

01421
101



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

**PLASMA RICO EN PLAQUETAS; MANEJO Y
APLICACIÓN EN LA REGENERACIÓN PERIODONTAL**

T E S I S A

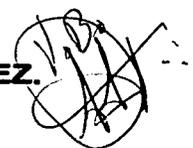
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

CIRUJANA DENTISTA

P R E S E N T A :

LORENA FÉLIX CARLOS

DIRECTORA: C.D.M.O. ALMA AYALA PÉREZ.



MÉXICO D. F.

NOVIEMBRE 2003

A



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme dado la oportunidad de estudiar una carrera en la Facultad de Odontología.

Muchas gracias a mis padres por darme una educación y la oportunidad de llegar a esta etapa de mi vida. Se que no ha sido sencillo pero me da mucho gusto poder contar con ustedes.

A mis hermanos Toño y Ana porque siempre he sentido que son el mejor regalo que mis papás pudieron haberme dado, formamos un buen equipo.

Quiero agradecer a mi tía Lulú por su apoyo profesional, consejos y regaños en su momento logrando hacerme crecer como persona y profesionalmente.

A mis amigas y amigos que han disfrutado esta etapa conmigo y hemos crecido juntos.

Quiero dar un agradecimiento muy especial a toda mi familia por sentirme siempre apoyada en las decisiones que he tomado en mi vida.

Dra. Alma Ayala muchas gracias por el tiempo y la paciencia que ha empleado conmigo para este trabajo.

Dr. Oscar Díaz de Ita muchas gracias por la orientación y apoyo.

Gracias al C.D. Rodrigo por haberme prestado su caso clínico.

Gracias a todas las personas que han confiado en mí. Los quiero mucho.

Lorena.

POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU.

INDICE

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN A LA BIOLOGÍA ÓSEA

| | |
|---|----|
| 1.1 ESTRUCTURA DEL HUESO..... | 7 |
| 1.2 MICROESTRUCTURA..... | 8 |
| 1.3 CÉLULAS ÓSEAS..... | 9 |
| 1.4 MATRICES..... | 13 |
| 1.5 PROTEÍNAS MORFOGENÉTICAS ÓSEAS..... | 15 |
| 1.6 MACROESTRUCTURA..... | 16 |

CAPITULO 2 REPARACIÓN CONTRA REGENERACIÓN

| | |
|--|----|
| 2.1 REMODELACIÓN..... | 22 |
| 2.2 PROCESOS BIOLÓGICOS EN UNA ZONA POST-EXTRACCIÓN..... | 23 |

CAPITULO 3 PRINCIPIOS BÁSICOS PARA LA REGENERACIÓN ÓSEA.....28

CAPITULO 4 FACTORES DE CRECIMIENTO

| | |
|---|----|
| 4.1 FUNCIÓN DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO EN LA CICATRIZACIÓN..... | 36 |
| 4.2 FACTOR DE CRECIMIENTO DERIVADO DE LAS PLAQUETAS..... | 41 |
| 4.3 FACTOR DE CRECIMIENTO VASCULAR ENDOTELIAL..... | 44 |
| 4.4 FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMADO..... | 44 |
| 4.5 FACTOR DE CRECIMIENTO INSULÍNICO I Y II..... | 46 |
| 4.6 FACTORES DE CRECIMIENTO FIBROBLÁSTICOS..... | 47 |
| 4.7 FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO..... | 47 |

CAPITULO 5 GEL ADHESIVO DE FIBRINA AGREGADO DE PLAQUETAS

| | |
|---|----|
| 5.1 PLAQUETAS..... | 50 |
| 5.2 PRUEBAS DE FUNCIÓN PLAQUETARIA..... | 52 |
| 5.3 PLASMA RICO EN PLAQUETAS..... | 55 |
| 5.4 AGREGADO DE PLAQUETAS (P.R.F.C.)..... | 56 |

**CAPITULO 6
TÉCNICA DE OBTENCIÓN DEL P.R.F.C.**

| | |
|---|----|
| 6.1 OBTENCIÓN DE PLASMA RICO EN PLAQUETAS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN | 65 |
| 6.2 PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DEL PLASMA RICO EN PLAQUETAS..... | 66 |
| 6.3 ACTIVACIÓN Y AGREGACIÓN DE LAS PLAQUETAS..... | 69 |
| 6.4 OBTENCIÓN DE FIBRINA AUTÓLOGA..... | 71 |

**CAPITULO 7
APLICACIONES CLÍNICAS.**

| | |
|--|----|
| 7.1 TRATAMIENTOS DE CANINOS INCLUIDOS..... | 73 |
| 7.2 APICECTOMÍAS TRATAMIENTO DE DEFECTOS..... | 74 |
| 7.3 REGENERACIÓN ALREDEDOR DE IMPLANTES..... | 74 |
| 7.4 INJERTOS EN BLOQUE..... | 75 |
| 7.5 TRATAMIENTOS DE DEFECTOS PERIODONTALES..... | 76 |
| 7.6 APLICACIÓN DEL PLASMA RICO EN PLAQUETAS EN CIRUGÍA PARA ELEVACIÓN DE SENOS..... | 77 |
| 7.7 AUMENTO DE REBORDE UTILIZANDO REGENERACIÓN OSEA GUIADA Y PLASMA RICO EN PLAQUETAS..... | 77 |

| | |
|--|-----------|
| CAPITULO 8 CASO CLÍNICO | 84 |
|--|-----------|

| | |
|--------------------------|-----------|
| CONCLUSIONES..... | 88 |
|--------------------------|-----------|

| | |
|-------------------------|-----------|
| REFERENCIAS..... | 90 |
|-------------------------|-----------|

INTRODUCCIÓN

La enfermedad periodontal es el resultado de procesos infecciosos que afectan la función de los tejidos del periodonto.

En los años 90's empezó a haber una difusión en el uso de Plasma Rico en Plaquetas, de esta manera se obtuvo fibrina autóloga cuando se activó con trombina bovina y se aportaron Factores de Crecimiento para la regeneración ósea.

La función de la regeneración es restaurar el tejido dañado y recuperar las propiedades mecánicas y funciones originales. Para esto se utilizan diferentes injertos de hueso: autógeno, aloinjeto y aloplástico, los cuales son materiales que nos ayudan a reparar un defecto o deficiencia tisular.

Es importante mencionar que dentro de torrente sanguíneo encontramos las plaquetas que tienen la capacidad de adherirse a superficies y formar un coágulo en el lugar quirúrgico.

La sangre es uno de los tejidos más abundantes en el organismo, se ha considerado con el paso de los años muy complejo con amplias propiedades e influencia sobre las funciones de los tejidos u órganos, incluyendo la oxigenación, nutrientes y transporte de sustancias para el funcionamiento correcto de éstos.

El objetivo de este trabajo es hablar del plasma plaquetario, de los factores de crecimiento, su obtención y sus aplicaciones terapéuticas para la regeneración ósea en zonas intraorales. Dentro de las propiedades específicas para nuestro fin es el estudio en concreto de las plaquetas sanguíneas y del plasma.

Se exponen distintas técnicas para la obtención de éste y la posterior separación de las plaquetas. Cuando se habla de éste mencionamos que principalmente se encuentran las plaquetas como unidades básicas en la coagulación y que vistas desde otro enfoque nos sirven dentro de estudios avanzados para la regeneración ósea en zonas intraorales.

El objetivo terapéutico de colocar un coágulo de plasma rico factores de crecimiento en el alvéolo nos ayuda a tener una temprana reparación y acelerar el proceso regenerativo del hueso

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN A LA BIOLOGÍA ÓSEA

- 1.1. ESTRUCTURA DEL HUESO.**
- 1.2. MICROESTRUCTURA.**
- 1.3. CÉLULAS ÓSEAS.**
- 1.4. MATRICES.**
- 1.5. PROTEÍNAS MORFOGENÉTICAS ÓSEAS.**
- 1.6. MACROESTRUCTURA.**

1. INTRODUCCIÓN A LA BIOLOGÍA ÓSEA

1.1 ESTRUCTURA DEL HUESO:

Los elementos tisulares del proceso alveolar no son diferenciados de los otros tejidos óseos. La porción de hueso alveolar de las líneas del proceso alveolar crean los alvéolos que alojan a las raíces de los dientes. Si este es delgado, las perforaciones del hueso compacto pueden tener aperturas muy pequeñas para permitir el paso de vasos sanguíneos, vasos linfáticos y fibras nerviosas.¹

Apófisis alveolar, o proceso alveolar, puede ser definida como aquella parte de los maxilares, superior e inferior, que forma y sostiene los alvéolos de los dientes. La apófisis alveolar se desarrolla conjuntamente con el desarrollo y erupción de los dientes. Dicho proceso óseo está formado en parte por células del folículo dentario y por células que son independientes del desarrollo dentario. El hueso alveolar constituye el aparato de inserción de los dientes, cuya función principal es distribuir y absorber las fuerzas generadas.

El hueso que recubre las superficies radiculares es más grueso en la zona palatina que en la vestibular del maxilar. Las paredes de los alvéolos están tapizadas por hueso compacto y el área entre los alvéolos, incluida la pared ósea compacta, está ocupada por hueso esponjoso.

La apófisis alveolar comienza a formarse temprano en la vida fetal, con depósito de minerales en pequeños focos de la matriz mesenquimática que rodea el germen dentario. Estas pequeñas zonas mineralizadas aumentan de tamaño, se fusionan, se absorben y se remodelan hasta que se constituye una masa continua de hueso en torno a los dientes plenamente erupcionados. El contenido mineral de hueso es hidroxapatita.

La nutrición del hueso está asegurada por la incorporación de vasos sanguíneos al tejido óseo.²

A pesar de su rigidez, no es un tejido permanente e inmutable. Las células que forman el hueso están implicadas en un proceso continuo de renovación.

Estas células se encuentran en la matriz extracelular, que es una red compleja formada por macromoléculas. La matriz participa activamente en el metabolismo celular y que regula el comportamiento de las células que están en contacto con ella.

Los componentes del hueso microestructuralmente se clasifican en células, matriz inorgánica, matriz orgánica y factores señalizadores solubles. Todos estos componentes celulares y macromoleculares están organizados en jerarquías macroestructurales que son el hueso cortical y el hueso trabecular.³

El hueso es un tejido conectivo mineralizado especializado que contiene un 33% de matriz orgánica, un 28% de colágena de tipo I, 5% de la matriz orgánica es proteína no colágena, incluyendo osteonectina, osteocalcina, proteína morfogenética ósea, proteoglicano óseo y sialoproteína ósea.¹

1.2 MICROESTRUCTURA

Las células óseas surgen en el embrión las células madre osteoprogenitoras y las células madre mesenquimatosas.

Las propiedades de este tipo de células, no están diferenciadas sino a la mitad de camino de su diferenciación; se pueden dividir indefinidamente, cuando se dividen, cada célula hija puede especializarse en distintas direcciones y convertirse en célula mesenquimatosa indiferenciada pluripotencial, que puede considerarse una célula progenitora de distintos

tejidos, o bien diferenciarse y adquirir las características físicas y funcionales de una célula ósea.³

La diferenciación de las células es un proceso complejo que conlleva muchas transiciones celulares. La presencia de factores específicos es esencial por la progresión de una etapa a otra, la cual dirige el fenómeno de diferenciación.⁴

En esta diferenciación tienen un papel activo las proteínas morfogenéticas (PMG) y los factores de crecimiento (FC).³

1.3. CELULAS ÓSEAS

Hay varios fenotipos de células asociadas al hueso, se verán tres: osteoblastos, osteocitos y osteoclastos.⁴

Osteoblastos: Derivan de estas células embrionarias pluripotenciales de origen mesenquimatoso. La transformación de estas células embrionarias hasta osteoblastos se realiza gracias a la diferenciación celular que lleva a determinadas células osteoprogenitoras y a células inducibles osteoprogenitoras. Las células locales son determinadas osteoprogenitoras, y por otro lado están las células osteoprogenitoras inducibles como los pericitos que llegan al lugar de la herida de tres a cinco días. Estos pericitos se pueden convertir en osteoblastos mediante interacciones endógenas con las PMGs (proteínas morfogenéticas), ya que estas proteínas tienen un papel muy activo en la diferenciación celular.³

Los osteoblastos formadores de hueso o en reposo, incluidos los odontoclastos, que son células multinucleares que participan en la reabsorción ósea, están presentes en las siguientes áreas:

1. En la superficie de las trabéculas óseas del hueso esponjoso.

2. En la superficie externa del hueso cortical que conforma los maxilares.
3. En las paredes alveolares del lado del ligamento periodontal.
4. En la porción interna del hueso cortical del lado de los espacios medulares. ²

Cuando el hueso se daña en consecuencia de un trauma, células locales restauran la forma y la función ósea mediante la recapitulación de acontecimientos embriológicos. Las células locales son determinados osteoprogenitores. Los pericitos se pueden convertir en osteoblastos mediante interacciones endógenas como las PMG (proteínas morfogenéticas).

Los osteoblastos secretan la matriz ósea, que se deposita en láminas por arriba de la matriz preexistente, esta secreción de los osteoblastos se llama osteoide, un producto cuya modificación extracelular origina un sustrato orgánico insoluble que consiste principalmente en colágeno tipo I y se convierte en matriz ósea mineralizada rápidamente por deposición de cristales de fosfato cálcico (hidroxiapatita) que se encuentra en el medio extracelular. Primero se deposita la capa de colágeno y encima se deposita la fase orgánica (hidroxiapatita), este proceso se conoce como mineralización. ³

Los osteoblastos son células secretoras metabólicamente activas que secretan proteínas como osteocalcina, osteopontina, la osteonectina y otros proteoglicanos y además factores señalizadores solubles PMG (proteínas morfogenéticas), FCT (factor de crecimiento transformado), FCI I Y II (factor de crecimiento insulínico I y II), interleucina-1 y FCDP (factor de crecimiento derivado de las plaquetas).

La secreción de estos productos por parte de los osteoblastos ocurre durante la embriogénesis ósea y durante su mantenimiento y reparación.

La vida activa de los osteoblastos humanos se cree que es de 1 a 10 semanas y transcurrido este tiempo, las células pueden desaparecer; algunos osteoblastos forman recubrimiento, se les denomina células de revestimiento del hueso y aproximadamente un 15% se convierten en osteocitos.⁴

Algunos osteoblastos están libres en la superficie mientras que otros están fijos, sumergidos en su propia secreción.

La rigidez de esta matriz ósea hace que el hueso crezca sólo por superposición, esto es, añadiendo capas de matriz adicional a las superficies libres del tejido duro.³

Osteocitos: Son células relativamente inactivas, no se dividen ni secretan matriz, aunque su metabolismo es crucial para la vitalidad del hueso y para el mantenimiento de la homeostasis.⁴

Los osteocitos ocupan una pequeña cavidad o laguna dentro de la matriz, lagunas óseas. Estas lagunas óseas están interconectadas entre sí a través de una red de canalículos.³

El sistema resultante canalicular-lacunar es esencial para el metabolismo celular al permitir la difusión de nutrientes y de los productos de desecho. Es muy grande la superficie entre los osteocitos con sus prolongaciones citoplasmáticas por un lado y la matriz mineralizada por el otro. Esta enorme superficie de intercambio actúa como reguladora, para los niveles de calcio y de fosfato séricos por medio de los mecanismos de control hormonal.²

La vitalidad del hueso está garantizada a través de esta red de conexión. Los osteocitos son células finales incapaces de renovarse, por lo tanto el recambio de la población celular se realiza a través de sus precursores que son los osteoblastos.⁴

Osteoblastos, osteocitos y osteoclastos juegan un papel muy importante en la regulación del calcio y en la homeostasis del hueso, que son los procesos fisiológicos fundamentales de la modelación y remodelación del hueso. ³

Durante el remodelado del hueso, los osteocitos próximos al diente anquilosado absorberán tanto hueso como diente. Cuando concluya la fase reabsortiva, los osteocitos formarán hueso en el área reabsorbida. ²

Osteoclastos: Son macrófagos que se desarrollan a partir de monocitos originados en el tejido hematopoiético de la médula. Estos monocitos se liberan en el torrente sanguíneo y mediante fusión producen células multinucleadas de hasta 100 μm de diámetro con una media de unos 10 a 12 núcleos, conocidos como osteoclastos. ⁴

La absorción del hueso está siempre vinculada a los osteoclastos. Éstas son células gigantes especializadas en la degradación de la matriz mineralizada (hueso, dentina, cemento). La osteolisis (es decir, la degradación del hueso) es un proceso celular activo ejercido por los osteoclastos. ²

Viajan en el torrente sanguíneo y se recogen en los lugares de absorción del hueso. Los osteoclastos forman cavidades y hacen túneles, (denominadas lagunas de Howship) son móviles y capaces de migrar por la superficie ósea, crece un vaso capilar por el centro de dicho túnel y las paredes se van poblando de osteoblastos que van haciendo capas óseas concéntricas y así se va modelando el hueso. ³

El osteoclasto absorbe por igual sustancias orgánicas e inorgánicas. La absorción se produce por liberación de sustancias ácidas, que forman un medio ácido en el cual las sales minerales del tejido óseo comienzan a disolverse. Las sustancias restantes serán eliminadas por enzimas y fagocitosis osteoclásticas. ²

Los moduladores más importantes para el desarrollo de los osteoclastos parecen ser la interleucinas -1,-3,-6 y -11 junto con TGF α . La interleucina-11 parece ser el principal factor de control para el desarrollo de los osteoclastos.³

1.4 MATRICES

La matriz es generalmente referida como un tejido osteoide. El osteoide es producido por osteoblastos, como un reflejo de la formación de nuevo tejido óseo. Esto es gracias a la colágena, glicosaminoglicanos, agua y osteocitos, incluidos en la matriz ósea. La sustancia intersticial del hueso está constituida por dos componentes principales: uno es matriz orgánica y otro lo constituyen las sales inorgánicas.⁵

La matriz extracelular ayuda a que las células conserven su estado diferenciado. Esta matriz está formada por proteínas extracelulares que interaccionan entre sí formando una malla, juega un papel activo y complejo en la regulación del comportamiento de las células que están en contacto con ella. Las células que forman el tejido son las que determinan las propiedades del tejido; organizan la matriz extracelular y esta misma recíprocamente influye en la orientación, organización y en el comportamiento de las células que contiene.³

Matriz orgánica: Aproximadamente el 35% del peso de hueso deshidratado es matriz orgánica. El principal componente es el colágeno tipo I (90%) y el 10% restante son componentes no colágenos y sedimento.⁴

La matriz orgánica está impregnada por una hidroxiapatita pobremente cristalizada y pobre en calcio.¹

Presenta con gran frecuencia resistencia a la tracción, por lo que se requiere un contenido de colágena mayor que el del cartílago. Aproximadamente el 90% del contenido orgánico de la matriz ósea es colágena.⁶

Los colágenos forman la parte fibrosa de la matriz extracelular, el esqueleto, incluyendo el colágeno fibrilar (Tipos I, II, III, V y XI) y el colágeno no fibrilar tipo IV ; pero la colágena predominante del hueso es del tipo I.⁷

Las proteínas no colágenas modulan la mineralización y la unión de las células a la matriz. Esta unión celular al sustrato de matriz extracelular se conoce como anclaje. El anclaje cambia la forma de la célula y tiene por lo tanto un papel activo en el proceso de diferenciación de osteoblasto a osteocito.

Las moléculas adhesivas y antiadhesivas juegan un papel importante en las interacciones de la matriz extracelular, se conoce como reciprocidad dinámica. La principal molécula de adhesión de matriz extracelular es la fibronectina, una glucoproteína asociada a la superficie celular. Las células se pueden unir a la matriz vía fibronectina.⁴

La matriz extracelular proporciona señales reguladoras e instrucciones, ofreciendo una superficie de anclaje para factores solubles como las proteínas morfogenéticas (PMG) y los factores de crecimiento.

La unión de estos factores a la matriz extracelular puede facilitar su liberación controlada en respuesta a las demandas locales, una propiedad a ser explotada por las estrategias terapéuticas. Los mecanismos homeostáticos que rigen el funcionamiento, protección, cinética de liberación e inactivación, implica a la matriz extracelular y las células así como sus receptores que son las que responden a dichas proteínas.³

Matriz inorgánica: También conocida como mineralizada, responde al 60-70% del hueso deshidratado. Contiene aproximadamente un 99% del calcio, un 85% del fósforo y alrededor de un 40 y 60% del sodio y del magnesio que contiene el organismo.

Teóricamente existe una solución supersaturada de calcio y de fosfato en el medio extracelular, aunque en el equilibrio homeostático sólo los dientes y los huesos se mineralizarán.

Está claro que una serie de productos celulares junto con el colágeno organizan el microentorno y el sustrato adecuado para generar una matriz adecuada para la mineralización. ⁴

1.5 PROTEINAS MORFOGENÉTICAS ÓSEAS

Estas proteínas dirigen el desarrollo embriológico de las células, tejidos y órganos además de su importante papel en la fisiología postfetal.

Utilizando las nuevas tecnologías se han identificado PMG-1 (proteínas morfogénicas -1) hasta BMP-9 (proteínas morfogénicas-9) y su secuencia de aminoácidos revelan de PMG-2 (proteínas morfogénicas-2) hasta PMG-9 (proteínas morfogénicas-9) pertenecen a la familia FCT-B (factor de crecimiento transformado beta). Estas PMG se pueden dividir en familias según la secuencia de aminoácidos que contienen: son PMG-2 y PMG-4; PMG-3 conocida como osteogenina; PMG-5 a PMG-8 se conocen como proteína osteogénica -1 y proteína osteogénica-2 respectivamente y PMG-8B proteína osteogénica-3; y PMG-9. Además se han identificado de PMG-10 a PMG-13.

PMG-1 no forma parte de la familia FCT-B. (3)

En la actualidad estos factores de crecimiento se reconocen como multifuncionales, un factor de crecimiento de los reconocidos como

multifuncional, puede por un lado estimular la proliferación de ciertos tipos celulares, y por otro lado inhibir la proliferación de otros y además causar efectos no relacionados con la proliferación en otros tipos de células.

Están implicados en la reparación y en la regeneración, regulación de procesos celulares clave como la mitogénesis, quimiotaxis, diferenciación celular y metabolismo.³

1.6 MACROESTRUCTURA

Los osteocitos se localizan en unos espacios llamados lagunas óseas que están comunicadas entre sí a través de canalillos. La matriz extracelular se dispone en forma de láminas o capas, entre las que se encuentran estas lagunas óseas. Según la disposición de estas láminas, el tejido óseo puede ser cortical (denso o compacto) y trabecular (esponjoso). Todos los huesos tienen las dos variedades del tejido óseo pero en distinta disposición y cantidad. El tejido compacto es típico de los huesos largos y de la parte periférica de los huesos cortos y anchos; el tejido esponjoso forma parte central de los huesos cortos y anchos y la epífisis de los huesos largos.³

Hueso cortical o compacto: Macroscópicamente el hueso cortical aparece denso y compacto. El hueso haversiano es el tipo más complejo de hueso cortical. Las paredes de los alvéolos están tapizadas de hueso compacto. El hueso laminar se distribuye circunferencialmente en torno a los conductos de havers, que contienen los vasos sanguíneos que nutren los huesos y vasos linfáticos, y a menudo los nervios que inervan los huesos. Los sistemas de havers, en el hueso cortical funcionan como contrafuertes, está formado por entre 4 y 20 anillos concéntricos; cada uno de estos

anillos está poblado por un número variable de osteocitos; cada osteocito esta unido a sus congéneres osteocitos en la misma laminilla y a los osteocitos de las láminas adyacentes a través de una red de hilos finísimos que atraviesan el canaliculo. ²

Los canales de Volkmann penetran en el hueso cortical en dirección oblicua, proporcionando canales vasculares y linfáticos para el intercambio metabólico y el tráfico de las señales solubles, como hormonas y proteínas. La compleja distribución del hueso alrededor del canal vascular se conoce como osteon, es un cilindro irregular, ramificado y anastomosado, compuesto de un canal neurovascular colocado más o menos centralmente y rodeado por capas de hueso laminar, se encuentran orientados sobre el eje largo del hueso y son las principales unidades estructurales del hueso cortical.

El hueso cortical está formado por muchos osteones adyacentes y el canal central de estos osteones se denomina el canal harversiano.

Hueso esponjoso: Entre el hueso cortical está el hueso esponjoso o trabecular. Las laminillas óseas delimitan espacios más o menos amplios e irregulares, visibles a simple vista. Esta estructura forma un enrejado de trabécula tridimensional.

Las trabéculas rodean espacios medulares de forma irregular revestidos por una capa de células endósticas delgadas y aplanadas. Hay una amplia variación en el patrón trabecular del hueso esponjoso.

El hueso trabecular está sujeto a un complejo conjunto de cargas y esfuerzos, aunque parece que predomina la compresión; de todas formas más que ser diseñada para soportar la carga, el hueso trabecular ha sido diseñado para responder rápidamente a las necesidades fisiológicas. ^{3,8}

Se encuentra en forma predominante en los espacios interradiculares e interdentaes en cantidades limitadas en sentido vestibular o lingual, excepto

en el paladar. El hueso esponjoso se encuentra más en el maxilar que en la mandíbula. ⁸

CAPITULO 2

REPARACIÓN CONTRA REGENERACIÓN

2.1 REMODELACIÓN.

2.2 PROCESOS BIOLÓGICOS EN UNA ZONA POST-EXTRACCIÓN.

2. REPARACIÓN CONTRA REGENERACIÓN

Se entiende como **reparación** de un tejido la restauración de dicho tejido sin que éste conserve su arquitectura original ni tampoco su función. Cuando dicho tejido no recupera su estado original, sus propiedades físicas y mecánicas son claramente inferiores a las del tejido original, está es una transformación que es general ocurre espontáneamente y el resultado es la cicatrización.

Se entiende como **regeneración** cuando la restauración de dicho tejido posee propiedades indistinguibles del tejido original.³

Los neutrófilos son las primeras células que llegan a la herida y desaparecen en pocos días. Los macrófagos que empiezan a acumularse juegan un papel muy importante ya que liberan gran cantidad de factores de crecimiento y citocinas amplificando de esta forma la señal que iniciaron las plaquetas al desgranularse.

La colocación del coágulo del PRGF en el alvéolo tiene por tanto un papel importante en las fases tempranas de la reparación, contribuyendo a optimizar y acelerar el proceso regenerativo del hueso.⁹

Lo que interesa no es reparar sino regenerar, esto implica reconstruir la forma y restaurar la función.

Las razones por las que un tejido cicatriza en vez de regenerarse, es que puede contener las células necesarias para su regeneración pero le faltan las señales estimuladoras que desencadenen los acontecimientos necesarios para la regeneración. No existe ninguna duda acerca del papel crítico que juegan los factores de crecimiento y las proteínas morfogenéticas. Puede que la regeneración sea cuestión sólo de activar ciertas células proporcionándoles las señales estimuladoras adecuadas o bien de neutralizar ciertas señales supresoras de regeneración.

Existen grandes parecidos entre los mecanismos de la embriogénesis y de reparación, y en ambos las células precursoras, los factores de crecimiento y las proteínas morfogenéticas juegan un papel muy importante.

Cuando las células necesarias para la regeneración no son muy abundantes, como ocurre por razones de edad o enfermedad, quizá se puedan trasplantar dichas células o sus precursoras, bien solas o utilizando como vehículos membranas o matrices que promuevan su diferenciación y favorezcan su orientación.

Un requisito para la regeneración es el potencial de división de las células. Las células se clasifican en lábiles, estables y permanentes, basándose en su capacidad para dividirse. No todas las poblaciones de células diferenciadas están sujetas a regeneración y renovación. Las células permanentes si se pierden no pueden ser sustituidas, tienen una vida larga y por eso viven en entornos protegidos, es el caso de la mayoría de las células nerviosas.

Sin embargo, la mayoría de las poblaciones de células diferenciadas no son permanentes sino que se renuevan. Las nuevas células se pueden originar de dos formas: por duplicación sencilla de las células preexistentes que se dividen originando células hijas del mismo tipo o bien se pueden generar a partir de células madre no diferenciadas por un proceso de diferenciación que implica un cambio en el fenotipo celular.

Las proporciones de la renovación varían de un tejido a otro, el tiempo de renovación puede ser tan corto como una semana o tan largo como un año. Muchos tejidos cuya cinética de renovación es muy lenta se pueden estimular para que produzcan nuevas células mayor velocidad cuando exista la necesidad.³

El tejido óseo es un sistema dinámico que mantiene su estructura gracias a un equilibrio entre actividades opuestas. Las células que forman el hueso están implicadas en procesos continuos de remodelación: por un lado los

osteoclastos reabsorben el hueso viejo mientras que los osteoblastos depositan nueva matriz ósea. Estas células osteoprogenitoras trabajan cooperativamente y son las responsables de la remodelación normal del hueso. Cuando se descompensa este proceso de renovación se acelera la absorción del hueso y se descompensa frente a la formación de hueso nuevo.³

2.1 REMODELACIÓN

Tanto el hueso cortical como el trabecular se remodelan constantemente mediante un ciclo específico de actividad celular.

El proceso de remodelación del hueso implica las siguientes etapas:

1. Activación de las células osteogénicas precursoras.
2. Absorción activa del hueso.
3. Período de descanso.
4. Formación de hueso nuevo.

La suma de procesos asociados con la remodelación homeostática se conoce como activación, absorción y formación. Los osteoblastos se activan mediante factores de señalización y desocupan una zona de hueso; los osteoclastos son estimulados, se instalan en la zona que han dejado libre los osteoblastos, se unen, se absorben, y en respuesta a señales aún sin identificar, cesan la absorción y se liberan.³

La formación de hueso por los osteoblastos se da en la zona que ha sido absorbida por los osteoclastos; las lagunas de absorción osteoclástica (lagunas de Howship) se repueblan por un contingente de osteoblastos que fabrica osteoide o hueso joven, el cual se calcifica, quedando restaurado así

el hueso. El grupo de células responsables de este proceso dinámico se conoce como unidad básica multicelular o unidad de modelado óseo (UMO) y la cantidad de hueso formado por una unidad básica multicelular es la unidad básica estructural.

En humanos el proceso dura entre 6 y 9 meses; este período de tiempo se conoce como sigma. El proceso de remodelación en hueso cortical está tipificado por los osteoclastos que se sumergen por el hueso y en cuya estela los osteoblastos coordinan la deposición del hueso.

En circunstancias normales el proceso de absorción y formación están estrechamente acoplados y el resultado es que no hay cambio en la masa ósea.

El esqueleto del adulto contiene aproximadamente 35 millones de unidades básicas estructurales, una por cada unidad básica multicelular o de modelado óseo, se regenera casi completamente cada 10 años. La cresta alveolar de la mandíbula se regenera muy rápidamente para reparar el micro daño que resulta de las tremendas fuerzas masticatorias. Las regiones que contienen médula amarilla pueden renovarse cada 20 años, mientras que el hueso cortical de ilion que contiene médula hematopoiética se renueva en intervalos de tres años.

2.2 PROCESOS BIOLÓGICOS EN UNA ZONA POST-EXTRACCIÓN

En el supuesto de que todas las paredes estén conservadas y que se hubiera realizado un colgajo de desplazamiento para obtener un cierre por primera intención, el alvéolo se rellenará de sangre, formando un coágulo de fibrina. En el supuesto de haberlo rellenado con algún material osteoconductor, por ejemplo hidroxiapatita absorbible, hueso liofilizado o hueso autólogo, el coágulo englobará estos materiales.³

Al agregarse las plaquetas durante la formación del coágulo, cambian de forma, se unen entre ellas por medio de los receptores de superficie de la

membrana y liberan el contenido protéico de los gránulos α ; entre otras muchas proteínas están los factores de crecimiento. Algunas de estas proteínas tienen propiedades quimiotácticas atrayendo células al lugar de la herida.

El coágulo de fibrina se encontrará en una situación de hipoxia respecto al lecho receptor bien oxigenado. El pH será ácido (4-6) respecto al lecho receptor pH-7. Desde los primeros momentos todos estos estímulos van a provocar el comienzo de la revascularización del coágulo, la migración de células pluripotenciales, de células osteocompetentes, la mitogénesis de las células osteoprogenitoras y de la mitogénesis de los fibroblastos.

La acción iniciada por los factores de crecimiento liberados por las plaquetas será continuada a partir del tercer o cuarto día por los factores de crecimiento liberados por los macrófagos.

La hipoxia que se encuentra en el coágulo de fibrina en contraposición con el lecho receptor bien oxigenado crea un gradiente de oxígeno que atrae a los macrófagos (monocitos) que continúan liberando factores de crecimiento.

Durante este tiempo continúa de forma muy activa la revascularización del coágulo de fibrina formándose capilares y arteriolas desde el lecho receptor, que tiende a invadir todo el coágulo de fibrina. Durante este proceso continúa la diferencia de pH del coágulo de fibrina (acidosis) respecto al lecho receptor. El tejido conectivo comienza una rápida reparación.

Se inicia una carrera para conseguir rellenar espacios. Si las condiciones son óptimas el defecto se rellenará de células osteocompetentes y obtendremos **regeneración**. Si el defecto es muy grande y no se han creado las condiciones idóneas, parte del defecto se rellenará de tejido conectivo y parte de tejido óseo. Por lo tanto, no habremos conseguido la "regeneración total" sino una **reparación parcial (tejido cicatrizal)**.³

A partir del día 10 y hasta el final de la segunda semana se completa el proceso de revascularización formándose anastomosis (arteriola-capilar). También entramado trabecular de colágeno. El coágulo de fibrina está bien oxigenado equilibrándose el gradiente de oxígeno y frenándose la actividad de los macrófagos. El pH se equilibra, se frena la angiogénesis. Los osteoblastos han proliferado desde el lecho receptor comenzando la migración por el nuevo entramado de colágeno. Comienza la formación de matriz extracelular. Los fibroblastos han proliferado sobre la matriz de colágeno para soportar el crecimiento de los capilares. El tejido conectivo de la herida epiteliza por completo.

Entre la tercera y cuarta semana finaliza la formación de hueso tipo I (inmaduro). El hueso neoformado se consolida, habiendo aumentado en gran medida el número de osteoblastos. La fase de osteoconducción finaliza y podemos dar por finalizada formación de hueso inmaduro Tipo I. Los osteoblastos se han trasladado desde el lecho receptor a través de todo el entramado y comienza la fase de sustitución progresiva hacia hueso maduro Tipo II.

A partir de la cuarta semana se completará la fase de sustitución progresiva. Los monocitos se agregan al injerto, transformándose en osteoclastos. Histológicamente tendremos todavía un hueso desorganizado con una distribución aleatoria de las trabéculas que se irán ordenando a lo largo de este segundo y tercer mes, hasta completar una estructura de hueso maduro. En este hueso hay menos células y más matriz extracelular, menos osteoblastos y más osteocitos.³

Pueden surgir complicaciones o circunstancias que podrían alterar la respuesta del organismo como:

Infección: Si el lecho o el injerto se infectan o si se produce un secuestro, se inactivarán las células osteocompetentes y se inhibirá la angiogénesis.

Pérdida del coágulo: Por aspiración del propio paciente succionando la zona del defecto, por presión (prótesis removible no permitiendo la revascularización epitelización deficiente, por una epitelización deficiente, dehiscencia de las suturas o que la lengua no permita la correcta cicatrización, también hay que tener en cuenta que en los fumadores encontramos una mala epitelización. ³

CAPITULO 3

PRINCIPIOS BÁSICOS PARA LA REGENERACIÓN ÓSEA.

3. PRINCIPIOS BÁSICOS PARA LA REGENERACIÓN ÓSEA

Utilizando estos tres componentes del tejido (matriz, células y sustancias reguladoras solubles) se pueden desarrollar estrategias para la regeneración in vitro y en vivo. Mediante la combinación de estos tres elementos, en el entorno apropiado, se obtiene regeneración.

En los tejidos no vascularizados con baja actividad mitótica no puede haber reparación o regeneración de los defectos.

Existen tres mecanismos relacionados con el éxito en la regeneración ósea, estos mecanismos son la osteogénesis, la osteoinducción y la osteoconducción. Todos los materiales que se utilizan en los injertos poseen al menos uno de estos tres mecanismos de acción.

Los tres tipos primarios de injerto de hueso son hueso autógeno, aloinjerto y aloplástico. Los mecanismos por los cuales estos materiales pueden trabajar normalmente dependen del origen y composición de este material. El hueso autógeno es material orgánico autólogo, utilizado la osteogenesis, osteoinducción y osteoconducción para la formación de nuevo tejido óseo. Aloinjerto, el cual puede ser hueso cortical o trabecular, tiene osteoconducción y posible propiedades de osteoinducción, pero no osteogénicas. Aloplástico el cual puede ser compuesto por material natural o sintético son típicos osteoconductivos.⁴

Osteogénesis: Es el proceso de formación y desarrollo de hueso nuevo. Un material osteogénico se deriva o bien está formado por tejido implicado en el crecimiento y reparación, ejemplo el hueso autólogo.

Las células osteogénicas pueden promover el crecimiento óseo, incluso en otros tejidos.

Osteoinducción: Proceso de estimulación de la osteogénesis. Los materiales osteoinductivos se pueden utilizar para mejorar la regeneración ósea, y el hueso puede crecer o extenderse por una zona donde normalmente no se encuentra. La regeneración ósea es estimulada por la liberación de proteínas inductivas que facilitan la diferenciación celular.

Ejemplo de materiales osteoinductivos:

- Hueso autólogo, en la fase de absorción libera proteínas morfogenéticas (PMG).
- P.R.F.C. (plasma rico en factores de crecimiento) libera FC que estimulan la quimiotaxis, la diferenciación y proliferación celular.
- Proteínas morfogenéticas (PMG).

Osteoconducción: Proporciona la estructura o matriz física apropiada para la deposición de hueso nuevo. Los materiales osteoconductivos son guías para el crecimiento óseo y permiten que se deposite hueso nuevo. El proceso de reparación o regeneración ósea se produce a partir de células osteoprogenitoras del propio huésped. Se crea una estructura para que se pueda formar hueso por sustitución progresiva. La absorción será lenta (dependiendo del bio-material y del lecho receptor) y progresiva.³

Materiales osteoconductivos:

- Hueso autólogo, además de ser osteogénico y osteoinductor es también osteoconductor.

- Fibrina autóloga (P.R.F.C.).
- Hidroxiapatita absorbible (Bio-Oss).
- Sulfato de calcio (Bone-Mousse, tipo I).
- Fosfato tricálcico (Bone-Mousse, tipo II).
- Fibrina liofilizada (Tisucol).
- Hueso desmineralizado (DFDBA).
- Cristales cerámicos bioactivos.

Para favorecer la formación de hueso nuevo a través de su superficie, un injerto osteoconductor necesita que exista hueso previamente, o bien células mesenquimatosas diferenciadas.

Todos los materiales utilizados para la reparación poseen al menos uno de estos tres mecanismos de acción y es el hueso autólogo el único que posee los tres.

Dentro de los procesos regenerativos hay dos técnicas que debemos mencionar que son: la regeneración tisular guiada y la osteodistracción.

Regeneración tisular guiada (osteopromoción): Es la capacidad de inducir la formación ósea mediante la utilización de barreras, a este proceso se le denomina regeneración tisular guiada. El mecanismo no es otro que crear una barrera física para que la revascularización del defecto provenga del lecho receptor e impida la llegada de capilares del conectivo de zonas adyacentes. Se ha comprobado cómo la utilización de barreras con P.R.F.C mejora notablemente la epitelización por encima de la barrera.³

Osteodistracción: Su filosofía no es otra que, provocar una fractura, ir separando los dos fragmentos. La finalidad de esta separación que se estire el coágulo de fibrina que se forma entre ellos, para crear un puente óseo

entre ambos fragmentos. Lo fundamental es que los dos extremos de la fractura estén estables para que no se rompa ese puente de fibrina y futuro puente óseo.

Adición de células: El suministro de células exógenas y de precursores será necesario cuando se encuentre disminuida la proliferación de las células precursoras por razones de enfermedad, tamaño de la lesión, edad, etc.

Desde una perspectiva de crecimiento óseo exclusivamente, el mejor injerto es el hueso autólogo por sus propiedades, ya que utiliza los tres mecanismos; la osteogénesis, la osteoinducción y la osteoconducción. El hueso autólogo se puede obtener de varias localizaciones, dependiendo de la cantidad de hueso necesario puede ser:

Intraoral : mentón, rama ascendente, tuberosidad.

Extraoral: cresta ilíaca, calota, tibia, costilla.

Factores de diferenciación (son inductivos): Uno de los componentes minoritarios de la matriz ósea son las PMG; se aislaron apartir del hueso. Se descubrieron por su capacidad de inducir la formación de hueso nuevo. Esta capacidad osteoinductiva se evalúa midiendo la formación de hueso en lugares ectópicos. ³

Cuando se tratan células mesenquimatosas y líneas celulares derivadas de embriones o adultos, el resultado es la diferenciación de estas células en condroblastos u osteoblastos. Inducen la formación de marcadores del fenotipo osteoblástico, como la osteocalcina y la fosfatasa alcalina. Estas proteínas pertenecen a la familia de FCT-B. BMP-2,-3,-4,-6 y -7 (también llamada proteína osteogénica-1 PO-1), inducen la formación de hueso y

cartílago; parece que intervienen en la diferenciación de las células madre pluripotenciales.³

CAPITULO 4.

FACTORES DE CRECIMIENTO

4.1 FUNCIÓN DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO EN LA CICATRIZACIÓN.

4.2 FACTOR DE CRECIMIENTO DERIVADO DE LAS PLAQUETAS.

4.3 FACTOR DE CRECIMIENTO VASCULAR ENDOTELIAL.

4.4 FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMADO.

4.5 FACTOR DE CRECIMIENTO INSULÍNICO I Y II.

4.6 FACTORES DE CRECIMIENTO FIBROBLÁSTICO ACIDO Y BÁSICO.

4.7 FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO.

4. FACTORES DE CRECIMIENTO

Son polipéptidos que aumentan la replicación celular y tienen importantes efectos en la diferenciación y función de las células. Los factores de crecimiento son producidos por diferentes tipos de células y tejidos. Su acción se ejerce sobre células de la misma clase (factores autócrinos) o sobre células de diferentes clases (factores parácrinos).

Los factores de crecimiento ejercen efectos múltiples en los fenómenos de remodelado del hueso, como moléculas de señalización, actuando como mitógenos de células mesenquimatosas no diferenciadas y de células pre-osteoblasticas, induciendo la expresión del fenotipo osteoblástico y actuando como sustancias quimiotácticas para las células preosteoblásticas y para los monocitos.³

La epitelización y restauración de la superficie de la herida tiene lugar simultáneamente a las otras etapas descritas y son mucho más eficaces y rápidas cuando se utiliza PRFC. Su estrategia consiste en actuar en la primera etapa de la reparación y sustituir el coágulo de sangre que se formaría en su lugar rellenar el alveolo con un coágulo de PRFC. Al mismo tiempo sellamos el alveolo evitando su contaminación proporcionamos una gran concentración de factores de crecimiento y otras proteínas adhesivas que aceleran y optimizan las primeras etapas de la reparación. Los componentes críticos de este coágulo de PRFC son las plaquetas que se desgranulan en el propio alveolo y proporcionan moléculas señalizadoras como FCDP, TCT-B, FCVE, FCI-I y FFC que inician los acontecimientos moleculares y celulares de la reparación. Es muy importante el papel de las células en la reparación de la herida; la médula ósea contiene células madre para el tejido óseo. Estas células son atraídas a la herida por los FC que proporcionan señales, es decir, son sustancias quimiotácticas para distintos

tipos de células desaparecen en pocos días. Los macrófagos que empiezan a acumularse juegan un papel muy importante ya que liberan gran cantidad de factores de crecimiento y citocinas amplificando de esta forma la señal que iniciaron las plaquetas al desgranularse.

A nivel del hueso, los factores de crecimiento juegan un papel muy importante en el control de los dos mayores procesos de remodelación ósea, es decir la formación y la absorción. Pueden ser sintetizados por células esqueléticas, por la matriz orgánica y por células de tejidos adyacentes.¹¹

Los distintos tipos de células diferenciadas se deben mantener no sólo en las proporciones adecuadas, sino también en las posiciones correspondientes. Las células del mismo tipo se reconocen entre sí y permanecen juntas y ordenadas formando el tejido y cada tipo de célula ocupe el territorio que le corresponde, deben existir señales de comunicación entre los distintos tipos de células. Se trata de proteínas que son enviadas de una célula a otra para transmitir una señal concreta: migración, diferenciación, activación, etc. La célula o grupo de células que reciben la señal pueden estar próximas o alejadas de la célula que ha sintetizado y liberado dicho factor.³

Se ha visto que el tejido óseo contiene numerosas de estas proteínas de señalización que juegan un papel muy importante en la remodelación y en la reparación ósea debido a que tienen un efecto muy potente en la actividad de dicha célula ósea. A los factores de crecimiento también los denominan factores de diferenciación y de crecimiento, pero se refieren a las mismas proteínas solubles. Se definen como un tipo de mediadores biológicos que regulan acontecimientos claves en la reparación del tejido; estos

acontecimientos son proliferación celular, quimiotaxis (migración celular dirigida), diferenciación celular y síntesis de matriz extracelular.

Además de estos factores de crecimiento existe una super familia de proteínas también implicadas en la señalización celular del tejido óseo denominadas proteínas morfogenéticas (PMGs).

Su existencia se descubrió al observar que ciertos tejidos parecían tener una sustancia osteogénica que inducía la formación del hueso nuevo.

Urist (1965) mostró que el hueso desmineralizado en ácido clorhídrico, liofilizado e implantado en lugares ectópicos, inducía la formación ósea. Este fenómeno se ha denominado principio de inducción ósea. La matriz desmineralizada del hueso implantado se sustituye por nueva matriz ósea y se mineraliza, produciéndose hueso reticulado que evoluciona a hueso cortical. Se identificaron un grupo de proteínas no colágenas en la matriz desmineralizada que eran responsables de este fenómeno; se denominaron PMGs y fueron consideradas las responsables del principio de inducción ósea. Muchos FC se han añadido a la super familia de las PMG basándose en la homología de su secuencia de aminoácidos, como es el caso de la familia de proteínas de factores de crecimiento TGFB1 hasta B5. ³

4.1 FUNCION DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO EN LA CICATRIZ

Algunos de ellos son sintetizados prácticamente todas las células, por ejemplo factores de crecimiento transformado tipo B-1(FCTB1). Esto significa que afecta en cierto modo a casi todos los procesos fisiológicos. Cada factor de crecimiento tiene una o varias actividades concretas fundamentales. Para transmitir una señal concreta, una vez liberados de la célula que los fabrica, deben interaccionar con su receptor correspondiente.

Estos receptores son unas proteínas que se encuentran en la membrana celular. La unión de los factores de crecimiento a sus receptores específicos es lo que desencadena las acciones biológicas, convirtiendo este acontecimiento extracelular en un acontecimiento intracelular; se transmite un estímulo al interior de la célula, donde se amplifica esta señal y se encausa de forma específica. La amplificación de esta señal implica un amplio espectro de enzimas con funciones especializadas.

En la actualidad se reconocen los factores de crecimiento como multifuncionales, un factor de crecimiento de los reconocidos como multifuncional, puede por un lado estimular la proliferación de ciertos tipos celulares, y por otro lado inhibir la proliferación de otros y además causar efectos no relacionados con la proliferación en otro tipo de células.³

Los factores de crecimiento son una clase de mediadores biológicos multifuncionales que pueden afectar el crecimiento celular, la diferenciación, la embriogenia, la inflamación, la reparación hística, la reacción inmunitaria y la síntesis de matriz.¹²

Factor de crecimiento epidérmico: Es un péptido aislado, estimula la abertura precoz del párpado y la erupción dental en ratones recién nacidos. Con métodos de recombinación de ADN (ácido desoxirribonucleico) se produce el factor de crecimiento epidérmico y se reconoce que acelera la regeneración epidérmica y estimula el depósito de colágena y GAG; también interviene en la neovascularización.

Factor de crecimiento derivado de plaquetas: Se produce en monocitos, células endoteliales, células de músculo liso y fibroblastos. Es mitógeno para los fibroblastos y las células del músculo liso y se sabe que opera como quimioatrayente para fibroblastos, leucocitos y células del músculo citado.

Desempeña una función esencial en las primeras fases de la reparación histica. Se almacena en los gránulos de plaquetas. También estimula la producción de colagenasa por los fibroblastos; en consecuencia, favorece la remodelación de la matriz extracelular.

Factores de crecimiento vinculados con fibroblastos: Son dos formas bien definidas: factor ácido de crecimiento relacionado con fibroblastos, aislado del cerebro y la retina, y factor básico de crecimiento vinculado con los fibroblastos, aislado del cerebro y la hipófisis. Ambos son mitógenos potentes para los fibroblastos y se unen a heparansulfatos distribuidos a lo largo de la membrana basal; regulan la síntesis y el depósito de diversos elementos de la matriz extracelular.

Factor de crecimiento de transformación: Estos elementos (FCT) aunque purificados en un principio de células tumorales, también se producen en células normales y son mediadores relevantes de muchos procesos normales. Apenas se comienza a investigar la función del FCT- α en el proceso de reparación. En plaquetas y macrófagos activados se reconocen péptidos parecidos al FCT- α . Cuando funcionan de manera sinérgica con el factor de crecimiento epidérmico, se nota que aceleran la reepitalización en heridas cutáneas.

El factor FCT-B posee una función muy importante en la reparación y se estima que le corresponde una parte fundamental en la regulación de las células del sistema inmunitario, así como de aquellas epiteliales y del tejido conectivo. También se sabe que el hueso es fuente de FCT-B, donde se presenta en cantidades mayores que en muchos blandos.¹²

En el proceso de reparación, el factor de crecimiento transformado tipo beta (FCT-B) posee una función principal en la formación de tejido de granulación

e incrementa la expresión de los genes conectados con la elaboración de la matriz extracelular, como fibronectina y diversas clases de colágena. Fomenta la contracción de la matriz de colágena por los fibroblastos, hecho que sugiere una función probable en la contracción del tejido conectivo y el cierre de heridas.

Factor de crecimiento tipo insulina: Incluyen al factor I de crecimiento insulina (FCI-I), que corresponde a la somatomedina Chumana, y el factor II de crecimiento insulina (FCI-II), correspondiente a la somatomedina A humana. Estos factores estimulan la proliferación de muchos tipos diferentes de células en cultivos.

Factor de crecimiento relacionado con células T (linfocinas): Se reconocen diversas clases de linfocinas, la interleucina -2 y el interferón gamma son los mas importantes en la cicatrización. La interleucina-2 activa las células inflamatorias, como los macrófagos, y favorece su función en la fase inflamatoria. El interferón gamma, tiene un efecto antiproliferativo y citotóxico prominente sobre una variedad de tipos celulares; se reconoce que regula diversas funciones en células mesenquimatosas. Causa regulación descendente en la síntesis de colágena en fibroblastos dérmicos humanos normales así como en fibroblastos de la esclerodermia.

Factor de crecimiento derivado del hueso: La osteogenina, uno de los factores óseos específicos, polipéptido derivado de extractos óseos, es indispensable para provocar las células progenitoras de los músculos contiguos y el tejido perivascular alrededor de un hueso fracturado, así como para diferenciar las células del periostio en cartílago y hueso. ¹²

Algunos de los factores de crecimiento que se encuentran en el tejido óseo, y en aquellos tejidos implicados en la regeneración son:

- a) FCDP: factor de crecimiento derivado de plaquetas.
- b) FCVE: factor de crecimiento vascular endotelial.
- c) FCT-B: factor de crecimiento transformado tipo B.
- d) FCFA y FCFB: factor de crecimiento fibroblástico ácido y básico.
- f) FCI-I y FCI-II: factores de crecimiento insulínico tipo I y II.
- g) FCE: factor de crecimiento epidérmico.

Estudios previos en lesiones agudas han mostrado cómo los factores de crecimiento promueven la regeneración e influyen en parámetros tales como la re-epitelización, angiogénesis y la síntesis de matriz extracelular. Muchas de estas proteínas las sintetizan las células y se almacenan en la matriz ósea en forma insoluble y se solubilizan cuando son activas.

Como los factores de crecimiento interactúan entre sí, se pueden hacer múltiples combinaciones y las posibilidades son ilimitadas.

Todos los avances en la identificación de FC y PMGs, su estructura, mecanismo de acción etc., van paralelos a los avances en biotecnología, que permiten a los investigadores identificar con especificidad y a veces cuantificar las distintas proteínas. Estos avances en Biología Molecular han permitido identificar los ADN que codifican proteínas concretas, las proteínas morfogenéticas, factores de crecimiento y sus receptores, se sabe la localización exacta, en qué cromosoma y en qué segmento de éste se encuentran los genes que codifican FCDP Y FCT-B etc., o sus receptores.

Ello permite a los científicos realizar deleciones de un gel, es decir, eliminar el gen concreto, y ver qué sucede con el feto o animal sujeto a esta manipulación genética, de esta forma se obtiene información sobre la

función concreta de esa proteína. En esta idea se basa también la terapia genética, consiste en transferir secuencias de ADN concretas, que codifiquen factores de crecimiento y proteínas morfogenéticas, al núcleo de las células. En vez de administrar las proteínas, se administrarían sus precursores.

El líquido amniótico contiene gran cantidad PMGs y FC, además de otras sustancias. Parece que el contacto tóxico de la herida con el líquido amniótico podría ser una de las causas de que las heridas fetales se reparen sin formación de cicatriz.³

4.2 FACTOR DE CRECIMIENTO DERIVADO DE LAS PLAQUETAS(FCDP)

Se denominó así, porque se encontró por primera vez en las plaquetas, aunque también lo producen otro tipo de células como macrófagos y células endoteliales.³

Es un polipéptido, ha sido aislado de tejidos normales y de tejidos neoplásicos, incluyendo la matriz ósea y células osteosarcoma.¹¹

Se trata de una proteína que se almacena en los gránulos alfa de las plaquetas y se libera en sitios lesionados cuando las plaquetas se agregan y se inicia la cascada de coagulación.

Fue Antoniades HN 1981 quien lo purificó partiendo de la plaqueta, y lo aisló mediante electroforesis de poliácridamida. Esta técnica separa las proteínas en función de su tamaño; identificó dos formas que denominó factor de crecimiento derivado de plaquetas tipo I y II (FCDP-I y FCDP-II), ambos están formados por dos cadenas de aminoácidos de pesos moleculares diferentes. No pudo determinar la concentración en plasma, pero sí en suero.

Se trata de una proteína formada por dos cadenas de aminoácidos A y B. Estas dos cadenas tienen una similitud del 60% en su estructura.

Estas formas de FCDP se expresan de forma diferente en distintos tipos de células; es decir, el contenido de las distintas formas de FCDP es variable según el tipo de célula.

El FCDP fue el primer factor de crecimiento que se demostró que era quimiotáctico. Se dice que una sustancia es quimiotáctica cuando tiene la propiedad de atraer a distintos tipos de células que circulan en el torrente sanguíneo o se encuentran en los tejidos próximos. Dichas células migran hacia el tejido dañado y tienen un papel activo en la regeneración. FCDP es quimiotáctico para monocitos y macrófagos.

Su principal blanco del FCDP es el osteoblasto, que cuenta con receptores de membrana altamente diferenciados, semejantes a los de los fibroblastos, por medio de los cuales es activado por este factor de crecimiento.

El papel del FCDP es muy complejo; la importancia de su papel fisiológico se puede comprobar cuando se realizan distintas deleciones de los genes que codifican los dos tipos de receptores para PDGF. Los receptores de FCDP alfa y beta son esenciales en el desarrollo embriológico, y por lo tanto lo serán también en los procesos de regeneración.

El FCDP estimula la síntesis de ADN y de proteínas en el tejido óseo, pudiendo comportarse como un factor local o sistémico de crecimiento esquelético. Estudios recientes reportan un efecto de engrosamiento del periostio cuando actúa en sinergismo con el IGF.I también puede estimular la reabsorción de hueso, esta acción parece estar medida por la liberación de prostaglandinas.^{3,11}

Los receptores constituyen un eslabón en la cadena de sucesos que desencadena el FCDP.

Para que las distintas isoformas de FCDP ejerzan su acción deben interaccionar con sus receptores correspondientes. Los receptores son proteínas que se encuentran insertadas en la membrana celular, al acoplarse el ligando correspondiente se desencadena un acontecimiento celular como respuesta.

Existen dos tipos diferentes de receptores de membrana a los que se una FCDP, denominados α y β . El receptor α es una proteína de 170 KDa, y el receptor β una proteína de 190 KDa. Ambos receptores están relacionados estructuralmente, tienen una porción extracelular con cinco dominios tipo inmunoglobulina, una sola región transmembrana y una porción intracelular con un dominio tirosin kinasa. Estos receptores también tienen características comunes con los receptores para otros factores de crecimiento.

El receptor α se une a las dos cadenas A y B, mientras que el β se une sólo a la cadena B. Ambos receptores inducen respuestas mitogénicas; el receptor B está implicado en la estimulación de la quimiotaxis, mientras que α no. La densidad de receptores α y β varía dependiendo del tipo de célula. Las células que tienen solamente receptores β responden a FCDP-B, mientras que las células que poseen los dos tipos de receptores responden a las tres isoformas.

Otras actividades de FCDP son estimulación de la liberación de los gránulos por los neutrófilo y monocitos, estimulación de la fagocitosis de los neutrófilos, estimulación de la síntesis de colágeno, estimulación de la actividad y secreción de la colagenasa.³

La composición de FCDP parece que es dependiente del tipo de célula. La forma AA se secreta por los fibroblastos preferentemente, células musculares lisas, osteoblastos y astrocitos. La forma BB parece más asociada a macrófagos. Las plaquetas producen ambas formas A y B, estudios recientes sugieren que el 65% es AB, 23% BB y 12% AA. El tipo de PDGF depende de los ARN (Ácido ribonucleico) mensajeros producidos y de la eficiencia de la traducción de estos ARN a proteínas, por tanto la regulación es compleja.

4.3 FACTOR DE CRECIMIENTO VASCULAR ENDOTELIAL VEGF

Se trata de una proteína homodimérica cuya secuencia de aminoácidos tiene similitud del 24% con FCDP-B, pero se une a distintos receptores que el PDGF e induce distintos efectos biológicos. Es un mitógeno potente y selectivo para las células endoteliales, su importancia queda manifiesta por su acción angiogénica in vivo.

4.4 FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMADO (FCT)

Los TGFs son polipéptidos aislados de tejidos neoplásicos o normales que alteran el crecimiento celular normal.

La primer vez que se identificó se trataba de un factor que promovía la transformación de los fibroblastos en cultivo celular, la acción del FCT sobre estas células alteraba su fenotipo y las transformaba en células tumorales. Resultó ser una mezcla de dos proteínas FCT Y FCT-B, pertenecen a la super familia de proteínas óseas morfogenéticas, actinas e inhibinas. (kingsley DM, 1994).^{3,11}

Los primeros no han sido aislados de células óseas y por lo tanto se desconoce su importancia en el remodelado óseo. Sin embargo, se sabe

que estos compuestos se comportan como mitógenos, estimulando la reabsorción ósea. Los segundos son polipéptidos más grandes son sintetizados por muchos tejidos pero fundamentalmente por las células óseas y las plaquetas. Se ha demostrado que los FCT-B se encuentran en la matriz ósea.

El FCT-B1 se secreta de forma inactiva o latente. Puede formar dos tipos de complejos latentes, uno de ellos denominado LAP (latency associated peptide), se forma al asociarse FCT-B1 con una proteína. Si además se asocia también con otra proteína de enlace el complejo se denomina LTBP (latent TGF-B binding protein) Estas proteínas parece que facilitan su secreción y también contribuyen a su estabilización. El FCT-B libre tiene una vida media de unos dos minutos, mientras que en forma latente tiene una vida media de 90 min. Pero para que exista actividad biológica debe estar en forma libre. El mecanismo fisiológico de liberación del factor de crecimiento transformado de la proteína no se conoce, aunque parece que la proteólisis es una parte de este mecanismo.

Para que el factor FCT-B ejerza su acción deberá interactuar con los receptores correspondientes. Por otra parte los factores de crecimiento FCT-B1 estimula la formación de osteoclastos, mediante el aumento de la capacidad de sus precursores para llegar al sitio de absorción diferenciarse y de fusionarse.^{3,11}

Prácticamente todas las células sintetizan FCT-B1 y todas las células expresan receptores para los FCT, este hecho indica que FCT-B1 afecta de alguna forma a todos los procesos fisiológicos.

Tiene tres papeles fundamentales:

- a) **Modula la proliferación celular, generalmente como supresor.**

- b) Mejora la deposición de matriz extracelular aumentando la síntesis e inhibiendo la degradación.
- c) Tiene efecto inmunosupresor a través de varios mecanismo.

La acción específica de FCT-B1 en una célula depende de las circunstancias exactas del entorno celular.

Estudios previos en lesiones agudas de piel han mostrado cómo los FC promueven la reparación e influyen en parámetros tales como la re-epitelización, angiogénesis y la síntesis de matriz extracelular. Muchos de estos factores de crecimiento los sintetizan las células óseas y se almacenan en la matriz ósea. Una vez liberados por la célula, o quizás liberados de la matriz durante la remodelación o la reparación, son mitogénicos para los osteoblastos y aumentan la producción de matriz.³

4.5 FACTORES DE CRECIMIENTO INSULINICO (FCI-I Y FCI-II)

Llamado también Somatomedina-C, fue aislada por primera vez en el plasma humano, en donde cumple funciones de crecimiento corporal. Esta sustancia esta implicada en la medición de la acción de la hormona de crecimiento sobre el organismo. Sus acciones sobre el hueso son diversas, a nivel de huesos largos, FCI estimula el crecimiento longitudinal, este factor mejora la supervivencia de injertos óseos.¹¹

Ambos se encuentran en el hueso en gran cantidad. El FCI-I es el factor de crecimiento más abundante en la matriz ósea. El FCI-I lo producen los osteoblastos y estimula la formación de hueso induciendo la proliferación celular, la diferenciación y la biosíntesis de colágeno tipo I.

En el hueso se sintetizan altos niveles de FCI-I y es secretado por los osteoblastos, FCI-I regula por tanto la formación de hueso de forma autocrina. FCI-I también aumenta el número de células multinucleadas osteoclasticas.³

4.6 FACTORES DE CRECIMIENTO FIBROBLASTICOS ÁCIDO Y BÁSICO. (FCFa y FCFb)

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

Se trata de un factor de crecimiento peptídico aislado originalmente de la glándula pituitaria que estimula la multiplicación celular en diferentes tejidos mesodérmicos. A nivel de hueso el FCF aumenta la producción de ADN e inhibe la síntesis de colágeno en células de cultivo óseo.

El factor FCFb índice la migración celular. Los experimentos de cultivos celulares indican que gran variedad de las células sintetizan FCF, incluidos fibroblastos y ostoblastos. Además se han identificado cuatro tipos diferentes de receptores para FCF cuya especificidad e importancia fisiológica están aún sin determinar.^{3,11}

4.7 FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMICO (FCE)

La molécula precursora de este factor de crecimiento es una glucoproteína de membrana de gran tamaño que por proteolisis origina un fragmento de 53 aminoácidos, el factor de crecimiento epidérmico (FCE). Su estructura es

similar a la del factor de crecimiento transformado de tipo alfa su acción biológica es similar pero no idéntica. Ambos estimulan la mitosis de fibroblastos y queranocitos y aceleran el cierre de las heridas.

Proveniente principalmente de las glándulas submaxilares. Tienen una actividad de estimulación del crecimiento de varias células de origen ectodérmico, endodérmico y mesodérmico, incluyendo a los condrocitos. A nivel hueso, este factor estimula la absorción ósea en cultivo de tejidos.

Se sintetiza en diversos tejidos: riñones, glándula submandibular, glándula lacrimal, en saliva, lágrimas y orina.

Favorece la reparación de las heridas estimulando la migración y división de las células epiteliales y aumentando la síntesis de proteínas como la fibronectina. Aunque el factor de crecimiento epidérmico (FCE) no aumenta la síntesis de ARN mensajero para proteínas de la matriz extracelular como el colágeno, los trabajos recientes apuntan a que lo hace por un mecanismo indirecto, atrayendo fibroblastos por quimiotaxia, éstos a su vez sintetizan colágeno produciéndose un aumento del colágeno total.^{3,11}

CAPITULO 5

GEL ADHESIVO DE FIBRINA AGREGADO DE PLAQUETAS

5.1. PLAQUETAS.

5.2 PRUEBAS DE FUNCIÓN PLAQUETARIA.

5.3 PLASMA RICO EN PLAQUETAS.

5.4 AGREGADO DE PLAQUETAS (P.R.F.C)

5. GEL ADHESIVO DE FIBRINA AGREGADO DE PLAQUETAS

5.1. PLAQUETAS.

Las plaquetas normales son cuerpos anucleados de 2 a 3 μm de diámetro, que parece color azul claro. La cualidad de la plaqueta es la capacidad de adherirse a superficies extrañas y formar cúmulos en reacción a diversos estímulos, que incluyen trombina, adenosindifostato (ADP) y catecolaminas.

Las plaquetas se forman en la médula ósea de donde son liberadas hacia la circulación. Cerca de 80% de ellas circulan y 20% están en el bazo; Si el bazo aumenta de tamaño en forma notable, la distribución cambia y pueden estancarse en el bazo incluso 80% de las plaquetas. En personas normales algunas plaquetas quizá mueran por envejecimiento después de 7 a 14 días, en tanto que otras se emplean en la reparación de lesiones vasculares menores de la vida diaria. Hay ciertos datos de que las plaquetas jóvenes son mayores y más activas y muestran concentraciones más altas de enzimas que las plaquetas viejas. La médula ósea no contiene una reserva importante de plaquetas.¹³

Las plaquetas contribuyen a la hemostasia al formar tapones plaquetarios y fomentar la producción de trombina.³

Las plaquetas se adhieren a estructuras subendoteliales expuestas por la lesión; estas estructuras incluyen fibras de colágena y membrana basal. La existencia de grupos amino libres y espaciados con regularidad en la molécula de colágena son de gran importancia para la adherencia plaquetaria. También se requieren de ciertas proteínas plasmáticas, incluyendo fibrinógeno, que queda expuesto tras el daño en un vaso.¹³

Después de adherirse a las fibras de colágena, las plaquetas expulsan el contenido de sus gránulos, proceso llamado reacción de liberación. La trombina también provoca esta reacción y, en la hemostasia fisiológica, es probable que la colágena y la trombina inicien la liberación del contenido granular. La adrenalina y el ADP también fomentan la acumulación y liberación en las plaquetas.

La liberación de ADP hace que se acumulen otras plaquetas y es entonces un componente clave en la ampliación de la extensión de la acumulación plaquetaria; se desconoce el mecanismo por el que el ADP produce acumulación. Las concentraciones bajas de ADP solo provocan acumulación plaquetaria primaria, que es reversible, en tanto que las concentraciones mayores producen acumulación y liberación irreversibles.

Las plaquetas participan en las reacciones de los factores de coagulación que dan lugar a la formación de trombina al suministrar una superficie lipoproteínica (factor plaquetario 3) en que interaccionan las enzimas y sustratos de la coagulación.

Consolidación y estabilización: La trombina, producida por los mecanismos de la coagulación, causa coalescencia del tapón plaquetario y formación de fibrina. Las plaquetas fusionadas y la fibrina forman un tapón hemostático estable.¹³

Retracción del coágulo: cuando la sangre o el plasma rico en plaquetas se coagulan in vitro, las plaquetas activadas causan retracción de los filamentos de fibrina. Disminuye el volumen del coágulo y se expulsa el líquido atrapado en él. La prueba de retracción del coágulo es simple y suministra información útil. La retracción del coágulo se estudia con facilidad dejando que se coagule sangre total o coagulando, con trombina, plasma rico en plaquetas, para después de una hora tomar nota del grado

de retracción del coágulo. La retracción del coágulo es defectuosa cuando hay un defecto congénito y grave en la función plaquetaria, trastorno llamado trombostenia, o cuando son muy bajas la cuenta plaquetaria o la concentración de fibrinógeno.

5.2. PRUEBAS DE FUNCION PLAQUETARIA

Los taponos plaquetarios detienen con rapidez la hemorragia. Una prueba es medir el tiempo de sangrado, se determina por la técnica de Ivy modificada, en que se hace una incisión en una zona avascular del antebrazo, y se mide el tiempo necesario para que cese el sangrado. El tiempo de sangrado varia de 1 a 4 minutos, esta cifra depende del número y la eficacia de las plaquetas y la capacidad que tienen los vasos capilares para contraerse cuando se produce la herida, así como del tiempo que tarda en formarse el coágulo; es normal en trastornos del sistema de la coagulación, pero anormal si hay trombocitopenia grave, defectos de la función plaquetaria o falta total de fibrinógeno en la sangre.

La acumulación plaquetaria se estudia in vitro al registrar el aumento de la transmisión de luz que se lleva a cabo cuando se añaden sustancias (colágena, adrenalina y ADP) acumulada a un recipiente que contiene plasma rico en plaquetas y se agita en forma continua.

Cuenta plaquetaria: La cantidad normal de plaquetas es de 150 000 a 400 000/mm³ y se mide por medio de un contador electrónico de partículas o por microscopia de contraste de fase.^{13,14}

Coagulación sanguínea: Su principal función del mecanismo de coagulación es producir trombina, que estabiliza el tapón plaquetario y forma

el coágulo de fibrina, estos fenómenos bloquean en forma mecánica la hemorragia de los vasos rotos. El sistema de la coagulación consiste en una serie de proenzimas que, en estado inactivo, circulan en el plasma y que se activan cuando el sistema empieza a funcionar.

Las deficiencias de factores de la coagulación pueden deberse a producción reducida o a la elaboración de proteínas anormales con actividad biológica defectuosa o con catabolismo excesivamente rápido.¹³

Adhesivo de fibrina: La cola de fibrina o adhesivo de fibrina es un material biológico que se desarrolló en respuesta a la necesidad de mejorar los agentes hemostáticos y los adhesivos quirúrgicos. La eficacia del adhesivo de fibrina se ha demostrado en distintas especialidades y disciplinas quirúrgicas.³

La utilización de la fibrina liofilizada y de la fibrina autóloga como material osteoconductor y como vehículo para la compactación de injertos se ha utilizado rutinariamente tanto en traumatología como en cirugía oral durante las últimas décadas.

Tayapongsak en 1994 publicó el uso de fibrina autóloga obtenida por crioprecipitado para la compactación de injertos en cirugía maxilofacial con esperanzadores resultados.^{15,10}

Whitman y Marx en 1998, publicaron la utilización del PRP como base para la obtención de fibrina autóloga activando el PRP con trombina bovina.

Stater y cols en 1995, mostraron un trabajo in vitro, resultados que indican aumento en la proliferación y diferenciación de osteoblastos humanos, y un incremento en la síntesis de matriz extracelular cuando se cultivan dichos osteoblastos en presencia de factores de crecimiento plaquetarios.¹⁰

Matras en los años 80 describió el adhesivo de fibrina tisular como una sustancia con propiedades selladoras, hemostáticas, que promovía la reparación del tejido y el cierre de la herida. Se ha prohibido su utilización por riesgos potenciales de infección por transmisión vírica, hepatitis C y SIDA.

La razón es que el fibrinógeno que contiene estos productos proviene de polos de plasma humano o bien de un único donante, pero se trata siempre de un fibrinógeno homólogo.

Se ha desarrollado otra modalidad, la obtención del fibrinógeno autólogo del propio paciente, que evita riesgos de infección.

Debido a las grandes ventajas que presenta la utilización de esta sustancia, es el agente hemostático perfecto, sella en minutos, no es tóxico, se absorbe y además promueve el crecimiento y la reparación del tejido donde se aplica.

Para obtener el fibrinógeno por medio de crioprecipitación, se obtienen concentraciones de fibrinógeno de 30-60 mg/mL. Que además contiene los factores de coagulación VIII y XIII. Como alternativa a este método de crioprecipitación se utiliza un método de precipitación con sulfato de amonio.

3,4

El mecanismo de formación de la cola de fibrina mimetiza la última etapa de la coagulación, en la cual el fibrinógeno se convierte en fibrina por acción de la trombina. El mecanismo es el siguiente: la trombina en presencia de calcio rompe los fibrinopéptidos A y B de la molécula de fibrinógeno originando así los monómeros de fibrina; además la trombina activa el factor XIII que favorece el entrecruzamiento de estos monómeros formando el coágulo. La trombina tiene una acción proteolítica sobre el fibrinógeno, éste es soluble pero al romperse y convertirse en fibrina se vuelve insoluble y

forma esa sustancia viscosa que constituye el adhesivo o cola de fibrina. El tiempo de formación de esta cola puede ser inferior a 5 segundos cuando se emplean concentraciones elevadas de trombina y se puede retardar a varios minutos disminuyendo esta concentración. La trombina que se utiliza en este preparado es de origen bovino. Según algunos autores la trombina bovina conlleva un riesgo remoto de transmisión de encefalopatía bovina espongiiforme, este aspecto se debe tener en cuenta cuando se utiliza para reparar una fuga de líquido cefaloraquídeo. Hoy en día también se está utilizando trombina humana. Otra desventaja de este adhesivo es que requiere citar al paciente días antes de la cirugía.^{3,4}

5.3 PLASMA RICO EN PLAQUETAS

El objetivo terapéutico de la utilización de factores de crecimiento en cirugía oral para mejorar la capacidad del cuerpo en la regeneración. En muchas situaciones el proceso de regeneración es insuficiente.

Los factores de proteínas solubles PMG y FC han generado considerables intereses durante los últimos años. Estos compuestos actúan como proteínas de señalización para regular los procesos celulares claves tales como la diferenciación celular mitogénesis y quimitaxis.

La fibrina homóloga fue utilizada en un principio como un agente hemostático y adhesivo quirúrgico. A través del uso de técnicas con anticuerpos monoclonales, receptores también fueron identificados por estos factores de crecimiento en el hueso medular.¹⁵

La literatura ha proveído evidencia que los efectos benéficos de la fibrina no están limitados como osteoconductor y aglutinador en injertos. Recientemente se ha desarrollado un protocolo para la aplicación práctica y predispuesta de terapia regenerativa asistida con factores de crecimiento. La

técnica es relativamente fácil de implementar y los resultados pueden ser reproducidos consistentemente en pacientes. Este tratamiento consiste en la aplicación directa de concentrado de factores de crecimiento plasmáticos conocidos como factores de crecimiento ricos en plasma dentro del defecto. La alternativa a la preparación del adhesivo de fibrina autólogo, que requería la cita del paciente días antes de la cirugía, la obtención de un PRP mediante plasmaféresis, minutos antes de la intervención. La sangre se extrae sobre citrato sódico y por centrifugaciones sucesivas se separa la fracción del plasma rico en plaquetas.

5.4 AGREGADO DE PLAQUETAS (P.R.F.C.)

El éxito del gel de fibrina en cirugía ha llevado a desarrollar una técnica con la misma filosofía, en otro nivel de volúmenes de sangre. En primer lugar la fracción plasmática que se utiliza es diferente ya que se obtendrá por un centrifugado lento. Se obtiene un plasma rico en plaquetas con todas las proteínas y factores de coagulación plasmáticos (P.R.F.C.) en contraposición con otros protocolos que lo realizan con un doble centrifugado, a mayor velocidad para obtener un súper concentrado de plaquetas (P.R.P.). En segundo lugar lo se realiza con cantidades muy pequeñas de sangre.³

El tercer lugar el coágulo se obtiene al añadir calcio sin la necesidad de utilizar trombina bovina. Un pequeño volumen de sangre se extrae del paciente sobre citrato sódico, el citrato capta los iones de calcio de la sangre e impide su coagulación, lo que permite fraccionar dicha sangre por centrifugación y obtener el P.R.F.C. La estrategia se basa en la utilización de las plaquetas por varias razones. Por un lado funcionan como vehículo portador de factores de crecimiento y de otras proteínas que desempeñan un papel importante en la biología ósea, como son la fibronectina y otras

proteínas adhesivas. Además se va a controlar la liberación de estas proteínas contenidas en los gránulos α de las plaquetas, estas sustancias las vamos a concentrar y a depositar en el lugar de la herida, exponiendo y orientando un concentrado fisiológico de proteínas que va a intervenir acelerando y favoreciendo el proceso de reparación y regeneración.

Las plaquetas, también llamadas trombocitos son células sanguíneas que evitan el sangrado de los vasos dañados e inician los procesos de reparación de éstos. Se forman en la médula ósea a partir de una célula precursora, el megacariocito; las prolongaciones citoplasmáticas de éstos se separan dando lugar a las plaquetas, por lo tanto son células anucleadas. Una disminución en el número de plaquetas o un funcionamiento defectuoso puede originar un síndrome de sangrado. Las plaquetas juegan un papel importante en la patogénesis de la arterioesclerosis y en el desarrollo de los síndromes trombóticos.

Estas células sanguíneas inician el proceso hemostático formando un tapón en el vaso dañado. Muchas proteínas plaquetarias juegan un papel activo en estas funciones; las glucoproteínas de membrana (GP) intervienen en estos procesos de adhesión y agregación plaquetaria.³

Activación: La activación de las plaquetas provoca el cambio de la forma discoidea a esférica con pseudópodos, siendo éstos los que permiten el contacto entre las plaquetas. Como consecuencia de la activación se producen alteraciones en las glucoproteínas de membrana que favorecen la tendencia de las plaquetas a pegarse entre sí.

Agregación: Después del proceso de adhesión se inicia la agregación, y el resultado es la acumulación de las plaquetas en la capa inicial (formación del

trombo); las plaquetas se unen entre sí y esta unión depende de la activación de la integrina GPIIb-IIIa a la que se adhiere el fibrinógeno. Todos estos acontecimientos suceden in vivo. In vitro se puede reproducir un proceso similar al de agregación como el que se ha descrito. Cuando se añade el cloruro cálcico al P.R.F.C., las plaquetas cambian de conformación y se agregan, al agregarse se desgranulan (se vacía el contenido de sus gránulos α); el tiempo que transcurre entre la formación del agregado y su utilización es crítico por esta circunstancia, pudiéndose perder gran cantidad de los GFs en el exudado si se deja transcurrir mucho tiempo. El interés del agregado de plaquetas se debe a que contiene, entre otras, las siguientes proteínas: FCDP, FCVE, FCT-B, FCE, FCI-I. Las acciones e interacciones de estos factores de crecimiento varían dependiendo del tipo de célula (osteoblasto, fibroblasto) y de su grado de madurez.³

En lo relacionado con las células óseas FCI-I estimula la proliferación y diferenciación de osteoblastos y tiene mayor efecto combinado con otros factores de crecimiento. FCDP son mitogénicos para las células de origen mesenquimatoso y también promueven la formación de matriz extracelular. De esta forma se utilizan las plaquetas como fuente exógena de factores de crecimiento, que en algunos casos refuerzan las concentraciones ya existentes en el hueso, y en otros actúan en conjunto con éstos, estimulando la actividad de las células óseas y las células epiteliales.

La aplicación de los FC para acelerar y mejorar la reparación y renovación del tejido está avalada y documentada por numerosos trabajos, tanto en investigación *in vitro*, como investigación básica. Los vehículos que se están ensayando en la actualidad para contener y liberar los FC en el lugar de la herida son variados; van desde esponjas de colágeno, esponjas de alcohol polivinílico, hilos metálicos como soporte, recubiertos de un polímero conteniendo los FC.

El coágulo blanco, coágulo de P.R.F.C. funciona como vehículo natural de los factores de crecimiento y presenta muchas ventajas sobre otros diseños más sofisticados.

Como las plaquetas carecen de núcleo sus posibilidades de sintetizar proteínas, entre ellas el fibrinógeno, que captan el plasma por un mecanismo de endocitosis. Este fenómeno de endocitosis utiliza un sistema canicular conectado a la superficie e interrelaciona el medio plasmático externo con los gránulos, esta es la razón por la que las plaquetas contienen proteínas plasmáticas.

Las plaquetas también contienen proteínas que no están presentes en el plasma y que han sido sintetizadas a nivel de los megacariocitos, precursores de las plaquetas. Entre estas proteínas está la trombospondina, una glucoproteína que también está presente en la matriz orgánica ósea y que funciona como una proteína adhesiva.³

La unión de las células a la matriz se denomina anclaje; el anclaje origina cambios en el dominio citoplasmático de la célula, estos cambios originan una señal que se transmite al interior de la célula (núcleo), y como consecuencia la célula aumenta la síntesis de proteínas. La trombospondina como modulador de este anclaje celular. Se han observado presencia de osteonectina en los gránulos α plaquetarios, pero su estructura parece ser diferente a la de la osteonectina ósea.³

Durante la operación se extrae sangre, 5 cc y 40 cc, dependiendo el tamaño del defecto. a través de un catéter a una velocidad de 50 mL/min y la velocidad de centrifugación es de 5600 rpm. Esta fracción de plasma puede también contener factores de coagulación y proteínas plasmáticas que pueden fomentar la agregación plaquetaria y la formación de un coágulo estable. A medida que se extrae la sangre se añade fosfato de dextrosa de citrato para impedir su coagulación. Aunque su funcionamiento de los factores de crecimiento fue discutido, el efecto de la osteoconducción causó un coágulo de fibrina bien determinado.¹⁵

A medida que se centrifuga la sangre se separa en tres fracciones en función de su densidad. Estas fracciones son en orden de densidad creciente: plasma pobre en plaquetas (PPP), plasma rico en plaquetas (PRP) y células rojas.

El PRP puede permanecer a temperatura ambiente hasta el momento de su utilización. Cuando se necesita, se mezcla con cloruro cálcico y con trombina bovina y en un intervalo de 5 a 30 segundos, por efecto de la trombina, se coagula. Este cambio hace que las plaquetas se agreguen y se desgranulen, liberando las proteínas que contienen en su interior, los factores de crecimiento entre otras. El tiempo total para la preparación de este proceso es de unos 45min.³

La diferencia fundamental de este gel de plaquetas con el adhesivo de fibrina es la presencia de todas las proteínas plaquetarias y la concentración de fibrinógeno mucho más reducida, del orden de 2-4 mg/mL, unas 15 veces inferior al adhesivo de fibrina. El adhesivo de fibrina es mucho más viscoso que el gel, pero la fuerza tensil y la capacidad adhesiva de éste también son adecuadas, y ambos controlan eficazmente el goteo y el sangrado. (Quigley 1993)³

El riesgo del paciente es reducido, no es necesario infundir un exceso de plasma. Su fácil aplicación del P.R.F.C. se puede aplicar en múltiples circunstancias tales como defectos periodontales, preparación de un sitio de implante, extracciones, cualquier variedad de injertos, procedimientos de tejidos blandos, cirugía oral y aumento de reborde.

El primer obstáculo para la implementación clínica de la técnica de plasma rico en factores de crecimiento fuera del hospital envuelve el proceso de la recolección del plasma y por consiguiente la preparación de fibrina autóloga.

15

El plasma rico en plaquetas se desarrolla de sangre autóloga con un separador de células. Marx utilizó el Electromedics 500 (Medtronic) un separador de células que incrementa la densidad, el cual puede aislar y concentrar plaquetas durante la cirugía sin ninguna interferencia o retrasando el procedimiento de la cirugía. Un técnico o enfermera entrenado o certificado puede completar la recolección del plasma en 20 a 30 minutos.⁴

El separador celular entrega de 400 a 450ml de sangre autóloga a través de un catéter intravenoso central colocado durante la cirugía. El separador celular entrega la sangre a una velocidad de 50ml por minuto, usando una velocidad centrifuga de 5600 rpm. En cuanto se obtiene la sangre se le agrega un mililitro de dextrosa de citrato de fosfato lo cual asegura la anticoagulación.

Mientras la sangre es centrifugada, se separa en tres componentes básicos en función a la densidad. Desde el menos denso hasta el más denso el plasma pobre en plaquetas surge primero, después el plasma rico en plaquetas y el último en aparecer es el que tiene una mayor densidad de células rojas (RBC).

El plasma más pobre en plaquetas (PPP) es un plasma acelular; contabiliza por lo menos 200ml de volumen y se regresa al paciente. El componente RBC esencialmente de células rojas se contabilizan 180ml de volumen y también se regresan al paciente. El PRP es plasma con un número concentrado de plaquetas y células blancas. Se contabiliza por 70ml de volumen. Ambos el PPP y el PRP son fracciones de plasma. Sin embargo, contienen abundantemente fibrógeno y factores de crecimiento. La formación de fibrina no es sin embargo un factor de crecimiento, proveerá la matriz osteoconductiva natural necesaria en la regeneración del hueso.

Durante el proceso de centrifugación a 5400 rpm, el PPP se separa primero. Una vez que el PPP se ha recolectado la velocidad centrífuga se reduce a 2400 rpm para crear una separación precisa del PRP de las células rojas. Experiencia clínica indica que del primer mililitro al tercer mililitro de la muestra de células rojas contienen la mayor parte de plaquetas sintetizadas recientemente. Sin embargo esta muestra de RBC está incluida dentro del PRP.⁴

La aplicación clínica de PRP para eliminar el injerto de médula del hueso requiere iniciar el proceso de coagulación utilizando una mezcla de 10ml al 10% cloruro de calcio mezclado con 10 mil unidades de trombina bovina tópica (genfrac). El protocolo específico para la aplicación de PRP bajo estas condiciones requiere jeringas individuales de 10ml para cada mezcla. Cada mezcla se forma en el siguiente orden 6ml de PRP, 1ml de la mezcla de cloruro de calcio con trombina, y un ml de aire para funcionar como una burbuja mezcladora. La jeringa es agitada de 6 a 10 seg para iniciar la coagulación.

El gel de PRP desarrollado por esta manipulación se agrega al injerto en varias mezclas. Una nueva jeringa estéril es usada en cada mezcla debido a que la introducción de la mezcla de cloruro de calcio con trombina al contenedor con PRP coagularía el PRP restante. La introducción de una o

más mezclas de PRP al injerto antes de que el injerto sea colocado en la base del recipiente distribuye el PRP y por lo tanto los factores de crecimiento a través del injerto. Mezclas adicionales son distribuidas sobre la superficie del injerto una vez colocado.

La formación de fibrina en el proceso del PRP sirve como un adhesivo de fibrina y reúne de otra forma las células medulares, lo cual ayuda al cirujano para detallar el injerto. La red de fibrina actúa como base para la osteoconducción a través del injerto después los factores de crecimiento inician dentro de las plaquetas la osteogenesis.⁴

CAPITULO 6

TÉCNICA DE OBTENCIÓN DEL P.R.F.C.

6.1 EXPERIMENTACIÓN EN ANIMALES DE OBTENCIÓN DEL P.R.F.C.

6.2 PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DEL P.R.F.C.

6.3 ACTIVACIÓN Y AGREGACIÓN DE LAS PLAQUETAS.

6.4 OBTENCIÓN DE FIBRINA AUTÓLOGA.

6.TÉCNICA DE OBTENCIÓN DEL P.R.F.C.

6.1. EXPERIMENTACIÓN EN ANIMALES DE OBTENCIÓN DEL P.R.F.C.:

Se utilizaron tres cabras adultas, clínicamente sanas. Se realizó la extracción de sangre en una vena periférica de las cabras, se extrajeron 20ml de sangre en tubos venoject que contenían citrato sódico como anticoagulante. La sangre se centrifuga a 280g durante 8 minutos en una centrífuga modelo PRFC system . La fracción de plasma rico en factores de crecimiento que se utiliza está inmediatamente por encima de la serie roja. Se trasvasa esta fracción de plasma rico en factores de crecimiento y se añaden 50 uL de cloruro clásico por mililitro de plasma. A los 5-6 minutos se forma el coágulo que utilizamos para rellenar el alvéolo.

Después de un mes la reparación parcial de la herida solo ha tenido lugar en aquellos alvéolos en los que hemos colocado PRFC; los alvéolos control estaban en una fase primaria de la reparación, en algunos casos se había formado tejido conectivo pero no se veían trabéculas óseas.

El tejido obtenido era un tejido blando, poco consistente, y en varios casos resultó complicado poder extraer algo de tejido para biopsia ya que los alvéolos estaban parcialmente vacíos.

En las zonas que se habían rellenado con un coágulo de PRFC el tejido obtenido era un tejido denso que costaba trabajo extraer con el bisturí.

En el estudio microscópico de las biopsias, en todos los casos que se utilizó PRFC, se encontró tejido conectivo muy denso y tejido óseo neoformado en aproximadamente el 50 % de la biopsia. En todos los casos las zonas control estaban llenas sólo parcialmente por tejido conectivo y en algunos casos por tejido adiposo.

Este estudio describe las diferencias encontradas en preparaciones idénticas hechas en tibia de cabra, imitando alvéolos, cuando se tratan con PRFC y cuando no se realiza ningún tratamiento. El PRFC tiene la textura de un gel, contiene fibrina y factores de crecimiento y entre otras funciones actúa en la fase inicial como estroma provisional que favorece a la quimiotaxis, proliferación y diferenciación celular. La presencia de factores de crecimiento es crítica tanto en la diferenciación celular como en la mitogénesis.⁹

6.2. PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DEL P.R.F.C : En esta técnica se realiza la extracción de sangre al paciente minutos antes de comenzar la cirugía. La cantidad dependerá del defecto a tratar. Para la extracción de una pieza dentaria entre 10 y 20 cc. será suficiente; para una elevación de seno 30 cc. Se utilizan tubos estériles con citrato sódico al 3,8% como anticoagulante. Se centrifuga el plasma con un equipo digital que nos garantiza que los parámetros tiempo y velocidad son los adecuados. El tiempo será de 7 minutos, la velocidad de centrifugación de 280 G a temperatura ambiente. El plasma se separa en fracciones mediante pipeteado muy meticuloso para no crear turbulencias en las fracciones obtenidas.

Los primeros 500 μ L fracción 1, es un plasma pobre en plaquetas y por lo tanto pobre en factores de crecimiento.

Los siguientes 500 μ L fracción 2, corresponderán a un plasma con un número de plaquetas similar al que tiene la sangre periférica.

La fracción de plasma más rico en plaquetas y rico en factores de crecimiento son los 500 μ L inmediatamente encima de la serie roja fracción 3. Debemos saber que siempre contaremos de la serie roja hacia arriba y por lo tanto, si obtenemos más plasma éste será plasma pobre en factores

de crecimiento su volumen puede variar entre 1 y 2 cc. Lo importante es que aunque se comienza a pipetear por arriba, fracción 1-2-3, la más importante siempre es la 3-2. Si después de centrifugar observamos un tubo en el que el plasma está turbio con hematíes, este tubo se desecha, ya que esa pequeña hemolisis se debe a un defecto a la hora de extraer la sangre. Se ha provocado una lesión algo mayor de lo habitual en el vaso, liberándose una mayor cantidad de tromboplastina tisular y esto provoca que dentro del tubo se produzca la coloración rojiza del plasma y alteraciones en la formación del coágulo e incluso pequeños microcoágulos.^{3,10}

Un método para la producción plasma rico en plaqueta y concentrado de plaquetario utilizando una doble centrifugación en combinación con fibrina adhesiva tisular. Esta técnica constituye la mezcla básica para el aumento y mejorar un defecto óseo. También se describe el procedimiento por el cual el hueso autólogo o el sustituto de hueso se adhiere a la mezcla para incrementar el volumen en el injerto. La concentración plaquetaria provoca que factores de crecimiento estén contenidos a los sitios de injerto en una forma intensa, mientras que Tisseel sirve como un estándar, farmacéutico manufacturado de fibrina adhesiva.¹⁶

Otro método de obtención encontrado en un artículo Dietmar Sonnieithernos en el año 2000, menciona el PRP y concentrado plaquetario (CP) obtenidos de sangre autóloga son usados para proveer factores de crecimiento en altas concentraciones en el sitio del defecto óseo o una región donde requiera aumento. La extracción de concentraciones plaquetario se realiza por medio de un proceso de plasmaféresis por el cual solo el PRP es tomado del paciente y los componentes remanentes de la sangre son puestos de vuelta en el cuerpo. Esta técnica puede producir una concentración de

300% de los niveles sanguíneos normales. Por razones económicas, este procedimiento es generalmente solo usado en hospitales.

El plasma rico en plaquetas se usa mezclado con hueso autólogo para mejores resultados. Esto se coloca en el lecho receptor alrededor con trombina bovina, (la trombina ha sido previamente diluida con cloruro calcico al 10% para nulificar el efecto citrato) y colocado en el sitio del injerto. El PRP mezclado es típicamente aplicado en la capa para estabilizar el contorno. El fibrinógeno presente en el PRP es activado y convertido en un vínculo cruzado para la formación de fibrina. De esta manera el injerto se solidifica y se adhiere dentro del defecto. Esta técnica es cuando se usa con hueso particulado como sustituto, tal como hueso bovino, hidroxapatita o granulados de fosfato beta tricalcico. Las ventajas, desventajas, y compatibilidad actual de estos numerosos materiales y sus mezclas han sido previamente reportadas.

Una simple variación de este método para llenar un sitio de extracción y mejorar la calidad del hueso por consecuente la colocación del implante dental la toma es de 5ml de sangre con vacuolo de citrato. Este centrifugado a 160G por 6 minutos. El PRP es pipeteado y mezclado con cloruro de calcio. Después de 15 minutos el coágulo se solidifica y se introduce en el lugar de la extracción como un injerto, este mejora para improvisar la calidad del hueso durante su recuperación.

Después de la primera centrifugación esto es lo que se obtuvo:

El PPP: El nivel de suero es alto, el cual contiene fibrinogeno autólogo y es pobre en plaquetas.

El PRP: Segundo nivel de suero, el cual contiene fibrinogeno autólogo pero es rico en plaquetas.¹⁶

Línea de demarcación: La línea blanquecina está en el tope de la línea roja sanguínea, el cual es rica en plaquetas y células blancas.

Células sanguíneas: La fracción de color rojo del segundo nivel, contiene principalmente células rojas y plaquetas. El más alto de 6 a 7 mm es rico en plaquetas jóvenes, debajo de esto la concentración de plaquetas disminuye. Después de la segunda centrifugación, la fracción final se desenvuelve y se desarrolla y se refiere como:

El PPP: el nivel mas alto es un suero amarillo claro con fibrinógeno y una baja concentración de plaquetas.

El CP: Una menor cantidad y mayor el concentrado de plaquetas esta en la base del tubo centrifugado.

Estas combinaciones crearon fibrina densa y estable la cual es mas compacto, que el fabricado con fibrinogeno autólogo, porque el factor fibrinogeno y el factor XIII son concentrados en el tejido adhesivo. También la consistencia como miel del fibrinogeno en el adhesivo tisular hace su aplicación más fácil.

Esta técnica ha demostrado incremento en la eficacia para el manejo de CP en injertos. Esta probado que los costos son menores para la técnica del aumento y también presenta una mejor relación con el paciente. ¹⁶

6.3 ACTIVACIÓN Y AGREGACIÓN DE LAS PLAQUETAS

Después de tener la fracción de plasma se va a utilizar, para provocar la formación del coágulo se pueden emplear los diferentes protocolos:

1. Añadir 50 microlitros de cloruro cálcico al 10% por cada cc. De plasma rico en factores de crecimiento (fracción 3). Entre 5 y 8 min, se nos formará el coágulo. El tiempo varía en relación inversa al número de plaquetas. A mayor número de plaquetas menor será el tiempo de formación del agregado. Este dato tiene importancia ya que siempre hay una variabilidad personal del número de plaquetas que puede oscilar dentro de los límites fisiológicos entre 150.000 y 400.000. Si a este plasma, antes de activarlo se equilibra su

temperatura con la temperatura corporal (37) conseguirá la formación del coágulo en 2 ó 3 minutos.

2. Si se va a mezclar el plasma con cualquier material de injerto primero añadirá el cloruro de calcio y seguidamente se mezclará con el injerto. Entre 2 y 5 minutos más tarde se formará un agregado que contendrá el injerto, con una consistencia gomosa muy fácil de manipular y muy cómoda de compactar. De nuevo a 37 grados este tiempo se acortará a 2-3 minutos. Si el injerto es de hueso autólogo el coágulo englobando el injerto se formará en menos tiempo.
3. Si queremos obtener un efecto barrera se puede mezclar con sulfato cálcico (Bone-Mousse Tipo I). Se mezcla 2 cc. de polvo con 1 cc. de P.R.F.C., en 5 minutos se obtendrá un material gomoso fácil de manipular. Además del efecto barrera tendrá un efecto osteoconductor, y será totalmente absorbible en un plazo de 3 a 4 meses. Esta operación también se puede realizar con fosfato tricálcico. (Bone- Mousse Tipo II).
4. se puede mezclar el plasma con trombina bovina o con trombina humana. La agregación será inmediata. Un cc. De plasma con 50 microlitros de cloruro de calcio más 400 unidades de trombina humana o bovina. La ventaja es la agregación inmediata de las plaquetas, pero tiene dos inconvenientes, por un lado la utilización de trombina bovina o humana con cierto poder antigénico, y por otro que las plaquetas van a liberar el contenido de sus gránulos rápidamente en estas condiciones, por lo tanto se considera que las desventajas superan a las posibles ventajas y este protocolo casi no se usa y no se recomienda.³

6.4 OBTENCIÓN DE FIBRINA AUTÓLOGA

Cuando se activa el P.R.F.C. con cloruro cálcico, en unos minutos obtendremos un coágulo; al añadir el calcio se provoca la activación de la trombina endógena y la transformación del fibrinógeno en fibrina. En fotografías de microscopía electrónica, se observa que se forma una malla de fibrina, se activan las plaquetas y dentro de ese coágulo se van a seguir produciendo cambios. Sabemos que en su fase inicial las plaquetas activadas están esparcidas en esa malla y que poco a poco se van agregando, uniéndose entre sí lo que provoca cambios en su citoplasma, y como consecuencia la liberación del contenido de los gránulos α .

El coágulo recién formado se va a comportar como una esponja empapada en factores de crecimiento y otras citoquinas. Un coágulo retraído ha eliminado parte de su contenido en factores de crecimiento, las fibras de fibrina están engrosadas y mejor organizadas. Su modo de obtención consiste en acelerar la retracción del coágulo, esto se puede hacer introduciendo el plasma ya activado en un bloque térmico a 37 grados C. De esta forma obtendrá una fibrina bien organizada, lo único que hace es acelerar la cinética del coágulo en su última fase de retracción. Si es un P.R.F.C., este plasma tendrá más fibrinógeno y por lo tanto la malla de fibrina que obtiene tendrá un volumen mayor. También con las fracciones menos concentradas se puede obtener fibrina aunque sea un volumen menor. ³

CAPITULO 7

APLICACIONES CLÍNICAS.

7.1 TRATAMIENTOS DE CANINOS INCLUIDOS.

7.2 APICECTOMÍAS TRATAMIENTO DE DEFECTOS.

7.3 REGENERACIÓN ALREDEDOR DE IMPLANTES.

7.4 INJERTOS EN BLOQUE.

7.5 TRATAMIENTOS DE DEFECTOS PERIODONTALES.

7.6 APLICACIÓN DEL PLASMA RICO EN PLAQUETAS EN CIRUGÍA DEL INJERTO DE SENOS.

7.7 AUMENTO DE REBORDE UTILIZANDO ROG Y PLASMA RICO EN PLAQUETAS.

7. APLICACIONES CLÍNICAS

7.1 PREPARACIÓN DE ÁREAS FUTURAS. ZONAS POST-EXTRACCIÓN.

Una de las aplicaciones después de una extracción simple, la regeneración ósea será más rápida y completa. Se va a utilizar el plasma con dos consistencias diferentes: dentro del alvéolo se pondrá un coágulo de P.R.F.C. y para contener ese coágulo a modo de tapón, con el fin de evitar la realización de un colgajo de desplazamiento, podemos poner un tapón de fibrina, provocando la retracción del coágulo de P.R.F.C., o si no tenemos suficiente plasma la podemos obtener de una fracción menos concentrada (P.R.F.C.). La retracción del coágulo se va a producir a 37 grados en 10-15 minutos y si no, físicamente, con unas pinzas, podemos comprimir el coágulo y provocar su retracción. Daremos unos puntos de sutura en cruz para estabilizar el tapón de fibrina y evitar su aspiración. Los beneficios se van a percibir rápidamente, la extracción va a epitelizar más rápido, vamos a obtener regeneración ósea de forma más completa en menor tiempo, las posibilidades de infección o de una alveolitis seca van a desaparecer. Esta técnica está recomendada en fumadores o diabéticos que son pacientes que tiene una pobre epitelización, más propensos a padecer alveolitis.

Una vez realizada la extracción, se hará un legrado meticuloso para asegurar que no hay tejido conectivo secundario a una bolsa periodontal, ni a un granuloma periapical. En el caso de haberlo se hace el legrado y una cobertura antibiótica. A los 15 días observamos la epitelización del tapón de fibrina; a los tres meses se observa la regeneración epitelial. A los cuatro meses se observa la regeneración ósea. Es a partir de este momento cuando ya podemos poner un implante en la zona post-extracción.³

7.2 TRATAMIENTO DE CANINOS INCLUIDOS Y TERCEROS MOLARES.

En la extracción de piezas incluidas, el espacio se rellena con un gran coágulo de P.R.F.C. o con dos o tres coágulos hasta completar todo el efecto. En algunos casos podemos cubrir el alvéolo y el relleno de P.R.G.F. con fibrina autóloga a modo de membrana, para retener el coágulo. Se cierra el colgajo y se hace presión, sin dar puntos de sutura. Se confecciona una férula al vacío, para proteger el paladar y evitar la interposición de la lengua en la incisión.

7.3 APICECTOMÍAS. TRATAMIENTOS DE DEFECTOS ÓSEOS PERIAPICALES.

El tratamiento es mezclar factor de crecimiento rico en plaquetas con un biomaterial o con hueso autólogo, en el caso de que la ventana sea muy grande y haya riesgo de colapso. Si la ventana es pequeña sólo pondremos P.R.F.C. Se realiza la apicectomía con obturación retrograda y el enorme defecto se rellena sólo con P.R.F.C., a los nueve meses se observa hueso trabecular en todo el defecto. Cuando se observa una lesión quística, se realiza la resección y biopsia de la lesión con sospecha de un queratoquiste, el defecto se rellena sólo con P.R.F.C. a la semana catorce se observa regeneración de la lesión.

Cuando se extirpa un quiste periapical debe de quedar una ventana ósea grande así que la mezcla del FCRP con un biomaterial o hueso autólogo es una alternativa para evitar el colapso. Si la ventana es pequeña solo se pondrá PRFC. **Un estudio revela radiográficamente a los 9 meses hueso trabecular en todo el defecto, después de haber realizado una apicectomía con alteración retrógrada y llenado el defecto solo con PRFC.** ³

7.4 REGENERACIÓN ALREDEDOR DE IMPLANTES.

Se han utilizado membranas con éxito para la regeneración ósea alrededor de los implantes.

El riesgo de exposición de las membranas, sobre todo si son absorbibles, utilizando P.R.F.C. es mucho menor. En el caso de varón de 62 años después de un tratamiento periodontal básico y la extracción de las piezas de mal pronóstico, se procedió a la fase de colocación de implantes. Todos los implantes se colocaron en un estado quirúrgico, excepto los dos que se encontraban alrededor del defecto se quería regenerar. La cavidad se rellenó con el hueso autólogo obtenido del fresado mezclado con P.R.F.C. y se cubrió con una membrana Lambone, para evitar el colapso. A los cuatro meses, se realizó la reapertura; éste fue el aspecto clínico. Hueso compacto en todo el defecto. Se tomó una biopsia de la zona regenerada y de un resto de la membrana que estaba por palatino que no se había absorbido. Se observó en la biopsia el aspecto de trabeculado óseo con su morfología típica.

Otro caso, una mujer de 47 años se presenta con dolor, se le diagnostica fractura vertical, en el diente 13 el cual es pilar de una prótesis fija hasta el diente 17 y presenta una bolsa periodontal de 11 mm. Post-extracción del 13 se observa pérdida de la tabla externa se le colocó un implante de 5mm toda la cavidad se cubrió con hueso autólogo obtenido del fresado, mezclado con P.R.F.C. Se cubrió todo con fibrina obtenida del P.R.F.C. para estabilizar el injerto y cubrir la solución de continuidad que teníamos en el lecho de la extracción. Se hizo una incisión en el periostio para eliminar la tensión del colgajo y se suturó con monofilamento de cinco ceros. Se dio un punto cruzado para retener el coágulo de fibrina en el lugar de la extracción.

La regeneración en el lugar de la extracción presentó un excelente aspecto a los 3 meses. ³

Paciente de 58 años con fractura de la raíz palatina del segundo premolar, pilar de puente decidieron realizar la extracción y colocar inmediatamente un implante en el defecto de la extracción. Se colocó otro implante en el lecho del primer premolar. El defecto se rellenó con hueso autólogo mezclado con P.R.F.C. Todo ello se cubrió con fibrina autóloga y encima se puso una membrana absorbible empapada en P.R.F.C. A los cuatro meses el defecto estaba totalmente regenerado.

7.5 INJERTOS EN BLOQUE.

Estos injertos son una técnica de obligada utilización en algunos casos de grandes absorciones óseas. En casos de reabsorciones extremas en el maxilar superior, se utiliza bloques de cadera realizando un Lefort y un adelantamiento y descenso del maxilar.

En casos de pequeños defectos, para conseguir crecimiento tanto en anchura como en altura, el mentón y rama horizontal serán zonas de elección para la toma del injerto. Del mentón podemos obtener dos bloques de gran tamaño y un grosor de 5 o 6 mm. Su obtención es laboriosa, resulta una zona a menudo muy sangrante y con un post-operatorio molesto para el paciente. Se utiliza en casos de grandes absorciones en el maxilar superior post-traumatismo o por amplias absorciones por edentulismo prolongado.

La rama horizontal es nuestra zona de elección para pequeños bloques. El P.R.F.C. se utilizará en todos los casos de injertos en bloque con una doble finalidad: rellenar con un biomaterial la zona donante para estimular su regeneración y para cubrir y ayudar a remodelar el bloque que se vaya a colocar. De esta forma todos los bordes a las zonas limítrofes del bloque se compactaran con P.R.F.C. y hueso particulado para evitar escalones. ³

7.6 TRATAMIENTO DE DEFECTOS PERIODONTALES

El obtener regeneración ósea alrededor del implante resulta relativamente sencillo, los defectos periodontales tienen características histológicas diferentes. Por un lado la raíz no es osteoconductora y hay que regenerar no sólo tejido óseo sino también el ligamento periodontal, además el injerto va a estar más expuesto a una posible contaminación. Es muy pronto para validar esta técnica para el tratamiento de defecto periodontal, por los resultados parecen esperanzadores. Se necesitan más estudios para ofrecer resultados prometedores en la regeneración de defectos periodontales. ³

7.7 APLICACIÓN DEL PLASMA RICO EN PLAQUETAS EN CIRUGÍA DEL INJERTO DE SENO.

Otros autores han reportado el uso y aplicación de factores de crecimiento de citosina.

Los antecedentes científicos y varias técnicas de procesamiento para preparar los materiales autólogos son revisados aquí. Investigaciones de proyectos actuales estudian los injertos en el seno maxilar para la regeneración ósea y preparar el sitio del implante con factores de crecimiento plasma rico en plaquetas. La búsqueda de un agente ideal intraoperatorio hemostático para cirugía de tejido blando y duro dio como resultado el desarrollo de un adhesivo de fibrina, un agente hemostático con propiedades adhesivas.

Las aplicaciones quirúrgicas tempranas con fibrina demostraron propiedades subóptimas atribuidas a la falta de concentrado de fibrinogeno además de los costos de producción.

Lejos de la persecución del desarrollo para este agente hemostático dio como resultado un gel autólogo plaquetario el cual fue desarrollado por un producto de multicomponentes plasmapheresis a principios de 1990.

Una fracción de concentrado de sangre es extensamente utilizado en hematología. El término concentrado plaquetario (CP), es usado en hematología para denotar mas de 1 mL/ μ L de concentración de plaquetas y es sinónimo del termino plasma rico en plaquetas (PRP).

Este procedimiento involucra la separación de sangre y centrifugación en dos etapas. La primera suave o corta al girar separa el plasma de los paquetes de los glóbulos rojos. El plasma fraccionado más adelante es separado en un proceso duro y largo el cual separa el concentrado de plaquetas del plasma pobre en plaquetas (PPP).

El PRP se obtiene del centrifugado de sangre autóloga y luego combinado con trombina y cloruro de calcio que produce un gel en forma coagulo viscoso el cual puede ser introducido en la cirugía de injerto.

Evidencia documentada demuestra la liberación de una cascada de factores de crecimiento a través de la activación de las plaquetas con cloruro de calcio y trombina. Dos de esos factores de crecimiento son el factor de crecimiento derivado de plaquetas (FCDP), y el factor de crecimiento de transformación B-1(FCT-B-1). La función del FCDP en la reparación de tejido blando ha sido bien documentada. Investigaciones recientes describen la importancia de las plaquetas en la regeneración ósea. Las plaquetas pueden actuar como una fuente exogena de factores de crecimiento para estimular la actividad anabólica de las células del hueso. ¹⁷

En este artículo se describe un fondo histórico y los beneficios quirúrgicos del PRP en la curación de la herida. Aspectos técnicos del PRP sus logros y usos han sido descritos. Un especial énfasis está dirigido hacia las dos técnicas de proceso actualmente utilizados en el centro. Después de una revisión de literatura esta es la primera publicación describiendo el uso de PRP como un adjunto al injerto del hueso dentro del aumento del seno maxilar.¹⁷

7.8 AUMENTO DE REBORDE UTILIZANDO ROG Y PLASMA RICO EN PLAQUETAS.

Richard Shanaman, Marc R. Filstein, al combinar plasma rico en plaquetas (PRP) con materiales de injerto de hueso autógeno encontraron un incremento en la velocidad y calidad del nuevo hueso en procedimientos regenerativos. Los objetivos de esta serie de casos era evaluar el potencial del PRP en combinación con injerto óseo alogeno para aumentar la regeneración ósea en defectos del reborde alveolar que mostraban una pérdida vertical y horizontal previo a la colocación de implantes dentales. El aumento dio como resultado una ganancia clínica y radiográfica en ambos componentes vertical y horizontal de los defectos óseos, así mismo facilitando la subsecuente colocación de implantes dentales. La evaluación histológica en estos casos revelaron la presencia de residuos de partículas de alo injerto alrededor de tejido conectivo así como la formación de hueso nuevo en las áreas injertadas.

Sin embargo la adición de PRP aparentemente no aumentó la cantidad o calidad de la formación de nuevo hueso sobre la reportada en una regeneración ósea guiada (ROG).¹⁸

Este artículo reporta los resultados preliminares de tres pacientes los cuales el PRP fue utilizado en conjunto con la regeneración ósea guiada (PRP y

ROG) para el aumento del reborde previo a la colocación de implantes dentales. Dos pacientes presentaron reducción en el reborde alveolar en la parte posterior de la mandíbula, y el tercer caso describe el manejo de un defecto labial aislado en la parte anterior del maxilar.

Se revisaron las historias médicas de los pacientes para descartar enfermedades sistémicas o locales que podrían ser una contraindicaciones en la cirugía.

Seis meses después, el aumento del reborde alveolar fue reevaluado para la colocación de implantes. Clínicamente, había una ganancia de aproximadamente 2 mm a lo ancho y 3 a 4 mm en la altura. La mejoría en las dimensiones del reborde fueron propicias para la colocación de dos implantes de 7mm x 5 mm (3i) en el lugar de primer y segundo molar.

También se colocó uno de 13mm x 4 mm en la parte anterior del formen del segundo molar.

Clínicamente el aumento con PRP, derivados de hueso sustitutos (DFDBA, hueso autógeno, BioGran) y membranas de barrera resultaron en la regeneración alveolar vertical y horizontal obtener buenos resultados. Esto facilita en subsecuente la colocación de implantes dentales. La ganancia vertical fue entre 3 y 4 mm. Combinando el PRP con DFDBA resultó un material fácil de manejar por medio de esto facilitando la colocación y una estabilidad inicial del injerto.

Sin embargo, bajo las condiciones actuales de este estudio, es difícil de determinar si la adición de PRP aumenta la cantidad o calidad de formación de hueso sobre todo que pueda ser logrado usando técnicas convencionales de ROG.¹⁶

La Evaluación de los verdaderos efectos de PRP en la regeneración ósea es complicado por otras variables, incluyendo la adición de hueso autógeno a la mezcla del injerto, el uso de diferentes derivados sustitutos de hueso,

barreras de membranas, el uso de trombina-bobina, y la adición de perforaciones corticales. Dichas variables clínicas pueden a final de cuentas pueden influenciar el resultado del tratamiento independiente del efecto con el componente de PRP.

Además, el factor que los tres casos presentes requirieron de un procedimiento múltiple de injertos para asegurar una regeneración adecuada sugiere que PRP no demuestra ninguna habilidad osteoinductiva. Observaciones histológicas sugieren que el PRP combinado con DFDBA y cubierto con una membrana como barrera soporta la formación de hueso nuevo. Sin embargo la adición del PRP no aparece aumentar la calidad del recién formado hueso. El hueso regenerado estaba caracterizado por áreas recientemente formados de hueso vital en adición con partículas de DFDBA residuales no vitales, encontradas predominantemente en la región de la cresta del reborde. Estas partículas residuales aparentemente no soportan ninguna actividad osteogénica. Observaciones similares han sido reportadas en cualquier otro lugar utilizando ROG con cualquiera de los dos DFDBA o FDBA.

Series de reportes de otros casos reportaron resultados favorables siguiendo el uso de PRP, sugiriendo que PRP puede mejorar la calidad del nuevo hueso y su cantidad como resultado de una más rápida consolidación y mineralización del injerto.

Se sabe que las variaciones en la concentración de PDGF influyen en la recuperación del hueso, y, como con otros factores de crecimiento diferentes tales como proteínas morfogenéticas óseas, variaciones locales en la concentración puede ser una función del tipo de portador o sistema de entrega.¹⁸

Más allá de un control clínico así como estudios preclínicos son necesarios para determinar si hay un efecto terapéutico significativo asociado a PRP

cuando es combinado con diferentes materiales de injertos alogénicos , aloplásticos y xenogénicos. . Tales estudios deben tomar en consideración la influencia de otros factores incluyendo si se usa el autoinjerto, la influencia de perforación cortical en subsecuente curación de la herida, el efecto de usar diferentes derivados o substitutos del hueso, la diferencia de barreras de membranas y las variaciones de concentraciones de factores de crecimiento contenido dentro del PRP. ¹⁸

CAPITULO 8
CASO CLÍNICO

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CASO CLÍNICO

Paciente femenino de 43 años. Se presentó en la clínica de Periodoncia (DEPeI de la FO, UNAM)

aparentemente no presenta enfermedades sistémicas.

Se quejaba de cambio de posición y movilidad del diente 21, presentaba exudado purulento y respuesta pulpar.

PLAN DE TRATAMIENTO:

Se le realizó CPP, RAR, se ferulizó el diente 21, se llevó acabo su programa de fase I durante tres meses, se medicó amoxicilina de 500mg tres veces al día durante 7 días. Fig.1

TERAPIA PREQUIRÚRGICA (FASE II)

A los tres meses, el diente 21, no presentaba supuración, la respuesta pulpar había disminuido.

La placa bacteriana era mínima esté , en el resto de los dientes había una disminución adecuada de placa.

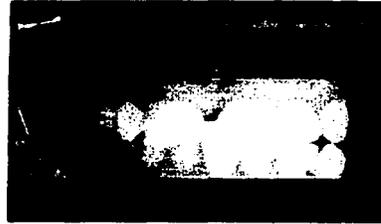


Fig. 1 Ferulización.

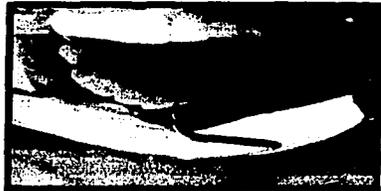


Fig.2 Arcada inferior.



Fig.3 Oclusión izquierda.



Fig.4 Oclusión derecha.

Se programó a la paciente, ese día unos 20 minutos antes de la extracción, se le hizo la toma de sangre de las venas de la fosa anticubital, utilizando el sistema Venofix "palomita".

Equipo P.R.F.C Biotechnology Institute, S.L. para la centrifugación y preparación del plasma. Se utilizaron tubos estériles con citrato sódico al 3.8% como anticoagulante, Fig. 5 y 6

El tiempo de centrifugación fue de siete minutos, a una velocidad de 280G a temperatura ambiente (la cantidad dependerá del defecto a tratar para llenar el sitio de la extracción del diente se necesita entre 10 y 20 cc.)

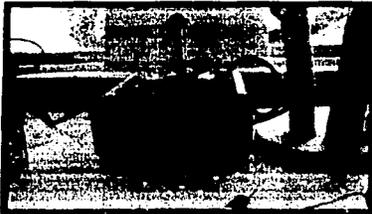


Fig. 5 y 6 Equipo para centrifugación (Bti) y preparación del plasma.

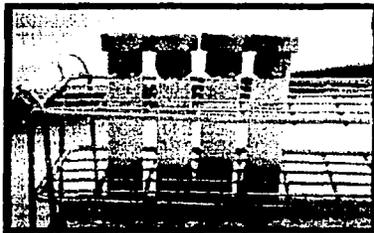
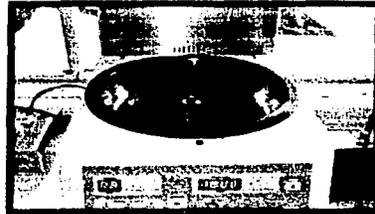


Fig.7 Tubos donde es preparado el plasma rico en plaquetas.



Fig.8 Bloque térmico.

Los primeros 500 μ L son un plasma pobre en plaquetas, los siguientes 500 μ L corresponden a un plasma con un número de plaquetas similar al que tiene la sangre periférica. Y la fracción de plasma más rico en plaquetas y factores de crecimiento son los 500 μ L inmediatamente encima de la serie roja.

Una vez que se obtiene el plasma que se va a utilizar, para provocar la formación del coágulo se añaden 50 μ L de cloruro cálcico al 10% por cada cc. de plasma rico en factores de crecimiento. Fig. 7 y 8

Se extrajo el diente 21, previamente ya se tenía el coágulo blanco recién formado listo para ser colocado en el sitio de la extracción.



Fig.9 Extracción del 21



Fig.10 y 11 Se observa el coágulo de PRP



Fig. 12 El alvéolo después de la extracción



Fig.13 y 14 Colocación del PRP



Después se suturó la zona con seda de tres ceros en donde se había sido colocado el PRP (arcada superior anterior).



Fig.15 vista oclusal.



Fig. 16 vista vestibular

Se citó a la paciente después de una semana observando una epitelización óptima.

Se espera una regeneración ósea de hueso maduro en mayor cantidad y calidad después de seis meses . Fig.17

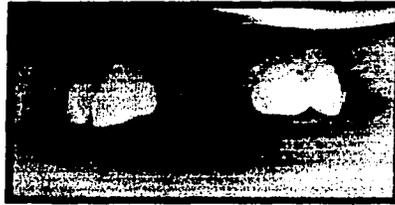


Fig. 17. Epitelización una semana después.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CONCLUSIONES

Se sabe que la historia clínica es un elemento de gran relevancia para el conocimiento profesional del paciente para determinar si es apto para recibir el tratamiento.

En este trabajo se exponen distintas aplicaciones del Plasma Rico en Plaquetas en la regeneración periodontal con resultados clínicos e histológicos demostrado por distintos autores ya mencionados.

La aplicación del PRP, se está realizando en DEPEI EN LA F.O. UNAM. con resultados satisfactorios tanto para el paciente como para el profesional.

Se ha demostrado en el presente caso clínico que la regeneración periodontal con este método alternativo se han obtenido buenos resultados en el tiempo que se ha utilizado hasta la fecha.

Actualmente existen controversias en cuestión al manejo y técnicas entre autores, pero casi todos llegan a las mismas conclusiones.

Una de las ventajas que se han visto en la actualidad es que se puede realizar en un consultorio, y con poca cantidad de sangre. La incorporación de esta técnica en los consultorios podrían aportar grandes beneficios a los pacientes sin ningún riesgo de contagio o transmisiones de enfermedades.

Los factores de crecimiento representan en la actualidad uno de los mejores recursos ya sea solo o en combinación con otros materiales para la regeneración ósea, siendo también útiles en cirugías como son elevación de seno, injertos en bloque y llenado de defectos óseos; recuperando así sus propiedades y funciones originales.

REFERENCIAS

- 1) Ten Cate "Tratado de Histología Oral ". Segunda Edición. Ed. Médica Panamericana 1986.
- 2) Lindhe, J. "Periodontología Clínica e Implantológica". Editorial Panamericana. Tercera Edición.
- 3) Anitua Eduardo. "Un nuevo enfoque en la regeneración ósea, Plasma Rico en Factores de Crecimiento". Ed. Puesta al día publicaciones. 2000.
- 4) Lynch E. Samuel. "Tissue Enginnering Applications in Maxillofacial Surgery and Periodontics". Quintessence Publishing. 1999.
- 5) Jowsey, Jenifer, D.P. "Metabolic Diseases of Bone". Vol 1 in the series. Saunders Monographs in Clinical Orthopedics. Edit. W:B. Saunders Company 1997.
- 6) Ham, Cormack. D. "Histología de Ham". Novena Edición, Edit. Harla Mex. 1988.
- 7) Don W. Fawcett, M.D., Bloom. "Tratado de Histología". Undécima edición. Ed. Interamericana-Mc Graw Hill 1992.
- 8) Carranza, Newman. "Periodontología Clínica". Octava edición. Ed. Mc Graw-Hill Interamericana 1998.
- 9) Anitua Eduardo. "Preliminary Results of Use in the Preparation of Future Sites for Implants". J. of Oral and Maxillofacial Implants. Vol. 14. No. 4. 1999
- 10) Anitua Eduardo. "La Utilización de los Factores de Crecimiento Plasmáticos en Cirugía Oral, Maxilofacial y Periodoncia". RCOE. Vol 6. No. 3. Junio 2001.
- 11) Carter-Bartlett Pablo Manuel, Acosta Nieves. "Metabolismo del Hueso Periodontal". Revista ADM. Vol XLIX. No. 5. sept-oct. 1992.
- 12) Carranza Fermin A. "Cirugía Periodontal Reconstructiva" . Clínica de Norteamérica. Ed. Interamericana. Vol. 3/1991.

- 13) Rifkind R.A. "Hematología Clínica". Tercera Edición. Ed. Interamericana 1988. pag. 168-173.
- 14) Higashida. "Ciencias de la Salud". Segunda Edición. Ed. McGraw Hill. 1991.
- 15) Anitua Eduardo. "The Use of Plasma-Rich Growth Factors (PRGF) in Oral Surgery". *Prac Proced Aesthet Dent* 2001. Vol.13 No.6
- 16) Sonnieitner Dietmar. Huemer Peter. "A Simplified Technique for Producing Platelet-Rich Plasma and Platelet Concentrate for Intraoral Bone Grafting Techniques: A Technical Note". *Int J. Oral Maxillofac Implants* 2000; 15.
- 17) Lozada, Jaime L. "Platelet-Rich Plasma Application in Sinus Graft Surgery: Part I-Background and Processing Techniques". Vol. XXVII/No. One/2001.
- 18) Shanaman, Richard. "Localized Ridge Aumentation Using GBR and Platelet-Rich Plasma: Case Reports". *Int. J. of Periodontics and Restorative Dentistry*. Vol. 21, No.4.2001.