



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION**

**SECRETARIA DE SALUD DEL DISTRITO FEDERAL
DIRECCION DE EDUCACION E INVESTIGACION
SUBDIRECCION DE FORMACIÓN DE RECURSOS HUMANOS**

**CURSO UNIVERSITARIO DE ESPECIALIZACION
EN CIRUGIA PLASTICA Y RECONSTRUCTIVA**

**"EVALUACION DEL EFECTO DEL PLASMA RICO EN FACTORES DE CRECIMIENTO
PLAQUETARIO EN BRECHAS OSEAS
MODELO EXPERIMENTAL"**

PRESENTADO POR

DR. JOEL FRANCISCO MARQUEZ MEDINA

**PARA OBTENER EL TITULO DE ESPECIALISTA EN
CIRUGIA PLASTICA Y RECONSTRUCTIVA**

**ASESOR DE TESIS
DR. RUBEN HERNANDEZ ORDOÑEZ**



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.

Doy Gracias

A Dios, por darme la fuerza y estar siempre a mi lado.

A mis padres, por estar conmigo en todo momento.

A Hannia y Arizbe, mis hijas quienes desde su nacimiento han sido mi inspiración.

A Lizzet por haberme dado los regalos más hermosos que una mujer puede dar a un hombre, y ayudarme en el presente trabajo.

A mi hermana Katia y Alma quienes a pesar de todo siempre han estado a mi lado.

Al Dr. Jorge González Rentería y todos mis maestros por darme la oportunidad convertirme en un cirujano plástico a través de sus enseñanzas.

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN / ABSTRACT

INTRODUCCION

MATERIAL Y METODOS

RESULTADOS

DISCUSION

CONCLUSIONES

REFERENCIAS

RESUMEN

Los factores de crecimiento se definen como un tipo de mediadores biológicos que regulan acontecimientos claves en la reparación del tejido. Existen tres mecanismos relacionados con el éxito en la regeneración ósea: la osteogénesis, la osteoinducción y la osteoconducción.

El objetivo general fue demostrar que el plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) estimula la regeneración ósea en huesos largos, siendo la hipótesis "El plasma rico en factores de crecimiento plaquetario estimula la regeneración ósea en brechas óseas."

En 10 conejos se crearon dos brechas óseas, una en cada hueso de cada pata, a la del lado derecho se aplicó gel de PRGF y a la izquierda no. Cuatro semanas después se tomaron biopsias y se comparó la celularidad.

Las biopsias del sitio tratado con gel de PRGF clínicamente se observó un sobrecrecimiento óseo y microscópicamente mayor número de células tipo osteoblasto en comparación al sitio donde no se utilizó PRGF. En cuanto a la celularidad observada en nuestro estudio fue la siguiente en los sitios donde se utilizó PRGF fue promedio fue 33.2 vs 19.3 sin PRGF. Se utilizó la t de student para el análisis de los resultados con un valor de p igual a 0.05. Los resultados obtenidos fueron para t 11.26, lo cual resulta estadísticamente significativo.

El PRGF ha sido utilizado con éxito para osteoinducción en defectos de huesos en cara por cirujanos maxilofaciales, el mismo procedimiento puede utilizarse para huesos largos pequeños, en nuestro estudio en un modelo animal, pero puede traspolarse a huesos de la mano.

El gel de plasma rico en factores de crecimiento es de utilidad en defectos óseos de huesos pequeños largos, ayudando a la regeneración ósea.

Palabras clave: factores de crecimiento, regeneración ósea, osteoinducción.

ABSTRACT

The growth factors are biologic mediators which regulate key steps in tissue repair. There are three mechanisms in relation with successful bone regeneration: osteogenesis, osteoinduction and osteoconduction.

The purpose of the present study was to evaluate if the gel plasma rich growth factor stimulates bone regeneration in longitudinal bone gaps.

In ten rabbits, two bone gaps were created in each leg. In the right leg, PRGF was used, and in the left leg, it was not. After 4 weeks, biopsies were taken from each bone gap and sent for microscopic analysis, and the cellularity was compared.

The biopsy from the PRGF-treated site clinically showed an overgrowth of bone, and the microscope showed a greater number of osteoblast cells compared to the control site. The number of cells found when PRGF was used was 33.2 vs 19.3 without PRGF. A Student's *t* test was used for statistical analysis with a $p = 0.05$. The result was 11.26, with significant statistics.

PRGF has been successfully used for osteoinduction in facial bone defects in maxillofacial surgery. The same procedure can be used in small longitudinal bone gaps, such as those in the hand. Our study in rabbits can be translated to human hand bones.

The PRGF gel works in bone defects, helping with bone regeneration.

Key words: growth factors, bone regeneration, osteoinduction.

INTRODUCCION

Las fracturas multifragmentarias de mano son un desafío para el cirujano debido a la complejidad que involucra su reconstrucción, su reparación consiste en una reducción y una osteosíntesis con fijación interna con clavos de acero de Kirschner ó material de titanio, placas y tornillos. A pesar una técnica adecuada, en ocasiones los múltiples fragmentos pueden retardar la consolidación ósea, o en su defecto llevar a complicaciones como pseudoartrosis ó no unión.

En los países europeos los cirujanos maxilofaciales han desarrollado un goma, compuesta por plasma autólogo, la cual es rica en factores de crecimiento plaquetario (PRGF) los cuales reportan ayudan a disminuir el tiempo de consolidación ósea en fracturas y promueven la formación de neohueso en donde se encuentra una brecha ósea (1).

Los tejidos están formados por tres componentes fundamentales: las células, la matriz extracelular insoluble y las moléculas solubles que sirven como reguladores de la función celular, y que la mayoría son proteínas (2).

Utilizando estos tres componentes del tejido (matriz, células y sustancias reguladoras) se pueden desarrollar estrategias para la regeneración "in vitro" y en vivo. La decisión para seleccionar los elementos necesarios para la regeneración deberá estar basada en la comprensión de los procesos naturales que regulan la reparación. En un principio el termino ingeniería tisular se refería a la construcción en el laboratorio de un modelo que contenía los tres elementos clave para la regeneración: células viables y elementos señalizadores (factores de crecimiento, etc.) insertados en un matriz biológica o sintética

que se podía implantar en los pacientes para facilitar la regeneración de tejidos concretos (3).

Mediante la combinación de estos tres elementos, en el entorno apropiado, se obtiene regeneración. A estos tres elementos debemos añadir unos factores locales que influyen, como son el entorno mecánico y vascular.

Existen tres mecanismos relacionados con el éxito en la regeneración ósea: 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.

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 es el proceso de estimulación de la osteogénesis. Los materiales osteoinductivos se pueden usar 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 reabsorción libera proteínas morfogenéticas (BMP's).
- Plasma rico en factores de crecimiento plaquetario, liberando factores de crecimiento que estimulan la quimiotaxis, la diferenciación y la proliferación celular.
- Proteínas morfogenéticas (BMP's).

Osteoconducción se trata de 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 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 reabsorción será lenta (dependiendo del biomaterial y del lecho receptor) y progresiva. Dentro de los materiales osteoconductivos tenemos:

- Hueso autólogo, además de ser osteogénico.
- Fibrina autóloga (plasma rico en factores de crecimiento).
- Hidroxiapatita reabsorbible (Bio-Oss).
- Sulfato de Calcio (Bone-Mousse, tipo I).
- Fosfato tricálcico (Bone-Mousse tipo II).
- Fibrina liofilizada (Tisucol).
- Hueso desmineralizado (DFDBA).
- Cristales cerámicos bioactivos.
- Las nuevas superficies osteoconductivas de los implantes.

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.

Los factores de crecimiento 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 la matriz extracelular. Además de estos factores de crecimiento existe una superfamilia de proteínas también implicadas en la señalización celular del tejido óseo denominadas proteínas morfogenéticas (BMP's, bone morphogenetic proteins). Su existencia se descubrió al observar que ciertos tejidos parecían tener una sustancia osteogénica que inducía la formación de hueso nuevo (4).

Urist en 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 las responsables de este fenómeno; se denominaron BMP's y fueron consideradas las responsables del principio de inducción ósea. Muchos factores de crecimiento se han añadido a la superfamilia de las BMP's basándose en la homología de su secuencia de aminoácidos, como es el caso de la familia de proteínas TGFβ1 (TGFβ1 hasta β5) (1).

El número de BMP's y factores de crecimiento hasta el momento actual es de unos 20 y representan un arsenal terapéutico aún por explotar. Se han agrupado basándose en la homología de su secuencia de aminoácidos. Aunque el nombre BMP describe una función concreta, morfogénesis, es un poco inexacto, ya que las BMP's también tienen un efecto en la proliferación celular, apoptosis (muerte celular) y diferenciación.

En la actualidad se consideran a los factores de crecimiento como multifuncionales, por ejemplo, un factor de crecimiento de los reconocidos como multifuncional, puede por un lado estimular la proliferación de ciertos tipos celulares, y por otro inhibir la proliferación de otra estirpe celular y además causar más efectos no relacionados con la proliferación en otro tipo de células.

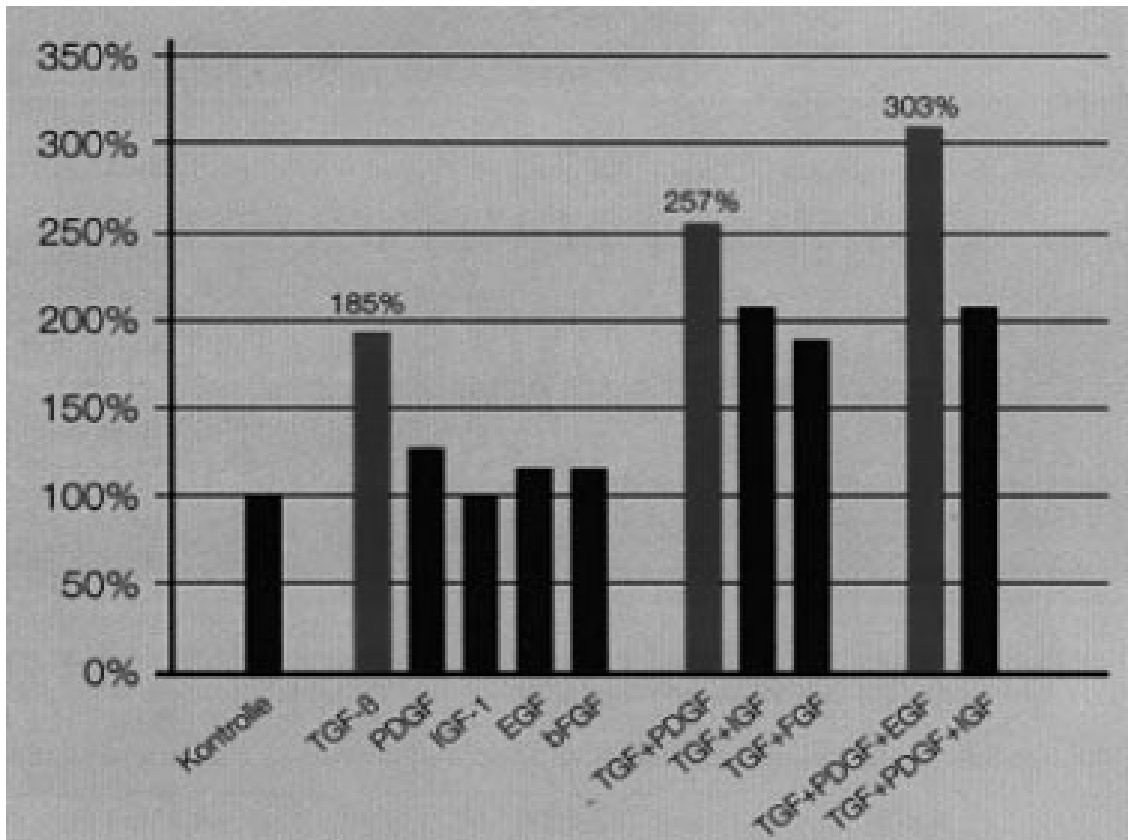
Unidades estructurales óseas corticales y trabeculares

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

- **PDGF**: factor de crecimiento derivado de plaquetas (platelet derived growth factor).
- **VEGF**: factor de crecimiento vascular endotelial (vascular endothelial growth factor).
- **TGF- β** : factor de crecimiento transformado tipo β (transformed growth factor).
- **AFGF** y **bFGF**: factores de crecimiento fibroblástico ácido y básico (acidic and basic fibroblastic growth factors).
- **IGF-I** e **IGF-II**: factores de crecimiento insulínico I y II (insulin like growth factors).
- **EGF**: factor de crecimiento epidérmico (epidermal growth factor).

Estudios previos en lesiones agudas han mostrado como los factores de crecimiento promueven la regeneración 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 (3).

Para evaluar la eficacia de los factores de crecimiento se utilizan modelos animales, principalmente perros y monos; la respuesta de ambos modelos a la aplicación de factores de crecimiento es predictiva de lo que sucedería en humanos. En el caso de la enfermedad periodontal, se ha visto en ambos modelos que la aplicación de factores de crecimiento mejora significativamente la regeneración. El primer estudio piloto se hizo con perros Beagle en 1989. Se prefiere el modelo de primates por ser anatómicamente más parecido al humano, pero en los primates la enfermedad es inducida, mientras que los perros padecen la enfermedad naturalmente. En ambos modelos el tratamiento con una combinación de PDGF mejoraba la regeneración comparado con zonas control.



Concentración de factores de crecimiento en sangre periférica y en concentrado de plaquetas.

El factor de crecimiento derivado de las plaquetas (**PDGF**), se encontró por primera vez en las plaquetas, aunque es producido por otro tipo de células como macrófagos y células endoteliales (4). Se trata de una proteína que se almacena en los gránulos alfa de las plaquetas, y se libera cuando se agregan y se inicia la cascada de la coagulación. Las células de tejido conectivo de dicha región responden a este factor de crecimiento iniciando un proceso de replicación. Se trata de una proteína cuyo peso molecular es de 30 KD, es un dímero formado por dos cadenas de aminoácidos A y B. Estas dos cadenas tienen una similitud de 60% en su estructura. La cadena A formada por 121 aminoácidos y la B por 125. Cada cadena esta codificada por un gen diferente, el gene que codifica A

está en el cromosoma 7 y para B en el cromosoma 22. La combinación de estas dos cadenas origina tres formas: AA, AB y BB, las tres formas juegan un papel importante en el desarrollo embrionario. Estas formas se expresan de forma diferente en distintos tipos de células; es decir, el contenido de las distintas formas es variable según el tipo de célula. El factor plaquetario fue el primer factor de crecimiento que se demostró era quimiotáctico para monocitos y macrófagos.

El papel del PDGF es muy complejo; la importancia del papel fisiológico se puede comprobar cuando se realizan distintos tipos de deleciones de los genes que codifican los tipos de receptores para PDGF. Cuando hay una deleción en el gene del receptor PDGF α , de ratones Patch, los ratones no sobreviven al nacimiento; durante la gestación desarrollan deformidades graves (5,6).

La composición del PDGF parece que es dependiente del tipo de célula. La forma AA se secreta por los fibroblastos preferentemente, células musculares lisas, osteoblastos y astrocitos. Por el contrario, la forma BB parece más asociada a macrófagos. Las plaquetas producen ambas formas A y B. Inicialmente se sugirió que el 70% del PDGF plaquetario estaba en la forma AB y el 30% restante en forma BB y el 12% AA. Pero estudios recientes sugieren que el 65% es AB, 23% BB, 12% AA. El tipo de los PDGF depende de los RNA mensajeros producidos y de la eficiencia de la producción de estos RNA's a proteínas, por tanto la regulación es compleja.

En general, las isoformas PDGF son mitógenas para las células de tejido conectivo, además de esta actividad mitógena tienen actividad quimiotáctica para los fibroblastos y células musculares lisas, que además tienen actividad mitógena en presencia de PDGF, pero también es quimiotáctico para los neutrofilos y células mononucleares para los que no es mitógeno. Otras actividades de PDGF son la estimulación de la liberación de gránulos por los neutrófilos y monolitos, estimulación de la fagocitosis de los neutrofilos,

estimulación de la síntesis de colágeno, estimulación de la actividad y secreción de colagenasa, etc (7,8).

Factor de crecimiento vascular endotelial (**VEGF**), es un mitógeno potente y selectivo para las células endoteliales. Aunque no se reconoce con detalle su papel en la regeneración, su importancia queda manifiesta por su acción angiogénica in vivo (9).

Factor de crecimiento transformado (**TGF**), la primera vez que se identificó se trataba de un factor que promovía la transformación de los fibroblastos en cultivo celular, la acción de este sobre las células alteraba su fenotipo y las transformaba en células tumorales. Resulto ser una mezcla de dos proteínas: $TGF\alpha$ y $TGF\beta$. Estas moléculas pertenecen a la superfamilia de proteínas que incluyen $TGF\beta$ 1 hasta β 5, proteínas óseas morfogénicas, actinas e inhibinas (10).

El $TGF\beta$ 1 tiene tres papeles fundamentales: modula la proliferación celular, generalmente como supresor; mejora la deposición de matriz extracelular aumentando la síntesis e inhibiendo la degradación y tiene efecto inmunosupresor. Estudios previos en lesiones agudas de piel han mostrado como los factores de crecimiento promueven la reparación e influyen en parámetros tales como la re-epitelización, angiogénesis y la síntesis de matriz extracelular (11,12).

Factores de crecimiento insulínico I y II (**IGF**), ambos se encuentran en el hueso en gran cantidad. El IGF-I es el factor de crecimiento más abundante en la matriz ósea, lo producen los osteoblastos y estimula la formación del hueso induciendo la proliferación celular, la diferenciación y la biosíntesis de colágeno tipo I (13,14).

Factores de crecimiento fibroblástico (**FGF**) ácido y básico, son proteínas de cadena sencilla que se origina 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, queratinocitos y además, algunas células especializadas como condrocitos y mioblastos.

El factor de crecimiento fibroblástico básico induce la migración celular. Los experimentos de cultivos celulares indican que gran variedad de las células sintetizan FGF, incluidos fibroblastos y osteoblastos. Además se han identificado cuatro tipos de receptores para FGF cuya especificidad e importancia fisiológica están aún por determinar.

Factor de crecimiento epidérmico (**EGF**), estimula la mitosis de fibroblastos y queratinocitos y acelera el cierre de las heridas. Se sintetiza en diversos tejidos: riñones, glándula submandibular, glándula lagrimal, glándula de Brunner y megacariocitos y se encuentra en la saliva, lágrimas y orina. Es un quimiotáctico para los fibroblastos, estos sintetizan colágeno produciendo un aumento de colágeno total.

Nuestro estudio 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, vamos a contar con liberación de proteínas contenidas en los gránulos α de las plaquetas, estas sustancias las vamos a concentrar y depositar en el lugar de la herida, exponiendo y orientando un concentrado fisiológico de proteínas que van a intervenir acelerando y favoreciendo el proceso de reparación y regeneración (15).

Las plaquetas con 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*. Tras una serie de etapas las prolongaciones plasmáticas de estos megacariocitos, se separan dando lugar a plaquetas, por lo tanto son células enucleadas. Tienen forma discoide con un diámetro de 1 a 3 μm ; la cifra normal de plaquetas en individuos sanos oscila de 150 mil a 400 mil por cc de sangre periférica.

Estas células sanguíneas inician el proceso hemostático formando un tapón en el vaso dañado. Cuando hay una alteración en el endotelio, las plaquetas que circulaban inertes se activan y se origina un proceso de varias etapas que finaliza con la formación del trombo plaquetario. Muchas proteínas plaquetarias juegan un papel activo en estas funciones; las glucoproteínas de membrana (GP) intervienen en los procesos de adhesión, activación y agregación plaquetaria.

Al añadir cloruro de calcio al plasma rico en factores plaquetarios, las plaquetas cambian de conformación y se agregan, al agregarse se degranulan (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 factores de crecimiento si se deja transcurrir mucho tiempo.

El interés del agregado de plaquetas se debe a que contiene, entre otras, las siguientes proteínas:

PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas.

VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular.

TGF β : factor de crecimiento transformado tipo beta.

EGF: factor de crecimiento epidérmico.

IGF-I: factores de crecimiento insulínico tipo I.

Las acciones e interacciones de estos factores de crecimiento varían dependiendo del tipo de célula (osteoblasto, fibroblasto) y de su grado de madurez.

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 concierto con éstos, estimulando la actividad de las células óseas y las células epiteliales (16).

La aplicación de factores de crecimiento 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 factores de crecimiento en el lugar de la herida son variados: desde esponjas de colágeno, de alcohol polivinílico, hilos metálicos como soporte, recubiertos de un polímero conteniendo los factores de crecimiento (15,17,18).

El **coágulo blanco**, funciona como un vehículo natural de los factores de crecimiento y presenta muchas ventajas sobre otros diseños más sofisticados.



La imagen muestra el aspecto de un coágulo rico en factores de crecimiento, que se produce a partir de sangre autóloga.

La hipótesis de nuestro estudio fue la siguiente: "El plasma rico en factores de crecimiento plaquetario estimula la regeneración ósea en una brecha ósea"; siendo el objetivo Demostrar que el plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) estimula la regeneración ósea en huesos largos, comparando la celularidad entre dos brechas óseas, una en la que se utilizó plasma rico en factores de crecimiento y otra donde no se utilizó.

MATERIAL Y METODOS

Se realizó un estudio experimental, prospectivo y comparativo en modelo animal, en instalaciones de consultorio médico particular en la Ciudad de México entre el 1 de julio del 2006 y 31 de julio del 2006. Se tomaron 10 conejos criollos machos, sanos con peso entre 3000 y 3500 grs. A todos los conejos se les administró anestésico intravenoso, ketamina, y fueron vigilados por médico anesthesiólogo. Se les realizó una brecha ósea en un hueso largo de ambas patas delanteras, en la pata derecha se aplicó gel de plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en la brecha ósea, mientras que en la brecha ósea de la pata izquierda no se aplicó.

Técnica para preparación de Gel de PRGF

1. Obtención de sangre periférica de una vena de la oreja derecha del conejo (misma vena que sirve para administración de medicamentos).

Se realizó la extracción de sangre a cada animal de experimentación unos minutos antes de comenzar la cirugía. Se utilizan tubos estériles con citrato sódico al 3.8% como anticoagulante, que se afora a 4.5 ml.

2. Se centrifuga el plasma en una centrifuga que nos garantiza que los parámetros de tiempo y velocidad son los adecuados.

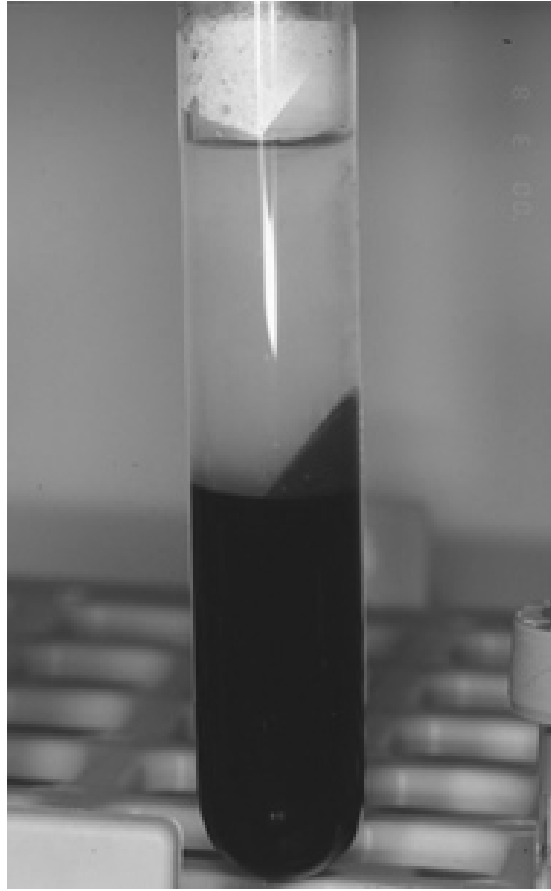
El tiempo será de 7 minutos a una velocidad de centrifugación de 5700 RPM a temperatura ambiente.



Centrifuga utilizada para separación de plasma de células sanguíneas.

3. El plasma se separa en fracciones mediante una pipeta, cuidando de no crear turbulencias en las fracciones obtenidas.

Los primeros 0.5 ml es un plasma pobre en plaquetas, y por lo tanto pobre en factores de crecimiento; los siguientes 0.5 ml corresponden a un plasma con un número de plaquetas similar al que tiene la sangre periférica. Finalmente los 0.5 ml que se encuentran justo encima de la serie roja es el plasma más rico en plaquetas y factores de crecimiento.



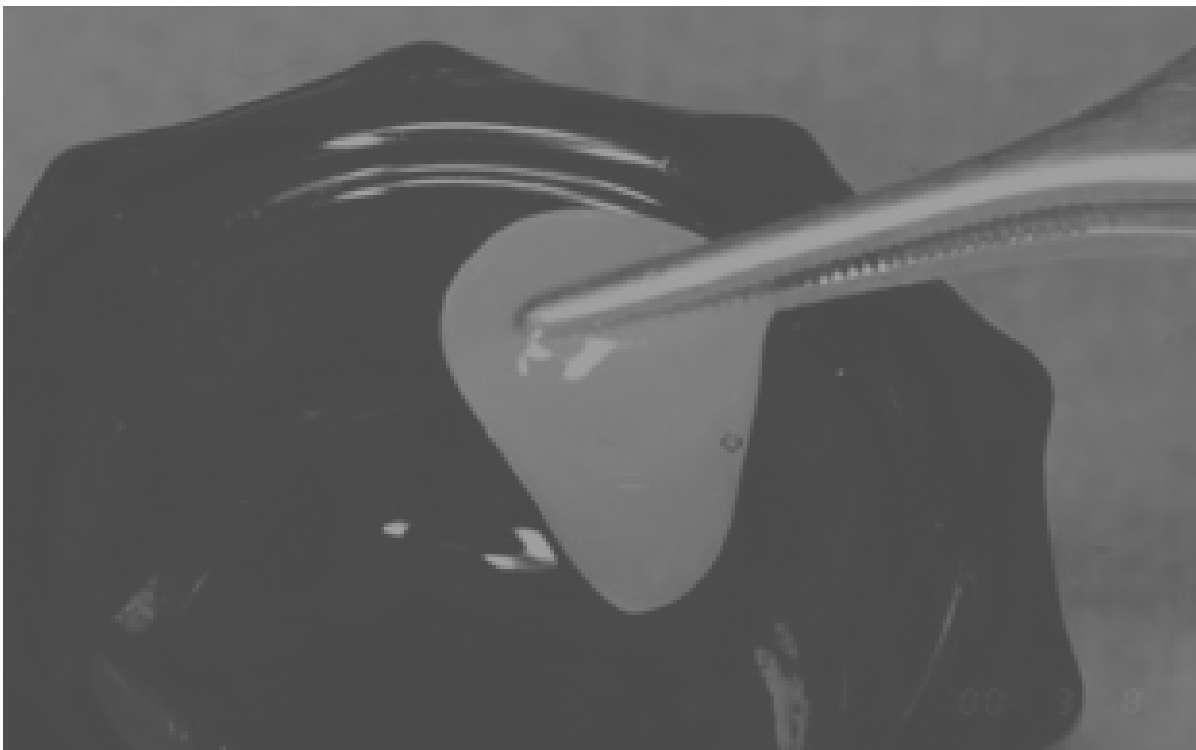
Separación de fracción celular y plasmática de la sangre.

El volumen de plasma que se obtiene tras la centrifugación varía ligeramente de unos individuos a otros. Como ya mencionamos la fracción del plasma más importante será la que se encuentre adyacente a la formula roja (1 ml). Un detalle importante que se debe mencionar es que si después de centrifugar se observa un tubo con hematíes, este tubo debe desecharse pues la muestra presenta hemólisis, lo cual causa alteraciones en la formación del coágulo e incluso pequeños microcoágulos.

4. Una vez habiendo obtenido la fracción del plasma rico en factores de crecimiento, para obtener el coágulo se añadirán 0.05 ml de cloruro de calcio al 10%, y entre 5 y 8 minutos se formará el coágulo.

El tiempo variará en relación inversa con el número de plaquetas, es decir a mayor número de plaquetas menor el tiempo para la formación del agregado.

Una variante consiste en añadir material de injerto al plasma activado, y entre 2 y 5 minutos se formará un agregado que contendrá el injerto, con una consistencia gomosa fácil de manejar y cómoda de compactar.



Coágulo de plasma rico en factores de crecimiento.

Técnica quirúrgica utilizada en los conejos

Primer tiempo quirúrgico:

1. Habiendo sujetado al animal a la mesa de trabajo y previa sedación con anestesia intravenosa, en la pata derecha se infiltra con xilocaína con epinefrina a nivel del sitio de la incisión, se incide y disecciona hasta hueso.
2. Se crea una brecha ósea de aproximadamente 1 cm con un perforador eléctrico.
3. Se coloca el gel de PRGF en la brecha ósea.
4. Sutura de músculo vicryl 4-0, sutura de piel nylon 4-0.
5. Se realiza mismo procedimiento en pata contralateral, pero sin la administración del gel de PRGF.

Colocación de gel de PGRF en brecha ósea.

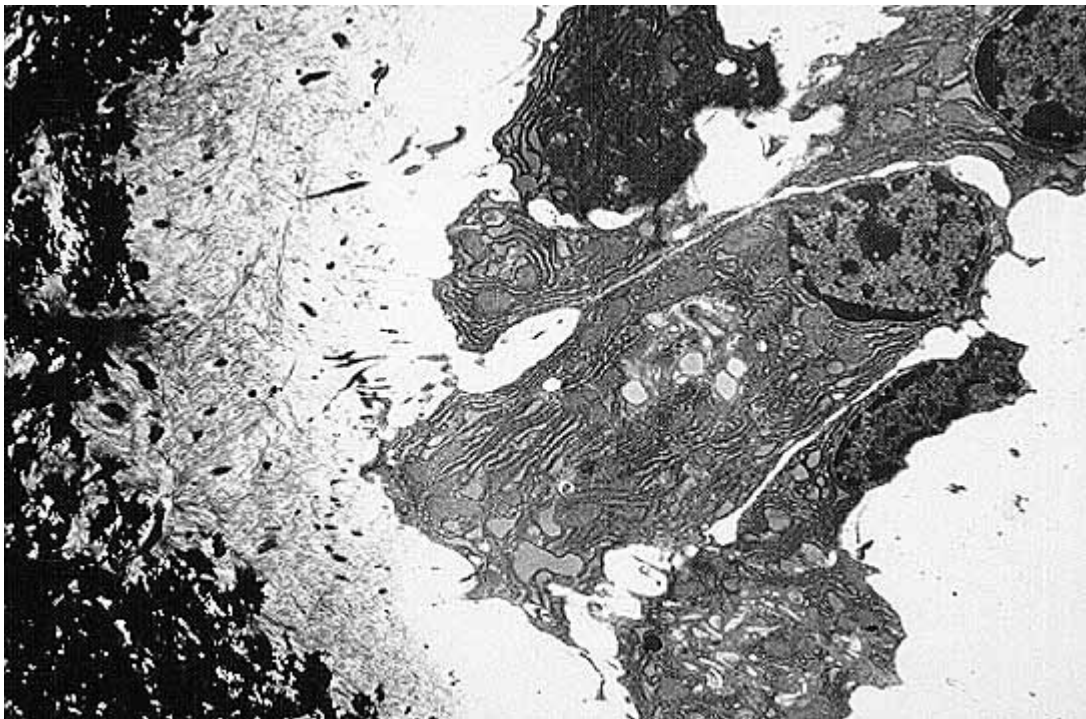
Segundo tiempo quirúrgico:

(Cuatro semanas después)

1. Sujetado el animal a la mesa de trabajo y bajo anestesia general intravenosa y local, se incide hasta sitio previo de brecha ósea en pata derecha.
2. Toma de biopsia de brecha ósea con osteotomo o cucharilla.
3. Cierre por planos, según se describe previamente.
4. Mismo procedimiento pata contralateral.

Toma de biopsia con osteotomo.

Las biopsias tomadas se fijaron en formol al 10% y se incluyeron en cera de parafina. Se obtuvieron secciones de un espesor de 5 micras de cada biopsia y se tiñeron con hematoxilina y eosina. Las secciones teñidas se fotografiaron. Todas las biopsias se enviaron a un laboratorio de análisis sin especificar cual era el grupo control y cual el problema.



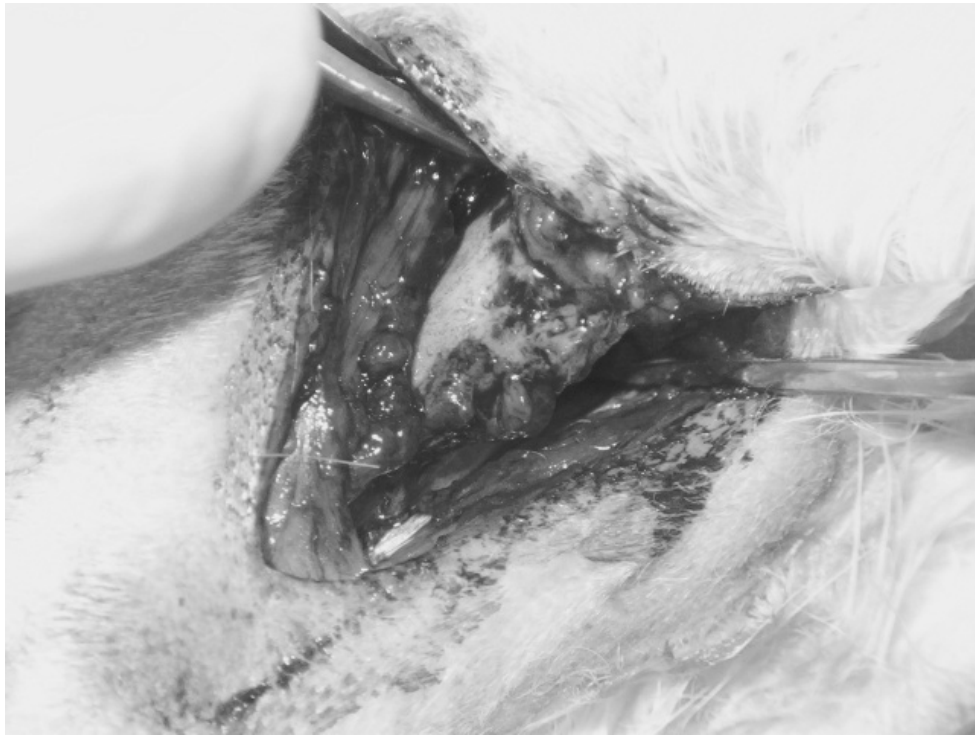
Osteoblastos sobre un ribete de osteoide. Obsérvese que el osteoblasto del centro presenta el núcleo en el extremo opuesto a la zona de contacto con el hueso. El osteoide se observa como un material finamente fibrilar de color gris y por debajo del mismo se sitúa el hueso mineralizado en color negro (Microscopía electrónica x 3400).

RESULTADOS

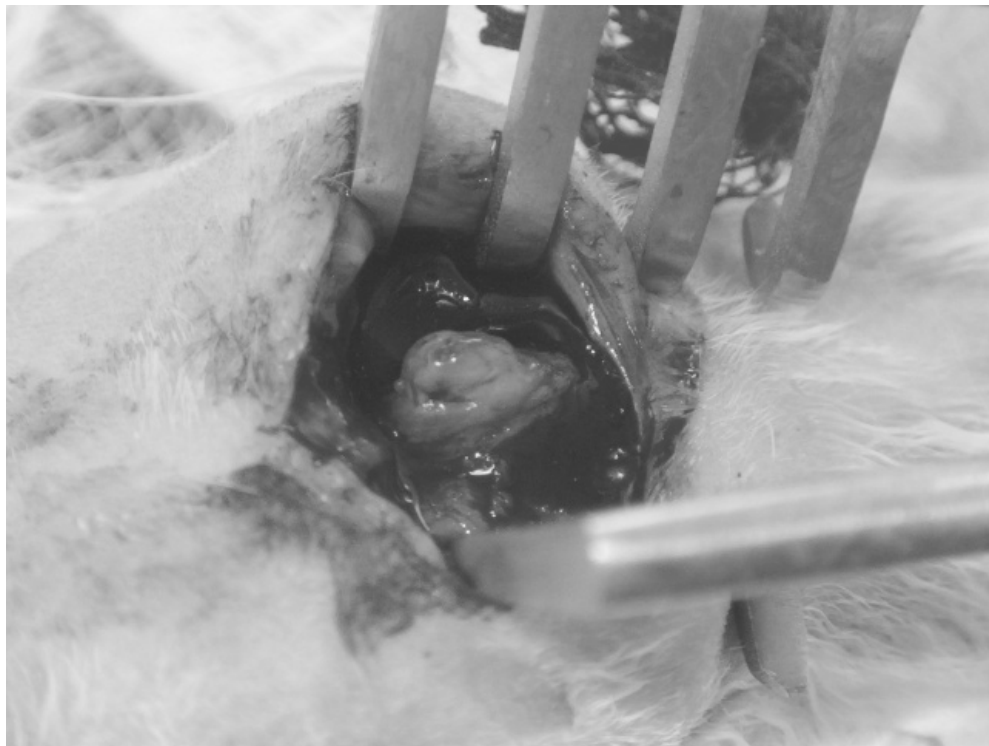
El total de los animales de experimentación completaron el estudio, no se presentaron casos de infección, solo en dos conejos se apreció la pérdida de extensión de la pata, quizá por compresión nerviosa durante el momento de la cirugía. Así mismo la cicatrización de todos los conejos se calificó de buena o excelente.

La regeneración de las áreas tratadas fue completa en los todos los casos. La regeneración fue evaluada por comparación de las áreas tratadas y las no tratadas. Las biopsias de estas áreas mostraron hueso compacto maduro con trabéculas bien organizadas y morfología normal.

En las 10 biopsias del grupo control se encontró una situación bastante homogénea a la reapertura. Todos ellos mostraron tejido conectivo rellenando la mayor parte del defecto, en claro contraste con los casos tratados con PRGF. Estas biopsias mostraron tejido conectivo con algunas trabéculas óseas. El grado de cicatrización se considero como normal.



Brecha ósea después de 4 semanas con regeneración ósea dentro normalidad.

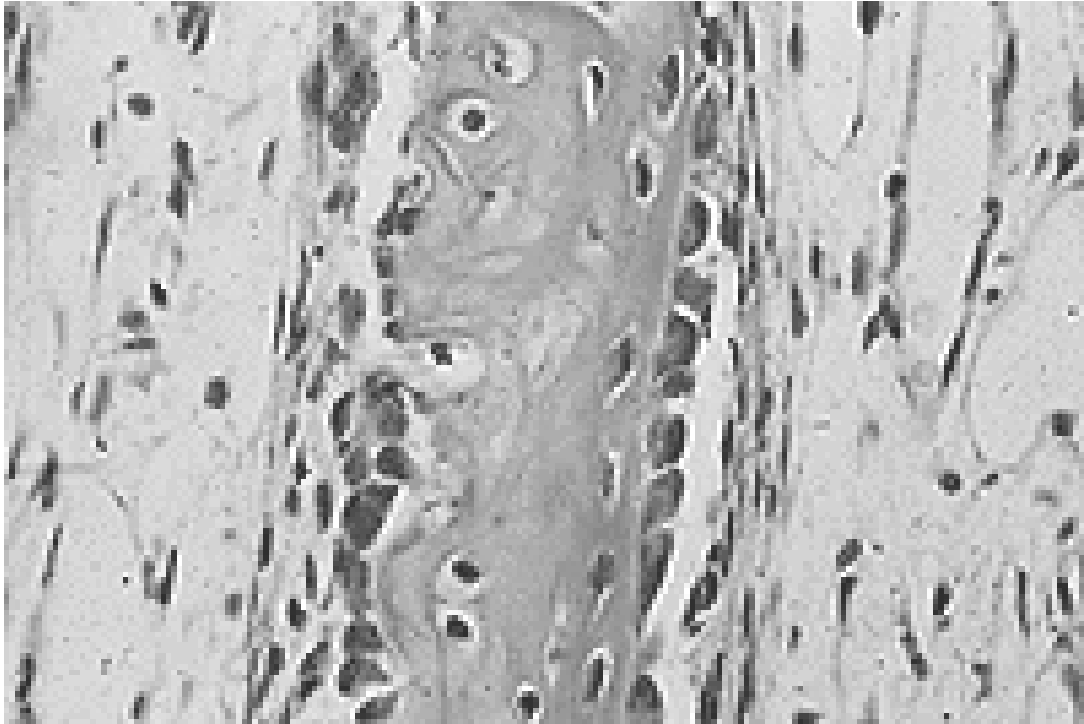


Brecha ósea tratada con PRGF 4 semanas después con sobrecrecimiento óseo.

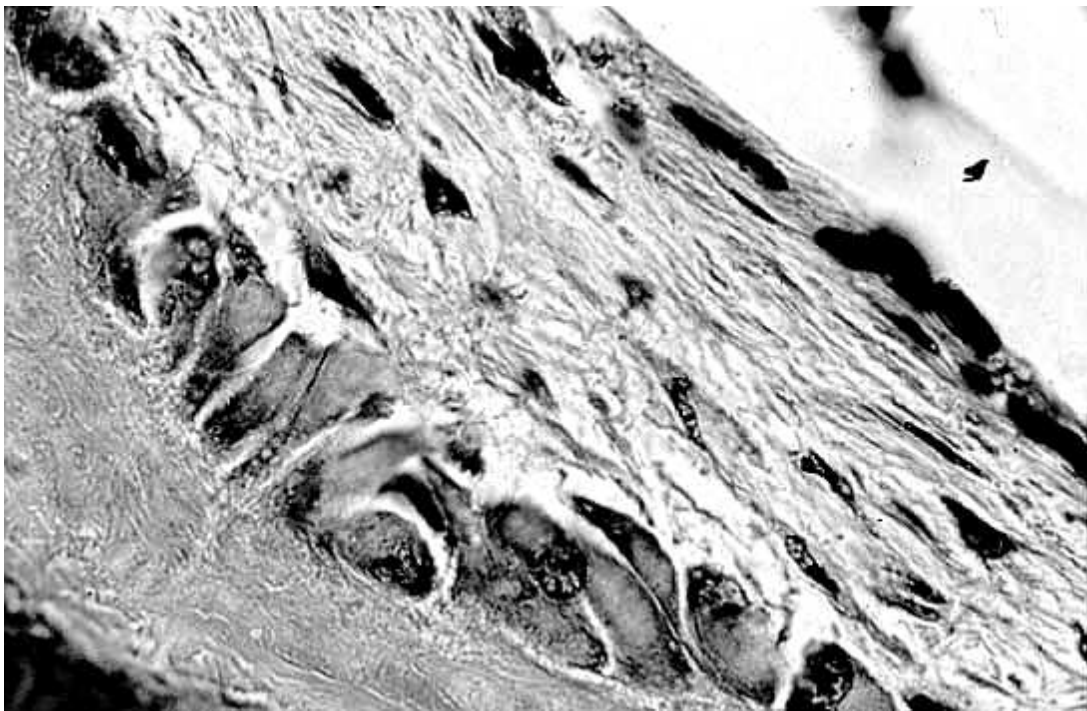
En cuanto a la celularidad observada en nuestro estudio fue la siguiente en los que se utilizó PRGF fue promedio fue 33.2 vs 19.3 sin PRGF.

Número de Conejo	Celularidad con PRGF	Celularidad sin PRGF
1	33	16
2	35	18
3	36	19
4	37	22
5	29	20
6	38	21
7	28	19
8	33	18
9	32	16
10	31	14

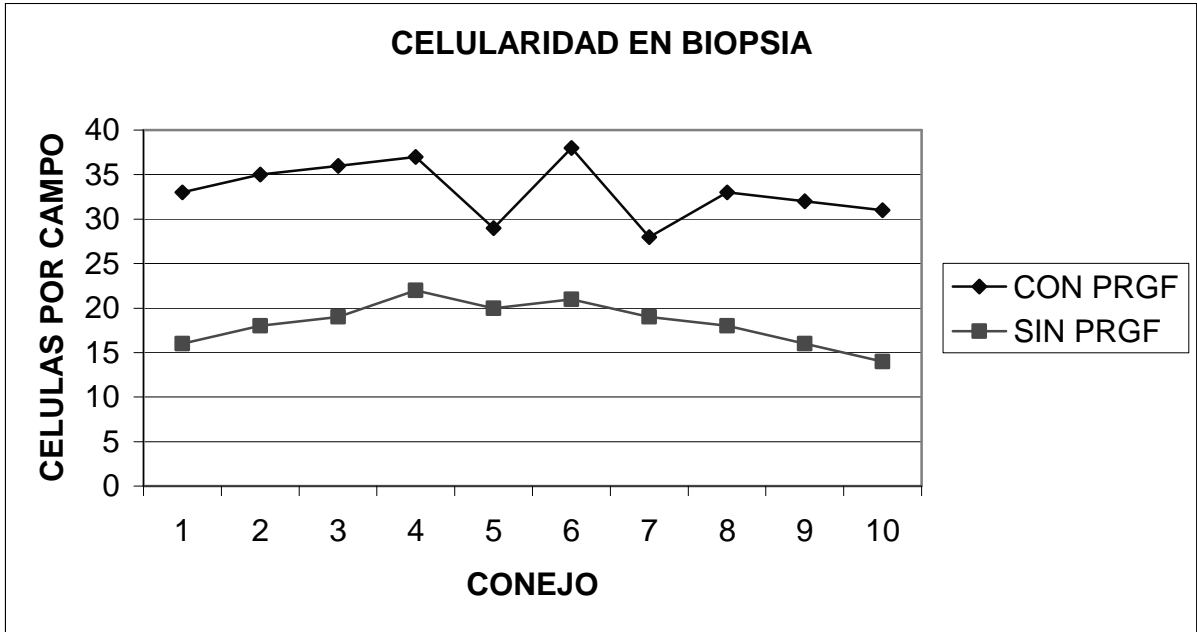
Se utilizó la t de student para el análisis de los resultados con un valor de p igual a 0.05. Los resultados obtenidos fueron para t 11.26, lo cual resulta estadísticamente significativo.



Biopsia donde NO se colocó PRGF los hallazgos la mayor parte tejido conectivo con algunas trabéculas en su interior y escasos osteocitos.



Biopsia del sitio donde se colocó PRGF los hallazgos en las biopsias fueron: trabéculas bien ordenadas con aspecto de hueso compacto y osteocitos en el interior con una morfología celular típica.



El gráfico representa la celularidad observada en el grupo tratado con PRGF en comparación con el no tratado. Se advierte el mayor número de células constante en todos los casos tratados con PRGF.

DISCUSION

Estudios previos habían identificado a las plaquetas como una fuente rica en PDGF y TGF- β (12). El uso de PRGF proporciona las condiciones para obtener una regeneración ósea más rápida y efectiva. El gel de PRGF es de fácil manejo pero debe emplearse sin demora para conservar la actividad de los factores de crecimiento. Además de éstos, las proteínas presentes en las plaquetas pueden actuar conjuntamente con otras citoquinas liberadas desde otras fuentes celulares modulando la homeostasis (8). Nuestros resultados indican que el refuerzo de la concentración de factores de crecimiento a través de la aplicación de PRGF en una brecha ósea acelera la regeneración ósea.

Las ventajas que presenta este producto son las siguientes: agente hemostático perfecto, sella en minutos, no es tóxico, se reabsorbe y además promueve el crecimiento y la reparación del tejido donde se aplica. Además que por ser producto autólogo evita riesgos de infección de enfermedades virales como la hepatitis y el VIH, entre otras.

No existen referencias con respecto a la utilización del PRGF a nivel de huesos de la mano, nuestro estudio demuestra su utilidad en brechas óseas en huesos semejantes a falanges y metacarpianos. El valor del PRGF a nivel huesos de la cara ya ha sido demostrada por estomatólogos y cirujanos maxilofaciales, así por ejemplo al realizar una extracción de un órgano dental rellenan el espacio con gel de PRGF encontrando una regeneración ósea al cabo de 16 semanas encontrando el sitio ideal para la colocación de un implante dental a nivel de mandíbula (18); además se ha utilizado en el seno maxilar para su relleno en conjunto con hueso liofilizado con excelentes resultados en cuanto a la regeneración ósea.

Hasta el momento actual no se ha encontrado ningún efecto negativo en la utilización del PRGF. La regeneración y epitelización en el 100% de los casos ha sido óptima y significativamente mejor que en las zonas control. Se ha encontrado regeneración ósea de hueso maduro en mayor cantidad y calidad que en las zonas control, como lo ha demostrado Anitua en diversos estudios clínicos (20).

CONCLUSIONES

1. El gel de plasma rico en factores de crecimiento plaquetario aumenta la regeneración ósea en huesos largos.
2. Es factible la obtención y uso del gel de plasma rico en plaquetas a nivel hospitalario.
3. Debe continuarse la investigación clínica del plasma rico en factores de crecimiento en defectos óseos de huesos en mano, y así demostrar los beneficios tal como ya lo han demostrado en huesos de cara los cirujanos maxilofaciales.

REFERENCIAS

1. Urist MR. Bone formation by autoinduction. *Science*. 1965. 150: 893.
2. Urist MR. The search for and the discovery of bone morphogenetic protein in Bone Grafts, derivatives and substitutes. Oxford, England. Butterworth-heinemann. 1994, 315-362.
3. Giannobile WV, Finkleman RD, Lynch S. Comparison of canine and non-human primate animal models for periodontal regenerative therapy: results following a single administration of PDGF/IGF-I. *J Periodontol*. 1994, 65: 1158-1168.
4. Antoniades HN. Human platelet derived growth factor (PDGF): Purification of PDGF-I y -II and separation of their reduced subunits. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981, 78: 7314-7317.
5. Bowen Pope DF, et al. Is PDGF really important? Testing the hipótesis. *Trenes Genet*. 1991. 7: 413-418.
6. Soriano P. Abnormal kidney development and hematological disorders in PDGF β receptor mutant mice. *Genes Dev*. 1994, 8: 1888-1896.
7. Heldin CH. Signal transduction via plateled derived growth factor receptors. *Biochim Biophys Act*. 1998; 1378 (1): F79-113.
8. Clunn GF, Refson JS, Lymn JS. Plateled derived growth factor β -receptors can both promote and inhibit chemotaxis in human vascular smooth muscles cells . *Arterioscl Throm Vas*. 1997. 17 (11): 2622-29.
9. Kingsley DM. The TGF β superfamily: new members, new receptors, new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev*. 1994; 8: 133.
10. Lawrence DA. Transforming growth factor β : a general review. *Eur cytokine netw*. 1996. 7:363.

11. Cox DA, Maurer T. Transforming growth factor β . Clin Immunol Immunopathol. 1997. 83 (1): 25-30.
12. Alevizopoulos A, Mermoud N. Transforming growth β factor : the breaking open of a black box. Bio Essays. 1997. 19(7): 581-91.
13. Canalis E, McCarthy T, Centrella M. Isolation and characterization of insulin-like growth factor I (somatomedin-C) from cultures of fetal rat calvario. Endocrinology. 1988. 122: 22-27.
14. McCarthy TL, Centrella M, Canalis M. Insulin-like growth factor (IGF) and bone. Connect Tissue Res. 1989. 20: 277-282.
15. Roldan J.C. et al. Bone formation in the presence of platelet rich plasma vs bone morphogenetic protein-7. Bone. 2004, 34(1): 80-90.
16. Howell TH, et al. A phase I/II clinical trial to evaluate a combination of recombinant human platelet derived growth factor-I. in patients with periodontal disease. J periodontol. 1997. 68(12): 1186-93.
17. Vishnu K Rumalla and Gregory L. Borah. Cytokines, Growth factors and Plastic Surgery. Plast Reconstr Surg. 2001. 108: 719.
18. Fernandez LRG y cols. Plasma rico en factores de crecimiento en cirugía bucal. Revista Odontológica Mexicana. 2005. 9(3): 141-146.
19. Roldan J.C. et al. Sinus floor augmentation with simultaneous placement of dental implant in the presence of platelet rich plasma or recombinant human bone morphogenetic protein-7. Clin Oral Implants Res. 2004. 15(6): 716-23.
20. Anitua Aldecoa Eduardo. Un nuevo enfoque en la regeneración ósea. Primera edición. Molca. España. 275 páginas.