fractales de 1,6 a 1,7 (como nuestro caso) representan configuraciones que corresponden a estructuras de agregación por difusión limitada en el tiempo, lo que sugiere que la configuración estructural de las células hematopoyéticas es dependiente de la difusión de citoquinas reguladoras en la medula ósea<sup>294</sup>.

En otro estudio sobre la cuantificación de los cambios en el hueso esponjoso en rodillas con osteoartritis, el valor fractal, reveló que la pérdida de hueso se produjo en todas las rodillas con osteoartritis en el compartimento medial. La disminución del número fractal de las trabéculas en el eje vertical y horizontal fue consistente con la disminución en el número de trabéculas asociada con la pérdida de hueso<sup>295</sup>.

También, en otro estudio de cálculo de dimensión fractal, para determinar la correlación entre la estructura trabecular del hueso y la densidad mineral ósea y la biomecánica del hueso, concluyeron que en un modelo de regresión multivariante además de la correlación positiva con la densidad mineral ósea, existe también la predicción de la resistencia y la elasticidad<sup>296</sup>.

Por lo que podemos concluir que en nuestro caso, el aumento de la dimensión fractal, implica que los callos con aloinjerto, proporcionan callos, más duros, con más volumen, y densidad mineral ósea, debido al aporte osteoconectivo, del aloinjerto proporcionando callos con mayor organización celular y seguramente más mineralizados.

## ESTUDIO DENSIDAD MINERAL ÓSEA

En el presente trabajo de experimentación, hemos aplicado el método corrector en la determinación de la densidad mineral ósea, a partir de los parámetros de calibración obtenidos, según nuestro método puesto a punto para las muestras estudiadas, mediante la utilización de “*phantoms*” de hidroxiapatita. Dado que la medida de densidad mineral ósea mediante unidades Hounsfield, es muy arbitraria, y depende del calibrado del aparato TAC<sup>269</sup>.

Los “*phantoms*” tienen una concentración y densidad conocidas (0 mg HA-1000mg HA) (Tabla 3) y su correlación con valores de intensidad de gris y mg/ml de

HA y la densidad ósea en  $\text{g/cm}^3$  se obtuvieron a partir del seguimiento radiológico del TAC (método descrito apartado materiales).

Los estudios han sido realizados en las áreas de interés ROI (correspondiente a los callos de fractura de los tres grupos experimentales, control, aloinjerto, aloinjerto + P-PRP), mediante el algoritmo utilizado en el software Image J plugin densitometer.

Aunque la densitometría ósea no es útil para determinar el proceso de la consolidación en un estudio transversal como el nuestro, sí nos permite determinar la solidez del injerto en su osteointegración. Así, podemos relacionarlo con el nivel de mineralización, ya que parece que éste no se ve afectado por factores como la congelación o por la respuesta inmunológica al callo de fractura, la incorporación y neoformación ósea<sup>9</sup>.

Nuestros datos experimentales nos proporcionan un valor de densidad ósea para el callo de fractura del grupo control de  $132,53 \pm 108,4$  mg/ml HA, o  $1,13 \pm 0,18$   $\text{g/cm}^3$  (Tabla 47). Valores claramente por debajo a los obtenidos en el grupo de aloinjerto, alcanzando valores de  $351,65 \pm 122,9$  mg/ml HA o  $1,35 \pm 0,12$   $\text{g/cm}^3$ . (Tabla 48) El grupo de aloinjerto + P-PRP, presenta valores de DMO, superiores al grupo control  $254,34 \pm 71,6$  mg/ml HA, o  $1,269 \pm 0,07$   $\text{g/cm}^3$  pero inferiores al valor obtenido en el grupo aloinjerto (Tabla 44). Esto supone una clara pérdida de potencial mineralizador en el proceso de consolidación del callo (Tabla 50).

La DMO, en el hueso cortical, presenta valores de 947,55, 983,74 y 975,24 mg HA/ $\text{cm}^3$  para cada uno de los grupos. Estos valores son homogéneos y similares sin diferencias significativas (Tabla 54 y Gráfica 31). Estos datos nos indican que en el proceso de consolidación de los callos de fractura a las 8 semanas estamos todavía en un callo secundario, muy lejos de la máxima mineralización.

En el estudio de correlación entre la densidad mineral ósea, y las variables histomorfométricas, (Tabla 58) se observa una clara correlación positiva valores de 0,94, 0,98 con respecto al volumen del callo y el grosor trabecular  $p < 0,05$ .

Por otro lado, la correlación de Pearson entre la densidad mineral ósea y la conectividad, y dimensión fractal, presenta valores positivos, de 0,7 y 0,82. La correlación directa entre la mineralización del callo de fractura y el número de trabéculas conectadas y el valor de dimensión fractal, supone que a mayor densidad mineral ósea, tenemos cambios en la superficie del callo de fractura y en la estructura

trabecular, de modo que aumentan el número de trabéculas conectadas entre sí en prácticamente un 50-70 % de los casos estudiados (Tabla 59).

En cambio, con el aplanamiento y anisotropía la correlación es negativa con valores de -0,949, -0,927 en el 85-90 % de los casos. Mayor mineralización implica trabéculas menos aplanadas, y una estructura, más ordenada con aposiciones de hueso más estructuradas (Tabla 59).

Estos datos experimentales concuerdan con los obtenidos por Aghaloo *et al.*<sup>224</sup> en un estudio con defecto óseo, rellenado con hueso bovino desmineralizado, se observó una mejor densidad ósea en los casos injertados con hueso autógeno, que en aquellos injertados con hueso bovino desmineralizado y PRP.

En otro estudio similar, en un modelo sobre hueso parietal en conejo, injertado en un defecto quirúrgico con hueso autógeno, PRP o una combinación de ambos. El análisis radiográfico, histológico e histomorfométrico permitió observar una ligera tendencia a mayor densidad de hueso con la adición de PRP que sin dicha adición, sin embargo, estas diferencias no eran estadísticamente significativas<sup>224</sup>.

También, nuestro equipo de investigación en un estudio en conejos con defecto cortical en tibia y peroné, la utilización del PRP y PPP no observó correlación significativa entre el recuento plaquetario y las variables geométricas y densitométricas analizadas. La utilización del PRP no modifica los procesos de reparación y cicatrización respecto al grupo control<sup>236</sup>.

También en otro estudio experimental en defecto óseo en el fémur de la oveja, mediante osteogénesis por distracción, la evaluación radiológica e histológica del hueso regenerado no mostraron diferencias significativas entre el grupo tratado con PRP y el grupo control (sin tratamiento) para ninguna de las variables analizadas (Evaluación de imágenes de TAC como la medición de la densidad de callo y el hueso cortical sano, tamaño fémur proximal y distal). No encontraron evidencias radiológica o histológica de que la administración de PRP aumente la formación de hueso <sup>268</sup>.

En otro estudio experimental mediante la adición de PRP a autoinjerto a los 15 días radiográficamente observaron la formación de hueso nuevo en los bordes de la lesión, primera fase de hueso nuevo con disposición trabecular delimitando pequeñas cavidades donde el tejido medular se está organizando, los fragmentos de hueso maduro del injerto son incorporados por el hueso nuevo, sin invasión del periostio. No

presenta diferencias significativas en cuanto a la densitometría y la cantidad de matriz ósea entre el control sin PRP y con el PRP<sup>47</sup>.

## **HISTOLOGÍA**

Las imágenes histológicas realizadas, mediante dos técnicas de tinción como son el Tricrómico de Masson y la Hematoxilina-Eosina, son fundamentales para valorar los procesos de regeneración ósea. En nuestro trabajo la histología confirma el estado de consolidación observado en las imágenes de reconstrucción tridimensional.

En los casos de aloinjerto, la osteointegración de la incorporación del injerto, entendida como interacción entre el injerto y el huésped con formación de hueso presenta las siguientes fases: la formación de hematoma (presencia de citoquinas y factores de crecimiento celular, fenómenos inflamatorios (migración y proliferación de células mesenquimales), invasión vascular, reabsorción osteoclástica focal y finalmente osificación membranosa y/o endocondral<sup>186</sup>.

En nuestro caso, el estudio histológico simple ha servido para valorar de forma cualitativa el tipo de neoformación ósea y la dirección de la formación a las ocho semanas, desde la intervención:

En el grupo control, se observa callo pobre, fibrótico, y limitado a los bordes de fractura con osificación por aposición perióstica (Figuras 23-25).

En el grupo de aloinjerto, con callos, con gran volumen y actividad celular, ribetes osteoblásticos, proceso de neoformación y calcificación correspondiente a una consolidación secundaria con osificación de patrón mixto tanto membranosa como endocondral dependiendo de las zonas de osificación, con hiper celularidad (Figuras 68 y 69) y procesos de osteointegración de los chips corticales procedentes de aloinjerto con amplias zonas de osificación y reabsorción (Figura 70). Aumento de la vascularidad con respecto al callo del control casi avascular. 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 (Figura 71).

En cuanto al grupo de aloinjerto + PRP, Se observa callo de importante volumen, pero muy fibrótico, desorganizado, con menor calcificación, con osteointegración de los chips, pero de forma menos reactiva (Figuras 72-74). Aumento

de la vascularidad con respecto al callo del control casi avascular al igual que el grupo de aloinjerto. La consolidación secundaria es la más importante. El hueso formado por este proceso es un hueso perióstico formado por osificación membranosa (Figura 75).

Estos resultados concuerdan por los obtenidos por Ma *et al.*<sup>296</sup> que encontraron en el examen histológico de una muestra con una concentración plaquetaria de hasta  $14,6 \pm 3,08$  veces la basal, mostraba un tejido de regeneración más desorganizado en el PRP que en el control.

También, en otro estudio histológico, a las 6 semanas en el grupo con autoinjerto presenta partículas de hueso autógeno utilizadas para el relleno del defecto en estado de reabsorción avanzada en ausencia de los bordes nítidos entre el defecto y el hueso preexistente frente al grupo con PRP con mucha menor actividad. De este modo se concluye que el método que auxilia en el proceso de reparación ósea de manera efectiva son los injertos óseos.

En otro estudio en perros compara la curación ósea de un defecto de resección mandibular reconstruido con hueso autógeno aislado, o combinado con PRP. Las biopsias a las 6 semanas y la microscopía por fluorescencia revelaron que el PRP no mejoró la neoformación ósea<sup>48</sup>.

Al igual que la histomorfometría, y la geometría trabecular, los datos histológicos, de nuestro estudio confirman que el grupo de aloinjerto tiene un comportamiento más activo y beneficioso en la consolidación ósea que el uso de aloinjerto+PRP y se correlacionan con el tipo de callo, con las características trabeculares observadas en cada uno de los grupos de estudio, es reseñable que estos resultados son de gran importancia y validan los resultados del seguimiento radiológico y reconstrucción en 3 D. Su utilidad, por tanto es muy importante en la valoración de sustancias osteoformadoras, con capacidad osteogénica y osteoconductiva en procesos de regeneración ósea en modelos animales.

Hay que señalar que el nivel de vascularidad es determinante en el proceso de regeneración ósea. El suministro vascular en el hueso es bien conocido por la cirugía ósea, pero todavía dentro del campo de investigación permanece con poco interés.

El hueso recibe aproximadamente el 10% del gasto cardíaco, y esto permite que el suministro de sangre aumente el grado de celularidad, favorece la remodelación y reparación ósea frente al cartílago, que es avascular. El suministro de sangre al

hueso llega a la cavidad endóstica por arterias nutritivas, y a continuación, fluye a través de sinusoides de la médula hasta el córtex.

Las reducciones en el suministro vascular se asocian con la pérdida ósea. Esto puede ser debido en parte a los efectos directos de la hipoxia, que bloquea la actividad osteoblástica y la formación de hueso afectando a la osteoclastogénesis y la reabsorción ósea<sup>298</sup>.

## **ESTADO ACTUAL DE LA INVESTIGACIÓN Y PERSPECTIVAS DE FUTURO**

En situaciones de hipoxia y falta de factores de crecimiento tras una lesión nos lleva a valorar, que las condiciones de la cavidad del defecto son determinantes a la hora del éxito, de la reparación y consolidación ósea. Para ello hay que tener en cuenta el denominado "*Pentaconcept*" que toma en cuenta: además, de 1º la osteogénesis, 2º osteoinducción y 3º la osteoconectividad, el 4º Estabilidad mecánica: los procesos biológicos de reparación de tejidos, requiere de inmovilización, con una correcta estabilización y alineación ósea. Son importantes tanto para una buena capacidad de curación como para un resultado funcional óptimo. Aparece un nuevo recurso, el 5º cámara biológica, es decir las condiciones biológicas del foco de fractura. De esta manera, la adición de ATMP (Advanced therapeutic Medicinal Products) como células añadidas, factores de crecimiento, carriers portadores de estas células y moléculas, más una situación mecánica óptima forman una combinación designada como el "concepto de diamante" en la literatura<sup>299, 300</sup>.

La situación biológica del área de la lesión no debe ser subestimada y se puede dividir en su condición de salud general y la situación local alrededor del defecto óseo a ser reconstruido. Este último puede ser considerado como una zona de alta actividad biológica que debe tener condiciones óptimas para permitir la reparación ósea.

En defectos relativamente pequeños esta área puede permanecer abierta permitiendo la conexión con zonas adyacentes pero en defectos más grandes, los tejidos que rodean al defecto por lo general son perturbados y es preferible aislar esta zona y considerarlo como una cámara biológica cerrada, que tiene su propio potencial biológico y actualmente se estudia la forma ideal para cerrar la cámara. Lo mejor parece ser mediante una membrana natural, con su propia vascularización que permite cierta secreción adicional de factores de crecimiento o una serie de bioactivo que

garanticen un aislamiento circundante fisiológico. De forma natural se puede crear membranas por reacción a cuerpo extraño, como ocurre por inserción primaria de cemento óseo en un defecto, se conoce como la técnica de Masquelet<sup>301</sup>.

Así, en el modelo de Thakkalapti<sup>302</sup> en 2015, detalla que el uso del PRP, puede afectar a la cicatrización de las heridas no sólo por una liberación de factores de crecimiento, sino también por otras propiedades físicas y químicas. La preparación PRP debido a su alto contenido de fibrina, presenta características sellantes que funciona como un hemostático y agente estabilizante y puede ayudar al coágulo de sangre y la inmovilización del injerto de hueso en el área del defecto. Observaron evidencias radiográficas de la formación de hueso a los 3 meses con relleno casi completo.

Los últimos experimentos más recientes en la regeneración ósea con concentrados plaquetarios, además de factores de crecimiento se empieza a estudiar nuevas sustancias con actividad osteoinductiva, como ciertas moléculas de bajo peso molecular, con efectos muy prometedores. Se ha visto que mediante el uso conjunto con material de injerto óseo proporcionan propiedades osteoconductoras adicionales. Muchas de estas moléculas pequeñas son también capaces de promover la vascularización del tejido<sup>303</sup>.

El grupo de Kon *et al.*<sup>238</sup>, preparó un estudio para investigar el potencial de regeneración con y sin plasma rico en plaquetas (PRP) con una mezcla de colágeno-hidroxiapatita en defectos osteocondrales en un modelo de oveja. Observaron que en la histología se apreciaba una buena integración de la superficie condral en ambos grupos de tratamiento aunque la regeneración ósea, fue significativamente mejor en el grupo tratado sin PRP, por tanto la combinación con factores de crecimiento plaquetario no tuvo un efecto aditivo; por el contrario, la administración de PRP tuvo un efecto negativo sobre los resultados obtenidos por perturbar el proceso regenerativo.

También en esta línea de nuevos aditivos, PRP y gránulos de hidroxiapatita presentan una mejora definitiva en la cicatrización de heridas, aumento de la densidad ósea, lo que, sin duda parece ser un método válido en la inducción y la aceleración de la regeneración ósea<sup>304</sup>.

También se está estudiando el efecto de las plaquetas en co-cultivo de condrocitos en la proliferación de los condrocitos. El trasplante de condrocitos tratados

---

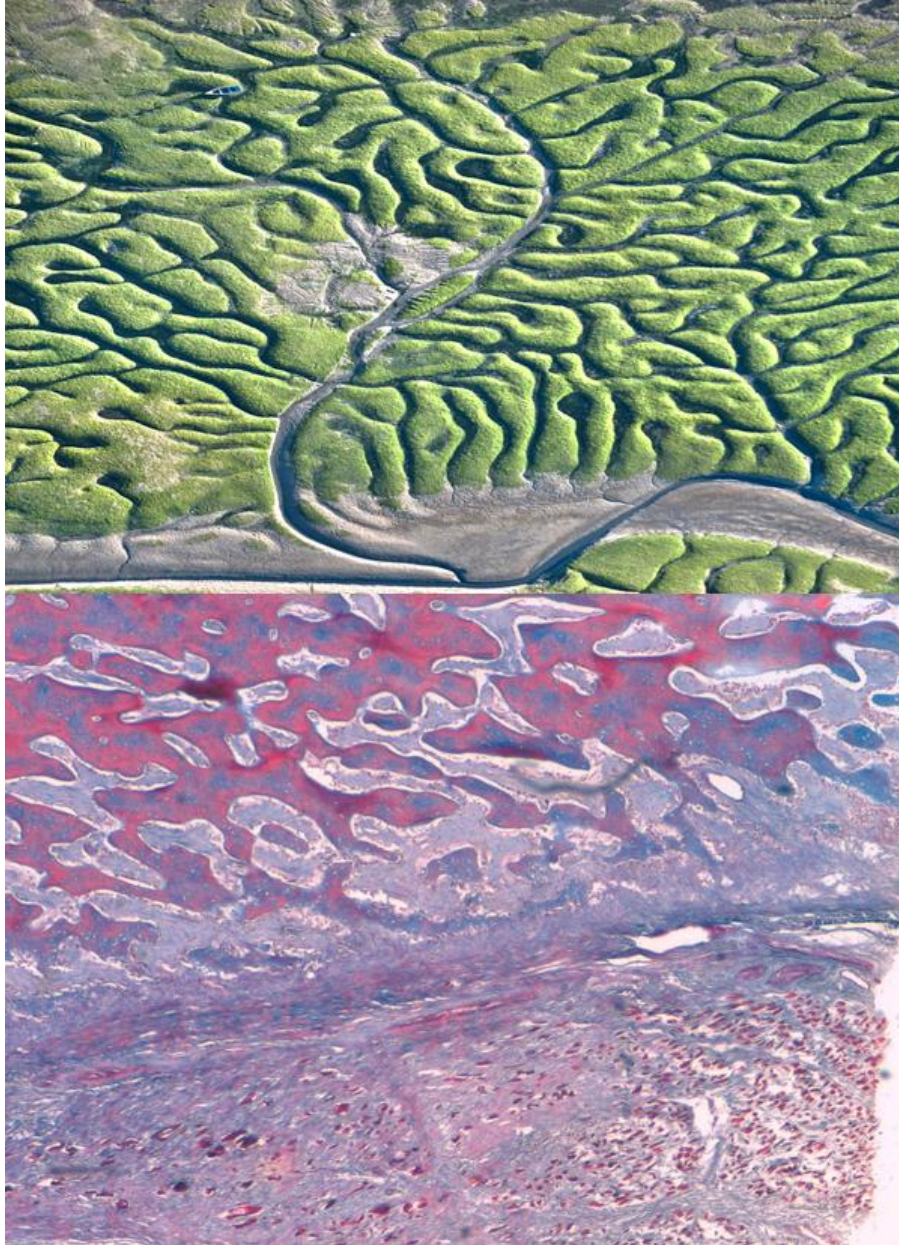
con plaquetas mostró mejor reparación del cartílago en un modelo de osteoartritis. Este estudio ha identificado el ADP derivado de plaquetas, como el mediador clave para la proliferación de condrocitos tratados con plaquetas y reparación del cartílago en la osteoartritis<sup>245</sup>.

Con todos los resultados obtenidos en esta tesis doctoral, proponemos como líneas futuras de investigación en el P-PRP para completar los objetivos marcados en este proyecto como son:

1. Una vez estudiados y analizados los factores de crecimiento liberados en nuestro PRP, sería muy interesante poder determinar el efecto de una dosis respuesta de estos factores de crecimiento tales como TGF  $\beta$ 1, PDGF AB, y añadir el VEGF, sobre la consolidación ósea de un defecto caracterizado como el nuestro.
2. Determinar la concentración óptima de los factores de crecimiento en la consolidación.
3. Estudiar y analizar longitudinalmente, el efecto de los factores de crecimiento de forma, cualitativa, cuantitativa y funcionalmente de los distintos factores de crecimiento mediante seguimiento radiológico TAC, para determinar todas las variables histomorfológicas y geométricas de las trabéculas del callo de fractura.







## 6. CONCLUSIONES

**Ilustración 6.** Estructuras fractales (superior: fotografía aérea marismas. Inferior: Fotografía microscopía óptica hueso trabecular)

1. El protocolo de obtención de P-PRP, con citrato dextrosa, sin leucocitos ni hematíes mediante doble centrifugado, aumenta la concentración plaquetaria de forma significativa hasta 7,1 veces el nivel basal.

2. La activación con calcio y trombina del P-PRP genera la degranulación plaquetaria efectiva y la liberación de factores de crecimiento (TGF  $\beta$ 1 y PDGF AB) derivados sólo de las plaquetas. Esta liberación alcanza su máximo en los 10 primeros minutos, y nos permite aumentar concentraciones hasta 7150,00 pg/ml de TGF  $\beta$ 1 pero sólo hasta 537,48 pg/ml de PDGF AB. Estos resultados son reproducibles y nos permiten saber de antemano qué concentración supra-fisiológica estamos aplicando.

3. La liberación de factores de crecimiento está correlacionada con el número de plaquetas, coeficiente de Pearson 0,96, pero no de forma lineal. Podemos afirmar que en nuestro P-PRP, a más plaquetas, más factores de crecimiento. Pero el mecanismo de liberación no es mecánico, las plaquetas no liberan ni todos los factores a la vez y ni de la misma manera.

4. La aplicación del P-PRP sobre un defecto cortical crítico, provoca, la consolidación completa en un 20% de los casos, con un callo de fractura, de características distintas si se utiliza P-PRP+aloinjerto o aloinjerto solo.

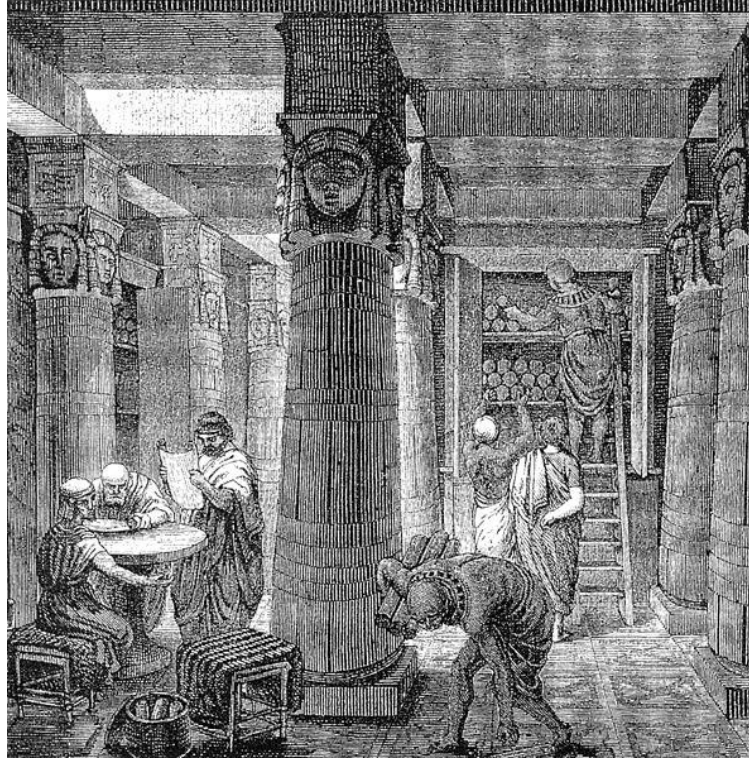
5. La histomorfometría del callo de fractura en nuestro modelo experimental determina que la adición de P-PRP genera callos de fractura de peor calidad ósea, de menor tamaño, con menor grosor trabecular, por lo que parece ser un callo con menor potencia osteogénica.

6. El estudio de la geometría trabecular, mediante seguimiento radiológico y tratamiento digital nos indica además, que el callo formado con la adición de P-PRP, presenta un esqueleto trabecular más laxo, y un entramado mucho más pobre, con muy pocas trabéculas que el obtenido con aloinjerto solo. Estos resultados, se han visto corroborados por el estudio histológico con grandes diferencias en cuanto a celularidad, mineralización y tipo de osificación.

7. Parámetros como la anisotropía, conectividad, valor fractal y grosor trabecular, están correlacionados positivamente con la densidad mineral ósea, y por tanto con la resistencia ósea. La adición de PRP, no mejora ninguno de estos parámetros.

8. El efecto estimulador del P-PRP está en entredicho, ya que la adición de P-PRP, no mejora la densidad mineral ósea del callo; más bien, el P-PRP disminuye el

potencial mineralizador y osteogénico del aloinjerto, generando un callo más inmaduro, fibrótico, con menor resistencia ósea con lo que disminuye las posibilidades de curación.



## 7. BIBLIOGRAFÍA

*Ilustración 7.* Representación artística del interior de la Biblioteca de Alejandría, con base en algunas evidencias arqueológicas (O. Von Corven) siglo XIX.

1. **Sánchez-Martín M.** Traumatología y Ortopedia. Valladolid: CEA Aula Médica; 2002. p. 37-42.
2. **Einhorn TA.** The Cell and Molecular Biology of Fracture Healing. Clin Orthop 1998; 355:7-21.
3. **Munuera L., Cordero J.** Ingeniería Tisular ósea: Cursos de actualización. 38 Congreso Nacional de la Sociedad Española de Cirugía Ortopédica y Traumatológica. Bilbao; 2001.nº 65-79188.
4. **Passuti N., Delecrin J., Gouin F., Heymann D.** Substituts osseux. En: Encycl Méd Chir Appareil locomoteur. Paris: Elsevier; 1999. p 6.
5. **Bonete Lluch D.** "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". Tesis Doctoral ISBN: 9788437068237. Universitat de Valencia 2006. Consultado 15 de mayo de 2015.  
  
Disponible en: <http://www.tesisenxarxa.net/TDX-0801108-115118/> Valencia 2006.
6. **Matamoro C., Caicedo H., Navia J.** Introducción Cirugía Reconstructiva con Aloinjertos Masivos para el Manejo de Tumores de las Extremidades Revista Colombiana de Ortopedia y Traumatología 1994; 7:72-93.
7. **Gil Albarova J., Garrido Lahiguera R., Gil Albarova R., Melgosa Gil M.** Materiales para la reparación y sustitución ósea; Factores de crecimiento y terapia genética en Cirugía Ortopédica y Traumatología. Mapfre Medicina 2003; 14:51-65.
8. **Bauer TW., Muschler GF.** Bone graft materials. An overview of the basic science. Clin Orthop 2000; 371:10-27.
9. **Amillo S., González F., Illescas JA.** Incorporación de aloinjertos óseos intercalares corticales. Estudio experimental en conejos. An Sist Sanit Navar 2003; 26:365-72.
10. **De Boer HH.** The history of bone grafts. Clin Orthop 1988; 226:292-7.
11. **Gruskin E., Doll BA., Futrell FW., Schmitz JP., Hollinger JO.** Demineralized bone matrix in bone repair: history and use. Advanced Drug Delivery Reviews 2012; 64:1063-77.
12. **Mehta S., Tracy Watson J.** Platelet Rich Concentrate: Basic Science and Current Clinical Applications. Orthop Trauma 2008; 22:433-8.



13. **Gomar F., Orozco R., Villar JL., Arrizabalaga F.** P15 small peptide bone graft substitute in the treatment of non-unions and delayed union. A pilot clinical trial. *Int Orthop* 2007; 31:93-9.
14. **Bose S., Roy M., Bandyopadhyay A.** Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends in Biotechnology* 2012; 30:546-54.
15. **Valle Ortiz A., Bauer TW., Muschler GF.** Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clin Orthop* 2000; 371:10-5.
16. **Arpornmaeklong P., Kochel M., Depprich R., Kübler NR., Würzler KK.** Influence of platelet rich plasma on osteogenic differentiation of rat bone stromal cells. An in vivo study. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004; 33:60-70.
17. **Pietrzak WS., Eppley BL.** Platelet Rich Plasma: Biology and New Technology. *The Journal of craniofacial surgery* 2005; 16:1043-54.
18. **Nurden A., Nurden P., Sánchez M., Andia I., Anitúa E.** Platelets and wound healing. *Frontiers in Bioscience* 2008; 13:3525-48.
19. **Dohan Ehrenfest DM., Bielecki T., Mishra A., Borzini P., Inchingolo F., SamMartino G., Rasmusson L., Evert PA.** In search of a consensus terminology in the field of platelet concentrates for surgical use: platelet-rich plasma (PRP), platelet-rich fibrin (PRF), fibrin gel polymerization and leukocytes. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 2012; 13:1131-7.
20. **Simpson AH., Mills L., Noble B.** The role of growth factors and related agents in accelerating fracture healing. *J Bone Joint Surg Br* 2006; 88:701-5.
21. **Sánchez M., Anitúa E., Cugant R., Azofra J., Guadilla J., Seijas R., y cols.** Nonunions treated with autologous preparation Rich in growth factors. *J Orthop Trauma* 2009; 23:68-71.
22. **Adler SC., Kent KJ.** Enhancing wound healing with growth factors. *Facial Plast Surg Clin North Am* 2002; 10:129-46.
23. **O'Connell SM., Carroll RJ., Beavis A., Arnoczky SP.** Flow cytometric characterization of cascade Platelet Rich Fibrin Matrix PRFM. Impact of exogenous thrombin on platelet concentrates. *Musculoskeletal transplant foundation* 2007; 128:207-11.

24. **Dohan DM., Choukroun J., Diss A., Dohan SL., Dohan A.J., Mouhy J. y cols.** Platelet –rich fibrin (PRF): A second generation platelet concentrate. Part III Leucocyte activation: A New feature for platelet concentrates. *Oral Surg Oral Med Pathol Oral Radiol Endod* 2006; 101:51-5.
25. **Yao E., Eriksson E.** Gene therapy in wound repair and regeneration. *Wound Repair Regener* 2000; 8:443-51.
26. **Marx RE.** Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg* 2004; 62:489-96.
27. **Harrison P., Cramer EM.** Platelet alpha-granules. *Blood Rev* 1993; 7:52-62.
28. **Bernuzzi G., Tardito S., Bussolati O., Adorni D., Cantarelli S., Fagnoni F., y cols.** Platelet gel in the treatment of cutaneous ulcers: the experience of the Immunohaematology and Transfusion Centre of Parma *Blood Transfus* 2010; 8:237-47.
29. **Anitúa E., Andia I., Ardanza J., y cols.** Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost* 2004; 91:4-15.
30. **Sánchez 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.
31. **Anitúa E.** Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999; 14:529-35.
32. **Marx R.** Quantification of Growth factor levels using a simplified method of Platelet-Rich Plasma Gel Preparation. *J Oral Maxillofac Surg* 2000; 58:300-1.
33. **Carrasco J., Bonete D., Gomar F.** Plasma rico en plaquetas vs. Plasma rico en factores de crecimiento. *Rev Esp Cir Osteoart* 2009; 46:127-40.
34. **Fernández Barbero JE., Galindo-Moreno P., Avila-Ortiz G., Caba O., Sánchez Fernández E., Wang HL.** Flow cytometric and morphological characterization of platelet rich plasma gel. *Clin Oral Implant Res* 2006; 17:687-93.
35. **Anitúa E., Andia I., Sánchez M., Azofra R., Zalduendo M., de la Fuente M., y cols.** Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture. *J Orthop Res* 2005; 23:281-6.

36. Carrasco Luna J., Bonete D., Silvestre A., Gomar F. Growth Factors Release on P-PRP Activated with Thrombin Assessment Assay. American International Journal of Biology 2015; 3:33-48.
37. González Lagunas J. Plasma Rico en Plaquetas. Rev Esp Cirug Oral y maxilofa 2006; 28:89-99.
38. Jakse N., Tangl S., Gilli R., Berghold A., Lorenzoni M., Eskici A., y cols. Influence of PRP on autogenous sinus grafts. An experimental study on sheep. Clin Oral Impl Res 2003; 14:578-83.
39. Ma L., Zheng LW., Sham MH., Lam CK., Zwahlen RA., Cheung LK. Effect of platelet-rich plasma on a rabbit model of nicotine-compromised bone healing. Journal of Oral & Maxillofacial Surgery 2011; 69:28-35.
40. Martínez-González JM., Cano Sánchez J., Gonzalo Lafuente JC., y cols. Do ambulatory use of platelet Rich plasma (PRP) concentrates present risks? Med Oral 2002; 7:375-90.
41. Velilla M., y cols. Recuerdo y actualización de las técnicas en Regeneración ósea para el práctico general. A propósito de dos casos. Gaceta Dental 2002; 127:52-63.
42. Anitúa E. Expansión de cresta con osteotomos: Estado actual. Utilización de plasma rico en factores de crecimiento (P.R.G.F). Rev Esp Cirug Oral y Maxilofacial. 2001; 23:158-62.
43. Angel MJ., Sgaglione A., Grande DA. Clinical applications of bioactive factors in sports medicine. Current concepts and future trends. Sports Med Arthrosc Rev 2006; 14:138-45.
44. Foitzik C., Strauss H., Lefort I. Osteotomy in atrophied maxilla and bone regeneration with pure phase beta tricalcium phosphate and PRP. Implant Dent 2003; 12:132-9.
45. Roldan JC., Jepsen S., Miller J., Freitag S., Rueger DC., Acil Y., Terheyden H. Bone formation in the presence of platelet rich plasma versus bone morphogenetic protein 7. Bone 2004; 34:80-90.
46. Schlegel KA., Kloss FR., Kessler P., Schultze-Mosgau S., Nkenke E., Wiltfang J. Bone conditioning to enhance implant osseointegration: an experimental study in pigs. Int J Oral Maxillofac Implants 2003; 18:505-11.

47. **Hatakeyama MM., Beletti ME., Zanetta-Barbosa D., Dechichi P.** Radiographic and histomorphometric analysis of bone healing using autogeneous graft associated with platelet rich plasma obtained by 2 different methods. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008; 105:13-8.
48. **Choi BH., Zhu SJ., Kim BY., y cols.** Effect of platelet-rich plasma (PRP) concentration on the viability and proliferation of alveolar bone cells: an in vitro study. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2005; 34:420-4.
49. **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; 63:362-9.
50. **Jakse N., Tangl S., Gilli R., Berghold A., Lorenzoni M., Eskici A., y cols.** Influence of PRP on autogenous sinus grafts. An experimental study on sheep. *Clin Oral Implants Res* 2003; 14:578-83.
51. **Torrella A., Toledo R., Hondares M., Calañas L.** Evaluación del anticoagulante citrate dextrose fosfato. *Rev Mex Patol Clin* 2003; 50:77-81.
52. **Brennan M.** Fibrin glue. *Blood Rev* 1991; 5:240-4.
53. **Tayapongsak P., O'Brien DA., Monteiro CB.** Autologous fibrin adhesive in mandibular reconstruction with particulate cancellous bone and marrow. *J Oral Maxillofac Surg* 1994; 52:161-6.
54. **Whitman DH., Berry RL., Green DM.** Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg* 1997; 55:1294-8.
55. **Anitúa E.** Un nuevo enfoque en la regeneración ósea. Plasma rico en factores de crecimiento. (PRGF). Vitoria: En Puesta al día S.L; 2000.
56. **Anitúa E.** The use of plasma-rich growth factors (PRGF) in Oral surgery. *Pract Proced Aesthet Dent* 2001; 13:487-93.
57. **Marx RE., Carlson ER., Eichstaedt RM., Schimmele SR., Strauss JE., Georgeff KR.** Platelet rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998; 85:638-46.

**58. 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; 58:297-300.

**59. Kassolis JD., Rosen PS., Reynolds MA.** Alveolar ridge and sinus augmentation utilizing platelet-rich plasma in combination with freeze-dried bone allograft: case series. *J Periodontol* 2000; 71:1654-61.

**60. Borrione P., Gianfrancesco AD., Pereira MT., Pigozzi F.** Platelet-rich plasma in muscle healing. *Am J Phys Med Rehabil* 2010; 89:854-61.

**61. De Vos RJ., Van Veldhoven PL., Moen MH., Weir A., Tol JL., Maffulli N.** Autologous growth factor injections in chronic tendinopathy: a systematic review. *Br Med Bull* 2010; 95:63-77.

**62. Cervelli V., Gentile P., Scioli MG., Grimaldi M., Casciani CU., Spagnoli LG., y cols.** Application of platelet-rich plasma in plastic surgery: clinical and in vitro evaluation. *Tissue Eng Part C Methods* 2009; 15:625-34.

**63. Man D., Plosker H., Winland-Brown JE.** The use of autologous platelet-rich plasma (platelet gel) and autologous platelet-poor plasma (fibrin glue) in cosmetic surgery. *Plast Reconstr Surg* 2001; 107:229-37.

**64. Pallua N., Wolter T., Markowicz M.** Platelet-rich plasma in burns. *Burns* 2010; 36:4-8.

**65. Ding XG., Li SW., Zheng XM., Hu LQ., Hu WL., Luo Y.** The effect of platelet-rich plasma on cavernous nerve regeneration in a rat model. *Asian J Androl* 2009; 11:215-21.

**66. Shen YX., Fan ZH., Zhao JG., Zhang P.** The application of platelet-rich plasma may be a novel treatment for central nervous system diseases. *Med Hypotheses* 2009; 73:1038-40.

**67. Villela DL., Santos VL.** Evidence on the use of platelet rich plasma for diabetic ulcer: a systematic review. *Growth Factors* 2010; 28:111-6.

**68. Lane JM., Tomin E., Bostrom MPG.** Byosynthetic bone grafting. *Clin Orthop* 1999; 367:107-17.

**69. Eppley BL., Woodell JE., Higgins J.** Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plast Reconstr Surg* 2004; 114:1502-8.

**70. Sánchez Martín M.** Injertos óseos en traumatología y Cirugía Ortopédica. Valladolid: Secretariado de publicaciones e intercambio editorial. Universidad de Valladolid.

**71. Hapa O., Cakici H., Kukner A., Aygun H., Sarkalan N., Baysal G.** Effect of platelet-rich plasma on tendon-to-bone healing after rotator cuff repair in rats: an in vivo experimental study. *Acta Orthopaedica et Traumatologica Turcica* 2012; 46:301-7.

**72. Soomekh DJ.** Current concepts for the use of platelet-rich plasma in the foot and ankle. *Clin Podiatr Med Surg* 2011; 28:155-70.

**73. 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; 20:486-97.

**74. Findikcioglu, K., Findikcioglu F., Yavuzer R., Elmas C., Atabay K.** Effect of Platelet-Rich Plasma and Fibrin Glue on Healing of Critical-Size Calvarial Bone Defects. *Journal of Craniofacial Surgery* 2009; 20:34-40.

**75. Dong Z., Li B. Liu B., Bai S., Li G., Ding A., Zhao J., Liu Y.** Platelet-rich plasma promotes angiogenesis of prefabricated vascularized bone graft. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2012; 70:2191-7.

**76. Drago J., Braun H., Durham J., Ridley B., Odegaard J., Luong R., y cols.** Comparison of the acute inflammatory response of two commercial platelet-rich plasma systems in healthy rabbit tendons. *American Journal of Sports Medicine* 2012; 40:1274-81.

**77. Lee A., Chung W., Kim D., Lee K., Chung D., Do S., Kim H.** Anterior cruciate ligament reconstruction in a rabbit model using canine small intestinal submucosa and autologous platelet-rich plasma. *J Surg Res* 2012; 178:206-15.

**78. Bonete D., Carrasco J., Gomar F.** Platelet Rich Plasma in Critical bone Defect Animal Study. Annual Meeting American Academy of Orthopaedic Surgeons. New Orleans. 2010; 11: 744 n°377.

**79. Zechner W., Tangl S., Tepper G., Furst G., Bernhart T., Haas R., y cols.** 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.

**80. Kawasumi M., Kitoh H., Siwicka KA., Ishiguro N.** The effect of the platelet concentration in platelet-rich plasma gel on the regeneration of bone. *J Bone Joint Surg Br* 2008; 90:966-72.

**81. Bielecki T., Dohan Ehrenfest DM., Everts PA., Wiczowski A.** The role of leukocytes from L-PRP/L-PRF in wound healing and immune defense: new perspectives. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 2012; 13:1153-62.

**82. Fennis JPM., Stoelinga PJW., Jansen JA.** Mandibular reconstruction: a clinical and radiographical animal study on the use of autogenous scaffolds and platelet rich plasma. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2002; 31:281-6.

**83. King MW.** The medical biochemistry page. [themedicalbiochemistrypage.org](http://themedicalbiochemistrypage.org), LLC 2014. Consultado en enero 2015. Disponible en: <http://themedicalbiochemistrypage.org/es/signal-transduction-sp.php>.

**84 King MW.** The medical biochemistry page. [themedicalbiochemistrypage.org](http://themedicalbiochemistrypage.org), LLC 2014. Consultado en enero 2015. Disponible en: <http://themedicalbiochemistrypage.org/es/growth-factors-sp.php>

**85. Gálvez-Gastélum FJ., Sandoval-Rodríguez AS., Armendáriz-Borunda J.** El factor de crecimiento transformante  $\beta$  como blanco terapéutico. *Salud Pública* 2004; 46:341-50.

**86. Yuniko A., Asanura K., Tonomura H., Kimura T., Masuda K.** Transforming growth factor  $\alpha 3$  stimulates proteoglycan and collagen synthesis under low oxygen tension by bovine intervertebral disc cell in alginate beads. 34th Annual Meeting of the International Society for the Study of the Lumbar Spine. Hong Kong, China; 2007. p.52.

**87. Laurencin CT.** *Bone Graft Substitutes*. Rossemont Illinois: ASTM international; 2003.

**88. Ehnert S., Zhao J., Pscherer S., Freude T., Dooley S., Kolk A., y cols.** Transforming growth factor 1 inhibits bone morphogenic protein (BMP)-2 and BMP-7 signaling via upregulation of Ski-related novel protein N (SnoN): possible mechanism for the failure of BMP therapy?. *BMC Medicine* 2012; 10:101-6.

**89. Sachinidis A., Locher R., Hoppe J., Vetter W.** The platelet-derived growth factor isomers, PDGF-AA, PDGF-AB and PDGF-BB, induce contraction of vascular smooth muscle cells by different intracellular mechanisms. *FEBS Lett* 1990; 275: 95-8.

**90. Antonaides HN., Williams LT.** Human platelet-derived growth factor: structures and functions. *Federation Proc* 1983; 42:2630-4.

91. **Ross R., Raines EW., Bowen-Pope DF.** The biology of platelet-derived growth factor. *Cell* 1986; 46:155-69.
92. **Gruber R., Varga F., Fisher MB., Watzek G.** Platelets stimulate proliferation of bone cells: involvement of platelet derived growth factor, microparticles and membranes. *Clin Oral Impl Res* 2002; 13:529-35.
93. **Rajaram S., Baylink DJ., Mohan S.** Insulin-like growth factor-binding proteins in serum and other biological fluids: regulation and functions. *Endocr Rev* 1997; 18:801-31.
94. **Bravant G., Von zur Muhlen A., Wuster C., Ranke MB., Kratzsch J., Kiess W., y cols.** Serum Insulin-like growth factor I reference values for an automated chemiluminescence immunoassay system: results from a multicentre study. *Horm Res* 2003; 60:53-60.
95. **Gómez JM., Maravall FJ., Gómez N., Navarro MA., Casamitjana R., Soler J., y cols.** The IGF-I system component concentrations that decrease with ageing are lower in obesity in relationship to body mass index and body fat. *Growth Horm IGF Res* 2004; 14:91-6.
96. **Bottaro DP., Rubin JS., Faletto DL., Chan AM., Kmieciak TE., Vande Woude GF., y cols.** Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science* 1991; 251:802-4.
97. **Johnson M., Koukoulis G., Matsumoto K., Nakamura T., Iyer A.** Hepatocyte growth factor induces proliferation and morphogenesis in nonparenchymal epithelial liver cells. *Hepatology* 1993; 17:1052-61.
98. **Hoeben A., Landuyt B., Highley MS., Wildiers H., Van Oosterom AT., De Bruijn EA.** Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev* 2004; 56:549-80.
99. **Kwong TQ., Mohamed M.** Anti vascular endothelial growth factor therapies in ophthalmology: Current use, controversies and the future. *Br J Clin Pharmacol* 2014; 78:699-06.
100. **Sporn M.B., Roberts A.B.** Peptide growth factors are multifunctional. *Nature* 1988; 332:217-06.



101. Cuevas P., Carceller F., Ortega S., Zazo M., Nieto I., Giménez-Gallego G. Hypotensive activity of fibroblast growth factor. *Science* 1991; 254:1208-10.
102. Beca T., Hernández G., Morante S., Bascones A. Plasma rico en plaquetas. Una revisión bibliográfica. *Av Periodon Implantol* 2007; 19:39-52.
103. Urist M.R. Bone: Formation by autoinduction. *Science* 1965; 150:893-9.
104. Everts PA., Knappe JT., Weibrich G. y cols. Platelet rich plasma and platelet gel: a review. *J. Extra Corpor Technol* 2006; 38:174-87.
105. Gandhi A., Bibbo C., Pinzur M., Lin SS. The role of platelet-rich plasma in foot and ankle surgery. *Foot Ankle Clin* 2005; 10:621-37.
106. Raczat T., Kraemer L., Gall C., Weiss DR., Eckstein R., Ringwald J. The influence of four different anticoagulants on dynamic light scattering of platelets. *Vox Sang* 2014; 107:196-9.
107. 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.
108. Gamradt Seth C., Rodeo Scott A., Warren Russell F. Platelet rich plasma in rotator Cuff Repair. *Technics in Orthopedics* 2007; 22:126-33.
109. O'Connell SM., Carroll RJ., Beavis A., Arnoczky SP. Flow cytometric characterization of cascade Platelet Rich Fibrin Matrix PRFM. En *The impact of exogenous thrombin on platelet concentrates (PC)*. Edison (New Jersey); Musculoskeletal Transplant Foundation 2008.
110. Roussy Y., Bertrand Duchesne MP., Gagnon G. Activation of human platelet-rich plasmas: effect on growth factors release, cell division and in vivo bone formation. *Clin Oral Implants Res* 2007; 18:639-48.
111. Ohba S., Wang W., Itoh S., Takagi Y., Nagai A., Yamashita K. Acceleration of new bone formation by an electrically polarized hydroxyapatite microgranule/platelet-rich plasma composite. *Acta Biomaterialia* 2012; 8:2778-87.
112. Carrasco J., Bonete D., Gomar F. Release of growth factors in PRP activated with thrombin. *Annual Meeting American Academy of Orthopaedic Surgeons*. San Diego. 2011; 12(813).p 148.

**113. López C., Giraldo C., Carmona J.** Evaluación de un método de doble centrifugación en tubo para concentrar plaquetas bovinas: estudio celular. Archivos de medicina veterinaria 2012; 44:109-15.

**114. Carmona J., López C., Giraldo C.** Uso de concentrados autólogos de plaquetas como terapia regenerativa de enfermedades crónicas del aparato musculoesquelético equino. Archivos de medicina veterinaria 2011; 43:1-10.

**115. Giovanini AF., Grossi JR., Gonzaga CC., Zielak JC., Gohringer I., Vieira JD., y cols.** Leukocyteplatelet-rich plasma (L-PRP) induces an abnormal histophenotype in craniofacial bone repair associated with changes in the immunopositivity of the hematopoietic clusters of differentiation, osteoproteins, and TGF-beta1. Clin Implant Dent Relat Res 2014; 16:259-72.

**116. Chizzolini C., Brembilla NC., Montanari E., Truchetet ME.** Fibrosis and immune dysregulation in systemic sclerosis. Autoimmunity Reviews 2011; 10:276-81.

**117. Harrison S.; Vavken P., Kevy S., Jacobson M., Zurakowski D., Murray M.** Platelet Activation by Collagen Provides Sustained Release of Anabolic Cytokines. American Journal of Sports Medicine 2011; 39:729-34.

**118. Malhotra A., Pelletier MH., Yu Y., Walsh WR.** Can platelet-rich plasma (PRP) improve bone healing? A comparison between the theory and experimental outcomes Arch Orthop Trauma Surg 2013; 133:153-65.

**119. Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil I., Alobera Gracia MA., Del Canto Pingarrón M., Blanco Jerez L.** Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2006; 11:47-51.

**120. Landry P.** Bone injury response. Clin Orthop Rel Res 1996; 332:260-73.

**121. Salom Taverner M.** Estudio del efecto de los bifosfonatos (zoledronato) sobre la consolidación de las fracturas. Tesis doctoral. ISBN 9788437088464. Universitat de Valencia 2012. Consultado Febrero de 2015.

Disponible en: <http://www.tdx.cat/handle/10803/81884>.

**122. Buckwalter JA., Glimcher MJ., Cooper RR., Recker R.** Bone biology. II: Formation, form, modeling, remodeling, and regulation of cell function. AAOS Instr Cours 1996; 45:387-99.

123. **Buckwalter JA., Glimcher MJ., Cooper RR., Recker R.** Bone biology. I: structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. AAOS Instr Course 1996; 45: 371-86.
124. **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, editor. Valencia: Ed. Martín;1999.
125. **Meyrueis P., Cazenave A.** Consolidation des fractures:Fracture healing. EMC-Reumatologie Orthopédie 2004; 1:138-62.
126. **Einhorn TA.** The science of fracture healing. J Orthop Trauma 2005; 19:4-6.
127. **Chao E., Inoue N.** Biophysical stimulation of bone fracture repair, regeneration and remodelling. Eur cells materials 2003; 6:72-85.
128. **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.
129. **Phillips AM.** Overview of the fracture healing cascade. Injury 2005; 36:5-7.
130. **Mountziaris PM., Mikos AG.** Modulation of the inflammatory response for enhanced bone tissue regeneration. Tissue Eng Part B Rev 2008; 14:179-86.
131. **Kolar P., Schmidt-Bleek K., Schell H., Gaber T., Toben D., Schmidmaier G., y cols.** The early fracture hematoma and its potential role in fracture healing. Tissue Eng Part B Rev 2010; 16:427-34.
132. **Jensen S., Broggin S., Hjorting-Hansen N., Schenk E., Buser D.** Bone healing and graft resorption of autograft, anorganic bovine bone  $\beta$ -tricalcium phosphate. A histologic and histomorphometric study in the mandible of minipigs. Clin Oral Impl Res 2006; 17:237-43.
133. **Duque de Miranda Chaves Netto H., Olate S., Alfonso Miranda Chaves M.G., Albergaria Barbosa J.R., Mazzonetto R.** Histological Analyses of Osseous Repair Defects. Recognized of Critic Defects. Int. J. Morphol 2009; 27:1121-7.
134. **Hing K. A., Wilson A., Buckland, T.** Comparative performance of three ceramic bone graft substitutes. Spine J 2007; 7:457-90.

135. **Plotkin LI., Manolagas SC., Bellido T.** Dissociation of the proapoptotic effects of bisphosphonates on osteoclasts from their antiapoptotic effects on osteoblasts/osteocytes with novel analogs. *Bone* 2006; 39:443-52.
136. **García FJ., García JM., Perez-Caballer AJ.** Fundamentos de los procesos de reparación tisular: factores de crecimiento. *Rev Ortop Traumatol* 2005; 49:5-16.
137. **Lindsey RW., Gugala Z., Milne E., Sun M., Gannon FH., Latta LL.** The efficacy of cylindrical titanium mesh cage for the reconstruction of a critical-size canine segmental femoral diaphyseal defect. *J Orthop Res* 2006; 24:1438-53.
138. **Reichert JC., Saifzadeh S., Wullschlegler ME., Epari DR., Schutz MA., Duda GN., y cols.** The challenge of establishing preclinical models for segmental bone defect research. *Biomaterials* 2009; 30:2149-63.
139. **Garcia P. Histing T., Holstein JH., Klein M., Laschke MW., Matthys R., Ignatius A., y cols.** Rodent animal models of delayed bone healing and non union formation. *European Cells and Materials* 2013; 26:1-14.
140. **Roberts TT., Rosenbaum AJ.** Bone grafts, bone substitutes and orthobiologics The bridge between basic science and clinical advancements in fracture healing. *Organogenesis* 2012; 8:114-24.
141. **Mora R., Pedrotti L., Battista Galli G.** Failure of Union. Nonunion of the long bones: diagnosis and treatment with compression: distraction techniques. Milan: Springer; 2006.
142. **Marsell R., Einhorn TA.** Emerging bone healing therapies. *J Orthop Trauma* 2010; 4 supl 1:4-8.
143. **Schmitz J., Hollinger J.** The critical size defect as an experimental model for craniomandibular non junction. *Clin Orthop Rel Res* 1986; 205:299-304.
144. **Hollinger Y., Kleinschmidt JC.** The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *J Craniofac Surg* 1990; 2:237-43.
145. **Slotte C., Lundgren D., Burgos PM.** Placement of autogenic bone chips or bovine bone mineral in guided bone augmentation: a rabbit skull study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2003; 18:53-8.
146. **Bosch C., Melsen B., Vargervik K.** Importance of the critical-size bone defect in testing boneregenerating materials. *J Craniofac Surg* 1998; 13:310-6.

147. **Vikjaer D., Blom S., Hjorting-Hansen E, y cols.** Effect of platelet-derived growth factor-BB on bone formation in calvarial defects: an experimental study in rabbits. *Eur J Oral Sci* 1997; 105:59-66.
148. **Torres J., Tresguerres I., Tamimi, FC., Niembro E., Blanco L.** Influence of platelet-rich plasma on bone regeneration: a histomorphometric study in rabbit calvaria. *The International journal of oral & maxillofacial implants* 2007; 22:563-8.
149. **De La Voragine S.** *La Leyenda Dorada*. Barcelona: Alianza Editorial; 2008.
150. **Pickover CA.** *El libro de la medicina. De los médicos brujos a los robots cirujanos*. Madrid: Ed. Librero; 2013.
151. **Sanan A., Haines SJ.** Repairing holes in the head: A history of cranioplasty. *Neurosurgery* 1997; 40:588-603.
152. **Tomford WW.** Bone allografts: past, present and future. *Cell and tissue bank* 2000; 1:105-9.
153. **Barth A.** Über histologische befunde nach knochen-implantationen. *Arch Klin Chir* 1893; 46:409-35.
154. **Curtis BF.** Cases of bone implantation and transplantation for cyst of tibia, osteomyelitic cavities and ununited fractures. *Am J Med Sci* 1893; 106:30-43.
155. **Huntington TW:** Case of bone transference: Use of a segment of fibula to supply a defect in the tibia. *Ann Surg* 1905; 41:249-51.
156. **Buchmann PI.** Treatment of elbow ankylosis by means of transplantation of the entire joint. *Zentralbl Chir* 1908; 19:582-4.
157. **Mankin HJ., Doppelt S., Tomford W.** Clinical Experiences with Allografts Implantation. The first ten years. *Clin Orthop Relat Res* 1983; 174:69-86.
158. **Muscolo D., Kawai, S. Roy R.** Cellular and Humoral Immune Response Analysis of Bone. Allografts Rats, *J. Bone and Joint Sug Am* 1976; 58:826-32.
159. **Lexer E.** Die verwendung der freien knochenplastik nebst versuchen uber gelenkversteifung & gelenktransplantation. *Art Klin Chir* 1908; 86:939-54.
160. **Phemister DB.** The fate of transplanted bone and regenerative power of its various constituents. *Surg Gynecol Obstet* 1914; 19:303-33.
161. **Lexer E.** Joint transplantation and arthroplasty. *Surg Gynecol Obstet* 1925; 40:782-809.

162. **Albee FH.** Bone-Graft Surgery. Philadelphia: W. B. Saunders; 1915.
163. **Inclán A.** The use of preserved bone graft in orthopaedic surgery. *J Bone Joint Surg Am* 1942; 24:81-97.
164. **Wilson PD.** Experiences with a bone bank. *Ann Surg* 1947; 40:932-45.
165. **Sanchís Olmos V.** El banco de huesos del Hospital Provincial de Madrid. *Acta Ortop Traum Ibérica* 1953; 1:3-12.
166. **González C.** El Banco Nacional de Huesos. Madrid: González C, editor; 1956.
167. **Ortiz-Cruz EJ.** Comentario. El Banco de Huesos del Hospital Clínico Provincial. *Revista de Ortopedia y Traumatología* 2002; 46:110-4.
168. **Bonfiglio M., Jeter WS., Smith CL.** The immune concept. Its relation to bone transplantation. *Ann NY Acad Sci* 1955; 59:417-38.
169. **Burwell RG.** Studies in the transplantation of bone. VI. Further observations concerning the antigenicity of homologous cortical and cancellous bone. *J Bone Joint Surg Br* 1963; 45:597-12.
170. **Curte PH., Powell AE., Herndon CH.** Immunological factors in homogeneous bone transplantation. The inability of homogeneous rabbit bone to induce circulating antibodies in rabbits. *Bone Joint Surg Am* 1959; 41:1482-8.
171. **Herndon CH., Chase SW.** The fate of massive autogenous and homogenous bone graft including articular surfaces. *Surg Gynec Obstet* 1954; 98:273-90.
172. **Ottolenghi CE.** Massive osteoarticular bone grafts. *J Bone Joint Surg Br* 1966; 48:646-59.
173. **Volkov M.** Allotransplantation of joints. *J Bone Joint Surg Br* 1970; 52:49-53.
174. **Garbuz DS., Masri BA., Czitrom AA.** Biology of allografting. *Orthop Clin North Am* 1988; 29:199-04.
175. **Toth JM., Lynch KL., Hackbarth DA.** Ceramic-induced osteogenesis following subcutaneous implantation of calcium phosphates. *Bioceramics* 1993; 6:9-13.
176. **Yoon ST., Boden SD.** Osteoinductive molecules in orthopaedics: basic science and preclinical studies. *Clin Orthop* 2002; 395:33-43.

177. **Le Nihouannen D., Daculsi G., Saffarzadeh A., Layrolle P.** Ectopic Bone Formation by Microporous Calcium Phosphate Ceramic Particles in Sheep Muscles Bone 2005; 36:1086-93.
178. **Khan SN., Cammisa FP. Jr., Sandhu HS., Diwan AD., Girardi F.P, Lane JM.** The biology of bone grafting. J Am Acad Orthop Surg 2005; 13:77-86.
179. **Younger EM., Chapman VW.** Morbidity at bone graft donor sites. J Orthop Trauma 1989; 3:192-5.
180. **Flynn JM.** Fracture Repair and Bone Grafting. En Orthopaedic Knowledge Update. Rosemont, Illinois: American Academy of Orthopaedic Surgeons, editor; 2011. p. 11-21.
181. **Malizos KN., Zalavras CG., Soucacos PN., Beris AE., Urbaniak JR.** Injertos libres vascularizados de peroné para reconstruir defectos óseos. J Am Acad Orthop Surg (ed esp) 2004; 2:432-41.
182. **Bae DS., Waters PM.** Free Vascularized Fibula Grafting: Principles, Techniques, and Applications in Pediatric Orthopaedics. Orthopaedic Journal at Harvard Medical School 2006; 8:86-9.
183. **Hak DJ.** The use of osteoconductive bone graft substitutes in orthopaedic trauma. J Am Acad Orthop Surg 2007; 15:525-36.
184. **Bohner M.** Design of ceramic-based cements and putties for bone graft substitution. Eur Cell Mater 2010; 20:1-12.
185. **Ooms EM., Wojke JGC., Van Der Waerden JPCM., Jansen JA.** Trabecular bone response to injectable Calcium phosphate (Ca-P) cement. J Biomed Mater Res 2002; 61:9-18.
186. **Valle Ortiz M., Crespo Romero R., García González V., González Roldán C., Jiménez Sánchez-Cruzado B., Martínez Breijo.** Taloinjertos Óseos. Acta Ortopédica Castellano-Manchega 2000; 1:59-62.
187. **Gimeno, MD.** Bone substitutes in distal radius fractures. Patología del Aparato Locomotor 2007; 5:82-90.
188. **Burchardt H.** The biology of bone graft repair. Clin Orthop 1983; 108:28-42.

- 189. Arzi B., DuRaine GD., Lee CA., Huey DJ., Borjesson DL., Murphy BG., y cols.** Cartilage immunoprivilege depends on donor source and lesion location *Acta Biomater* 2015; 1:72-81.
- 190. Weiland AJ., Phillips TW., Randolph MA.** Bone grafts: a radiologic, histologic, and biomechanical model comparing autografts, allografts, and free vascularized bone grafts. *Plast Reconstr Surg* 1984; 74:368-79.
- 191. Bauer TW., Muschler GF.** Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clin Orthop* 2000; 2:10-27.
- 192. Garg M., Dev G., Misra K., Tuli SM.** Early biologic behavior of bone grafts. A fine needle aspiration cytology study. *Acta Cytologica* 1997; 41:765-70.
- 193. Calvo J., Gaya A.** La respuesta inmunitaria en el trasplante de aloinjertos óseos. *Rev Inmunol* 2000; 19:148-55.
- 194. Kushner A.** Evaluation of Wolff's law of bone formation. *J Bone Joint Surg Am* 1940; 22:589-96.
- 195. Frymoyer JN., Pope MH.** Fracture healing in the sciatically denervated rat. *J Trauma* 1977; 17:355-61.
- 196. Koivukangas, A.** Effects of long-term clodronate administration on bone and on fracture healing in rat, with special reference to methodological aspects. *Oulu; Acta Univ. Oul;* 2002. p. 677.
- 197. Lindh C., Nilsson M., Klinge B., Petersson A.** Quantitative computed tomography of trabecular bone in the mandible. *Dentomaxillofac Radiol* 1996; 25:146-50.
- 198. Millett PJ., Cohen B., Allen MJ., Rushton N.** Bone mineral density changes in fracture callus: a densitometric study in rats. En: 42nd Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, Atlanta; 1996. p.450.
- 199. Iwashita Y.** Basic Study of the measurement of bone mineral content of cortical and cancellous bone of the mandible by computed tomography. *Dentomaxillofac Radiol* 2000; 29:209-15.
- 200. Maki K., Okano T., Morohashi T., Yamada S., Shibasaki Y.** The application of threedimensional quantitative computed tomography to the maxillofacial skeleton. *Dentomaxillofac Radiol* 1997; 26:39-44.



**201. Maki K., Miller A., Okano T., Shibasaki Y.** Changes in cortical bone mineralization in the developing mandible: a three-dimensional quantitative computed tomography study. *J Bone Miner Res* 2000; 15:700-9.

**202. Homolka P., Beer A., Birkfellner W., Nowotny R., Gahleitner A., Tschabitscher M, y cols.** Bone mineral density measurement with dental quantitative CT prior to dental implant placement in cadaver mandibles: pilot study. *Radiology* 2002; 224:247-52.

**203. Hamanishi C., Kawabata T., Yoshii T., Tanaka S.** Bone mineral density changes in distracted callus stimulated by pulsed direct electrical current. *Clin Orthop* 1995; 312:247-52.

**204. Markel MD., Bogdanske JJ.** The effect of increasing gap width on localized densitometric changes within tibial osteotomies in a canine model. *Calc Tissue Int* 1994; 54:155-9.

**205. Mosheiff R., Klein BY., Leichter I., Chaimsky G., Nyska A., Peyser A., Segal D.** Use of dual-energy X-ray absorptiometry (DEXA) to follow mineral content changes in small ceramic implants in rats. *Biomaterials* 1992; 13:462-6.

**206. Hounsfield GN.** Computed Medical Imaging Nobel Lecture, 8 December 1979 *J Radiol* 1980; 61:459-68.

**207. Molteni R.** From CT Numbers to Hounsfield Units in Cone Beam Volumetric Imaging: the effect of artifacts. En: 62th AAOMR. Chicago; 2011.

**208. Misch C.E.** Contemporary Implant Dentistry. Tercera edición. San Louis: Mosby; 2007.

**209. Mah P., Reeves TE., McDavid WD.** Deriving Hounsfield units using grey levels in cone beam computed tomography *Dentomaxillofacial Radiology* 2010; 39:323-35.

**210. Lagravere MO., Fang Y., Carey J., Toogood RW., Packota GV., Major PW.** Density conversion factor determined using a cone-beam computed tomography unit NewTom QR-DVT 9000 *Dentomaxillofacial Radiology* 2006; 35:407-9.

**211. Bryant JA., Drage NA., Richmond S.** Study of the scan uniformity from an i-CAT cone beam computed tomography dental imaging system. *Dentomaxillofac Radiol* 2008; 37:365-74.

**212. Bouxsein ML., Boyd SK., Christiansen BA., Guldberg RE., Jepsen KJ., Müller R.** Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res* 2010; 25:1468-86.

**213. Rasband W.S.** Image J. U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. Consultado en Febrero de 2015. Disponible en <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2014.

**214. Schneider CA., Rasband WS., Eliceiri KW.** "NIH Image to Image J: 25 years of image analysis". *Nature Methods* 2012; 9:671-5.

**215. Abramoff MD., Magalhaes PJ., Ram SJ.** Image Processing with Image J. *Biophotonics International* 2004; 11:36-42.

**216. Doube M., Klosowski MM., Arganda-Carreras I., Cordelières F., Dougherty RP., Jackson J., y cols.** Bone J: free and extensible bone image analysis in Image J. *Bone* 2010; 47:1076-9.

**217. Hildebrand T., Rüegeegger P.** A new method for the model-independent assessment of thickness in three-dimensional images. *J. Microsc* 1997; 185:67-75.

**218. Dougherty R., Kunzelmann K.** Informática espesor locales de estructuras en 3D con ImageJ. *Microsc. Microanal* 2007; 13:1678-9.

**219. Olivo-Marin JC.** Quantitative Image Analysis Unit at Institut Pasteur. Consultado en Febrero de 2015. Disponible en <http://www.bioimageanalysis.org/>

**220. De Chaumont, F., Chenouard N, Hervé N., Pop S., Provoost T., Meas-Yedid V., y cols.** Icy: an open bioimage informatics platform for extended reproducible research. *Nature Methods* 2012; 9:690-6.

**221. Carpenter AE., Jones TR., Lamprecht MR., Clarke C., Kang IH., Friman O., y cols.** CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome Biology* 2006; 7:R100.

**222. Life Sciences.** LAS X.. Consultado en Marzo de 2015. Disponible en: <http://www.leica-microsystems.com/products/microscope-software/software-for-life-science-research/>

223. **Rosset A., Spadola L., Ratib O.** Osirix: An Open-Source Software for Navigating in Multidimensional DICOM Images *Journal of Digital Imaging* 2004; 17:205-16.
224. **Aghaloo TL., Moy PK., Freymiller EG.** Investigation of platelet rich plasma in rabbit cranial defects: a pilot study. *J Oral Maxillofac Surg* 2002; 60:1176-81.
225. **Kim SG., Kim WK., Park JC., Kim HJ.** A comparative study of osseointegration of Avana implants in a demineralized freeze-dried bone alone or with platelet rich plasma. *J Oral Maxillofac Surg* 2002; 60:1018-25.
226. **Fennis JP., Stoelinga PJW., Jansen JA.** Mandibular reconstruction: an histological and histomorphometric study on the use of autogenous scaffolds, particulate corticocancellous bone grafts and platelet rich plasma in goats. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004; 33:48-55.
227. **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.
228. **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; 33:56-9.
229. **Ranly DM., McMillan J., Keller T., Lohmann CH., Meunch T., Cochran L, y cols.** Platelet derived growth factor inhibits demineralised bone Matrix-induced intramuscular cartilage and bone formation. A study of immunocompromised Mice. *J bone Joint Surg Am* 2005; 87:2052-64.
230. **Sarkar MR., Augat P., Shefelbine SJ., Shorlemmer S., Huber-Lang M., Claes L., y cols.** Bone formation in long bone defect model using platelet rich plasma loaded collagen scaffold. *Biomaterials* 2006; 27:1817-23.
231. **Choukroun J., Diss A., Simonpieri A., Girard MO., Schoeffler C., Dohan SL, y cols.** Platelet Rich fibrin (PRF): A second generation platelet concentrate. Part IV: clinical effects on tissue healing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006; 101:56-60.
232. **Graziani F., Ivanovski S., Cei S., y cols.** The in vitro effect of different PRP concentrations on osteoblasts and fibroblasts. *Clin Oral Implants Res* 2006; 17:12-9.
233. **Dallari D., Savarino L., Stagni C., Cenni E., Cenachhi A, Fornasari PM., y cols.** Enhanced Tibial Osteotomy healing with use of bone grafts supplemented with

platelet gel or platelet gel and Bone Marrow stromal cells. *J Bone Joint Surg Am* 2007; 89:2413-20.

**234. Chiang C., Su C., Huang C., Chen W., Chen T., Tzeng Y.** Early experience and results of bone graft enriched with autologous platelet gel for recalcitrant nonunions of lower extremity. *J Trauma* 2007; 63:655-61.

**235. Simman R., Hoffmann A., Bohinc RJ., Peterson WC., Russ A.J.** Role of Platelet-Rich Plasma in Acceleration of Bone Fracture Healing. *Annals of Plastic Surgery* 2008; 61:337-44.

**236. Bonete Iluch D., Gomar Sancho F., Carrasco Luna J.** Utilización de geles plaquetarios en la curación de los defectos óseos. Estudio experimental. *Rev Esp Cir Osteoart* 2009; 239:93-101.

**237. Cenni E., Savarino L., Perut F., Fotia C., Avnet S., Sabbioni G.** Background and rationale of platelet gel in orthopaedic surgery. *Musculoskeletal Surgery* 2010; 94:1-8.

**238. Kon E., Filardo G., Delcogliano M., Fini M., Salamanna F., Giavaresi G., y cols.** Platelet autologous growth factors decrease the osteochondral regeneration capability of a collagen-hydroxyapatite scaffold in a sheep model. *BMC Musculoskeletal Disorders* 2010; 11:220-9.

**239. Lee JY., Nam H., Park YJ., Lee SJ., Chung CP., Han SB., Lee G.** In Vitro Cellular & Developmental Biology. *Animal* 2011; 47:157-64.

**240. Murawski CD., Kennedy JG.** Bone Marrow Aspirate Concentrate and Platelet-rich Plasma as Biological Adjuncts to the Surgical Treatment of Osteochondral Lesions of the Talus. *Techniques in Orthopaedics* 2011; 26:22-7.

**241. Bibbo C.** Platelet-rich Plasma to Augment Fracture Healing. *Techniques in Foot & Ankle Surgery* 2012; 11:9-12.

**242. Jadhav GR., Shah N., Logani A.** Case Report Platelet-Rich Plasma Supplemented Revascularization of an Immature Tooth Associated with a Periapical Lesion in a 40-Year-Old Man. *Hindawi Publishing Corporation Case Reports in Dentistry* 2014; 1:1-4.

**243. Slawson D.** Platelet-Rich Plasma May Minimally, If at All, Benefit Patients with Knee Osteoarthritis *American Family Physician* 2014; 89:574-8.

**244. Yong Y., Rexiti P., Qiang W., Lu, J., Alifu Y., Xue-ying H., y cols.** Autologous platelet-rich plasma and autologous bone graft for comminuted fractures: randomized controlled follow-up. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research* 2014; 18:3603-8.

**245. Zhou Q., Xu C., Cheng X., Liu Y., Yue M., Hu M., y cols.** Platelets promote cartilage repair and chondrocyte proliferation via ADP in a rodent model of osteoarthritis. *Platelets* 2015; 1:1-11.

**246. Parthasaradhi T., Chandran CR., Ranganathan AT., Jain A., Parabhakar P., Padmanaban S.** Management of a One-wall Intrabony Osseous Defect with Combination of Platelet Rich Plasma and Demineralized Bone Matrix- a Two-year Follow up Case Report. *J Dent Shiraz Univ Med Sci* 2015; 16:219-23.

**247. Tatsuro K., Jiro K., Kazuhiko M., Hideaki T., Hisayuki M., Kazuhiro M., Kouichi O., y cols.** Platelet-Rich Plasma with Basic Fibroblast Growth Factor for Treatment of Wrinkles and Depressed Areas of the Skin. *Plastic & Reconstructive Surgery* 2015. En prensa.

**248. Sánchez Belda A., Sánchez Trujillano MC.** Raza roja levantina. Razas Ovinas españolas. Asociación nacional de criadores de raza guirra. 1964. Consultado Abril 2015. Disponible en: <http://www.anguirra.com/publicaciones.htm>.

**249. DIAPLISA BIOMEDICA S.A.** Diaplisa Biomedica 2014. Consultado en Marzo de 2015. Disponible en: <http://www.diaplisabiomedica.com.mx/index.php/productos/datos-fisiologicos-de-referencia>.

**250. Welde BT., Rearsen MJ., Onyangof., Chumo DA., Murithii RM., Roberts LM.** Natural and Acquired Resistance to *Trypanosoma vivax* in Cattle. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 1989; 83:185-94.

**251. Henry AK.** *Extensile Exposure*. Segunda edición. Edinburgo: E&S Livingstone; 1966.

**252. Kocher T.** *Textbook of Operative Surgery*. Tercera edición. London: Adam and Charles Black; 1911.

**253. Canale T.** *Campbell Cirugia Ortopedica*. Décima edición. Madrid: Elsevier; 2004.

**254. Loutit JF., Mollison PL.** Advantages of a disodium-citrate-glucose mixture as a blood preservative. *BMJ* 1943; 2:744-9.

255. **Wright S., Steinwandel U., Ferrari P.** Citrate anticoagulation using ACD solution A during long-term haemodialysis. *Nephrology* 2011; 16:396-02.
256. **Arganda-Carreras I., Fernández-González R., Munoz-Barrutia A., Ortiz-De-Solorzano C.** 3D reconstruction of histological sections: Application to mammary gland tissue. *Microscopy Research and Technique* 2010; 73:1019-29.
257. **Odgaard A., Gundersen HJG.** Cuantificación de la conectividad en el hueso esponjoso, con especial énfasis en las reconstrucciones en 3-D. *Hueso* 1993; 14:173-82.
258. **Toriwaki J., Yonekura T.** Número de Euler y de conectividad índices de tres fotos digital dimensional. *Forma* 2002; 17:183-09.
259. **Polder G., Hovens HLE., Zweers AJ.** Measuring shoot length of submerged aquatic plants using graph analysis. En: *Processing Image J User and Developer Conference*, Luxemburgo: Centre de Recherche Public Henri Tudor; 2010. p. 172-7.
260. **Lee TC., Kashyap RL., Chu CN.** Building skeleton models via 3-D medial surface axis thinning algorithms. *CVGIP. Graphical Models and Image Processing* 1994; 56:462-78.
261. **Harrigan TP., Mann RW.** Characterization of microstructural anisotropy in orthotropic materials using a second rank tensor. *J Mater Sci* 1984; 19:761-7.
262. **Laboratory FAST, University Paris Sud.** Fluides, Automatique et Systèmes Thermiques. Consultado en Marzo de 2015. Disponible en: <http://www.fast.u-psud.fr/~moisy/ml/boxcount/html/demo.html>.
263. **Fazzalari NL., Parkinson H.** Fractal dimension and architecture of trabecular bone. *J Pathol* 1996; 178:100-5.
264. **Müller-Karger CM., Cerrolaza M.** Un nuevo método para la simulación de la estructura ósea mediante la versión P de elementos finitos. *IMME* 2001; 39:23-54.
265. **Rasband WS.** Image J, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. Consultado Marzo de 2015, en Disponible en: <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2015.
266. **Weibrich G., Kleis WKG., Buch R., Hitzler WE., Hafner G.** The Harvest Smart PRPePTM system versus the Friadent-Schütze platelet-rich plasma kit Comparison of a semiautomatic method with a more complex method for the preparation of platelet concentrates. *Clin Oral Impl Res* 2003; 14:233-9.

**267. Mazzucco L., Balbo V., Cattana E., Guaschino R., Borzini P.** Not every PRP-gel is born equal. Evaluation of growth factor availability for tissues through four PRP-gel preparations: Fibrinet, RegenPRP-Kit, Plateltex and one manual procedure. *Vox Sang* 2009; 97:110-8.

**268. Hernández-Fernández A., Velez R., Soldado F., Saenz-Rios JC., Barber I., Aguirre-Canyadell M.** Effect of administration of platelet-rich plasma in early phases of distraction osteogenesis: an experimental study in an ovine femur model. *Injury* 2013; 44:901-7.

**269. Lucarelli E., Beccheroni A., Donati D., Sangiorgi L., Cenacchi A., Del Vento, AM., y cols.** Platelet derived growth factors enhance proliferation of human stromal stem cell. *Biomaterials* 2003; 24:3095-100.

**270. Nagata MJ., Messori M., Pola N., Campos N., Vieira R., Esper LA., y cols.** Influence of the ratio of particulate autogenous bone graft/platelet-rich plasma on bone healing in critical-size defects: a histologic and histometric study in rat calvaria. *J Orthop Res* 2010; 28:468-73.

**271. Knut Beitzel MB., McCarthy R., Russell P., Apostolakos J., Cote MP., Mazzocca AD.** Learning about PRP using cell-based models Muscles, Ligaments and Tendons Journal 2014; 4:38-45.

**272. Bernuzzi G., Tardito S., Bussolati O., Adorni D., Cantarelli S., Fagnoni F., y cols.** Platelet gel in the treatment of cutaneous ulcers: the experience of the Immunohaematology and Transfusion Centre of Parma. *Blood Transfus* 2010; 8:237-47.

**273. Tschon M., Fini M., Giardino R., Filardo G., Dallari D., Torricelli P., y cols.** Lights and shadows concerning platelet products for musculoskeletal regeneration. *Frontiers in Bioscience* 2011; 3:96-07.

**274. Schär MO., Diaz-Romero J., Kohl S., Zumstein MA., Nesic D.** Platelet-rich Concentrates Differentially Release Growth Factors and Induce Cell Migration In Vitro. *Clin Orthop Relat Res* 2015; 473:1635-43.

**275. Logan TT., Villapol S., Symes AJ.** TGF- $\beta$  superfamily gene expression and induction of the Runx1 transcription factor in adult neurogenic regions after brain injury. *PLoS One* 2013; 8:e59250.

**276. Fufa D., Shealy B., Jacobson M., Kevy S., Murray MM.** Activation of platelet-rich plasma using soluble type I collagen J Oral Maxillofac Surg 2008; 66:684-90.

**277. Wen CY., Qin L., Lee KM., Chan KM.** Peri-graft bone mass and connectivity as predictors for the strength of tendon-to-bone attachment after anterior cruciate ligament reconstruction. Bone 2009; 45:545-52.

**278. Christgau M., Moder D., Hiller KA., Dada A., Schimitz G., Schmalz G.** Growth factors and cytokins in autologous platelet concentrate and their correlation to periodontal regeneration outcomes. J Clin Periodontol 2006; 33:837-45.

**279. Claes L., Blakytyn R., Gockelmann M., Schoen M., Ignatius A., Willie B.** Early dynamization by reduced fixation stiffness does not improve fracture healing in a rat femoral osteotomy model. J Orthop Res 2009; 27:22-7.

**280. 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.

**281. Ni M., Tang P., Wang Y., Li G.** Experimental study on promoting bone consolidation by using platelet-rich plasma and decalcified bone matrix during distraction osteogenesis Chinese Journal of Reparative & Reconstructive Surgery 2011; 25:661-7.

**282. Zhu, SJ., Choi, BH., Jung, JH., Lee, SH., Huh JY., You TM., y cols.** Comparative histological analysis of tissue-engineered bone using platelet-rich plasma and platelet-enriched fibrin glue. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics 2006; 102:175-9.

**283. Aydogan DB., Moritz N., Aro HT., Hyttinen J.** Analysis of trabecular bone microstructure using contour tree connectivity. Medical Image Computing & Computer-Assisted Intervention: MICCAI 2013; 16:428-35.

**284. Kazama JJ., Koda R., Yamamoto S., Narita I., Gejyo F., Tokumoto A.** Comparison of quantitative cancellous bone connectivity analyses at two- and three-dimensional levels in dialysis patients. Calcified Tissue International 2009; 84:38-44.

**285. Yao W., Hadi T., Jiang Y., Lotz J., Wronski TJ., Lane NE.** Basic fibroblast growth factor improves trabecular bone connectivity and bone strength in the lumbar vertebral body of osteopenic rats. Osteoporosis International 2005; 16:1939-47.

**286. Shen V., Dempster DW., Birchman R., Xu R., Lindsay R.** Loss of cancellous bone mass and connectivity in ovariectomized rats can be restored by combined



treatment with parathyroid hormone and estradiol. *Journal of Clinical Investigation* 1993; 91:2479-87.

**287. Portero-Muzy NR., Chavassieux PM., Mitton D., Duboeuf F., Delmas PD., Meunier PJ.** Euler (strut.cavity), a new histomorphometric parameter of connectivity reflects bone strength and speed of sound in trabecular bone from human os calcis. *Calcified Tissue International* 2007; 81:92-8.

**288. Dakai J., Liu Y., Saha PK.** Application of fuzzy skeletonization ot quantitatively assess trabecular bone micro-architecture. *Conference Proceedings: Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine & Biology Society* 2013; 3682-5.

**289. Szabo ME., Thurner PJ.** Anisotropy of bovine cortical bone tissue damage properties. *Journal of Biomechanics* 2013; 46:2-6.

**290. Aiyangar AK., Vivanco J., Au AG., Anderson PA., Smith EL., Ploeg HL.** Dependence of anisotropy of human lumbar vertebral trabecular bone on quantitative computed tomography-based apparent density. *Journal of Biomechanical Engineering* 2014; 136:091003.

**291. Dauschies M., Rohde K., Gluer CC., Barkmann R.** The preliminary evaluation of a 1 MHz ultrasound probe for measuring the elastic anisotropy of human cortical bone. *Curr Osteoporos Rep* 2014; 1:1-9.

**292. Sanyal A., Keaveny TM.** Biaxial normal strength behavior in the axial-transverse plane for human trabecular bone--effects of bone volume fraction, microarchitecture, and anisotropy. *Journal of Biomechanical Engineering* 2013; 135:121010.

**293. Chappard D., Legrand E., Haettich B., Chales G., Auvinet B., Eschard JP., y cols.** Fractal dimension of trabecular bone: comparison of three histomorphometric computed techniques for measuring the architectural two-dimensional complexity. *J Pathol* 2001; 195:515-21.

**294. Naeim F., Moatamed F., Sahimi M.** Morphogenesis of the bone marrow: fractal structures and diffusion-limited growth. *Blood* 1996; 87:5027-31.

**295. Messent EA., Ward RJ., Tonkin CJ., Buckland-Wright C.** Tibial cancellous bone changes in patients with knee osteoarthritis. A short-term longitudinal study using Fractal Signature Analysis. *Osteoarthritis & Cartilage* 2005; 13:463-70.

- 296. Chaves Netto HDM., Olate, S., Chaves MMGA., Barbosa AJR., Mazzonetto R.** Análisis histológico del proceso de reparación en defectos óseos. Reconocimiento de defectos críticos. *Int J Morphol* 2009; 27:1121-7.
- 297. Ma L., Zheng LW., Sham MH., Lam CK., Zwahlen RA., Cheung LK.** Effect of platelet-rich plasma on a rabbit model of nicotine-compromised bone healing. *Journal of Oral & Maxillofacial Surgery* 2011; 69:28-35.
- 298. Marenzana M., Arnett TR.** The Key Role of the Blood Supply to Bone. *Bone Research* 2013; 3:203-15.
- 299. Lammens J., Laumen A., Delpont H., Van Lauwe J.** The Pentaconcept in skeletal tissue engineering. A combined approach for the repair of bone defects. *Acta Orthop Belg* 2012; 78:569-73.
- 300. Giannoudis PV., Einhorn TA., Schmidmaier G., Marsh D.** The diamond concept-open questions. *Injury* 2008; 39:5-8.
- 301. Karger C., Kishi T., Schneider L., Fitoussi F., Masquelet AC.** French Society of Orthopaedic Surgery and Traumatology. Treatment of posttraumatic bone defects by the induced membrane technique. *Orthop Traumatol Surg Res* 2012; 98:97-02.
- 302. Thakkalapati P., Chandran CR., Ranganathan AT., Jain AR., Prabhakar P., Padmanaban S.** Management of a One-wall Intrabony Osseous Defect with Combination of Platelet Rich Plasma and Demineralized BoneMatrix- a Two-year Follow up Case Report. *J Dent Shiraz UnivMed Sci* 2015; 16:219-23.
- 303. Balmayor ER.** Targeted delivery as key for the success of small osteoinductive molecules. *Adv Drug Deliv Rev* 2015. En prensa.
- 304. Preeti K., Anisha M.** Efficacy of Platelet Rich Plasma and Hydroxyapatite Crystals in Bone Regeneration After Surgical Removal of Mandibular Third Molars. *J Maxillofac Oral Surg* 2013; 12:51-9.