



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE DERMATOLOGÍA,
ESTOMATOLOGÍA, RADIOLOGÍA Y MEDICINA FÍSICA

***“EFECTO DEL PLASMA RICO EN FACTORES DE
CRECIMIENTO (PRFC) EN LA REGENERACIÓN EN
TEJIDOS BLANDOS Y TEJIDO ÓSEO.
ESTUDIO EXPERIMENTAL EN CONEJOS ALBINOS
DE NUEVA ZELANDA.”***

MEMORIA DE TESIS DOCTORAL

FRANCISCO MOLINA MIÑANO

MURCIA, 2008

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría dar mis más sinceros agradecimientos a mis directores:

A la doctora María Pía López Jornet gracias por darme la oportunidad de formar parte del mundo de la investigación y de la Medicina Bucal. Gracias por darme la oportunidad de poder estar escribiendo estas palabras, que nunca podrán expresar la admiración y el agradecimiento hacia ti. Gracias por tu apoyo y por tu paciencia. Nunca lo olvidaré.

Al doctor Fabio Camacho Alonso, profesor, compañero y, sobre todo, amigo. Quien a pesar de muchas ocupaciones y dificultades trabajó para sacar esta tesis adelante, y creo que incluso en ocasiones disfrutó con ello. Han sido unos años inolvidables.

Al doctor Vicente Vicente Ortega, por saber tener paciencia conmigo y poner a mi disposición todos sus conocimientos y sabiduría, tanto en lo profesional como en lo personal.

A José Víctor y a Nuria, por su gran trabajo y ayuda, en el laboratorio, con ellos el camino ha sido más fácil.

A todos mis compañeros y amigos que trabajan y colaboran con la Unidad Docente de Medicina Bucal por estar ahí, en los momentos buenos y malos.

Al personal del Servicio de Apoyo a la Investigación (SAI) por toda su ayuda.

A mis padres, Francisco y Maria Encarnación, GRACIAS por esta oportunidad única que me habéis ofrecido, no sé cómo agradeceros todo el esfuerzo que habéis tenido que realizar para que pueda estar donde estoy. GRACIAS.

A mi hermana Isabel María, por esos momentos únicos y llenos de felicidad que compartimos.

A mis abuelos, por creer en mí y no dejarme desfallecer, hasta que se hicieran realidad mis sueños.

A mi novia, María, que ha sabido comprender la importancia que para mí ha representado el poder realizar este proyecto, por entender mis ausencias y mi carácter. Gracias por todo tu apoyo y comprensión, que me ha ayudado tanto durante este tiempo.

A mis amigos, por estar ahí, a pesar de la distancia.

Y a todos aquellos que han creído en mí y me han apoyado.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	4
I. INTRODUCCIÓN	5
Reglamentación general.	
Cavidad Bucal.	7
Heridas.	9
Curación de las heridas.	12
El hueso y los injertos óseos.	24
Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRFC).	47
II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	63
III. MATERIAL Y MÉTODOS	66
MATERIAL	67
MÉTODOS	73
IV. RESULTADOS	100
En tejidos blandos.	101
Forma aplicación: Gel o infiltrado.	122
Radiológicos.	126
Histomorfometría.	134
V. DISCUSIÓN	142
VI. CONCLUSIONES	155
VII. BIBLIOGRAFÍA	157
VIII. APÉNDICE ESTADÍSTICO	174

ABREVIATURAS

BMPs	Proteínas Morfogenéticas óseas
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EVGF	Factor de Crecimiento Endotelial Vascular
EFC-Hep	Factor de Crecimiento unido a Heparina
FCE	Factor de Crecimiento Epidérmico
FCFα	Factor de Crecimiento Fibroblástico alfa
FCFβ	Factor de Crecimiento Fibroblástico beta
GFs	Factores de Crecimiento
IGF	Factor de Crecimiento similar a la Insulina
IL-1	Interleukina 1
IL-6	Interleukina 6
KCF	Factor de Crecimiento de Queratinocitos
MSCs	Células Mesenquimales Indiferenciadas
PDGF	Factor de Crecimiento Derivado de las Plaquetas
PMNS	Polimorfonucleares neutrófilos
PRFC	Plasma Rico en Factores de Crecimiento
PRP	Plasma Rico en Plaquetas
TGFα	Factor de Crecimiento Transformante alfa
TGFβ	Factor de Crecimiento Transformante beta

I. INTRODUCCIÓN

El investigador y el cuidador deben asegurar un adecuado bienestar a los animales de experimentación según las normativas vigentes para cada especie animal en cuanto a ciclos de luz, temperatura, humedad, ruido, limpieza, socialización, entre otros aspectos.

Asimismo, la sensibilidad de la comunidad científica y la presión de la opinión pública frente a la utilización de los animales de experimentación son cada vez más evidentes, lo que se demuestra en las numerosas publicaciones, reuniones, simposios y congresos al respecto, así como en el gran número de sociedades que han ido desarrollándose preocupadas por el bienestar del animal de laboratorio.

REGLAMENTACIÓN GENERAL.

Estas disposiciones se encuentran especificadas en diferentes sectores legislativos como, por ejemplo, normas básicas que deben cumplir los estabularios, protección de la naturaleza, protección de los animales respecto a los actos de crueldad, entre otros (**Directiva 98/81/CEE de 26 de octubre de 1997, D.O.C.E. 5 de diciembre de 1998, B.O.E. nº 268, 8 de noviembre de 2007**).

La experimentación animal comenzó en los siglos I y II d.C., cuando Galeno realizó disecciones en animales. Durante la Edad Media dejaron prácticamente de realizarse experiencias en animales, volviendo a resurgir en los siglos XVII y XVIII, cuando se llevó a cabo el progreso en la experimentación animal, hasta llegar al siglo XIX, en el que Claude Bernard crea el término de “medicina experimental”, que se opone totalmente a la medicina tradicional hipocrática, a la que clasificó de pasiva y expectante, en contraposición con la medicina experimental, que se consideraba activa y basada en la realización de experimentos (**Mármol, 2004**)

En cuanto a la reglamentación, hay cuatro puntos básicos: a) régimen de autorización, esto es, las experiencias científicas o experimentales con animales no pueden ser practicadas más que por personas autorizadas; b) condiciones adecuadas de tenencia y mantenimiento de los animales, y control de procedencia; c) procedimientos experimentales aprobados por un comité ético de experimentación animal, y d) control de los experimentos por parte del comité así como por una unidad de garantía de calidad

del centro. De estos puntos se deduce que la competencia se encuentra íntimamente ligada con la responsabilidad.

Por lo que respecta a la limitación, las experiencias con animales sólo se deben realizar cuando los estudios hagan esperar un resultado científico hasta ahora no confirmado, o bien si ayudan a esclarecer problemas sin solución actual.

En definitiva, si bien es cierto que cada vez son más las directrices, reglamentaciones y leyes que regulan la utilización de animales con fines experimentales, la incesante innovación tecnológica y científica hace que las actuales normativas deban revisarse constantemente para asegurar un adecuado grado de calidad y seguridad en la ética y legislación de la experimentación animal.

CAVIDAD BUCAL DEL CONEJO ALBINO DE NUEVA ZELANDA.

La cavidad bucal del conejo de Nueva Zelanda, como ocurre con otros animales, incluido el hombre, tiene dos porciones diferenciadas: el vestíbulo de la boca y la cavidad bucal propiamente dicha (**Vázquez-Autón, 1999**):

VESTÍBULO DE LA BOCA: Es el espacio comprendido entre la cara vestibular de los dientes y los labios y los carrillos. Didácticamente se divide, a su vez, en dos vestíbulos:

Vestíbulo labial: Espacio comprendido entre los dientes incisivos y los labios superior e inferior, y que está formado por los siguientes elementos.

Labio superior:

- Filtro o surco subnasal → hendidura longitudinal del labio superior, en carnívoros y pequeños rumiantes.
- Frenillo del labio superior → pliegue medio de la mucosa que une el labio superior y la encía.

Labio inferior: Frenillo del labio inferior → pliegue medio de la mucosa que une el labio inferior y la encía.

Abertura de la boca: Hendidura entre los labios superior e inferior.

Ángulo de la boca: Corresponde a la comisura de los labios o zona de unión entre los labios superior e inferior.

Vestíbulo bucal: Corresponde al espacio comprendido entre los dientes premolares y molares y los carrillos.

Papila parotídea: Pequeña elevación en la mucosa del carrillo determinada por la desembocadura del conducto parotídeo.

CAVIDAD PROPIA DE LA BOCA: Es el espacio comprendido entre los dientes. Queda limitada caudalmente por el bode rostral de los arcos palatoglosos; rostro-lateralmente por la cara lingual de los dientes y la encía; dorsalmente por el paladar duro y centralmente por la lengua y los recesos sublinguales laterales.

Paladar duro: Es el paladar óseo revestido por una mucosa fuertemente cornificada. Causalmente se continúa con el paladar blando.

Crestas o rugosidades palatinas: Son crestas transversas de la mucosa del paladar duro. Su número varía según la especie, siendo el cerdo quien más rugosidades palatinas presenta.

Rafe del paladar: Línea media de unión de ambas mitades del paladar duro. Hacia él convergen las rugosidades palatinas.

Papila incisiva: Elevación de la mucosa bucal en el extremo rostral del paladar duro, a nivel del rafe del paladar. En ella se abren los conductos incisivos.

Lengua

Vértice de la lengua → extremo rostral de la lengua.

Cuerpo de la lengua → parte de la lengua comprendida entre el vértice y la raíz.

Raíz de la lengua → Parte de la lengua caudal a las papilas gustativas valladas o circunvaladas, donde nos encontramos con la *Tonsila Lingual* que es un tejido linforreticular en la raíz de la lengua.

Bordes de la lengua.

Dorso de la lengua, donde encontramos:

- Surco medio de la lengua → hendidura longitudinal en el dorso de la lengua, muy manifiesta en el perro.

- Papilas linguales → son de dos tipos: mecánicas (filiforme, cónicas y lentiformes) y gustativas (fungiformes, valladas y foliadas).

Caras ventrales de la lengua

- Frenillo de la lengua → pliegue de mucosa que une el extremo rostral de la lengua al suelo de la cavidad propia de la boca.

Suelo de la cavidad propia de la boca: Es el límite ventral de la cavidad bucal propiamente dicha, y en ella podemos observar:

Receso sublingual lateral: Espacio ventral a la lengua, entre el frenillo de la lengua y la mandíbula (cara lingual).

Pliegue sublingual: Pliegue de la mucosa del receso sublingual lateral donde desembocan los conductos sublinguales menores de la glándula sublingual.

Carúncula sublingual: Elevación de la mucosa cerca del extremo rostral del pliegue sublingual y rostrolateral del frenillo. En ella desemboca el conducto mandibular (glándula mandibular) y el sublingual mayor (glándula sublingual).

HERIDAS

CONCEPTO: Una herida es una solución de continuidad del tejido afectado por una falta de absorción de la fuerza traumática que las ha provocado. Cuando el tejido que ha sido dañado no puede curar de forma natural, debe ser reparado manteniendo sus bordes unidos por medios mecánicos, hasta que hay cicatrizado lo suficiente como para resistir tensiones sin necesidad de dichos soportes (**Cohen, 1994**).

CLASIFICACIÓN.

Existen múltiples clasificaciones (**Bowler, 2001**):

Según el espesor de los tejidos afectados:

- Epidérmicas o Arañazos: la pérdida afecta exclusivamente a parte de la epidermis.
- Erosión: pérdida de sustancia o desprendimientos de epidermis, sin afectar a la membrana basal.
- Superficiales: hasta tejido celular subcutáneo.

- Profundas, complicadas o complejas: afectan a tejidos más profundos.
- Penetrantes: a cavidades naturales, habitualmente no comunicadas con el exterior (abdomen, tórax, articulaciones, etc.).
- Perforantes: afectan a vísceras huecas albergadas en aquellas cavidades.
- Por empalamiento: por orificio anal o vaginal.

Según la dirección

- Longitudinales/ Transversales/ Oblicuas/ Espiroideas.

Según la forma

- Simples.
- Angulares.
- Estrelladas.
- Avulsivas o con colgajos
- Con pérdida de sustancia

Según el agente que los provoca:

- Incisas: por instrumentos cortantes y se caracterizan por bordes limpios y netos.
- Contusas: por instrumentos romos y se caracterizan por bordes irregulares y desflecados.
- Penetrantes: producidas por agentes punzantes.

MANIFESTACIONES CLÍNICAS.

- **General:** síncope o lipotimia (por el dolor o estado emocional), shock hipovolémico (si la hemorragia es importante), cuadros clínicos por afectación de órganos.
- **Local:** dolor, hemorragia (arterial: sangre roja con latidos; venosa: oscura y sin presión; capilar: roja en sábana), y separación de los bordes de la herida.

DIAGNÓSTICO.

Consiste en:

- Conocer el tiempo transcurrido y mecanismo de la misma.
- Determinar la existencia de hemorragia activa.
- Revisar si existe daño a nervios, tendones, músculos y huesos.
- Buscar posible afectación de órganos.
- Valorar la viabilidad de los tejidos afectados.

TRATAMIENTO.

La curación satisfactoria de una herida se produce por cicatrización de la misma. Su tratamiento básico consistirá en afrontar por planos sus bordes y mantener este contacto en reposo el tiempo suficiente para que el organismo ponga en marcha el fenómeno de la cicatrización (**Bowler, 2001**), que puede ser:

Por primera intención: Se realiza de forma inmediata; es la más frecuentemente utilizada y la que produce una cicatriz de mejor calidad y en el menor tiempo posible. Se realiza en las primeras 24 horas y cuando esta no está contaminada y es posible obtener unos bordes regulares que permitan un aceptable afrontamiento de los mismos.

Por segunda intención o diferida: Se produce cuando el cierre se ha demorado más de 24 horas. Requiere un Friedrich o refresco de sus bordes previamente a la sutura o bien se deja que cierre sin nuestra intervención. Produce una cicatriz de peor calidad y tarda más tiempo en curar.

Asimismo se deben valorar los daños a otros tejidos y realizar lavado enérgico tanto de la herida como de las regiones adyacentes con agua y jabón neutro, seguida de abundante irrigación con solución salina; rasurado de las zonas cercanas a la herida. Hemostasia con compresión digital o gasas, mediante ligaduras o incluso con bisturí eléctrico.

Se deben tener en cuenta dos factores para decidir en qué momento se realizará el cierre de la herida:

Aspecto de la herida: Presencia de suciedad, cuerpo extraños, cuantía de la necrosis, desvitalización, vascularización y presencia de signos inflamatorios (celulitis perilesional, edema, olor, etc.).

Tiempo de producción: Va a determinar en gran medida la actitud a seguir. Si han pasado menos de 3 horas, se procederá al cierre primario. Si han pasado entre 3 y 12 horas, se realizará cierre primario, aunque la tasa de infección será mayor. Si han pasado más de 12 horas, se valorará la localización y la posible infección local, ya que en la mayoría de las heridas no estaría indicado el cierre primario; se puede hacer un Friedrich y revisión en 24 horas, y si en este intervalo no aparecen signos inflamatorios ni necrosis, se puede hacer un cierre diferido en 48-72 horas (**Bowler, 2001**).

Por último, aproximaremos los bordes mediante técnicas de suturas por planos (eliminando espacios muertos y evitando el acumulo de secreciones que formarían semoras, hematomas o abscesos), sin tensión, con el mínimo material extraño y

manteniéndola en reposo. Utilizando para ello: puntos de sutura, agrafes, puntos de esparadrapo, o pegamentos tisulares (**Quinn, 2000**).

Para prevenir la contaminación, deben ser aisladas del medio ambiente, protegerlas y para mayor comodidad del paciente, las heridas se cubren con apósitos. En las heridas no complicadas, basta con gasas secas cuando no se ha dejado un drenaje; en heridas muy amplias, exudativas o en las que se prevé una fuerte reacción inflamatoria, se colocarán apósitos con abundantes gasas o compresas que recojan esas secreciones y ligeramente compresivos para contrarrestar el edema.

La herida debe mantenerse en reposo durante el tiempo que dure su cicatrización, ya que el movimiento de la zona aumenta la tensión de los bordes, aumentando la irritación de los puntos de sutura o adhesivos tisulares e interfiriendo con el proceso cicatricial.

La retirada de los puntos de sutura (en caso de no ser reabsorbibles o de no usar adhesivos tisulares) se realizará cuando la cicatriz formada sea capaz de mantener la unión de los bordes de la herida por sí sola. Esto depende en gran medida del espesor de los tejidos afectados, extensión de la herida y del tipo y material de sutura empleado en la misma. Lo habitual es mantener los puntos durante una semana a 12 días (**Parell, 2003**).

CURACIÓN DE LAS HERIDAS

La cicatrización comprende una serie de procesos encaminados a reparar el daño tisular. La reparación de una herida es un proceso dinámico que requiere la participación de diversos mecanismos que actúan de forma sinérgica e interactiva (**Cohen, 1994**).

Los principales factores implicados en la cicatrización son:

- Las células sanguíneas.
- Los mediadores solubles (citoquinas).
- La matriz extracelular.
- Las células parenquimatosas.

Las citoquinas, son hormonas sintetizadas por diversas células que regulan una gran variedad de procesos. Sus acciones se producen localmente o a distancia, y se clasifican en:

- *Acción endocrina*: actuando sobre receptores situados a distancia utilizando como medio de transporte el torrente sanguíneo.
- *Acción paracrina*: sobre los receptores de células vecinas.
- *Acción autocrina*: sobre los receptores de la propia célula que la produce.
- *Acción intracrina*: sobre su propio citoplasma sin ser secretada fuera de las células.

La mayor parte de las citoquinas actúan de forma sinérgica, utilizando varios mecanismos. En la tabla 1 se expone una relación de las citoquinas más importantes que participan en el proceso de cicatrización.

La excesiva producción de TGF β se ha visto relacionada con la formación de cicatrices hipertróficas y queloides.

Los principales componentes de la sustancia fundamental intercelular son:

- *Colágeno*: es una molécula con tres cadenas peptídicas, y es la única proteína con hidroxiprolina. Las prolinas son hidroxiladas después de sintetizadas las cadenas. Es sintetizado en los fibroblastos en forma de procolágeno, y una vez glicosilado, se secreta al espacio intercelular en forma de colágeno. En este espacio forma un entramado por medio de la lisil-oxidasa. El colágeno es degradado por colagenasas. Existen al menos trece tipos de colágeno, y el tipo I es el más importante.
- *Elastina*.
- *Fibronectina, laminina, proteoglicanos y ácido hialurónico*.

Tabla 1. Citoquinas que afectan a la cicatrización de heridas (Chao, 2003).

Citoquinas	Células productoras	Célula diana y efectos principales.
<i>Familia de factores de de crecimiento epidérmico</i>		<i>Regeneración epidérmica y mesenquimal.</i>
EGF	Plaquetas	Proliferación y movilidad células pleiotrópicas
TGF α	Macrófagos, células epidérmicas	
EGF-Hep	Macrófagos	
<i>Familia de factores de crecimiento fibroblástico</i>		<i>Vascularización de la herida</i>
FGF- β	Macrófagos, células endoteliales	Proliferación fibroblástica y angiogénesis
FGF- α	Macrófagos, células endoteliales	
KGF	Fibroblastos	Proliferación y motilidad de las células epidérmicas
<i>Familia de factores β de crecimiento transformante</i>		<i>Fibrosis y fortalecimiento de la resistencia de la cicatriz</i>
TGF β_1 y β_2	Plaquetas y macrófagos	Motilidad epidérmica Quimiotaxis de macrófagos y fibroblastos Síntesis de matriz extracelular Remodelación
TGF β_3	Macrófagos	Efectos anticicatriciales
<i>Otros</i>		
PDGF	Plaquetas, macrófagos y células epidérmicas	Proliferación fibroblástica, quimiotaxis y activación de macrófagos
VEGF	Células epidérmicas, macrófagos	Angiogénesis y aumento de la permeabilidad vascular
TNF α	Neutrófilos	Expresión pleiotrópica de factores de crecimiento
IL-1		
IGF	Fibroblastos, células epidérmicas	Reepitelización y formación del tejido de granulación
F. estimulante de colonias 1	Múltiples células	Activación de macrófagos y formación de tejido de granulación

FASES DE LA CICATRIZACIÓN DE LAS HERIDAS.

Las limitaremos a la cicatrización de las heridas mucosas y cutáneas, proceso que supone regeneración epitelial y formación de cicatriz de tejido conjuntivo, por lo que puede servir como ejemplo de los principios generales aplicables a la curación de todas las heridas. Sin embargo, hay que tener en cuenta que cada tejido del organismo posee células y características específicas que pueden modificar el esquema básico expuesto.

En el proceso de cicatrización se pueden distinguir diversas fases. Estas fases de la reparación de las heridas se suceden y se solapan progresivamente para dar lugar a la cicatriz, y son: hemostasia, inflamación, reparación o formación tisular y remodelación (Cotran, 2000).

Fase de hemostasia: Inmediatamente, tras la agresión quirúrgica, se produce una vasoconstricción por la liberación de catecolaminas en un primer intento hemostático del organismo. En este instante las plaquetas producen fibrina y se liberan los mediadores de la inflamación. El coágulo sanguíneo mantiene la hemostasia y sirve de “matriz extracelular” para la migración celular (Yücel, 2003).

Fase de inflamación: como respuesta a la agresión, y una vez finalizado el fenómeno de vasoconstricción transitoria, tiene lugar una vasodilatación con aumento de la permeabilidad capilar y migración celular. Esta respuesta, propia de la inflamación, se debe a la liberación de mediadores, como son las citoquinas, histamina y prostaglandinas. Los elementos celulares que más participan son:

- Las *plaquetas*: que además de participar en la hemostasia, son células secretoras de importantes mediadores para la cicatrización como, el factor de crecimiento derivado de las plaquetas que atrae y activa a macrófagos y fibroblastos.
- Los *neutrófilos*: realizan la fagocitosis de partículas extrañas y bacterias. Después de realizar su labor, sus restos son expulsados con la escara de fibrina o fagocitados por los macrófagos.
- Los *monocitos*: que habitualmente circulan por el torrente sanguíneo son también reclutados por quimiotaxis. Estos se transforman en macrófagos activados que liberan diversos factores de crecimiento que favorecen el inicio de la formación del tejido de granulación. Los macrófagos se adhieren a la matriz extracelular y hacen que otros monocitos se transformen en

macrófagos inflamatorios y reparadores. Los macrófagos tienen un papel fundamental en la transición entre inflamación y reparación (**Coulombe, 2003**).

Fase de reparación: Nuevos tejidos van sustituyendo el defecto producido por la agresión. Estos tejidos conforman al epitelio que procede de la epidermis adyacente así como el del nuevo tejido conjuntivo que se va formando, también llamado tejido de granulación. De este modo se producen tres hechos fundamentales:

1. *Reepitelización* desde las capas basales.
2. Formación de tejido de granulación o formación de matriz extracelular mediante la síntesis de colágeno y sustancia fundamental.
3. *Neovascularización, neoangiogénesis o neoformación vascular*, que consiste en el crecimiento de yemas vasculares desde los vasos hemostáticos.

1. Reepitelización

La reepitelización de las heridas comienza unas horas después de producida la lesión. Inmediatamente después, las células epiteliales retraen sus tonofilamentos, pierden sus desmosomas (uniones intercelulares) y forman filamentos de actina para desplazarse.

De este modo, estas células migran sobre la superficie celular. Uno o dos días después de la lesión se produce la proliferación desde los bordes de la herida. Las células epiteliales adquieren su fenotipo normal al restablecerse la integridad de la membrana basal (**Ortonne, 1981; Garthick, 1994; Paladini, 1996; Singer, 2003**).

2. Formación de tejido de granulación

Es el nuevo estroma denominado tejido de granulación. Al cuarto día comienza a invadir el defecto de la herida. Los macrófagos se encargan de liberar los mediadores de la angiogénesis y la fibroplasia. El factor de crecimiento derivado de las plaquetas y el factor de crecimiento transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) estimulan la proliferación de fibroblastos. Estos comienzan la formación de una matriz extracelular constituida por fibrina, fibronectina y ácido hialurónico. Esta matriz provisional es sustituida posteriormente por una matriz colágena, por la acción del TGF- $\beta 1$. Las alteraciones de este proceso de sustitución son las responsables de la formación de los queloides y las cicatrices hipertróficas. Aunque antes se creía que el colágeno se sintetizaba días

después de la agresión, se ha demostrado que su síntesis comienza después de 10 horas y que alcanza la máxima función sintética entre el quinto y el séptimo día (**Luo, 2003**).

3. Neovascularización

La angiogénesis es estimulada inicialmente por los factores de crecimiento fibroblásticos procedentes de los macrófagos activados. Posteriormente, la hipoxia produce la liberación del factor de crecimiento endotelial de las células epidérmicas.

La fibronectina parece jugar un papel importante en el movimiento de las células endoteliales. La proliferación de yemas vasculares cesa cuando el tejido de granulación cubre la herida (**Cherry, 2003; Rodgers, 2003; Soybir, 2003**).

Fase de remodelación: En esta fase se originan los fenómenos de:

1. *Contracción de la herida:* Durante la segunda semana de cicatrización, los fibroblastos forman microfilamentos de actina en la cara citoplasmática de la membrana celular y multiplican las uniones intercelulares. Estos miofibroblastos interactúan entre sí y con la matriz colagenosa para producir la contracción de la herida. Este proceso facilita la cicatrización de la lesión, aproximando los bordes del defecto. Su acción se manifiesta especialmente en las cicatrices por segunda intención (**Millbourn, 2004**).

2. *Reorganización de la matriz extracelular:* Una vez que cesan la inflamación, la fibroplastia y la angiogénesis, se produce un equilibrio entre síntesis y catabolismo de colágeno. El catabolismo del colágeno depende de las denominadas metaloproteasas, sintetizadas por diversas líneas celulares.

De esta forma, el tejido de granulación se transforma en cicatriz propiamente dicha, aumentando su resistencia. Así, las fibras de colágeno se alinean en el sentido de las fuerzas tensionales a las que es sometido el tejido cicatricial, para poder alcanzar máxima resistencia. Después de tres semanas, la cicatriz sólo alcanza el 20% de su fuerza final. Posteriormente, alcanza lentamente la resistencia máxima.

En la piel, por ejemplo, la máxima fuerza de resistencia que alcanza la cicatriz es el 70% de la que tendría sin sufrir lesión. Esta resistencia la alcanza al año de producirse la lesión (**Sheridan, 2004**).

CICATRIZACIÓN POR PRIMERA INTENCIÓN

Uno de los ejemplos más simples de reparación de las heridas es la cicatrización de una incisión quirúrgica limpia, no infectada, con los bordes aproximados mediante suturas quirúrgicas. Se denomina cicatrización primaria o por primera intención.

La incisión sólo causa una interrupción focal de la continuidad de la membrana basal epitelial y la muerte de un número relativamente escaso de células epiteliales y de tejido conjuntivo. En consecuencia, la regeneración epitelial predomina sobre la fibrosis. La fibrina procedente de la sangre coagulada ocupa con rapidez el estrecho espacio de la incisión: la deshidratación de la superficie produce una costra que recubre y protege el lugar de la reparación (**Cotran, 2000**).

En las primeras 24 horas:

Se observan leucocitos polinucleares neutrófilos en los bordes de la incisión, que se desplazan hacia el coágulo de fibrina. Las células basales del borde cortado de la epidermis comienzan a mostrar un aumento de la actividad mitótica. En 24 a 48 horas, las células epiteliales de ambos bordes han comenzado a desplazarse y proliferar a lo largo de la dermis, depositando componentes de la membrana basal conforme avanzan. Las células se encuentran en la línea media bajo la superficie de la costra y forman una capa epitelial delgada pero continua.

En el día 3:

Gran parte de los neutrófilos se han reemplazado por macrófagos y el tejido de granulación invade de forma progresiva el espacio de la incisión. Las fibras de colágeno son ya evidentes en los bordes de la herida, pero están orientadas verticalmente y no se extienden de un borde a otro. La proliferación de células epiteliales continúa y la capa epidérmica es más gruesa.

En el día 5:

La neovascularización alcanza su máxima expresión, a medida que el tejido de granulación ocupa el espacio de la incisión. Las fibrillas de colágeno son más abundantes y comienzan a unir los bordes de la herida. La epidermis recupera su espesor normal a medida que la diferenciación de las células de superficie origina un epitelio con queratinización superficial.

Durante la segunda semana:

Tiene lugar una acumulación continua de colágeno y proliferación de fibroblastos. El infiltrado leucocitario, el edema y la vascularización son mucho

menores. Se inicia el proceso prolongado de “blanqueamiento”, debido al depósito creciente de colágeno en el seno de la cicatriz y a la regresión de los vasos capilares.

Al final del primer mes:

La cicatriz está formada por tejido conjuntivo celular, carente en gran parte de células inflamatorias, y recubierto por una epidermis prácticamente normal. No obstante, los anejos cutáneos destruidos en la línea de incisión no se recuperan. El tiempo aumenta la resistencia a la tensión de la herida.

CICATRIZACIÓN POR SEGUNDA INTENCIÓN

Cuando la pérdida de células o tejido es más extensa, como sucede en un infarto, una úlcera inflamatoria, en la formación de abscesos o incluso en heridas extensas, el proceso de reparación es más complejo. En estas circunstancias, la mera regeneración de las células parenquimatosas no puede restablecer la estructura original.

En consecuencia, existe una penetración importante de tejido de granulación desde los bordes de la herida, seguida con el tiempo de una acumulación de matriz extracelular y formación de una cicatriz. Esta forma de curación se conoce como cicatrización secundaria o por segunda intención.

La cicatrización secundaria difiere de la primaria por (**Cotran, 2000**):

- Los defectos hísticos extensos contienen, por su propia naturaleza, mayor volumen de restos necróticos, exudados y fibrina que deben eliminarse. Por consiguiente, la reacción inflamatoria es más intensa, con un mayor potencial de lesiones secundarias, mediadas por la inflamación.
- La cantidad de tejido de granulación formada es mucho mayor. Los defectos de mayor extensión acumulan un mayor volumen de tejido de granulación para ocupar las soluciones de continuidad de la estructura del estroma y proporcionar el andamiaje subyacente para el crecimiento del nuevo tejido epitelial. En general, cuanto mayor es el volumen de granulación, mayor es la masa de tejido cicatricial.
- La cicatrización secundaria muestra el fenómeno de contracción de la herida. En un plazo de seis semanas, por ejemplo, los defectos cutáneos extensos pueden experimentar una reducción del 5% al 10% de su tamaño original, en gran parte por contracción. Este proceso se atribuye a la presencia de miofibroblastos, unos fibroblastos modificados que

poseen muchas de las características estructurales y funcionales de las células contráctiles del músculo liso.

INFLAMACIÓN

Una de las definiciones de la inflamación corresponde a *la reacción o respuesta del tejido vivo vascularizado a la agresión local*. Los invertebrados sin aparato circulatorio, los organismos unicelulares y los parásitos multicelulares tienen sus respuestas particulares a las agresiones locales; pero lo que caracteriza al proceso inflamatorio en las formas biológicas superiores es la reacción de los vasos sanguíneos, que conduce al acumulo de líquido y células sanguíneas (**Chao, 2003**).

Esta reacción local intenta destruir, diluir o aislar el agente lesivo y pone en marcha una serie de acontecimientos que, hasta donde es posible, intentar curar y reconstruir el tejido lesionado. La reparación comienza en las primeras fases de la inflamación, pero sólo suele ser completa cuando la influencia lesiva ha sido neutralizada. Durante la reparación, el tejido lesionado es sustituido por la regeneración de las células parenquimatosas originarias, por sustitución del defecto por tejido fibroblástico cicatricial (cicatrización) o, más frecuentemente, por una combinación de ambos procesos (**Yücel, 2003**).

INFLAMACIÓN AGUDA.

La inflamación aguda tiene una duración relativamente corta, desde unos minutos a varias horas o uno o varios días, y sus principales características son la exudación de líquido y proteínas plasmáticas (exudado) y la emigración leucocitaria, predominantemente de neutrófilos. Independientemente de la naturaleza del agente agresivo, la inflamación aguda es bastante estereotipada. Por otra parte, la inflamación crónica es menos uniforme. De mayor duración, se asocia histológicamente a la presencia de linfocitos y macrófagos y a la proliferación de vasos sanguíneos y tejido conjuntivo.

Fases de la inflamación aguda

Aunque no es fácil diferenciar claramente distintos momentos en un proceso dinámico, podemos distinguir tres fases fundamentales (Cotran, 2000):

1. *Cambios de flujo y calibre vascular:* Primero se produce una vasoconstricción transitoria de las arteriolas. El siguiente y fundamental acontecimiento es la vasodilatación, que primero afecta a las arteriolas y luego da lugar a la apertura de nuevos lechos vasculares en la zona. Esto se sigue de una menor velocidad de la circulación, consecuencia del incremento de la permeabilidad de la microvascularización.

A medida que se desarrolla la ralentización del flujo sanguíneo, comienza a observarse el desplazamiento de los leucocitos, principalmente neutrófilos, hacia el endotelio vascular, proceso denominado *marginación leucocitaria*. Los leucocitos se adhieren al endotelio, primero de forma transitoria; poco después emigran a través de la pared vascular, hacia el tejido intersticial, proceso denominado migración.

2. *Cambios de la permeabilidad vascular:* La vasodilatación y el aumento de la presión hidrostática pueden dar lugar a cierto grado de trasudación. Sin embargo, ésta es enmascarada pronto por el incremento de la permeabilidad y exudación de proteínas plasmáticas, el hecho característico del edema inflamatorio agudo.

En el edema inflamatorio se produce una pérdida de líquido rico en proteínas que se escapa a través del endotelio y, por lo tanto, hay una reducción de la presión osmótica intravascular, acompañada de un incremento en la presión osmótica en el líquido intersticial, lo que conduce a una alteración en el retorno del líquido a la sangre en el extremo venoso del capilar. Por consiguiente, existe una marcada salida de líquido.

3. *Participación celular: exudación leucocitaria y fagocitosis:* El acumulo de leucocitos (principalmente neutrófilos y monocitos), es el rasgo más importante de la reacción inflamatoria. Los leucocitos engloban y fagocitan las bacterias, inmunocomplejos y restos celulares necróticos y sus enzimas lisosómicas contribuyen de otras formas en la respuesta defensiva. El paso de leucocitos del interior del vaso sanguíneo al foco de la lesión se produce por:

- *Marginación:* Conforme se produce la pérdida de velocidad y el estancamiento del flujo, los leucocitos se separan de la columna central del vaso sanguíneo, y se colocan en contacto con el endotelio. Primero

las células ruedan lentamente a lo largo de las paredes de los capilares y vénulas y, finalmente, se paran en algún punto.

- *Adherencia:* Los leucocitos se adhieren en gran número a la superficie endotelial. En el incremento de la adhesión leucocitaria intervienen interacciones específicas entre moléculas de adherencia complementarias, presentes en las superficies leucocitarias y endotelial.
- *Emigración y quimiotaxis:* La emigración alude al proceso mediante el cual los glóbulos blancos móviles escapan de los vasos hacia los tejidos perivascuales. Todos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos y linfocitos utilizan la misma vía.

En la mayoría de los casos de inflamación aguda predominan los neutrófilos en los primeros momentos de la reacción inflamatoria, siendo sustituidos por los monocitos posteriormente. Esto se explica fundamentalmente debido a: a) los neutrófilos, de corta vida, se desintegran y desaparecen en 24-48 horas, en tanto que los monocitos sobreviven mucho más tiempo en los tejidos; b) la emigración de los monocitos se mantiene mucho después de haber cesado la polinucleares; y c) los factores quimiotácticos para los leucocitos y monocitos son activados en momentos diferentes de la reacción.

- *Fagocitosis y degranulación:* La fagocitosis y la liberación de enzimas por los neutrófilos y macrófagos constituyen dos de los principales beneficios derivados del acumulo de los leucocitos en el foco inflamatorio. En primer lugar, la partícula que va a ser ingerida, se adhiere a la superficie del leucocito, un fenómeno que requiere alguna forma de reconocimiento por parte del leucocito. El segundo paso es el englobamiento con la siguiente formación de una vacuola fagocítica. El tercero es la destrucción y degradación del material ingerido.
- *Liberación extracelular de los productos leucocitarios:* Las alteraciones que se producen en las membranas de los neutrófilos y monocitos tras la unión receptor-ligando durante la quimiotaxis y fagocitosis dan lugar a la secreción de productos no sólo dentro del fagolisosoma, sino también al espacio extracelular. Las más importante son: a) enzimas lisosómicas; b) metabolitos activos derivados del oxígeno; y c) productos del ácido araquidónico, incluyendo prostaglandinas y leucotrienos. Estos productos son poderosos mediadores de los efectos celulares y vasculares de la

inflamación y lesión tisular, y amplifican los efectos del estímulo inflamatorio inicial.

La inflamación aguda puede seguir una de las siguientes evoluciones (**Cotran, 2000**):

A) Resolución completa: con recuperación normal de la zona inflamada; ésta es la evolución habitual cuando la lesión es leve, como en una quemadura superficial, y cuando ha habido escasa destrucción tisular.

B) Curación por cicatrización: ocurre cuando ha habido una sustancial destrucción tisular, cuando la inflamación ha ocurrido en tejidos que no se regeneran y si ha habido una abundante exudación de fibrina.

C) Abscesificación: se produce principalmente en las infecciones por microorganismos piógenos.

D) Progresión a la inflamación crónica: aunque la transición entre la inflamación aguda y crónica es a veces difícil de delimitar, la respuesta inflamatoria crónica tiene algunas características particulares que permiten su descripción separada.

Progresión a la inflamación crónica

Las características histológicas fundamentales de la inflamación crónica corresponden a:

1. Infiltración de células mononucleadas, principalmente macrófagos, linfocitos y células plasmáticas.
2. Proliferación de fibroblastos y, en muchos casos, de pequeños vasos sanguíneos.
3. Incremento del tejido conjuntivo (fibrosis).
4. Destrucción tisular (**Cotran, 2000**).

La infiltración de monocitos y macrófagos es un componente particularmente importante de la inflamación crónica.

En la inflamación aguda de corta duración, si se elimina el agente irritante, los macrófagos terminan desapareciendo (porque se destruyen o porque pasan a los vasos linfáticos y de allí a los ganglios linfáticos). Si el agente lesivo no es eliminado, como ocurre en la infección tuberculosa, en algunas reacciones inmunitarias o cuando existe un irritante crónico, el acumulo de macrófagos puede persistir durante largos períodos de tiempo.

Otros tipos celulares presentes en la inflamación crónica son los linfocitos, células plasmáticas, eosinófilos y células cebadas.

Aunque los leucocitos polimorfonucleares suelen ser considerados el rasgo característico de la inflamación aguda, muchas formas de inflamación crónica, que pueden durar varios meses, continúan conteniendo grandes cantidades de neutrófilos y forman el pus. En la inflamación crónica del hueso (osteomielitis), el exudado neutrófilo puede persistir durante meses.

Por último, la inflamación crónica se resuelve mediante la proliferación de fibroblastos y colágeno, y la reducción de los vasos; aunque en fases tempranas podemos encontrar algunos monocitos aislados.

EL HUESO Y LOS INJERTOS ÓSEOS.

EL HUESO

Es el principal componente del esqueleto adulto por lo que posibilita la acción mecánica de la musculatura, protege órganos vitales y alberga la médula ósea hematopoyética. El hueso sirve además de reservorio de calcio, fósforo y otros iones. No es totalmente sólido sino que tiene pequeños espacios entre sus componentes, formando pequeños canales por donde circulan los vasos sanguíneos encargados del intercambio de nutrientes (**Roach, 2000**).

Desde el punto de vista macroscópico existen dos tipos de hueso:

Hueso cortical o compacto que constituye el 80% del total de los huesos y ocupa el $3,5 \times 10^6$ mm² de la superficie total del esqueleto. Constituye la mayor parte de la diáfisis de los huesos largos así como de la parte externa de todos los huesos del organismo. El hueso compacto supone protección y soporte. Tiene una estructura de láminas o anillos concéntricos alrededor de canales centrales llamados *canales de Havers* que se extienden longitudinalmente. Los canales de Havers están conectados con otros canales llamados *canales de Volkmann* que perforan el periostio. Ambos canales son utilizados por los vasos sanguíneos, linfáticos y nervios para extenderse por el tejido óseo. Entre las láminas concéntricas de matriz mineralizada hay pequeños

orificios o lagunas de forma elíptica donde se encuentran los *osteocitos*. Para que estas células puedan intercambiar nutrientes con el líquido intersticial, cada laguna dispone de una serie de canalículos por donde se extienden las prolongaciones de los osteocitos. Los canalículos están conectados entre sí, y eventualmente a los canales de Havers (**Wheater, 1987**).

Cuando la estructura microscópica de estas láminas es madura, el conjunto de un canal central, las láminas concéntricas que lo rodean y las lagunas, canalículos y osteocitos en ellas incluidos reciben el nombre de *osteona secundaria o sistema de Havers*, que tiene un diámetro medio de 200-300µm. Las restantes láminas entre osteonas se llaman *láminas intersticiales*, y las que están en contacto con periostio y endostio, *láminas circunferenciales* (**Eriksern, 1994; Hollinger, 1999**). La resistencia a la compresión de este hueso es 10 veces mayor a un mismo volumen de hueso trabecular (**Bostrom, 2000**).

Hueso esponjoso o trabecular, constituye el 20% del total de los huesos y ocupa el 7×10^6 mm² de la superficie total del esqueleto. A diferencia del hueso compacto, el hueso esponjoso no contiene osteonas, sino que las láminas intersticiales están dispuestas de forma superpuesta, no concéntricas, formando unos tabiques o placas llamadas *trabéculas*. Estos tabiques forman una estructura esponjosa dejando huecos que están llenos de médula ósea roja. Dentro de las trabéculas están los osteocitos que yacen en las lagunas con canalículos que irradian desde las mismas. En este caso, los vasos sanguíneos penetran directamente en el hueso esponjoso y permiten el intercambio de nutrientes con los osteocitos. El hueso esponjoso es el principal constituyente de las epífisis de los huesos largos y del interior de la mayor parte de los huesos cortos y planos (**Eriksen, 1994; Serrano, 1998**).

Los huesos maxilofaciales siguen la distribución macroscópica de los huesos planos de la bóveda craneal, es decir, existe una cortical interna, una externa y en el interior una zona de hueso esponjoso. El maxilar presenta esta disposición en la mayor parte de su superficie, excepto en la zona de la tuberosidad en donde adquiere la morfología de los huesos cortos (finas corticales y abundante hueso esponjoso).

Periostio y endostio. El periostio reviste la superficie externa de todos los huesos excepto en las superficies articulares. Es un tejido especializado organizado en 2 capas, la interna rica en células osteoblásticas y preosteoblásticas, y la externa rica en fibras colágenas y en vasos sanguíneos que penetran en los canalículos intraóseos.

El endostio es una fina capa de tejido conjuntivo que tapiza la cavidad medular de los huesos largos, los conductos de Volkmann y de Havers del hueso compacto y los espacios medulares del hueso esponjoso. Las células mesenquimales indiferenciadas que contiene en su interior tienen potencialidad osteogénica y hematopoyéticas (Soleri, 1995; Bostrom, 2000).

Desde el punto de vista microscópico se distinguen 3 tipos de huesos que corresponden a diferentes fases de maduración, cuyas características se describen en la *Tabla 2* (Eriksen, 1994; Roberts, 1995; Bostrom, 2000; Fernández, 2006).

Tabla 2. Tipos de hueso según su estructura macro y microscópica.

ESTRUCTURA MACROSCÓPICA	ESTRUCTURA MICROSCÓPICA	
HUESO TRABECULAR/ ESPONJOSO (Unidad Multicelular Básica-Trabécula)	HUESO INMADURO/ TIPO I/PRIMARIO/ JOVEN/ DE NUEVA FORMACIÓN	HUESO ENTRELAZADO/RETICULAR. Gran número de osteocitos globulares de gran tamaño con núcleo muy visible. Tinción intensa. Gran número de vasos. Distribución anárquica de células y matriz extracelular. Gran número de osteoblastos anexos con producción de osteoide. Desorden arquitectural de las fibras de colágenos (luz polarizada).
		HUESO DE FIBRAS PARALELAS/COMPUESTO Menor número de osteocitos elipsoidales y de menor tamaño. Tinción menos intensa que el H. entrelazado. Disposición más homogénea de las células y la matriz extracelular. Distribución paralela de las fibras de colágeno (luz polarizada).
	HUESO LAMINAR/MADURO/TIPO II/ SECUNDARIO/NATIVO/ANTIGUO. Trabécula Secundaria. Menor número de osteocitos difíciles de ver dentro de la laguna osteocítica. Tinción menos intensa que el H. de fibras paralelas. Disposición de las células y la matriz extracelular en láminas paralelas. Distribución paralela de las fibras de colágeno (luz polarizada).	
HUESO CORTICAL/ COMPACTO. (Unidad Multicelular Básica- Osteona)	HUESO INMADURO/ TIPO I/ PRIMARIO/ NEOFORMADO/ JOVEN/ DE NUEVA FORMACIÓN	HUESO ENTRELAZADO/RETICULAR. Gran número de osteocitos globulares de gran tamaño con núcleo muy visible. Tinción intensa. Gran número de vasos. Distribución anárquica de osteoblastos anexos con producción de osteoide. Desorden arquitectural de las fibras de colágeno (luz polarizada).
		HUESO DE FIBRAS PARALELAS/COMPUESTO. Osteona primaria. Menor número de osteocitos elipsoidales y de menor tamaño. Tinción menor intensa que el Hueso entrelazado. Disposición más homogénea de las células y la matriz extracelular agrupados alrededor de un vaso más ancho que el conducto de Havers. Distribución paralela de las fibras de colágeno (luz polarizada).
	HUESO LAMINAR/MADURO/TIPO II/SECUNDARIO/ NATIVO/ ANTIGUO. Osteona Secundaria. Menor número de osteocitos difíciles de ver dentro de la laguna osteocítica. Tinción menos intensa que el H. de fibras paralelas. Disposición de las células y la matriz extracelular en láminas concéntricas alrededor de los conductos de Havers. Distribución paralela de las fibras de colágeno (luz polarizada).	

El hueso entrelazado es producto de una secreción rápida (30-50 $\mu\text{m}/\text{día}$) y asincrónica de las células. Tiene un índice de deposición y recambio mayor que el hueso laminar. Sobre este hueso entrelazado se va depositando mayor cantidad de mineral y las fibras colágenas se reestructuran y compactan de manera organizada (**Eriksern, 1994**).

En el hueso laminar la matriz ósea (densamente mineralizada) se dispone en forma de laminillas superpuestas. En cada laminilla las fibras colágenas se disponen paralelamente según una dirección que se modifica en cada laminilla sucesiva. Entre las laminillas se encuentran incluidos los osteocitos. Se origina por una secreción lenta ($<1\mu\text{m}/\text{día}$) y sincrónica. En el hueso cortical inicialmente se forma una osteona primaria o sistema de Havers atípico (formada por hueso fibras paralelas) que está delimitada por una línea basófila lisa. Posteriormente se forma la osteona secundaria o sistema de Havers producida por un proceso de remodelación (reabsorción-aposición), y es delimitada por una línea ondulada o festoneada. La osteona secundaria además tiene un canal de Havers de diámetro menor que la primaria. En el hueso trabecular también se distingue una trabécula primaria (formada por hueso fibras paralelas) y posteriormente una trabécula secundaria (formada por hueso maduro) (**Eriksern, 1994**).

En el hueso maduro las fibras colágenas se disponen en láminas paralelas pero en cada lámina las fibras forman un ángulo agudo con respecto a las láminas contiguas. Esta disposición determina que al observar el hueso laminar mediante luz polarizada alternen las láminas claras de aspecto muy brillantes (láminas birrefringentes: fibras orientadas perpendicularmente a la luz polarizada) con las oscuras (láminas no birrefringentes: fibras orientadas en un ángulo más o menos agudo con respecto a la luz polarizada) (**González, 1995**). En el hueso embrionario o inmaduro las fibras se disponen de manera desordenada. Cuando este tipo de hueso se observa mediante luz polarizada no muestra alternancia de bandas claras y oscuras sino un aspecto finamente fibrilar. Este aspecto es debido a que solo brillan las escasas fibras colágenas que al azar han quedado dispuestas perpendicularmente a la luz polarizada. En el esqueleto adulto normal el hueso entrelazado prácticamente ha desaparecido, pero puede formarse de nuevo si se acelera la producción de matriz (callos de fractura, tumores óseos...).

La matriz ósea que no se halla mineralizada también se denomina osteoide, teniendo una importante proporción de fibras colágenas y proteínas que se originan de los osteoblastos en el proceso de remodelación. El osteoide puede observarse en forma

de finos ribetes de unas 10 micras de espesor que revisten la superficie de algunas trabéculas y tapizan algunas cavidades intracorticales (**Serrano, 1998**).

Existen dos tipos de osificación (**Eriksen, 1994; Hollinger, 1999; Bostrom, 2000**):

Osificación endocondral: se produce en los huesos de las extremidades, vértebras y el cinturón óseo pectoral y pélvico. Las células mesenquimales se diferencian en condrocitos debido a una disminución del aporte vascular. Posteriormente este cartílago es invadido por nuevos vasos y las células mesenquimales indiferenciadas se diferencian directamente en osteoblastos y el cartílago es reabsorbido y sustituido por hueso.

Osificación intramembranosa: es el tipo de osificación que se produce en los huesos de la bóveda craneal, ilion, escápula, clavículas y en los huesos maxilares. La osificación se produce directamente a partir de las células mesenquimales indiferenciadas y el tejido conectivo estromal, sin necesidad del paso intermedio del cartílago hialino. Se produce una concentración de células mesenquimales indiferenciadas que se concentran alrededor de una red de capilares profusa. La diferenciación a osteoblastos y la producción de ciertas proteínas origina deposición de cristales de hidroxiapatita en las vesículas de la matriz y después siguiendo la orientación de las fibras de colágeno. Inicialmente se forma un entramado o laberinto de hueso entrelazado que irá evolucionando hasta el sistema laminar maduro.

MATRIZ ÓSEA

Se forma de un componente inorgánico (65% del peso húmedo) y de un componente orgánico (20% del peso húmedo) y agua (10%) (**Bostrom, 2000**). El componente inorgánico de la matriz ósea está constituido en su mayor parte por fosfato cálcico en forma de cristales de **hidroxiapatita** $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$. La precipitación del fósforo y calcio en forma más o menos cristalina sobre la red de colágeno va a depender de la acción de diferentes proteínas no colagénicas de la matriz. En total el tejido óseo de un adulto contiene 1100 gramos de calcio (el 99% del calcio total del organismo) y aproximadamente 600 gramos de fósforo (es decir, el 85% del fósforo total del organismo). Los cristales se disponen en forma de bastones o agujas que se deponen entre las fibrillas de colágeno (**Hollinger, 1999**).

La matriz ósea es la responsable de las extraordinarias propiedades biomecánicas del hueso. Las fibras colágenas le proporcionan flexibilidad y resistencia a la tensión mientras que las sales minerales le confieren dureza, rigidez y resistencia a la compresión (**Bostrom, 2000**).

El componente orgánico se halla integrado por proteínas colagénicas (80-90%), colágeno tipo I (>95%), colágeno tipo IV (<5%) y una pequeña proporción de otras proteínas no colagénicas de gran importancia (10-20%). Estas proteínas no-colagénicas son importantes para la proliferación y diferenciación celular, así como para la adhesión célula-célula y célula-substrato.

CÉLULAS ÓSEAS

Linaje osteoblástico

A partir de las células mesenquimales indiferenciadas se van a diferenciar los preosteoblastos, los osteoblastos, las células de revestimiento (lining cells) y los osteocitos.

Los **preosteoblastos** son células de aspecto fibroblástico cercanas a las superficies óseas pero separadas de estas por otros tipos celulares (células de revestimiento, osteoblastos). Los preosteoblastos son difíciles de identificar en condiciones normales, pero pueden observarse con facilidad si sufren una hiperplasia como, por ejemplo, en el hiperparatiroidismo.

Los **osteoblastos** son células de forma cúbica, de aproximadamente 10 μm de diámetro, citoplasma basófilo y ricas en una isoenzima específica de la fosfatasa alcalina. Derivan de los preosteoblastos y suelen considerarse células con diferenciación terminal. No obstante, existen datos que sugieren que, al menos en parte, conservan la capacidad de proliferar de manera limitada. Los osteoblastos se hallan en contacto directo con las superficies óseas formando grupos compactos de una sola capa de espesor. De manera característica el núcleo de estas células se sitúa en el extremo que se halla más alejado de la superficie ósea sobre la que asientan. El estudio ultraestructural permite comprobar que entre el núcleo y la superficie de contacto con el hueso se sitúan de manera sucesiva el aparato de Golgi y abundantes cisternas de retículo endoplásmico rugoso. Estas características ultraestructurales son típicas de las células con capacidad para segregar grandes cantidades de proteínas. Los osteoblastos sintetizan el componente orgánico de la matriz ósea: colágeno tipo I, proteínas no colagénicas y

factores de crecimiento. Su vida media se cree que está en un rango de 1-10 semanas a partir del cual desaparecerían mediante un proceso apoptótico, algunos sin embargo se convierten en células de revestimiento y un 15% en osteocitos (**Hollinger, 1999**).

Los osteoblastos pueden permanecer en las superficies óseas o quedar rodeados por la matriz que sintetizan. Cuando los osteoblastos que han permanecido en la superficie finalizan la síntesis de matriz, se aplanan y se convierten en **células de revestimiento** (células del endostio o “lining cells”). Estas células, a través de la producción de IL6 e IL1, parecen desarrollar un importante papel en el control del remodelado óseo mediante la atracción de osteoclastos (**Manolagas, 1995; Bostrom, 2000**).

Los osteoblastos que quedan en el espesor de la matriz adquieren aspecto estrellado y pasan a denominarse **osteocitos**. Estas células se hallan en contacto entre sí y con las células de la superficie (células de revestimiento, osteoblastos) mediante finas prolongaciones tubulares de su citoplasma que recorren la matriz ósea en diversas direcciones. La cavidad de la matriz ósea que contiene el cuerpo celular del osteocito se denomina *laguna osteocitaria*, y los diminutos canalículos que albergan sus prolongaciones citoplasmáticas reciben el nombre de *conductos calcóforos*. El estudio ultraestructural de los osteocitos revela que presentan un aparato de Golgi y un retículo endoplásmico rugoso menos desarrollado que los osteoblastos. Estas organelas se concentran en el cuerpo celular donde se disponen alrededor del núcleo. En los puntos de contacto entre las prolongaciones citoplásmicas se observan uniones tipo gap. En estas uniones existen pequeños canales intercelulares con un diámetro interno de 1.5nm. Estos canales permiten el paso directo de una a otra célula de iones inorgánicos y pequeñas moléculas hidrosolubles (aminoácidos, azúcares, nucleótidos y vitaminas) por lo que posibilitan una comunicación química y eléctrica.

Los osteocitos son células con una escasa actividad metabólica pero su preservación parece necesaria para que el tejido óseo mantenga sus propiedades biomecánicas. La situación de los osteocitos es teóricamente ideal para detectar el estrés mecánico y las microlesiones de la matriz. Estas células podrían transmitir señales a las células de revestimiento que utilizarían la información recibida para modular localmente el remodelado (**Duncan, 1995; Serrano, 1998; Martin, 2000**).

Linaje osteoclástico

A partir de las células madres hematopoyéticas se diferencian los monocitos, los preosteoclastos y los osteoclastos.

Los **osteoclastos** son células multinucleadas (10-12 núcleos), de citoplasma acidófilo y ricas en anhidrasa carbónica y TRAP, con un diámetro de unos 100 μm (**González, 1995**). Son de mayor tamaño que los osteoblastos y se disponen sobre las superficies óseas de manera aislada o en grupos poco numerosos. Al igual que los osteoblastos son células polarizadas en la que los núcleos se sitúan en el extremo que se halla más alejado de la superficie ósea sobre la que asientan.

El estudio ultraestructural de los osteoclastos revela que sus organelas se concentran en el citoplasma perinuclear donde los complejos de Golgi son abundantes. En el resto del citoplasma se observan abundantes mitocondrias y estructuras vesiculares de diversas densidades y tamaños. A ambos lados de la zona de plegamiento la membrana se aplanada y se adhiere más íntimamente a la matriz. En las tres dimensiones del espacio este segmento aplanado corresponde a un rodete que adhiere el osteoclasto a la superficie ósea de manera parecida a como lo haría el bode de una ventosa. Así, el espacio comprendido entre la membrana fruncida y la matriz ósea queda convertido en un microambiente que se halla aislado del intersticio medular.

El segmento de citoplasma adyacente a esta zona aplanada se halla libre de organelas por lo que se denomina *zona clara*. Esta zona contiene abundantes microfilamentos de actina que probablemente se relacionan con la capacidad de traslación de la célula. De hecho los osteoclastos a medida que reabsorben el hueso realizan un movimiento de vaivén parecido al que efectúa el cepillo de un carpintero. El territorio sobre el que se desplaza un osteoclasto durante el proceso de reabsorción es varias veces superior al de la superficie de la célula y se denomina *dominio osteoclástico* (**Serrano, 1998; Minkin, 1999**).

BIOLOGÍA DE LA REGENERACIÓN ÓSEA

El tejido óseo es uno de los más dinámicos del organismo reconociéndose una serie de actividades biológicas atribuibles al sistema esquelético: crecimiento, regeneración, modelado, y remodelado (**Eriksen, 1994**). En esta sección nos vamos a dedicar a las fases de regeneración, modelado y remodelado, ya que son los 3 fenómenos óseos que a menudo se superponen en el tiempo, y que pueden intervenir en

la cicatrización de la fractura ósea, en la cicatrización ósea periimplantaria y la distracción histogénica. Es el único capaz de regenerarse a sí mismo de manera completa a través de reactivar los procesos que tienen lugar durante su embriogénesis. Se trata de uno de los procesos más complejos y apasionantes que aparecen en la biología, en el cual se producen una serie de acontecimientos celulares y bioquímicos que conducirán a la formación en la zona a reparar de un hueso con propiedades físicas y morfología similares a la del hueso normal. Dicha reparación se produce a partir de una solución de continuidad del hueso por trauma externo o bien tras osteotomía quirúrgica. Por otro lado, la fatiga mecánica puede causar microfracturas trabeculares que no modifican la morfología externa del hueso, sin embargo, estas fracturas microscópicas se reparan a través de microcallos de fractura que muestran una dinámica similar a la de los grandes callos.

Hay que tener en cuenta que el término de reparación es en ocasiones confundido con el concepto de regeneración. La *regeneración* es un proceso por el cual el tejido originado es estructural y funcionalmente idéntico al tejido inicial mientras que la *reparación* genera un tejido diferente al inicial al trauma formando una cicatriz.

Parece ser que el índice de regeneración y remodelado óseo va decreciendo de manera que aumenta la evolución en la escala filogenética, además existen variabilidad entre distintos individuos de la misma especie, así como según la localización anatómica, la edad del individuo, el sexo del individuo o la existencia de patología sistémica (por ejemplo, osteoporosis, diabetes).

Según la **especie** animal existen diferentes tiempos de regeneración y de remodelado. Existe una relación inversamente proporcional entre el índice y el potencial de regeneración ósea y la evolución en la escala filogenética (**Swennen, 2002**). Así en el hueso cortical del humano cada ciclo de remodelado, conocido como sigma, dura 4 meses, en el perro 3 meses y en el conejo 6 semanas (**Parfitt, 1987; Eriksern, 1994; Hollinger, 1999**). Parece además que según las especies existen diferencias en cuanto a la producción de diferentes moléculas implicadas, de esta manera se ha observado en distracción alveolar en conejos una sobreexpresión de BMP-7, mientras que esto no ocurre en ratas (**Rauch, 2000**).

En relación con la **localización anatómica** parece que el remodelado se presenta de manera diferente en las diversas estructuras óseas del organismo. **Verna (1999)** realizan un estudio histomorfométrico del remodelado en cresta ilíaca, foramen mandibular y ángulo mandíbula, en 50 cadáveres humanos. Observaron que la

porosidad cortical (parámetro histomorfométrico definido por la presencia de osteonas en fases activas de remodelado) era mayor en la cresta ilíaca. El tamaño de las osteonas era mayor en la mandíbula que en la cresta ilíaca, y también mayores en los hombres que en las mujeres. Esto parece que es debido a que las regiones que soportan tensión generan unas osteonas más grandes que en zonas que reciben compresión. Se observó un aumento de la porosidad cortical mandibular según aumentaba la edad. Además, en la zona mentoniana la porosidad aumentaba cuando existía oclusión, mientras que en el ángulo era más poroso cuando no había oclusión. Esto confirma la hipótesis de que en pacientes desdentados la distribución de estrés es mayor en la región molar y en la rama ascendente donde se estimularía más el remodelado, y en los dentados en el hueso alveolar, apófisis coronoides y cuerpo mandibular.

Con la **edad** hay una disminución de las células mesenquimales indiferenciadas, y menor respuesta de los osteoblastos a las señales que les llegan de los factores solubles. Son además, unos osteoblastos tres veces menos reactivos en relación con la formación de nódulos minerales, y expresión de fosfatasa alcalina. Hollinger estudió en un modelo de reparación de fractura en ratas, que a los 7 días de curación la expresión de osteopontina era evidente en los animales de 6 meses mientras que la inmunoreacción era negativa para las ratas de 24 meses (**Hollinger, 2000**).

El **sexo** va a influir de manera determinante en el metabolismo óseo, principalmente por la diferente influencia de las hormonas sistémicas en los hombres y en las mujeres. Parece que la función osteoblástica se mantiene constante en el hombre a lo largo de su vida mientras que en la mujer se ve incrementada en las primeras etapas posmenopáusicas. Esto se asocia al factor protector contra la reabsorción de las hormonas androgénicas que están aumentadas en el hombre (**Clarke, 1996**).

FASE DE LA INFLAMACIÓN

Tras el daño inicial (fractura limpia, osteotomía quirúrgica) se produce una laceración de los vasos sanguíneos con exudado de líquidos y proteínas plasmáticas (edema) e inmediatamente después formación de un **coágulo** de fibrina tras la cascada de la coagulación, vasoconstricción y necrosis de los bordes óseos de fractura.

Dirigiendo la cascada de la coagulación se encuentran las **plaquetas** que tienen una doble función, como control hemostático y como contenedor de señales como el PDGF, el TGF β 1, el TGF β 2, el IGF-1, y ciertas proteínas de adhesión como la

fibronectina, que son desprendidos a través de sus membranas en forma de gránulos α . Estos factores aparecen en la fase inicial del coágulo, y actúan quimotácticamente sobre las células mesenquimales indiferenciadas y sobre los osteoblastos de revestimiento que se van acercando al foco de fractura pero en pequeñas cantidades en esta fase (**Ponseti, 1995; Barnes, 1999; Marx, 1999**). Las plaquetas van a contener también el mayor inhibidor de la plasmina, el α 2-antiplasmina, por lo que su mayor producción retrasa la disolución de la red de fibrina creada (**Gemmell, 2000**). También aparecen IL1 e IL6 a partir de los linfocitos, y aparecen también en estas fases tempranas las BMPs procedentes de la matriz extracelular del hueso adyacente y de los osteoblastos de revestimiento.

En este coágulo inicial, los productos de degradación producidos por la necrosis celular y los factores de crecimiento iniciales, atraen a los polimorfonucleares (PMNs neutrófilos), linfocitos y monocitos (que se transforman en macrófagos, los cuales pueden permanecer varios meses en la zona de regeneración) que inician la fagocitosis de los productos de necrosis.

Marx (1999) establece una extrapolación en humanos de los eventos observados experimentalmente de la regeneración en defectos óseos maxilofaciales rellenos con *injertos óseos*. Observaron que el ambiente que se produce en esta fase es de una disminución en el pH(4-6) y de la tensión de oxígeno (5-10 mm Hg) que atrae a los macrófagos y los PMNs al foco debido al gradiente de tensión en relación con el hueso adyacente (45-50 mm Hg). Sin embargo, esta disminución de pH también favorece la diferenciación condroblástica si se continúa en el tiempo (**Gotcher, 1998**).

Entre los días 3 y 5 después del trauma inicial, va desapareciendo progresivamente la red de fibrina, se forma un **tejido de granulación**, que se mantiene hasta aproximadamente los 14 días. Se regeneran nuevos vasos, varios tipos de colágeno (fundamentalmente tipo II) que forman una nueva red, y aparecen otras células (fibroblastos, linfocitos, monocitos y macrófagos) aumentando también la proporción de MSCs (fase celular del callo). Las plaquetas desaparecen como principales presentadores de GFs, siendo los **macrófagos** los principales productores de citoquinas. Los macrófagos del PDGF y TGF β , expresarían otros factores como el FGF y el VEGF que junto al TGF β , promoverían la angiogénesis (por la migración y proliferación de células endoteliales, y precursores de células endoteliales). El papel de los macrófagos en las fases iniciales de la osteogénesis no está bien estudiado hasta el momento (**Glowacki, 1998; Hollinger, 1999**).

Se considera que la penetración vascular en el hueso cortical es de 0,05 mm/día, y en el trabecular de 0,5 mm/día. Los FGF-2 inicialmente favorecerían la angiogénesis, pero de manera dosis dependiente, de tal manera que a dosis elevadas se promovería la fibrosis. Se ha observado que la utilización de VEGF recombinante humano estimula la neovascularización y la síntesis de DNA en conejos, pero no en primates; siendo descritas varias moléculas (angiogenina, IL8, TGF α ,...) con capacidad angiogénica, aunque no se ha demostrado que todas ellas tengan alguna influencia en la formación ósea (**Glowacki, 1998**).

Otro modelo interesante para valorar la regeneración ósea es la que se desarrolla en el *alveolo postextracción*. **Adriens (1999)** realizó una extrapolación al humano del cronograma de la curación postextracción observada experimentalmente. Inicialmente se produce un coágulo sanguíneo con formación de una red de fibrina, y a las 48 horas se produce hemólisis central del coágulo e inicio de la formación del tejido de granulación (migración al foco de PMNs neutrófilos, monocitos y fibroblastos). Al final de la primera semana existe un tejido con plexo vascular organizado, fibroblastos y fibras colágenas. Se inicia también la reabsorción del tejido óseo necrótico. En los bordes de la herida hay una proliferación del epitelio. Durante la segunda semana existe mayor proliferación del epitelio y mayor densidad de las fibras colágenas.

Al igual que ocurre en una herida en la piel, una herida endoósea sufre una contracción con el fin de acelerar la cicatrización reduciendo la herida. En el hueso esto es menos evidente, pero se realiza por acción de los fibroblastos al traccionar de la matriz extracelular y orientar las fibras de colágeno (**Davies, 2000**)

FASE DE LA PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN CELULAR

La proporción de las células mesenquimales indiferenciadas presentes en los canales óseos, endostio, periostio y médula ósea es variable a lo largo de la vida siendo de 1:100.000 en adolescentes, 1:250.000 a los 35 años, 1:400.000 a los 50 años y 1:2.000.000 a los 80 años, y se considera que el procedimiento de regeneración mesenquimal seguiría el mismo proceso de señales que suceden en el periodo embriológico y que solo se diferenciaría la cantidad de células mesenquimales indiferenciadas. Estas células pueden acceder al foco de fractura desde los tejidos de alrededor (periostio y médula ósea) y la sangre. El ciclo celular de cualquier célula progenitora sigue 5 etapas de comportamiento (**Frank, 2002, Muschler, 2002**):

- Activación: salida del estado quiescente de las células mesenquimales indiferenciadas por acción de los factores reguladores.
- Proliferación: originada por factores mitogénicos.
- Migración: facilitada por diferentes factores reguladores e influenciada por factores biomecánicos y geométricos de la matriz.
- Diferenciación: progresión en el linaje en el que aparecen las diferencias morfológicas y moleculares específicas del linaje, terminando en la diferenciación celular en donde la célula produce el tejido, que una vez formado va a indicar la maduración de esas células. Entre las variables biológicas que van a determinar el linaje celular de las células mesenquimales indiferenciadas se encuentran la tensión de oxígeno, el pH del fluido intersticial, la concentración de nutrientes, los estímulos mecánicos, la composición química de la matriz extracelular y por supuesto la concentración de determinados factores reguladores.
- Supervivencia o muerte: la apoptosis o muerte programada también es una forma de diferenciación.

Hay que tener en cuenta que la diferenciación celular es uno de los pilares en la reparación ósea y de hecho en enfermedades con una disminución de las células precursoras osteogénicas (por ejemplo, osteoporosis) influyen en la capacidad de reparación ósea. Por otro lado, estas células osteoprogenitoras son indispensables en la regeneración debido a la imposibilidad de división y migración de los osteoblastos (aunque parece que tendrían una proliferación limitada) y también se considera que la movilidad de los osteoblastos está limitada a 0,4 mm (400µm), aunque pueden moverse a más distancia cuando existe una estructura previa de fibrina. Además, la vida media de los osteoblastos es de 8-10 días por lo que tienen que ser renovados constantemente por las células mesenquimales indiferenciadas. Estas células precursoras migran a través de una superficie implantada osteoconductiva o a través de las redes osteoconductivas de la matriz extracelular. En el caso de no existir un implante estas células son la vanguardia de las espículas de crecimiento óseo (por ejemplo, en distracción o en fractura ósea) **(Davies, 2000)**.

Los TGFβ, PGE₂, IGF y BMPs de la matriz extracelular actúan sobre las células mesenquimales indiferenciadas. Además estas MSCs producen TGFβ, IGF y BMPs que

de manera autocrina favorecen la diferenciación a osteoblastos y de manera paracrina la producción de proteínas óseas por parte de los osteoblastos ya existentes (**Marx, 1999**).

En el modelo de *injertos óseos* a los 14 días se equilibraría el gradiente de tensión de oxígeno entre zona de injerto y zona de hueso adyacente, disminuiría la angiogénesis y se aumentaría considerablemente la migración de MSCs y la diferenciación y proliferación de osteoblastos maduros. Parece ser que los componentes colágenos actuarían como presentadores de los factores de crecimiento moduladores a las células receptoras que llegan al sitio de fractura a partir de los bordes de fractura (espacios de médula ósea), el periostio y endosito. El TGF β inicialmente activaría la diferenciación de fibroblastos y la movilización de las células mesenquimales desde los tejidos adyacentes al foco de fractura. Parece también que inhibiría la actividad osteoclástica y la formación de nuevos osteoclastos, limitando la reabsorción únicamente a la zona de hueso dañado por el trauma quirúrgico (**Marx, 1999**).

La diferenciación de los osteoclastos a partir de los macrófagos va a iniciar la reabsorción y renovación de la capa de hueso necrótico (aprox. 1 mm) que se ha producido tras el trauma inicial. Este proceso inicial de reabsorción se produce a los 14 días y se continúa durante varios meses. Para remodelar ese hueso alterado y rellenar el gap con hueso laminar es necesario al menos un ciclo de remodelación (1 sigma). En los conejos 1 sigma es 1,5 meses, en el perro de 3 meses, y en la especie humana de 4 meses, aunque dependiendo del tamaño del gap y la capacidad de regeneración (**Eriksern, 1994, Minkin, 1999**).

FASE DE LA FORMACIÓN ÓSEA

El tipo de hueso inicial es el tejido osteoide y posteriormente el hueso inmaduro entrelazado o reticular, que derivado de la terminología traumatológica forma el “callo blando”. La función de este callo es la de estabilizar los fragmentos de fractura; si los fragmentos son móviles el cartílago será predominante en el huso neoformado debido a una formación endocondral. Por otro lado, en los defectos pequeños este callo blando se forma de hueso inmaduro formado de manera intramembranosa a partir de los bordes de fractura. En el caso de defectos más amplios o de huesos largos la zona central sería avascular con formación de cartílago y el hueso entrelazado sólo estaría en las zonas periféricas posteriormente ese cartílago sería sustituido por hueso por un procedimiento de osificación endocondral (**Garces, 1999**).

Extrapolando estudios experimentales podemos valorar los tiempos de formación ósea en humano (**Eriksern, 1994**). El primer tipo de tejido óseo que se forma es el **osteóide**, o matriz extracelular no mineralizada formado en su mayoría por colágeno tipo I que va a formar el andamiaje fundamental para la mineralización de la matriz. A medida que se va formando este osteóide algunos osteoblastos quedan incluidos en él diferenciándose en osteocitos.

El osteóide es mineralizado progresivamente por un gran número de cristales de hidroxiapatita relativamente pequeños, formando el **hueso inmaduro entrelazado** (2 semana-6ª semana) en donde se deposita el 70% del mineral del hueso maduro. Su organización y el depósito del 30% restante puede durar varios meses. La mineralización de la red de colágeno se ve influenciada por la producción de los osteoblastos de proteínas como la fosfatasa alcalina, osteopontina, fibronectina, sialoproteína ósea y trombospondina (**Hollinger, 1999**).

Una vez formado el hueso entrelazado, se inicia un proceso de aumento de mineralización y de compactación laminar alrededor de un vaso sanguíneo. Esa ordenación ósea puede ser una variante fina (osteona primaria), o de manera más basta (hueso en espiral) dando lugar a una osteona primaria o trabécula primaria que sigue estando formada por **hueso inmaduro de fibras paralelas** (6ª-18ª semana). Esta osteona o trabécula primaria de hueso inmaduro debe pasar por un proceso de remodelado (18ª-54ª semana) para pasar a osteona secundaria que sí está formada por hueso laminar o haversiano (**Eriksern, 1994**).

En el modelo de injertos óseos se observó que la formación de hueso inmaduro entrelazado se observa a las 4 semanas. El proceso de maduración de ese hueso dura hasta los 6 meses aunque el aspecto de hueso normal llega a tardar en aparecer tras el remodelado hasta 6 años (**Marx, 1999**).

En el modelo de alvéolo postextracción se demuestra que a partir de la 4ª semana se forma el hueso inmaduro que va creciendo desde la zona apical hacia arriba por las paredes del alvéolo, originándose de manera intramembranosa. Existiendo menor formación en el lado bucal que en el lado palatino. Entre las semanas 5ª y 7ª aparecen las primeras trabéculas formadas de hueso inmaduro. Después de 2 meses la curación es completada y se inicia la remodelación hacia hueso laminar que durará entre 6 y 12 meses. Parte del alveolo va a ser ocupado por un tejido de reparación (tejido fibroso) en vez de hueso (**Adriaens, 1999**).

FASE DEL REMODELADO Y MODELADO ÓSEO

El *remodelado* es una reestructuración interna mediante la cual el tejido óseo envejecido (con microfracturas) ya existente es sustituido por un tejido óseo joven, para resistir de mejor forma las cargas biomecánicas, pero sin modificar la distribución espacial del hueso. En el *modelado*, sin embargo, no hay un recambio sino solo un cambio de tamaño y/o forma del hueso y puede ser anabólico (aposisión) o catabólico (reabsorción) de manera superficial, pero no los dos procesos acoplados en la misma localización como ocurre en el remodelado. Este proceso se produce durante el crecimiento óseo hasta la edad adulta y también ante determinadas situaciones de carga (sobrecarga o atrofia) en el paciente adulto provocando una nueva reorientación del hueso. En los huesos maxilares no existe el modelado a nivel del endosito pero sí el que ocurre en las superficies periósticas. En ocasiones ambos conceptos de modelado y remodelado han sido confundidos (**Serrano, 1990; Eriksen, 1994**).

En el adulto, cerca de un 8% del tejido óseo es renovado anualmente. Esta cifra es superior en el joven e inferior en el anciano. El remodelado óseo se lleva a cabo mediante la acción sucesiva (acoplamiento) de osteoclastos y osteoblastos sobre una misma superficie ósea. Cada ciclo de remodelado consta de tres fases: reabsorción, reposo o inversión y formación.

El conjunto de osteoclastos y osteoblastos que de manera coordinada actúan en una superficie ósea durante un ciclo de remodelado recibe el nombre de **Unidad Multicelular Básica (BMU)** (**Eriksen, 1994**). Las BMU se activan de manera asincrónica, por lo que mientras unos ciclos de remodelado se hallan en fase de reabsorción, otros se encuentran en fase de reposo o de formación. La BMU cortical (cono de corte) avanza unos 4000 μm a una velocidad aproximada de 20 $\mu\text{m}/\text{día}$, llevándole aproximadamente 200 días. La BMU trabecular (hemicono de corte) avanza la mitad de la distancia que la cortical, a la mitad de velocidad, en aproximadamente el mismo periodo de tiempo (**Parfitt, 2002**). Parece que una parte del remodelado es dirigido (“targeted”) por las microfracturas para lograr su reparación, mientras que otro remodelado es el denominado excedente o hipotético. Para explicar este segundo tipo de remodelado se han establecido diferentes causas: 1.- Remodelado dirigido para la remoción de hueso hipermineralizado. 2.- Remodelado dirigido que crece más allá de su objetivo de reparación debido a situaciones hormonales y un mayor aporte de osteoclastos. 2.- Proceso hipotético no dirigido (**Parfitt, 2002**).

El nuevo segmento de tejido óseo que resulta de la acción de cada BMU se denomina **Unidad Estructural Básica (BSU)**. El límite entre el hueso preexistente y la nueva BSU es identificable morfológicamente como una línea ondulada y recibe el nombre de superficie de inversión, que indicaría el límite máximo de entrada de los osteoclastos en el hueso. La formación de tejido óseo no es continuo. La superficie que indica el límite entre el hueso depositado durante un período de actividad y el depositado durante el período siguiente se denomina *superficie de parada* y se distingue histológicamente como una línea basófila lisa. El número de superficies de parada aumenta con la edad. Tanto las superficies de inversión como las de parada se denominan como *superficies de cementación* (cement lines) (por la unión que hacen de estructuras óseas) (Serrano, 1990).

Se denomina *recambio óseo* (*bone turnover*) al volumen total de hueso que es renovado por unidad de tiempo mediante el remodelado. El recambio óseo es directamente proporcional al número de ciclos de remodelado en curso o, lo que es lo mismo, al número de BMU activas. La diferencia entre el volumen de hueso formado y el de hueso reabsorbido, por unidad de tiempo, se denomina *balance óseo*. Si la reabsorción y la formación son idénticas, el balance es igual a cero y el volumen total de hueso (masa ósea) no variaría en función del tiempo. Si la formación y la reabsorción no son iguales, la masa ósea se modificará en sentido positivo o negativo. El balance óseo corresponde a la suma aritmética del hueso ganado o perdido en cada ciclo de remodelado. Así pues, una vez instaurado un balance positivo o negativo, la velocidad a la que se perderá o ganará masa ósea será directamente proporcional al número de BMU activa. La remodelación es de 5-10 veces más rápida en el hueso trabecular que el cortical.

La remodelación ósea consta de 4 fases fundamentales:

I. Fase de reposo

Los huesos están cubiertos por una capa delgada de células superficiales o de revestimiento, aparentemente inertes, aplanadas, con un grosor de 0,1 a 1 μm , con un diámetro de 50 μm y son representantes de la transformación terminal de osteoblastos, los cuales probablemente conservan restos de receptores hormonales y de respuesta a los estímulos, pero no pueden sintetizar colágena, impidiendo esta carencia el que se les pueda llamar osteoblastos en reposo; al parecer también pueden retener la función de precursores celulares osteogénicos.

Estas células son activadas por los osteocitos por transducción de impulsos mecánicos y piezoeléctricos y/o por la liberación de factores de crecimiento, induciendo citoquinas que diferencian y atraen a los osteoclastos, de tal modo que se retraen permitiendo el acceso de los osteoclastos de la matriz mineralizada (**Serrano, 1998**).

II. Fase de reabsorción

En el hueso compacto los osteoclastos, partiendo de un canal de Havers o de Volkmann, excavan un túnel de sección circular. Por esta razón las BSU corticales, llamadas también osteonas, tienen forma cilíndrica o de cono, que estarán centradas por un nuevo canal de Havers. En la remodelación del hueso esponjoso los osteoclastos labran en la superficie de las trabéculas, excavaciones poco profundas y de base ancha. Por esta razón las BSU trabeculares, llamadas también *lagunas de Howship*, tienen forma de lente plano-convexa.

El avance del cono de corte de la osteona secundaria se realiza a una velocidad de unos 30 $\mu\text{m}/\text{día}$ en el hueso cortical, y de 0,6 $\mu\text{m}/\text{día}$ en el hueso trabecular, dura de 1-2 meses en humanos. Los osteoclastos de las nuevas osteonas dejan un límite periférico ondulado a su paso que diferencian a una osteona primaria de la secundaria cuando se observan cortes histológicos (**Eriksern, 1994**).

Los osteoclastos primero solubilizan el mineral y luego se encargan de la matriz orgánica mediante enzimas ácidas lisosomales. El mineral se solubiliza acidificando el microambiente creado entre la matriz ósea y la membrana fruncida del osteoclasto. La acidificación ($\text{pH}=4$) se logra bombeando hacia el hueso los protones H^+ . En el citoplasma de los osteoclastos la anhidrasa carbónica tipo II cataliza la reacción entre el CO_2 y el H_2O dando lugar a CO_3H_2 que se disocia en CO_3H^- y H^+ , el H^+ es bombeado activamente hacia la matriz ósea a través de la membrana plegada mediante una bomba de protones dotada de una ATPasa específica. El CO_3H^- es expulsado fuera de la célula a través de la superficie opuesta donde es intercambiado activamente en la célula por Cl^- . El Cl^- no se acumula en el interior del osteoclasto puesto que es expulsado mediante canales específicos del borde plegado, hacia la matriz ósea donde se une a los H^+ , originando finalmente HCl que disuelve la matriz mineral. El bloqueo de tales canales está marcando líneas de investigación para desarrollar fármacos que inhiban la reabsorción ósea (**Mundy, 1992; Mindin, 1999**).

Una vez eliminado el mineral, la matriz orgánica es digerida por colagenasas ácidas y otras enzimas proteolíticas de origen lisosómico, cuyos productos migran por

endocitosis al lado opuesto a la reabsorción. Cuando se ha completado el proceso de reabsorción, los osteoclastos mueren por apoptosis. Los núcleos se hacen más pequeños e hiper cromáticos y se fragmentan hasta desaparecer y el citoplasma aumenta su acidofilia y se retrae. Estos restos celulares serán fagocitados por células macrofágicas. In vitro, la apoptosis de los osteoclastos es promovida por el factor de crecimiento tumoral beta (TNF- β , por Tumoral Necrosis Factor- β). La profundidad de la erosión de la reabsorción va a depender del tiempo a que esté predefinida la apoptosis, todavía desconocido, aunque de manera habitual tiene un espesor de 50 μm en las trabéculas, y una longitud de 100 μm en las osteonas. En las cavidades de reabsorción también se observan otras células mononucleares, que realizan el último tercio de la reabsorción y su función no está del todo clara. Parece que el calcio liberado durante la reabsorción puede penetrar en el interior del osteoclasto a través de canales de Ca^{++} situados en la membrana plegada e inhibir la actividad reabsortiva de estas células (**Teitelbaum, 2000**).

III. Fase de inversión

Es un período de aparente inactividad en la que se sustituyen los osteoclastos por osteoblastos (1-2 semanas). Se produce el llamado “*acoplamiento*” en el que los preosteoblastos son transformados en osteoblastos, y sustituyen a los osteoclastos. No se conoce con exactitud el mecanismo por el cual se activan los osteoblastos y se realiza la iniciación del fenómeno de acoplamiento (**Serrano, 1990**).

Mundy (1999) ha propuesto un modelo para conocer el mecanismo de activación de los preosteoblastos. Estaría mediado por el TGF β , mecanismo que probablemente siguen otros factores. El TGF β está unido en la matriz a una proteína de unión, que lo protege contra la proteólisis en el ambiente de pH ácido, por debajo del osteoclasto. Esta proteína liberará el péptido cuando aumente el pH en el exterior del borde rugoso al desaparecer los osteoclastos. El TGF β liberado puede estimular, entonces, el reclutamiento de osteoblastos próximos. Es inherente a este modelo un mecanismo que mantiene el equilibrio entre resorción y formación, es decir, cuanto más se eliminan los osteoclastos, más TGF β es liberado y más osteoblastos nuevos son reclutados para depositar hueso nuevo.

IV. Fase de formación

Esta fase dura unos 3 meses en los humanos y se realiza la deposición de un nuevo hueso. Los osteoblastos depositan en primer lugar una línea de cementación (superficie de inversión) y seguidamente una matriz ósea no mineralizada que forma

una capa de unas 10 micras de espesor denominada *ribete de osteoide*. Entre el depósito de osteoide y mineralización existe un tiempo de demora de unos 10 a 20 días. Durante este período la matriz ósea sufre cambios en su composición y estructura que la hacen apta para el depósito de mineral (maduración de la matriz). La mineralización se inicia en la interfase entre el osteoide y el hueso mineralizado preexistente y avanza hacia la superficie a lo largo de un plano de barrido de 2 a 3 micras de espesor. Este plano, integrado en parte por mineral amorfo no bien organizado, se denomina *frente de mineralización*. A medida que este frente va dejando tras de sí matriz ósea mineralizada en forma de cristales de hidroxiapatita. Una vez completado el depósito de hueso los osteoblastos que no se han incorporado a la matriz se aplanan y pasan a formar parte del endostio (lining cells). Con este proceso el hueso alcanza en pocos días un 70% de su mineralización máxima. A continuación se iniciaría una mineralización secundaria que dura de 3 a 6 meses y termina cuando el hueso ha alcanzado el 90-95% de su mineralización (Serrano, 1990).

Aproximadamente entre 100 y 150 osteoblastos ocupan la superficie de un osteoclasto. Parece que la capacidad para rellenar totalmente la cavidad depende más de la capacidad de diferenciación osteoblástica a partir de las MSCs que del número de osteoblastos de revestimiento que estuviesen fijados a la línea de cemento antes de iniciarse el proceso de formación. Al final de la fase de formación los osteoblastos se transforman en células de revestimiento y muchos de ellos se eliminan mediante un proceso apoptótico (Martin, 2000).

HISTORIA DE LOS INJERTOS ÓSEOS

El primer indicio del empleo de injertos óseos para la reconstrucción de defectos óseos data de 1668, cuando *Van Meekren* trasplantó hueso heterólogo de un perro al hombre para restaurar un defecto en el cráneo. En 1809 *Merrem*, realizó el primer trasplante de injerto autólogo óseo con éxito. En 1878 *Macewen*, según se informa, trasplantó con éxito un hueso alogénico en humanos. En 1891 *Bardenheuer* fue el primero en realizar un injerto de hueso autólogo a la mandíbula. En 1908, *Payr* describió el uso de trasplantes libres de tibia y costilla. En 1938 *Orell* produjo un material de injerto de hueso bovino por medio del uso de álcalis fuerte, y en 1942 *Wilson*, creó un banco de huesos usando técnicas de congelación.

CLASIFICACIÓN DE LOS INJERTOS ÓSEOS

Una de las posibilidades terapéuticas disponible para compensar la pérdida ósea consiste en la restitución de ésta mediante la utilización de diversos tipos de injertos o sustitutos óseos, entre los cuales y según su procedencia diferenciamos los siguientes (Peñarrocha-Diago, 2006):

- *Autoinjerto*. Injerto procedente del propio individuo. Las células óseas vivas son transplantadas de una parte a otra del mismo organismo. Su procedencia es variada, desde la zona anterior de la tibia, pasando por la cresta ilíaca y de calota, llegando hasta zonas dadora intraorales como pueden ser la zona del mentón, la rama ascendente mandibular o la tuberosidad maxilar.
- *Aloinjerto*. Injerto procedente de individuos de la misma especie.
- *Xenoinjerto*. Injertos procedentes de otras especies.
- *Sustitutos no óseos*. Injertos naturales o sintéticos.

LOS AUTOINJERTOS ÓSEOS

Existen numerosos estudios sobre los autoinjertos, y la mayoría de los autores consideran el injerto de hueso autólogo como el mejor sustituto óseo, ya que posee las mejores propiedades biológicas. Es osteogénico, pues contiene células vitales, factores de crecimiento óseo y proteínas morfogenéticas y no provoca reacciones inmunitarias adversas debido a que el material injertado procede del propio individuo (Misch, 1995; Monte, 1995).

La aplicación del hueso autólogo en la zona receptora puede realizarse de en forma particulada o en bloques óseos. La elección de la procedencia del injerto y la cantidad o volumen de éste dependen del defecto óseo que se esté tratando. El hueso injertado puede estar formado de hueso cortical, de hueso esponjoso o de ambos.

Según Bouchardt (1983), existen tres diferencias histológicas entre los dos tipos de hueso: a) los injertos de hueso esponjoso se revascularizan de forma más rápida y completa que los injertos de hueso cortical; b) en el injerto de hueso esponjoso, existe inicialmente una formación de hueso por aposición, seguida de una fase de resorción, mientras que en el hueso cortical ocurre inicialmente la resorción seguida de la aposición; y c) los injertos de hueso esponjoso son completamente reemplazados por un

proceso de remodelación. En el hueso cortical el proceso de remodelación tarda mucho más y permanece durante largos períodos como una mezcla de hueso necrótico y hueso vital.

Los autoinjertos óseos son muy utilizados en el campo de la cirugía maxilofacial y oral, por ejemplo, para la obliteración del seno frontal en casos de osteomielitis crónica (**Acosta-Feria, 2006**).

Una de las zonas dadoras de estos injertos es la zona proximal de la tibia (**Jaske, 2001**). Se pueden obtener entre 5 y 30 cc de hueso esponjoso en partículas, tomados con cucharillas o trefinas en la meseta tibial. Las complicaciones que pueden aparecer en la zona donante son la equimosis (más frecuente), molestias al deambular, serosas y rara vez parestesias, tromboflebitis o fractura tibial (**Mazock, 2004; Hernández-Alfaro, 2005**).

OTROS INJERTOS ÓSEOS

Como aparecía en la clasificación anterior de los distintos tipos de injertos óseos, existen, además de los autoinjertos, otros tipos de injertos dependiendo de la procedencia como son los aloinjertos, xenoinjertos y sustitutos no óseos.

Los *aloinjertos* o injertos homólogos son injertos obtenidos de individuos de la misma especie. Una característica de estos materiales de injerto es su resorción: en el caso de hueso mineralizado es demasiado prematura para que cumpla su función y en el desmineralizado está excesivamente retardada, de forma que se encuentran partículas no vitales en el material de biopsia, así como partículas rodeadas de tejido fibroso (**Rivera, 2004**). En la actualidad, la obtención de estos injertos se realiza de manera muy rigurosa seleccionando al donante previo estudio médico y social del mismo, y recuperando los tejidos en las primeras 24 horas tras el fallecimiento. Las piezas obtenidas son almacenadas a -70°C y sometidas con posterioridad a cultivos y exámenes sexológicos y un proceso riguroso de esterilización que le confiere una mayor seguridad para evitar reacciones inmunitarias y contagios (**Peñarrocha-Diago, 2006**).

Por otra parte encontramos los *xenoinjertos*, material procedente de especie diferente a la del receptor. Se consiguen a través de procesos industriales y consiguen productos biocompatibles y estructuralmente similares al hueso humano, con un contenido mineral parecido. Los xenoinjertos son osteoconductores y su ventaja estriba en que son de fácil obtención y hasta hace poco se consideraban casi por entero libres de

riesgo. Aunque este último punto está cuestionado, sobre todo a lo que se refiere a la hidroxiapatita de origen bovino, con la aparición de la encefalopatía espongiiforma bovina (**Peñarrocha-Diago, 2006**).

Cada vez es más frecuente el uso combinado de autoinjertos y xenoinjertos.

El último tipo de material de injerto óseo son los *aloinjertos o sustitutos sintéticos no óseos*, donde podemos encontrar materiales como el fosfato tricálcico, las hidroxiapatitas sintéticas, los cristales bioactivos y los polímeros (*Tabla 3*).

Tabla 3: Sustitutos no óseos (Peñarrocha Diago, 2006)

<u>No reabsorbibles</u>	<u>Reabsorbibles</u>
<ul style="list-style-type: none"> - Polímeros - Polisulfonas porosas - Biocristales - Hidroxiapatitas densas y porosas sintéticas 	<ul style="list-style-type: none"> - Naturales <ul style="list-style-type: none"> o Coral - Sintéticos <ul style="list-style-type: none"> o Hidroxiapatitas porosas o Fosfato tricálcico

El *fosfato tricálcico* es la forma porosa del fosfato cálcico (β -fosfato tricálcico). La proporción de calcio y fosfato es similar a la del hueso. Es un material de relleno parcialmente reabsorbible que también permite su reemplazo por hueso nuevo.

La *hidroxiapatita* $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ es el componente mineral del hueso. Se encuentra comercializado en las formas porosas y no porosas, y a su vez reabsorbibles o no, dependiendo del proceso de obtención. La hidroxiapatita sintética obtenida a alta temperatura es una cerámica, no porosa, densa, no reabsorbible y de cristal grande. Es osteofílica, osteoconductiva y en inicio inerte, biocompatible y particulada. La hidroxiapatita porosa se obtiene al incluir naftaleno en la mezcla, que al calentarse se sublima dejando poros en la partícula. Estos poros pueden no estar interconectados y, además, cuando el bloque así tratado se tritura para convertirla en partículas, es posible que queden fragmentos no porosos (**Rivera, 2003; Rivera, 2004; Peñarrocha-Diago, 2006**).

PLASMA RICO EN FACTORES DE CRECIMIENTO

Los factores de crecimiento son polipéptidos, contenidos en diferentes tipos celulares y en la matriz extracelular, que juegan un papel fundamental en la estimulación y regulación de la curación de heridas en diferentes tejidos del organismo. Parecen regular diversos procesos celulares, como son la mitogénesis, quimiotaxis, diferenciación y el metabolismo celular (**Garg, 2000**). Estos factores de crecimiento se encuentran acumulados en los gránulos β de las plaquetas.

En la actualidad se acepta que los factores de crecimiento tienen un papel esencial en el proceso de curación y formación tisular (**Werner, 2003**). En realidad, todos los estadios del proceso de reparación están controlados por una amplia variedad de citoquinas y factores de crecimiento actuando localmente como reguladores de las funciones celulares más básicas, usando mecanismos endocrinos, paracrin, autocrinos e intracrin. Los factores de crecimiento influyen en mucho de los procesos comunes de la reparación tisular y las enfermedades, incluyendo la angiogénesis, quimiotaxis y proliferación celular, además del control de la síntesis y degradación de las proteínas de la matriz extracelular (**Anitua, 2006**).

Su modo de acción se realiza al unirse a su receptor extracelular que va a activar la vía intracelular de transducción de señales (**Liebermann, 2002; Tabata, 2003**).

El descubrimiento de muchas de las funciones de los factores de crecimiento en la reparación tisular ha llevado a la conclusión de que el control temporal de su expresión es crucial en algunas intervenciones quirúrgicas y en el tratamiento de los desórdenes músculoesqueléticos, incluyendo fracturas óseas, defectos de cartílagos y lesiones musculares o tendinosas (**Luginbuehl, 2004**).

Las plaquetas son fragmentos anucleares de los megacariocitos, con una forma discoide y cuya concentración normal en sangre se ha considerado habitualmente de 150.000-400.000/ μ l ó $1,5-4 \times 10^6$ /ml. Cuando se produce una herida, a la membrana plaquetaria se une el factor plasmático de Von Willebrand (a través de la glicoproteína Ib) que hace que se unan al colágeno expuesto de la pared vascular (adhesión), y de esta manera se unan entre sí (agregación). La agregación entre plaquetas se hace a través de puentes de fibrinógeno entre glicoproteínas de membrana (glicoproteína IIb-IIIa). La activación (degranulación) de las plaquetas se puede realizar por varios mecanismos

mecánicos o químicos: uno de los más fuertes es la adhesión de las plaquetas al colágeno y otros componentes del subendotelio, o por la presencia de trombina.

Todos los mecanismos de activación plaquetaria, al parecer, lo hacen activando fosfolipasas de la membrana celular que promueven la liberación de Ca^{++} , el cual por sí solo produce agregación y secreción. La degranulación plaquetaria libera tromboxano A₂ (Tx A₂), adenosindifosfatos (ADP) y serotonina que estimulan el reclutamiento y activación de las plaquetas circundantes. También van a contener fibrinógeno, fibronectina e interleuquinas (IL) 1, 3 y 6. Cuando se activan las plaquetas asumen una morfología esférica y espinosa con movimientos de pseudópodos y expulsión de los gránulos (**Eснаola, 1998**).

Después de agregarse y activarse las plaquetas se liberan nuevos factores agregantes, que, junto con la fase plasmática de la coagulación van a originar la formación de trombina y posteriormente la sustitución del fibrinógeno soluble por la red de fibrina. En los gránulos alfa liberados por las plaquetas se van a encontrar una serie de factores de crecimiento (**Mundy, 1992; Anitua, 2001**).

Los diferentes tipos de factores de crecimiento son los siguientes:

- **Factor de crecimiento transformante β (TGF β):** descrito inicialmente en células que presentaban transformación maligna (sarcomas). Es una superfamilia que se detecta en el hematoma de fractura en las primeras 24 horas. Presenta 5 isoformas, pero las formas β 1 y β 2 han sido las más investigadas por lo que de manera general se refiere de manera conjunta las 2 isoformas como el TGF β . Los TGF β 1 y TGF β 2 se encuentran en las plaquetas principalmente y también en los macrófagos, linfocitos, neutrófilos, MSCs, osteoblastos (que lo producen con un efecto autocrino) y la matriz ósea. Van a actuar de manera paracrina o autocrina y su principal función es la quimiotaxis y diferenciación de las MSCs, y para la producción de colágeno por parte de los osteoblastos. Favorece también la angiogénesis. Inhiben la formación de osteoclastos y la reabsorción ósea (**Marx, 1999**). No es bien conocido pero parece que tiene un efecto mitogénico en las células mesenquimales e inhibitorio de la proliferación en células epiteliales y dependiente de la presencia de otros GFs.
- **Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF):** presenta 3 isoformas AA, AB y BB. Actúan en las células a través de un receptor tirosina-quinasa que pueden ser de tipo α y unirse a las cadenas A y B, o de tipo β que sólo se unen a cadenas β . Principalmente producido por las plaquetas, también

se produce en macrófagos, osteoblastos (isoforma BB), condrocitos, fibroblastos y las células endoteliales. Facilita la angiogénesis por vía indirecta a través de los macrófagos que actúan sobre las células endoteliales, realiza un efecto quimiotáctico y activador sobre las células de inflamación (macrófagos), favorece la quimiotaxis y proliferación de células mesenquimales (mitogénico), y facilitan la formación de colágeno tipo I por parte de los osteoblastos. Se achaca a este factor el 50% del efecto mitogénico proveniente de las plaquetas, el resto correspondería a otros GFs (**Ross, 1986**). Se considera que en la sangre normal existen 0,06 ng de PDGF por millón de plaquetas o 1200 moléculas de PDGF por plaqueta (**Barnes, 1999; Marx, 1999**).

- **Factor de crecimiento fibroblástico (FGF):** Su efecto sobre los fibroblastos fue la primera de sus funciones descrita, lo que le valió el nombre. La forma II o básica parece que es la más potente en la función mitogénica. Hoy se sabe que actúa también sobre otras células. Es producido no sólo por los fibroblastos sino también por los macrófagos, osteoblastos, plaquetas y células endoteliales a lo largo del proceso de curación ósea. Parece que aumenta la proliferación y diferenciación de osteoblastos y la inhibición de osteoclastos. Actúan sobre los fibroblastos aumentando su proliferación y la producción de fibronectina. También favorecen la angiogénesis por su acción mitogénica y quimiotáctica sobre las células endoteliales.
- **Factor de crecimiento similar a la insulina (IGF):** con una semejanza del 50% con la insulina, se encuentra en el torrente circulatorio unido a proteínas de unión específicas. Producido por las plaquetas, macrófagos, osteoblastos y MSCs, también se encuentra en la matriz ósea. De manera autocrina o paracrina estimula la proliferación (mitogénesis) y diferenciación de las MSCs y de las células de revestimiento, así como la formación por parte de los osteoblastos de osteocalcina, fosfatasa alcalina y de colágeno tipo I durante el remodelado óseo (**Marx, 1999**).
- **Factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF):** proteína que presenta 4 isoformas. También llamado factor de permeabilidad vascular o VPF. Actúa sobre la quimiotaxis y la proliferación de las células endoteliales. Realiza una hiperpermeabilidad de los vasos. Producido por varias células, entre ellas las plaquetas, macrófagos, osteoblastos y las células musculares lisas, sobre todo en estados de hipoxia. Su acción parece que está regulada por la acción de TGF β y

PDGF. Existen 0,0006 ng de VEGF por millón de plaquetas (**Banks, 1998; Lakey, 2000**).

- **Factor de crecimiento epidérmico (EGF):** descrito por primera vez en la glándula submaxilar, tiene una gran similitud con el TGF α lo que hace que se unan al mismo receptor. Su acción parece que también está regulada por la acción de TGF β y PDGF. Su función es mitogénica, proapoptótica, migración y de diferenciación, no sólo de las células epiteliales, sino también de fibroblastos, células del cristalino, células renales y células gliales a partir de células mesenquimales (**Bolufer, 1988**).

El mecanismo de acción de los distintos GFs sobre las células es bastante similar aunque todavía no se conocen las moléculas exactas y los caminos específicos de cada factor de crecimiento. Por otro lado, diferentes GFs pueden producir efectos biológicos opuestos en las mismas células (por ejemplo, PDGF y TGF β). En el torrente circulatorio y la matriz extracelular se unen a proteínas específicas poco conocidas que impiden su rápida degradación. De manera general, los GFs actúan a nivel de la membrana celular a través de receptores específicos, los cuales se activan iniciando en el citoplasma una actividad de fosforilación del tipo tirosina-kinasa (PDGF, FGF, IGF, VEGF, EGF) o bien seronina-treonina-kinasa (TGF β , BMPs), que activan específicos mecanismos de transducción de señales que se introduce en el núcleo para la expresión de genes específicos. El efecto final producido es multifuncional y va a depender de la célula diana y del estado fisiológico de la misma, de la relación con otras células, la matriz extracelular y la presencia de otros factores (**Martín, 1995; Martínez-Valverde, 1999**).

El mecanismo de acción de los distintos factores de crecimiento (FC) sobre las células es bastante similar. Por otro lado, diferentes factores de crecimiento pueden producir efectos biológicos opuestos en la misma célula (p. ej. PDFG y TGF β). En el torrente circulatorio, la matriz extracelular se une a proteínas específicas poco conocidas, que impiden su rápida degradación.

Tabla 4: Diferentes Factores de Crecimiento liberados por las plaquetas. (Martínez, 2002)

Factor de crecimiento de transformación β	Isoformas	5 isoformas. β 1 y β 2 son las más estudiadas
	Células productoras	Plaquetas, macrófagos, linfocitos neutrófilos, MSCs, osteoblastos, matriz ósea.
	Función	Quimiotaxis, diferenciación de las MSCs, producción de colágeno por osteoblastos, favorece la angiogénesis, inhibe la formación de osteoclastos y la reabsorción ósea (Marx, 1999). Tiene efecto mitogénico en las células mesenquimales e inhibe la proliferación en células epiteliales dependiendo de la presencia de otros factores de crecimiento.
Factor de crecimiento de origen plaquetario	Isoformas	3 isoformas : AA, AB y BB
	Células productoras	Plaquetas (principalmente) macrófagos, osteoblastos (isoforma BB) condrocitos, fibroblastos y células endoteliales.
	Función	Facilita la angiogénesis por vía indirecta a través de los macrófagos que actúan sobre las células endoteliales, efecto quimiotáctico y activador sobre las células de inflamación (macrófagos); favorecen la quimiotaxis y proliferación de células mesenquimales (mitogénico); facilita la formación de colágeno tipo I; 50 % del efecto mitogénico proveniente de las plaquetas (Ross, 1986; Barnes, 1999).
Factor de crecimiento fibroblástico	Isoformas	2 isoformas. Tipos I y II. La forma II o básica parece que es la más potente en la función mitogénica.
	Células productoras	Fibroblastos (principalmente), macrófagos, osteoblastos, plaquetas y células endoteliales.
	Función	Aumentan la proliferación y diferenciación de osteoblastos y la inhibición de osteoclastos. Actúan sobre los fibroblastos aumentando su proliferación y la producción de fibronectina. Favorece la angiogénesis por su acción mitogénica y quimiotáctica sobre células endoteliales.

Factor de crecimiento similar a la insulina	Isoformas	2 isoformas. Tipo I y II.
	Células productoras	Plaquetas, macrófagos, osteoblastos, MSCs y matriz ósea.
	Función	Estimula la proliferación (mitogénesis) y diferenciación de las MSCs y de las células de revestimiento, así como la formación por parte de los osteoblastos de osteocalcina, fosfatasa alcalina y de colágeno tipo I; induce la diferenciación de MSCs y de las células de revestimiento, durante el remodelado óseo, al igual que las BMPs y el TGF β (Marx, 1999)
Factor de crecimiento epidérmico	Isoformas	1 isoforma. Gran similitud con el TGF alfa, lo que hace que se unan al mismo receptor.
	Células productoras	Plaquetas, fibroblastos, células endoteliales.
	Función	Tiene función mitogénica, proapoptótico, migración y de diferenciación no sólo de las células epiteliales, sino también sobre fibroblastos, células renales y células gliales a partir de células mesenquimales.
Factor de crecimiento endotelial vascular	Isoformas	4 isoformas. También denominado factor de permeabilidad vascular (VPF).
	Células productoras	Plaquetas, macrófagos, osteoblastos y células musculares lisas, sobre todo en estados de hipoxia.
	Función	Actúan sobre la quimotaxis y la proliferación de las células endoteliales, realiza una hiperpermeabilidad de los vasos. Su acción parece estar regulada por la acción de TGF β y PDGF (Banks, 1998; Lakey, 2000).

De manera general los FC actúan a nivel de la membrana celular a través de receptores específicos; estos receptores se activan iniciando en el citoplasma una actividad de fosforilación del tipo tirosina-quinasa (PDGF, FGF, IGF, VEGF, EGF) o bien serina-treonina quinasa (TGF β , BMPs), que activan rutas específicas de transducción de señal que se introducen posteriormente en el núcleo para la expresión de genes específicos. El efecto final producido es multifuncional y va a depender de la célula diana y del estado fisiológico de la misma, de su relación con otras células, de la matriz extracelular y de la presencia de otros factores de crecimiento (**Martín, 1999; Martínez-Valverde, 1999**).

EVOLUCIÓN HISTÓRICA.

Los factores de crecimiento fueron descubiertos por **Knighton** en **1982**. En los años 90, el grupo de investigadores dirigido por **Marx (1998)** estudiaron el comportamiento del elemento de la sangre responsable de la reparación celular, “las plaquetas”, encontrando tres factores de crecimiento. Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), factor de crecimiento transformante tipo $\beta 1$ (TGF $\beta 1$) y factor de crecimiento transformante $\beta 2$ (TGF $\beta 2$). Otros autores describen siete factores de crecimiento (**Anitua, 2001; Herrera, 2004**).

APLICACIONES MÉDICAS DEL PLASMA RICO EN FACTORES CRECIMIENTO.

Los factores de crecimiento son utilizados de forma progresiva en medicina para favorecer la curación de heridas y la formación de nuevos tejidos.

Los desórdenes músculoesqueléticos son una de las causas de mayor morbilidad. Además, tienen un importante impacto en la calidad de vida, incluyendo discapacidad, con consecuencias económicas. La importancia de este problema queda expresada por el incremento del número de pacientes que sufren enfermedades articulares y fracturas por osteoporosis. Además, las lesiones músculoesqueléticas derivadas de las actividades deportivas y los accidentes de tráfico también contribuyen al incremento del coste socio-sanitario y financiero.

El uso del plasma rico en plaquetas ayuda a suplir muchos de estos requerimientos, particularmente como ayuda a la regeneración ósea. Muchos estudios *in*

vitro han demostrado, claramente, que los factores de crecimiento derivados de las plaquetas estimulan la proliferación de células formadoras de hueso trabecular humano (**Gruber, 2002**). Así, por ejemplo, **Arriaza**, en el año **2005**, realizó inyecciones percutáneas de Plasma rico en factores de crecimiento en pacientes que había sufrido fracturas de huesos largos, asociándolo a la terapia con ondas de choque, obteniendo buenos resultados.

También se está usando el plasma rico en factores de crecimiento en desórdenes de los tejidos blandos, incluyendo en estos las lesiones en tendones, ligamentos o discos articulares, lo que representa el 45% de todas las heridas músculoesqueléticas registradas cada año en Estados Unidos, sobre todo en personas que practican deporte (**Praemer, 1999**).

En relación a esta cuestión, el grupo de investigación de Eduardo Anitua, realizó estudios sobre los efectos de los factores de crecimiento liberados por las plaquetas en la biología de las células tendinosas, para probar el potencial terapéutico del PRGF (**Anitua, 2005**).

El conjunto de los factores de crecimiento liberados incrementan significativamente, *in vitro* la proliferación de células tendinosas humanas y estimulan la producción de factores angiogénicos como el VEGF (Factor de crecimiento Endotelial Vascular) y el HGF (Factor de Crecimiento Hepático) (**Anitua, 2007**).

Además, el HGF es un potente agente antifibrótico que puede reducir la formación de cicatrices alrededor del tejido tendinoso, lo que supondría una reparación de calidad inferior (**Award, 2003**).

Asimismo, el grupo de Eduardo Anitua cultivó células tendinosas en matrices de fibrina autóloga, simulando las condiciones de las células *in vivo*. Sus resultados mostraban que el uso de matrices de fibrina rica en plaqueta es una estrategia segura y efectiva para acelerar la proliferación de células tendinosas, estimular la síntesis de colágeno tipo I y promover la neovascularización tanto *in vitro* como *in vivo* (**Anitua, 2006**).

Además, la efectividad y seguridad de las preparaciones de plasma rico en plaquetas para el tratamiento de las ulceraciones ha sido recientemente publicado. Así, por ejemplo, el grupo de estudio de **Steed** en **1995**, realizaron un experiencia sobre 118 pacientes con úlceras crónicas de al menos 8 semanas de evolución. Después de dejar libre la herida de tejido infectado y necrótico, fueron tratados con factores de crecimiento derivados de las plaquetas, durante un máximo de 20 semanas.

Concluyeron que una aplicación tópica diaria del preparado del plasma rico en factores de crecimiento era un método seguro y efectivo para la estimulación y la curación de las úlceras diabéticas en miembros inferiores.

Otros estudios (**Escotto, 2001 y Martí-Mestre, 2005**), concluyeron que los factores de crecimiento eran una alternativa más al tratamiento de las úlceras de miembros inferiores. La explicación a este fenómeno la encontramos en que, al analizar histológicamente los tejidos de las heridas crónicas, se observa que hay muy poca celularidad, pocos fibroblastos, escasos capilares neo-formados y pocas células inflamatorias, mientras que los tejidos cicatrizados se caracterizan por un infiltrado de mononucleares y macrófagos, fibroblastos en división y numerosos capilares.

La cicatrización es un proceso complejo que involucra a diferentes factores. Después de una lesión, una serie de enzimas séricas se activan en cascada iniciando el proceso de cicatrización. La cascada de la coagulación controla la hemorragia en el espacio de la herida y, los mismos factores que activan esta cascada, también activan el sistema fibrinolítico, el cual modula el proceso de coagulación. El sistema del complemento es activado de la misma forma, lo que resulta en la formación del C_{5a}, el cual es el factor quimiotáctico para neutrófilos. Además, la activación de la cascada de las cininas permite la formación de potentes vasodilatadores que proveen de sangre y otros factores para la cicatrización de la herida.

Estas enzimas interactúan con el ambiente local, lo que atrae diferentes células a la herida, incluyendo plaquetas, monocitos, macrófagos, fibroblastos, células endoteliales y epiteliales. El ambiente de la herida es regulado por productos plaquetarios durante las primeras 24 horas de la herida y posteriormente por los monocitos, que se convierten en macrófagos de la herida. Las plaquetas y subsecuentemente los macrófagos, liberan factores de crecimiento en la herida, influenciando condiciones en ésta hasta que cicatriza.

Los factores de crecimiento son polipéptidos que regulan el crecimiento, diferenciación y metabolismo de varias células, actuando como factor mitógeno y quimiotáctico para neutrófilos y monocitos, estimulando la migración y proliferación de fibroblastos que permiten la síntesis y depósito de colágeno. También son factores quimiotácticos y mitógenos para las células endoteliales y epiteliales.

Cuando se utilizan ratones y ratas diabéticos alterados genéticamente, usando estreptozotocina, se observa retraso significativo en la cicatrización comparado con los controles no diabéticos. El mecanismo exacto por el cual los diabéticos no cicatrizan es

desconocido. Hay múltiple hipótesis como la glicosilación de proteínas estructurales importantes, factores de crecimiento, disminución de la liberación de oxígeno en el ámbito periférico por el engrosamiento de las membranas basales a nivel microvascular así como el déficit en la producción de factores de crecimiento específicos o falta de disponibilidad de estos en el sitio de la úlcera.

El plasma rico en factores de crecimiento también se está utilizando en cirugía ortopédica y articular. El estudio realizado por **Everts** y colaboradores, publicado en 2006, en el que realizaron 165 artroplastias total de rodilla, usando en 85 el plasma rico en factores de crecimiento en su forma de gel, observaron que, los pacientes a los que les habían añadido el gel necesitaban menos transfusiones de sangre que los del grupo control (**Everts, 2006**).

En otros ámbitos de la medicina, como es el caso de la cardiología, el plasma rico en factores de crecimiento se ha utilizado para tratar las heridas infectadas tras una cirugía cardíaca. Estas complicaciones en las heridas, supone un aumento en la morbilidad y mortalidad de los pacientes, y se traduce en una prolongación de la estancia hospitalaria y como consecuencia en los costes de la cirugía. La incidencia de complicaciones de la esternotomía varía ampliamente, oscilando entre un 0,16% en la cirugía congénita hasta un 4,5% en la cirugía de revascularización miocárdica (**Oakley, 1996; Ridderstolpe, 2001**).

El grupo de trabajo de **Tomasa Centella (2005)**, utilizó el plasma rico en factores de crecimiento para el tratamiento de 2 pacientes con infección profunda de esternotomía, 2 pacientes con fístula esternal y otros 2 con heridas profundas de la safenectomía, concluyendo que el plasma rico en plaquetas parece producir una aceleración de la cicatrización en heridas profundas, además de disminuir el tiempo de estancia y facilitar el trabajo de enfermería en pacientes con heridas infectadas tras cirugía cardíaca.

Otra de las especialidades médicas en las que se utiliza el PRP de manera exitosa es en la medicina y cirugía estética. La medicina antienvjecimiento ha cobrado auge, tanto por su continente (denominación y divulgación) como por su contenido (procedimientos diagnósticos, preventivos y terapéuticos). El uso del PRFC en la medicina antienvjecimiento está basado en la *bioestimulación*, conjunto de procedimientos para activar biológicamente las funciones anabólicas del fibroblasto, para que se produzca fundamentalmente colágeno tipo III, elastina y ácido hialurónico.

Además, en esta especialidad médica, se utiliza el PRFC en sus distintas formas de aplicación (**García-Gimenez, 2005; Hernández, 2005**):

- *Terapia tópica* en forma de coágulo para reparación cutánea.
- *Terapia subdérmica* (infiltración con adipocitos) para relleno de surcos o cicatrices deprimidas, para remodelación local o para reparación en paniculopatía edematofibroesclerótica (celulitis).
- *Terapia intradérmica* (a modo de mesoterapia) para bioestimulación cutánea.
- *Terapia tópica después de la exfoliación química* (por pulverización) para bioestimulación cutánea.

APLICACIONES DEL PLASMA RICO EN FACTORES DE CRECIMIENTO EN ODONTOLOGÍA Y CIRUGÍA MAXILOFACIAL.

En Odontología, el uso que se le ha dado al plasma rico en factores de crecimiento es muy variado.

En cirugía maxilofacial, por ejemplo, se ha empleado el plasma rico en plaquetas en el tratamiento de las sinusitis crónicas de los senos paranasales. Este tipo de sinusitis, puede dar lugar a complicaciones intracraneales como meningitis, trombosis de los senos venosos, absceso cerebral, absceso epidural y empiema subdural; pero también puede dar lugar a complicaciones extracraneales como mucocelos, osteomielitis, además, de complicaciones orbitarias.

Recientemente, se ha analizado el uso del Plasma Rico en Factores de Crecimiento como prevención de la alveolitis seca después de la exodoncia de terceros molares. Los autores, observaron mejor hemostasia, mejor aspecto del colgajo, menos dolor según una escala EVA, y menor incidencia de la alveolitis seca (**Mancuso, 2003**).

En el campo de la periodoncia, Okuda y Kawase han demostrado también la elevada concentración de PDGF y TGF-beta en el PRP, así como su elevada capacidad reguladora de la síntesis de colágeno en la matriz extracelular (**Kawase, 2003; Okuda, 2003**).

De Obarrio (2003) incorporaron el PRP a un aloinjerto de hueso combinado con técnicas de Regeneración Tisular Guiada para tratar defectos intraóseos, observando una ganancia significativa en la inserción clínica y en el relleno óseo de los controles a los 2 años.

Estudios en animales de experimentación (perros), a los que se les creaba defectos supraalveolares de 5 mm a partir de la línea amelocementaria, se les añadió al PRP + Bio-Oss® a las 6 semanas se sacrificaban los animales y se estudiaron al microscopio óptico. Los resultados obtenidos consistían fundamentalmente en el aumento de formación de hueso, cemento y ligamento periodontal, aunque se requieren más estudios para un mejor conocimiento del proceso (**Moreno Reyes, 2004**).

Otros trabajos han utilizado el PRP o el gel de fibrina en el manejo de defectos de recesión gingival, aisladamente o en combinación con diferentes técnicas de Regeneración ósea Guiada y distintos biomateriales. Pero sugieren asimismo que hay que seguir profundizando en el estudio (**Dugrillon, 2002; Lekovic, 2002**).

VENTAJAS DEL PLASMA RICO EN FACTORES DE CRECIMIENTO FRENTE AL PLASMA RICO EN PLAQUETAS.

El Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRFC) tiene las siguientes ventajas (**Anitua, 2000**):

- El PRGF posibilita la actuación conjunta de múltiples factores de crecimiento al mismo tiempo.
- Es un producto autólogo, lo que evita el riesgo de transmisión de enfermedades.
- Se activa con cloruro cálcico, lo que evita el desarrollo de algunas coagulopatías si se activara con trombina bovina como en el caso del PRP (**Lannddesberg, 2000**).
- Incrementa la vascularización de tejidos a través de la promoción de angiogénesis
- Proporciona un inmediato agente hemostático biocompatible, efectivo y seguro.
- Es reabsorbido por el organismo en días iniciando una regeneración local.
- Es quimiotáctico para múltiples linajes de células.
- Compacta injertos o bio-materiales, facilitando la manipulación y las reconstrucciones estructurales.
- El PRFC está prácticamente libre de leucocitos (**Anitua, 2004**).

Pero además, existen algunas diferencias entre el Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRFC) y el Plasma Rico en Plaquetas (PRP), que va desde el volumen sanguíneo necesario para su obtención, pasando por la diferencia entre ciclos, hasta los diferentes activadores que necesitan (**Anitua, 2001**).

Así pues, el PRP necesita un volumen sanguíneo de 50 a 500 ml, mientras que el PRFC solamente se necesitan entre 5 y 40 ml. El ciclo de centrifugado necesario para obtener el PRP es doble, es decir, se precisan dos ciclos de centrifugado a alta velocidad (entre 1500 y 3000 rpm) durante más de 30 minutos, mientras que para el PRFC sólo es necesario un ciclo de centrifugado a 1800 rpm durante 8-10 minutos.

Otra diferencia significativa consiste en que el activador del PRP es la trombina bovina, por lo que existe el riesgo de rechazo por parte del paciente, mientras que el PRFC utiliza como activador el cloruro cálcico.

El producto rico en plaquetas obtenido en el PRP puede congelarse y quedar disponible para el momento de la intervención, hasta días después, mientras que el PRFC debe ser aplicado inmediatamente después de su preparación porque la vida media de algunos FC es de sólo algunos minutos.

Estas diferencias las hemos recogido en la siguiente tabla.

Tabla 5: Diferencias entre PRP y PRFC

	PRP	PRFC
VOLUMEN SANGUÍNEO	50-500 ml	5-40 ml o más
CICLOS DE CENTRIFUGADO	2 a alta velocidad (1500-3000 rpm)	1 a baja velocidad (1800 rpm)
ACTIVACIÓN PLAQUETAS	SI	NO
ACTIVADOR	Trombina bovina (riesgo de rechazo)	Cloruro cálcico (no riesgo rechazo)
DURACIÓN CENTRÍFUGADO	> 30 min	15-20 min
CONCENTRACIÓN GLÓBULOS BLANCOS	Alta	Baja o nula
PRODUCTOS OBTENIDOS	Solo PRP	PRGF, fibrina, injertos, etc.

LIMITACIONES DEL PLASMA RICO EN FACTORES DE CRECIMIENTO.

Existen muy pocos estudios que informen sobre los posibles inconvenientes del uso del PRFC.

Martínez González (2002) realizó un estudio sobre la existencia del uso de concentrados del Plasma Rico en Factores de Crecimiento. Este estudio se basa en la sobreexpresión de factores de crecimiento y sus receptores en tejidos tumorales y displásicos. Los factores de crecimiento son polipéptidos, contenidos en diferentes tipos celulares y en la matriz extracelular, que juegan un papel fundamental en la estimulación y regulación. Parecen regular diversos procesos celulares, como son la mitogénesis, quimiotaxis, diferenciación y el metabolismo celular.

No se han publicado estudios sobre el riesgo de infección, transmisión de enfermedades o cualquier otro efecto indeseable. Tampoco se conocen las concentraciones ideales de cada factor de crecimiento o la dosificación adecuada para cada situación terapéutica en concreto.

En la carcinogénesis las sustancias promotoras van a actuar sobre el aumento de la proliferación celular en los clones de células inicialmente mutadas, mediante la modificación de algunos procedimientos bioquímicos celulares. Si no se promoviera la mitogénesis de esas células inicialmente mutadas, los mecanismos de control podrían desencadenar la muerte celular antes de que pudiera llegar a su diferenciación final. Los concentrados terapéuticos de factores de crecimiento podrían actuar, además de iniciadores, como promotores en la carcinogénesis, favoreciendo la división y promoción de células previamente mutadas o “iniciadas” en la carcinogénesis, o como facilitadores de la evolución clonal y de una posible inmortalización y progresión maligna celular. Este fenómeno estaría sometido a las exigencias dependientes del tiempo de evolución y de las alteraciones previas para desarrollar una neoplasia (**Martínez-González, 2002**).

Se han descrito también que, agentes químicos promotores como los ésteres de formol y en particular el 12-0-tetradeca-noil-13-forbol-acetato (TPA), parecen estimular la proliferación celular de manera muy similar a como lo hacen los factores de crecimiento y poseen receptores en la membrana celular de fibroblastos y células epidérmicas del ratón, e incluso para la transcripción del factor AP-1. El TPA, como el PDGF (Factor de Crecimiento Derivado de las Plaquetas), estimula la activación de una

proteína quinasa C (PKC), proteína implicada en la progresión del ciclo celular en el paso G₂/M (Caelles, 1999).

El estudio de DiGiovanni (2000) comprobó experimentalmente en ratones transgénicos que presentaban una actividad continua de IGF-1, que este factor de crecimiento ejercía un efecto promotor de la tumorigénesis de la piel en lesiones iniciadas anteriormente con 7-12 dimetilbenzantraceno (DMBA).

Otro factor a considerar es la capacidad antiapoptótica que se ha asignado a ciertos factores de crecimiento (IGF, VEGF) (Katoh, 1995; DiGiovanni, 2000; Pollak, 2000).

Por otra parte, existen muchas diferencias entre los estudios descritos en la bibliografía, que pueden deberse a que: a) los modelos animales utilizados en cada estudio, ya que en algunas especies animales, las heridas curan extremadamente bien incluso sin la adición de plaquetas, haciendo más difícil encontrar beneficios del Plasma Rico en Factores de Crecimiento en estos modelos; b) las técnicas para obtener los factores de crecimiento también difieren entre los estudios (Freymiller, 2004).

SISTEMAS DE OBTENCIÓN DEL PLASMA RICO EN FACTORES DE CRECIMIENTO

Algunos de los sistemas que existen en el mercado son:

Sistema PRGF[®]: Es comercializado por BTI[®] (BioTechnology Institute) y su característica más destacable es la inmediatez y sencillez del procedimiento, ya que no precisa el empleo de equipos desechables, y con simples jeringas, tubos de ensayo y pipetas se puede obtener el plasma rico en factores de crecimiento plaquetarios.

De esta característica se derivan sus principales ventajas, que son:

- La inmediatez de obtención, pues la única infraestructura que se precisa es la centrifugadora.
- Es el sistema más económico.

Su principal desventaja es que se debe ser muy meticuloso durante el proceso de pipeteo y manipulación del plasma para garantizar la esterilidad del procedimiento.

Sistemas PCCS[®] y GPS[®]: Los sistemas PCCS[®] de 3i[®] y GPS[®] de Biomet-Merck[®] comparten muchas características comunes y, por tanto, sus ventajas y desventajas son similares. Ambos emplean una centrifugadora y un dispositivo desechable para la obtención de un concentrado de plaquetas, cuya concentración de factores de crecimiento es menor que la obtenida con un sistema como el AGF[®]. Sin embargo, y gracias al empleo de los equipos desechables permiten una buena inmediatez de utilización a un precio menos elevado, a la vez que aseguran la esterilidad del proceso. En cuanto a las diferencias entre ambos, son escasas a efectos prácticos, quizá puede resultar importante que el sistema GPS[®] permite la obtención de una cantidad mayor de concentrado de plaquetas con el empleo de un solo equipo desechable.

Sistema AGF[®]: Este sistema es comercializado por MBA[®], es el menos inmediato de los cuatro ya que para su realización precisa la extracción previa de una unidad de sangre del paciente para su procesamiento en el banco de sangre, aunque esto garantiza la esterilidad y la obtención del plasma rico en factores de crecimiento y no de un concentrado de plaquetas. Por otro lado, el empleo del UltraConcentrador[®] es muy sencillo y facilita técnicamente la obtención del concentrado de factores de crecimiento con una concentración mayor que cuando se emplean concentrados de plaquetas.

Teóricamente este sistema asegura una mayor concentración de células de la serie blanca y fibrinógeno. Sus promotores sostienen que esta característica favorece una liberación más prolongada de los factores de crecimiento (puede llegar a dos semanas). Probablemente la mayor desventaja de este sistema sea su elevado precio.

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

La constante y creciente innovación de técnicas quirúrgicas dirigidas a mejorar el manejo de numerosas patologías de la cavidad bucal, representa uno de los mayores retos en nuestros días.

En los últimos años se han comunicado numerosos tratamientos con plasma rico en plaquetas (PRP) y factores de crecimiento (FC) autógenos (**Anitua, 2007**).

El plasma rico en factores de crecimiento (PRFC) se ha utilizado por primera vez en Odontología en el campo de la cirugía oral, y más concretamente en el campo de los implantes dentales, donde se ha observado que mejora la osteointegración de los mismos.

En la literatura científica revisada, el uso del PRP, en la curación de los tejidos blandos, ha sido estudiado en heridas extraorales. Algunos estudian la acción del PRP en las heridas de los tejidos blandos intraorales. Otros investigan el efecto del PRP y el PRFC en la regeneración ósea.

Sin embargo, debemos conocer las ventajas e inconvenientes del uso de estos procedimientos en el campo oral, por lo que nos planteamos las siguientes preguntas: ¿con qué técnicas podemos conseguir que las heridas ocasionadas tengan una reepitelización más rápida, y un menor proceso inflamatorio? y ¿qué forma de aplicación es más efectiva en la aceleración de la reepitelización y resolución de la inflamación? ¿Es efectivo el uso del PRFC en la regeneración ósea?; ¿Hay diferencias entre la aplicación de un autoinjerto de hueso sólo o mezclado con el PRFC?

OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es estudiar el efecto del Plasma Rico en Factores de Crecimiento en la cicatrización de las heridas provocadas en tejidos blandos (piel y mucosa del dorso lingual) y en el hueso en conejos albinos de Nueva Zelanda.

Este objetivo general, ha sido desglosado en una serie de objetivos específicos que nos permiten sistematizar y responder a los distintos aspectos que plantea nuestro estudio.

Objetivos específicos:

1. Estudiar el efecto del Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRFC) aplicado en gel o infiltrado en la reepitelización y la resolución de la inflamación a los 7 y 28 días de provocar heridas en la mucosa del dorso lingual.
2. Observar el efecto del PRFC tanto en forma de gel como infiltrado en la reepitelización y la inflamación de las heridas producidas en la piel a los 7 y 28 días.
3. Conocer las diferencias radiológicas entre la aplicación de injerto de hueso autólogo exclusivamente, injerto de hueso autólogo mezclado con gel de PRFC, o PRFC solamente, al mes o a los dos meses de realizar los defectos óseos en las tibias de conejos albinos de Nueva Zelanda.
4. Determinar cuantitativamente el hueso neoformado en esos defectos óseos tras la aplicación del PRFC frente al grupo control; y tras la aplicación de injerto de hueso autólogo exclusivamente o mezclado con gel de PRFC al mes y a los dos meses de la cirugía.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL

ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

Los animales de experimentación utilizados en este trabajo de investigación, corresponde a 20 conejos albinos de Nueva Zelanda (*Oryctolagus Cuniculi*) (Figura 1) machos, adultos (entre 92 y 100 días de vida) con un peso medio de 3662 g (rango de 2700 a 5200g), procedentes del Servicio de Animales de Laboratorio (SAI, nº REGAES: 300305440012) de la Universidad de Murcia. El proyecto de investigación correspondiente fue aprobado por la comisión de Bioética de la Universidad de Murcia, el día 31 de octubre de 2006.

Los animales fueron tratados siguiendo las normas de la Directiva Europea 89/609 y del Real Decreto 223/1988 del 14 de marzo, sobre protección de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. B.O.E. Nº 68 de 18 de marzo de 1988.



Figura 1: Conejo albino de Nueva Zelanda macho adulto.

ANESTÉSICOS UTILIZADOS.

- Imalgene[®] 1000 inyectable (MERIAL[®]. Laboratorios Merial, S.A. Rue Bourgelat. Lyon. Francia): en frascos de 10 ml que contienen clorhidrato de ketamina (11,520 g), clorbutos (500 mg) y 100 ml de excipientes c.s.p. Hipnótico de acción rápida y potente analgésico de escasa acción como relajante muscular. No causa depresión respiratoria ni tiene efectos acumulativos, consiguiendo una acción anestésica suficiente para la cirugía a los 15-20 minutos (*Figura 2*).



Figura 2: Anestésicos utilizados en el estudio.

- Xilagesic[®] al 2% inyectable (CALIER[®]. Laboratorios Calier, S.A. Les Franqueses del Vallès. Barcelona. España): en frascos de 25 ml que contienen 20 mg de xilacina en solución y 1 ml de excipientes c.s.p. Sedante con acción analgésica y relajante muscular. Está indicado para producir un estado de sedación acompañado de un periodo corto de analgesia.
- Jeringas Kendall Monoject[™] estériles de 3 cc (Kendall Healthcare. Tyco Healthcare. Inglaterra) y agujas Nipro[®] 25Gx5/8"x16mm. (Nipro Corporation. Japón).

INSTRUMENTAL QUIRÚRGICO.

Bisturí frío

- Bisturí circular o punch de biopsia de 6 mm de Ø y de 8 mm de Ø (Biopsy Punch de Stiefel®. Laboratorios Stiefel, S.A. Pinto. Madrid. España).
- Bisturí convencional.

Sutura quirúrgica estéril de polipropileno

Propilorc® 4/0 (REF. 71345. Lorca Marín®, S.A. Lorca. Murcia. España): es un monofilamento sintético, no absorbible, estéril, cuyo componente básico es un esteroisómero cristalino de polipropileno. Se suministra en color azul (colorante Luprofil Blue 70-8105 C3) para ser más visible en los tejidos. Se encuentra en una amplia variedad de calibres y longitudes, con o sin aguja de acero inoxidable. En este estudio se utilizó el de 4/0 USP, con 1,5 mm de calibre y 45 cm de longitud. Lo usamos con aguja de acero inoxidable circular de 3/8.

Hemos elegido el polipropileno debido a que este material reduce los efectos de la reacción tisular a cuerpos extraños durante el proceso de cicatrización, de acuerdo con los estudios de **Carew, 1998**.

PRFC en forma de gel e infiltrado.

- Jeringas Kendall Monoject® de 10 ml (LOT. C00306) y agujas BD Microlance™ 3 de 18Gx1 ½"x40 mm (REF. 304622).
- Jeringas Kendall Monoject™ estériles de 3 cc (Kendall Healthcare. Tyco Healthcare. Inglaterra) y agujas Nipro® 25Gx5/8"x16mm. (Nipro Corporation. Japón)
- Tubos de extracción de sangre estériles BTI de 5 ml de capacidad y con citrato sódico al 3,8% como anticoagulante (BioTechnology Institute, S.L. Miñano. Álava. España).
- Centrifugadora BTI modelo PRGF® System III (BioTechnology Institute, S.L. Miñano. Álava. España).

- Tubos de extracción de sangre estériles BTI de 5 ml de capacidad sin anticoagulante (BioTechnology Institute, S.L. Miñano. Álava. España).
- Pipetas BTI de 500, 100 y 50 μ l (BioTechnology Institute, S.L. Miñano. Álava. España).
- Activador PRGF (Cloruro cálcico). (BioTechnology Institute, S.L. Miñano. Álava. España).

Cirugía ósea.

- Bisturí convencional. (Bontempi®. Stainless. Alemania) con hoja nº 5 (Schreiber® Instrumente. Schreiber GMBH. Alemania).
- Periostotomos (Bontempi®. Stainless. Alemania).
- Bateas inoxidables (Twister Medical®. Barcelona. España).
- Fresa de trefina de 4 mm de diámetro (*Figura 3*) (Hu-Friedy® Mfg.Co.Inc.).
- Triturador de hueso tipo “Tenaza” (*Figura 4*) (Valdent S.L. Castellón. España).
- Suero fisiológico.
- Portaagujas Mayo-Hegar (Hu-Friedy® Mfg.Co.Inc.).
- Sutura de seda 4/0 (Lorca Marín®, S.A. Lorca. Murcia. España).
- Tijeras quirúrgicas rectas (Hu-Friedy® Mfg.Co.Inc.).
- Pinzas de disección (Hu-Friedy® Mfg.Co.Inc.).



Figura 3: Fresa de trefina 4 mm diámetro.



Figura 4: Triturador de hueso tipo tenaza.

EQUIPO RADIOLÓGICO.

- Equipo de radiología dental intraoral Elitys ® by Trophy. 60 kV, 7 mA, f0, 0,037 s (*Figura 5*).
- Captador RVG 6000 de Kodak Dental (*Figura 6*).
- Equipo informático Windows® XP® 80 Gb, 1,86 GHz, 1 Gb RAM.
- Programa informático Trophy Windows 5.06 para Windows.



Figura 5: Equipo radiológico.



Figura 6: Captador RVG 6000.

EQUIPO HISTOMORFOMETRÍA.

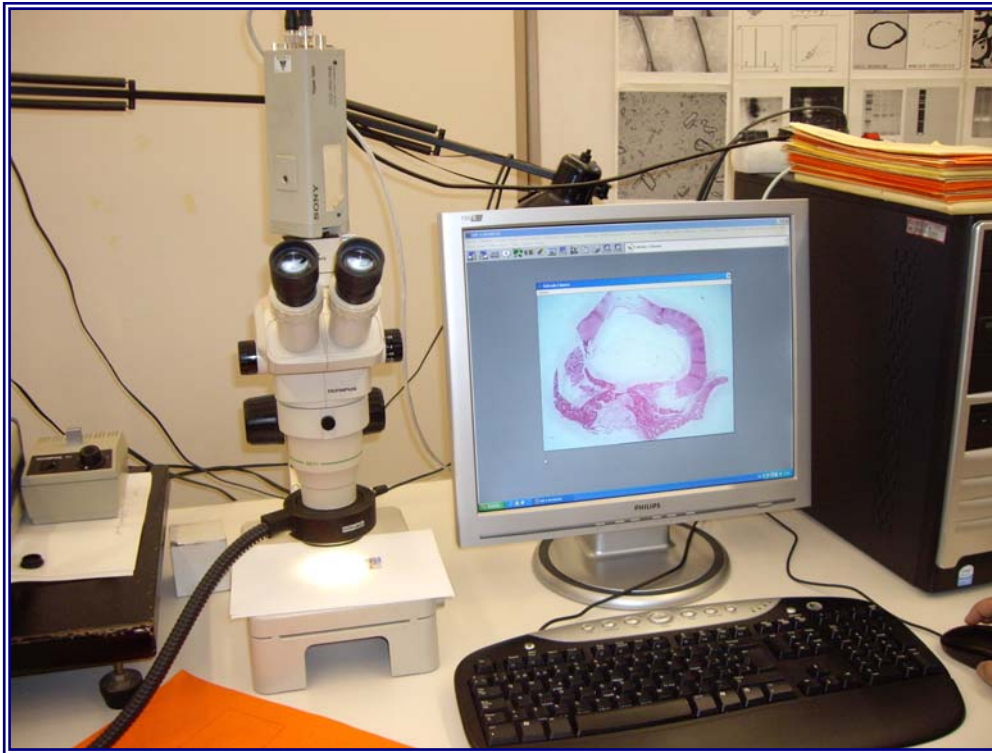


Figura 7: Equipo utilizado en la histomorfometría.

- Ordenador de control con monitor color y tarjeta digitalizadora.
- Cámara de vídeo en color, Sony DXC-151-AP con adaptación macro y micro-óptica y tablero reproductor (*Figura 7*).
- Programa de captación de imágenes MIP4 advances v.5.01.02 (Digital Image System S.L. Barcelona. España).
- Sistema de iluminación translúcida (cámara de Lambert) para lectura de negativos y diapositivas.
- Microscopio óptico de luz transmitida Axioskop Zeiss con conexión para cámara de vídeo.
- Vídeo magnetoscopio VHS Track con vídeo control color VCC 200 conectado a un monitor para entrada de imágenes al ordenador o grabación de imágenes procedentes del microscopio óptico o fotografías.
- Estereomicroscopio SZ11 Olympus con conexión a cámara de vídeo y adaptador para transluminación.
- Sistema de iluminación de luz fría, Olympus Highlight 2001.

MÉTODOS

DISEÑO GENERAL EXPERIMENTAL

Identificación de los animales: Cada conejo era identificado mediante una chapa identificadora en el cartílago de su oreja izquierda. A cada animal se le asignó un número al azar del 1 al 20 anotados en el libro de ensayos.

Diseño del estudio: Las sesiones quirúrgicas fueron realizadas siempre por el mismo investigador con la colaboración de dos ayudantes debido a la complejidad en el manejo y realización de la técnica quirúrgica, en estas sesiones realizamos 80 heridas, 40 en el dorso lingual y 40 en la piel.

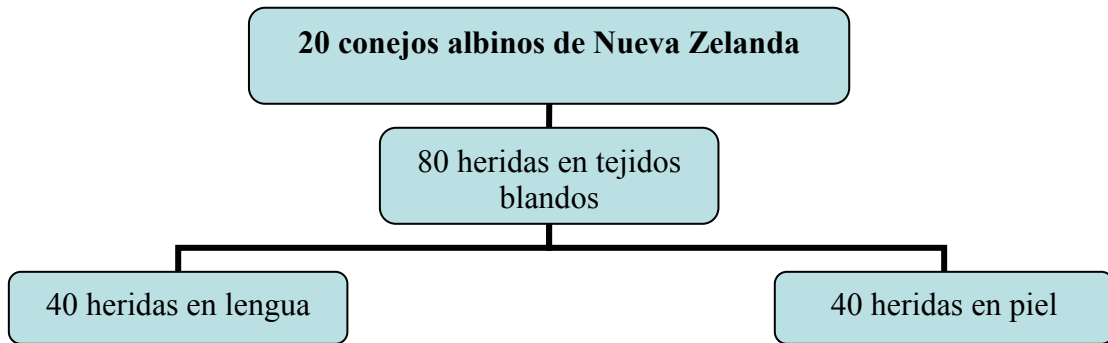


Figura 9: Heridas provocadas en tejidos blandos en los conejos albinos de Nueva Zelanda.

La muestra total fue dividida de forma homogénea (*Tabla 6*) en dos grupos $n=10$ animales y de similar peso para comparar las distintas formas de aplicar el PRFC en los tejidos blandos (mucosa del dorso lingual y piel).

Tabla 6: Peso medio de los animales que formaban los grupos de estudio.

GRUPOS	PESO INICIAL Media \pm SD	<i>p</i> -valor
PRFC gel (n = 10)	3824.00 \pm 840.941	0.359
PRFC infiltrado (n = 10)	3500.00 \pm 690.813	

Los 20 animales fueron divididos de forma aleatoria en dos grupos (n=10) según el tipo de técnica quirúrgica que sería aplicada:

- Grupo 1 (n=10): a los que se les aplicaría el PRFC en forma de gel, tanto en piel como en mucosa oral.
- Grupo 2 (n=10): PRFC en forma de infiltrado, tanto en piel como en mucosa oral.

Estos dos grupos a su vez, se dividieron en dos subgrupos (n=5), dependiendo del día de toma de la biopsia, 7 o 28 días, quedando finalmente los grupos: (*Figura 10 y 11*)

- Grupo A1 (n=5): aplicación del PRFC en gel, tanto en piel como en mucosa, y realización de biopsia a los 7 días de realizar la cirugía.
- Grupo A2 (n=5): PRFC en gel, tanto en piel como en mucosa, y biopsia a los 28 días.
- Grupo B1 (n=5): PRFC infiltrado, tanto en piel como en mucosa, y biopsia a los 7 días.
- Grupo B2 (n=5): PRFC infiltrado, tanto en piel como en mucosa, y biopsia a los 28 días.

A cada animal, se le realizaban 2 heridas en la mucosa del dorso lingual, una mesial que dejábamos vacía y fue utilizábamos como control; y otra distal en la que aplicábamos el gel o el infiltrado de PRFC. Además, en la piel de la zona cervical del dorso del animal, realizábamos otras 2 heridas, una caudal que usábamos de control, y otra craneal donde aplicábamos el PRFC en forma de gel o infiltrado.

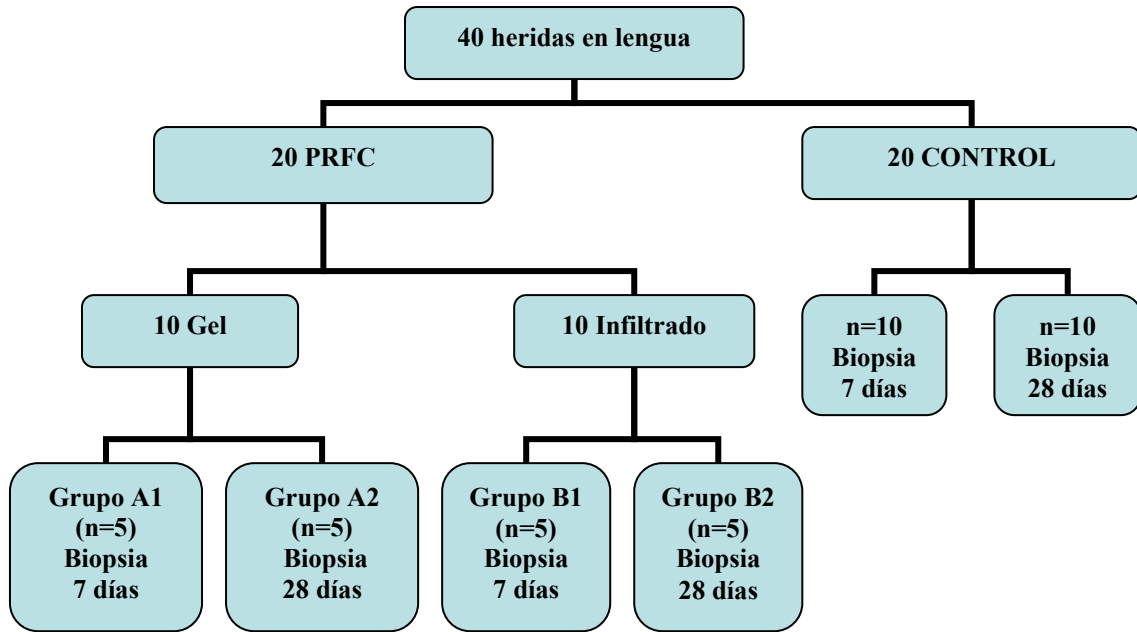


Figura 10: Heridas provocadas en el dorso lingual en los conejos albinos de Nueva Zelanda.

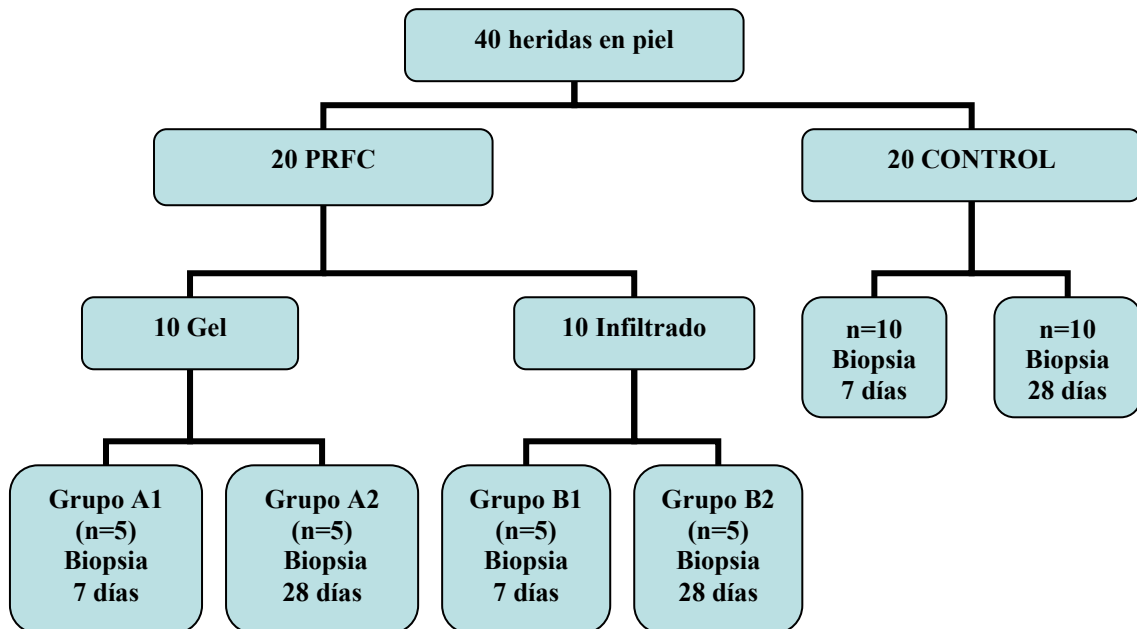


Figura 11: Distribución de las heridas provocadas en la piel en conejos albinos de Nueva Zelanda.

De las 40 heridas en la lengua, 20 correspondían a los controles y 20 a las que se les aplicaba el PRFC. De esta 20 heridas rellenas con el PRFC, la mitad se hacía con el PRFC en forma de gel, mientras que en la otra mitad se aplicaba el PRFC en forma de infiltrado. De igual modo en la piel, de las 40 heridas, 20 correspondían a las que aplicábamos el PRFC (bien en forma de gel o forma de infiltrado) y otras 20 como controles, que se dejaban vacías.

En estos mismos animales (n=20) realizamos heridas en las tibias. En cada una de las tibias realizábamos dos defectos óseos con una fresa de trefina de 4 mm de diámetro (80 defectos óseos). De estos, 20 se dejaban vacíos para usarlos como controles, 20 eran rellenos con PRFC en forma de gel, 20 con injerto de hueso autólogo triturado y mezclados con PRFC y otros 20 rellenos con injerto de hueso autólogo triturado. Dividimos a los animales en dos grupos, dependiendo del día del sacrificio; los 10 primeros animales fueron sacrificados al mes de realizar la cirugía, mientras que los 10 restantes se sacrificaron a los dos meses postcirugía.

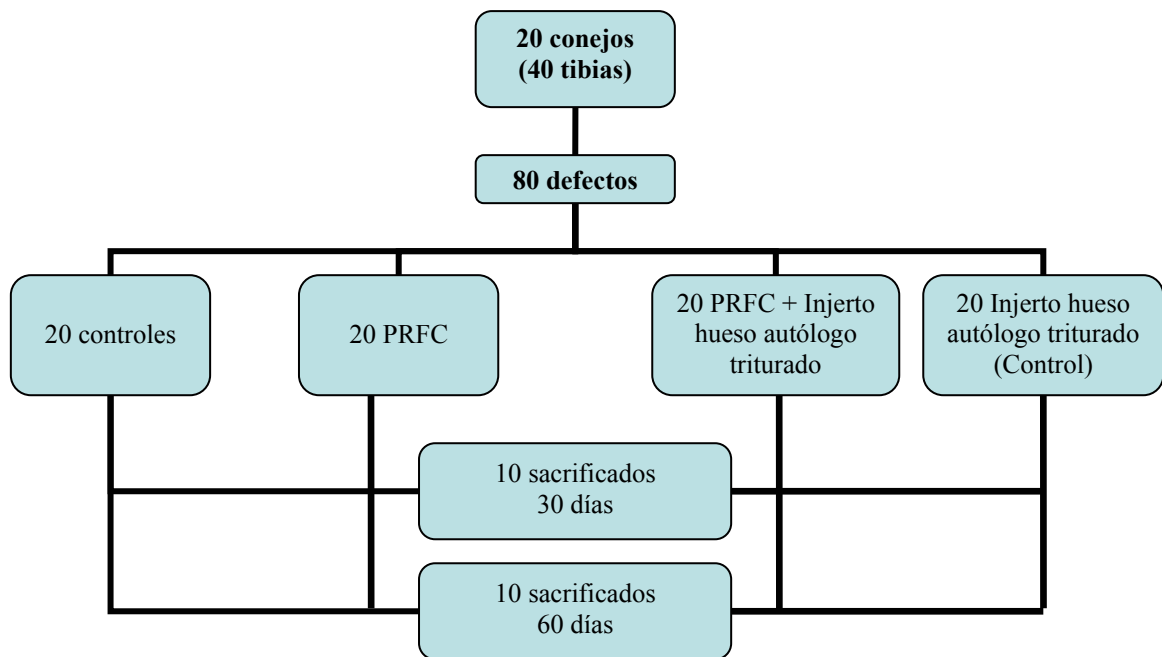


Figura 12: Distribución de las muestras según los defectos óseos realizados en conejos albinos de Nueva Zelanda.

Cuidados pre y postoperatorios: Tres semanas antes de la intervención, se depositaron en el Servicio de Animales de la Universidad de Murcia, individualmente en jaulas de 45 x 65 x 45 cm con el fin de permitirles adaptarse al medio. Se les mantuvo a temperatura de 20-21°C, humedad relativa del aire 45-65%, renovación de aire de 15 veces/hora, velocidad máxima de aire 0,5 m/s, fotoperiodo Luz/Oscuridad 12/12, ruido máximo de 55 dB e iluminación de 350lux/m².

Las intervenciones se realizaron en un quirófano de cirugía experimental convencional de 20 m² separado convenientemente de las áreas de rasurado, almacén de material quirúrgico, área de recuperación y vigilancia postoperatoria, según las recomendaciones de **Alexander, 1974** y cumpliendo con la normativa actual.

MÉTODO ANESTÉSICO.

Premedicación: Profilaxis antibiótica: Bencilpenicilina (Penilevel Retard 1.000.000 U.I. Laboratorios ERN. S.A. Barcelona España) 0,1 ml/kg, administrada en monodosis y 30 minutos antes de la intervención. Tras la premedicación del animal, se procedió al rasurado de la piel del dorso en la región cervical, más cercana a la cabeza, tras lo cual se limpió la zona con povidona yodada al 10% (Betadine[®]) garantizando la máxima asepsia del campo quirúrgico.

Técnica anestésica: Los animales fueron anestesiados con una mezcla de 60% de ketamina (Imalgene 1000[®]) y 40% de xilacina (Xilagesic[®]), administrando una dosis (de esta mezcla) de 1 ml/kg de peso del animal, mediante inyección intramuscular. La pauta anestésica utilizada resultó ser cómoda de aplicar, consiguió un tiempo anestésico suficiente, excelente relajación muscular y analgesia, careció prácticamente de complicaciones, de efectos tóxicos mínimos y produjo en el animal un despertar suave y progresivo.

OBTENCIÓN DEL PLASMA RICO EN FACTORES DE CRECIMIENTO EN GEL O EN INFILTRADO.

Para obtener el Plasma Rico en Factores de Crecimiento es necesario un volumen sanguíneo entre los 5 y 40 ml. De acuerdo con las recomendaciones actuales para el manejo de los animales de laboratorio, el volumen sanguíneo extraído no debe superar el 10% del volumen total de sangre del animal, para no producir un descenso importante de la volemia. De modo que, si un conejo de Nueva Zelanda macho y adulto tiene una media de 44-70 ml/kg, (**Morton, 1993**) y un peso medio de 3,6 kg, el volumen total sanguíneo es de aproximadamente 158,4 ml mínimo. Por lo que se puede utilizar un volumen sanguíneo de hasta 15 ml.

Obtuvimos un volumen sanguíneo de 10 ml por cada animal mediante punción cardiaca, mediante Jeringas Kendall Monoject[®] de 10 ml (LOT. C00306) y agujas BD Microlance[™] 3 de 18Gx1 ½"x40 mm (REF. 304622). Inmediatamente después de recolectar la sangre, la introducimos en 2 tubos de extracción de sangre estériles BTI de 5 ml de capacidad y con citrato sódico al 3,8% como anticoagulante (BioTechnology Institute, S.L. Miñano. Álava. España) (*Figura 13*), los cuales fueron centrifugados a 460 g (1800 rpm) durante 8 minutos en una centrifugadora BTI PRGF[®] Sytem III (BioTechnology Institute, S.L. Miñano. Álava. España) (*Figura 14*) para separar las distintas fases de la sangre, quedando los elementos formes de la sangre, incluidos los hematíes, en el fondo del tubo, los glóbulos blancos en la zona intermedia, y el plasma con las plaquetas, en la parte superior (*Figura 15*).



Figura 13: Tubos de extracción sanguínea BTI PRGF[®]. Los de tapón azul contienen el citrato sódico al 3,8% como anticoagulante, mientras que los de tapón blanco no contienen anticoagulante.

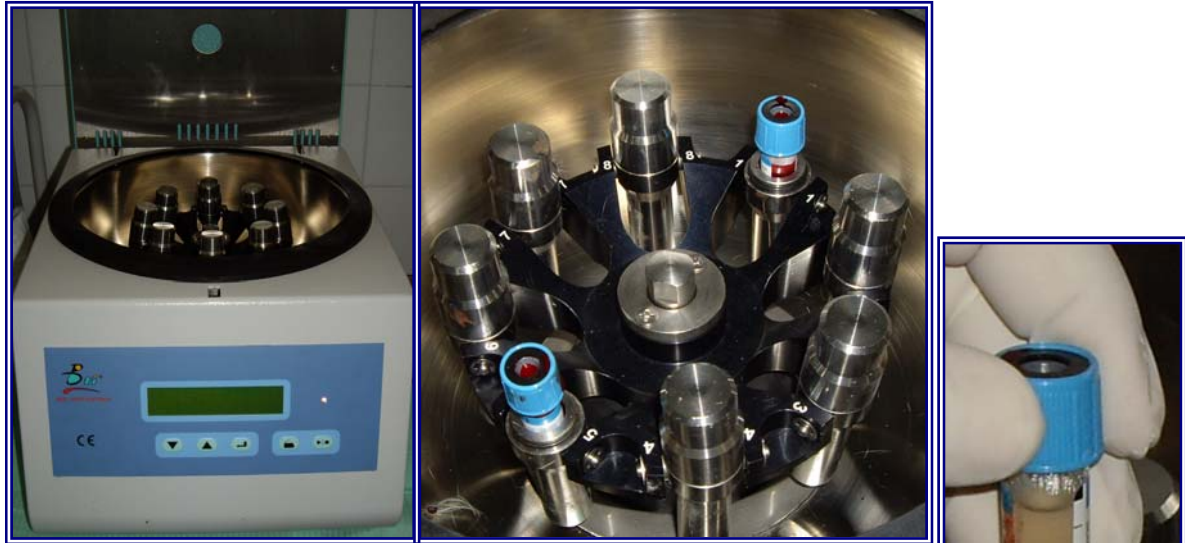


Figura 14: Centrifugadora BTI PRGF®.

Figura 15: Resultado de la centrifugación. Obsérvese la fase roja en la parte inferior, en la zona intermedia la fase blanca, y en la parte superior las 3 fases del plasma.

Para separar las distintas fracciones utilizamos las Pipetas BTI de 500 y 100 μ l (BioTechnology Institute, S.L. Miñano. Álava. España). De la siguiente forma:

- Primero separamos la primera fase o Fase I, que es la fase del Plasma Pobre en Plaquetas, que corresponde a los primeros 500 μ l con la Pipeta de 500 μ l.
- A continuación, pipeteamos la fase II o Plasma con Plaquetas, que corresponde a los siguientes 500 μ l, en la que la concentración de Plaquetas es intermedia, similar a la que existe en la sangre circulante.
- Por último, obtenemos el Plasma Rico en Plaquetas o Fase III que corresponde a los siguientes 500 μ l, y que se encuentra justo por encima de la fase blanca, en la que se localiza la mayor concentración de Factores de Crecimiento que es la que utilizamos en nuestro estudio. Para ello usamos la Pipeta de 100 μ l, y repetimos la operación 5 veces, realizamos un pipeteo cuidadoso para no crear turbulencias y no aspirar hematíes (*Figura 16*).

Las dos primeras fases, se trasladan a un tubo de cristal estéril, previamente etiquetado, para desecharla.

La tercera fase se lleva a un tubo de cristal estéril, previamente etiquetado, y posteriormente, procedíamos a su activación (*Figura 17*).



Figura 16: Pipeteo de las distintas fases del PRFC.



Fig. 17: Tubo que contiene la tercera fase o fase III del PRFC tras el pipeteado.

Una vez obtenida la fracción de plasma que vamos a utilizar, realizamos la activación de coágulo utilizando el cloruro de calcio al 10 % (Activador PRGF. BioTechnology Institute, S.L. Miñano. Álava. España) (*Figura 18*) para inducir la exostosis de los gránulos α del interior de las plaquetas. Tras esto, dejamos el tubo durante 10 minutos a temperatura ambiente, hasta que se crea un tapón gelatinoso muy consistente y de fácil manipulación, cuando queríamos obtener el gel de PRFC.



Figura 18: Activador PRGF (cloruro calcio al 10%).

Si queríamos usar el PRFC en infiltrado, no dejábamos que se formara ese gel, sino que, una vez añadido el activador, y mediante una jeringa Kendall Monoject™ estériles de 3 cc (Kendall Healthcare. Tyco Healthcare. Inglaterra) y aguja Nipro® 25Gx5/8”x16mm. (Nipro Corporation. Japón), se aspiraba 0,5 ml del contenido del tubo y se le inyectaba al animal.

Tras la aplicación del gel de PRFC, procedimos a analizar un fragmento de este coágulo al microscopio electrónico de barrido, observando una red de fibrina, con restos del citoplasma de las plaquetas y algunos gránulos como se observa en las imágenes (Figura 19 y 20).

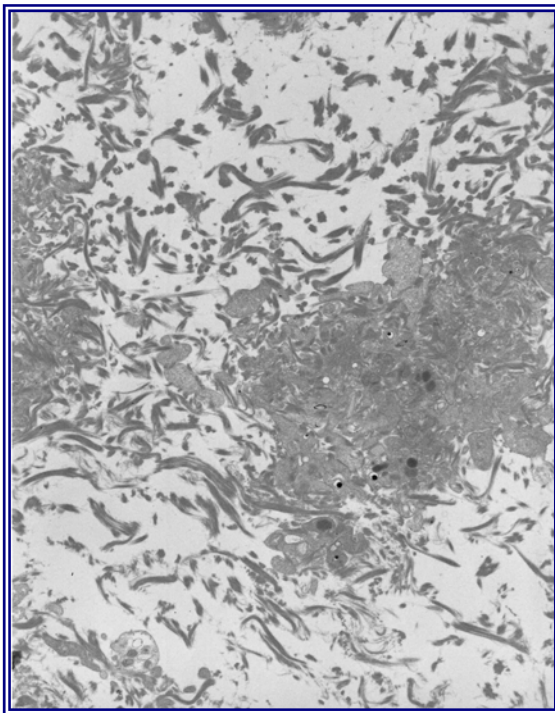


Figura 19: Imagen panorámica del coágulo de PRFC con acúmulos fibrilares de fibrinógeno y fragmentos de plaquetas con gránulos (3150x).

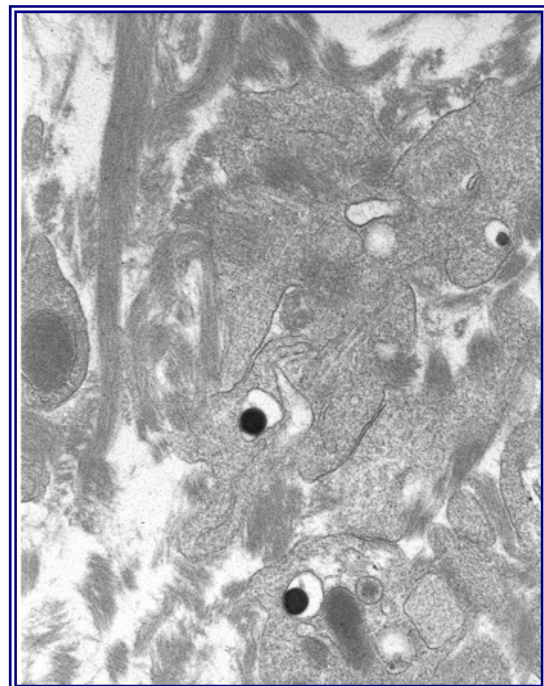


Figura 20: Detalle de los citoplasmas de las plaquetas con diferentes tipos de gránulos (18500x).

PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO.

Técnica quirúrgica empleada para provocar las heridas en el dorso lingual: En todos los animales de experimentación se utilizó una pinza mosquito recta para poder traccionar la lengua y tener una adecuada exposición de la misma; la boca se abrió con la ayuda de una pinza portaagujas. Todas las heridas fueron provocadas en la línea media del 1/3 media del dorso lingual (*Figura 21*).

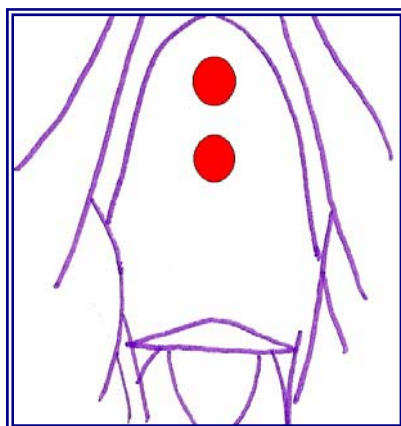


Figura 21: Esquema de la lengua de un conejo albino de Nueva Zelanda. (Naganuma, 2001).

A continuación, realizamos el marcaje con punch para biopsia de 6 mm de Ø (Biopsy Punch de Stiefel[®]. Laboratorios Stiefel, S.A. Pinto. Madrid. España), lo que nos permitió realizar todas las heridas con un mismo diámetro (*Figura 22*). Posteriormente eliminamos el epitelio marcado previamente con punch, mediante bisturí frío (Bontempi[®]. Stainless. Alemania) con hoja nº 5 (Schreiber[®] Instrumente. Schreiber GMBH. Alemania). A continuación, colocamos el Plasma Rico en Factores de Crecimiento en forma de gel o infiltrado y se suturó la herida, realizando dos puntos simples en mesial y distal de la herida con polipropileno (Propilorc[®]. REF. 71345. Lorca Marín[®], S.A. Lorca. Murcia. España) (*Figura 23*). Finalmente, realizamos el lavado de la herida quirúrgica con suero fisiológico y desinfección de la zona con povidona yodada al 10% (Betadine[®]).



Figura 22: Heridas realizadas en el dorso lingual con punch de 6 mm de diámetro.



Figura 23: Heridas del dorso lingual una vez suturadas.

Técnica quirúrgica empleada para provocar las heridas en la piel del animal:

Preparación preoperatorio: Colocación del animal en decubito prono. Posteriormente procedimos al rasurado de la piel del dorso de la región cervical en la que realizaríamos las heridas y posterior desinfección con povidona yodada al 10% (Betadine®). La técnica quirúrgica consistió en marcaje con punch para biopsia de 6 mm de Ø, lo que nos permitió realizar todas las heridas con un mismo diámetro (*Figura 24*).

Tras esto, se procedió a colocar el Plasma Rico en Factores de Crecimiento en forma de gel o infiltrado y se suturó la herida, realizando dos puntos simples en craneal y caudal de la herida con polipropileno (Propilorc®. REF. 71345. Lorca Marín®, S.A. Lorca. Murcia. España) (*Figura 25*).

Finalmente, se realizó el lavado de la herida quirúrgica con suero fisiológico y se volvió a desinfectar la zona con povidona yodada al 10% (Betadine®).



Figura 24: Zona de la piel del animal una vez realizada las heridas previa depilación y desinfección.



Figura 25: Aspecto de las heridas en la piel una vez suturada, limpiada y desinfectada.

Técnica quirúrgica para realizar las heridas en el hueso.

Para realizar las heridas en las tibias del animal, utilizamos la zona proximal antero-interna de la tibia para introducir la trefina, ya que la vía de abordaje de esta zona es poco traumática y sangrante, con lo que se pueden evitar pérdidas sanguíneas y descensos importantes de la volemia y porque además al ser intervenido el animal de las dos tibias, se podrían ocasionar grandes hematomas o bien infecciones locales e incluso en el peor de los casos la muerte del animal (**Barone, 1980; Popesko, 1981**).

Para realizar el defecto óseo, previamente depilamos la zona anterior de las extremidades posteriores del animal y procedimos a la desinfección de la zona con povidona yodada al 10% (Betadine®). Abordamos la tibia mediante una incisión cutánea de unos 15 mm (*Figura 26*) tomando como referencias anatómicas los relieves óseos proximal y distal de la tuberosidad tibial.

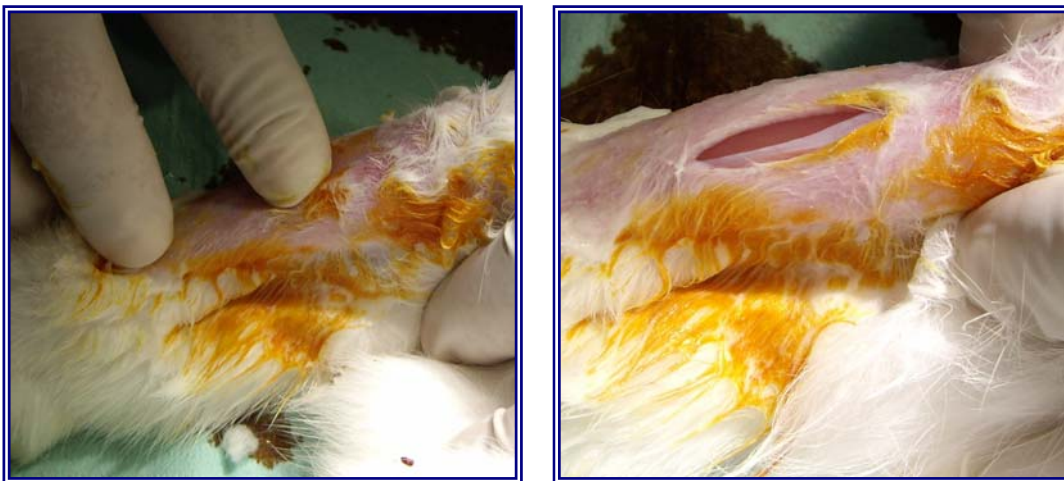


Figura 26: Palpación de la tibia para localizar las referencias anatómicas e incisión realizada para el abordaje quirúrgico.

Después de realizar un despegamiento por planos musculares y mucoperióstico cuidadoso, realizamos los defectos (dos defectos en cada tibia) con una fresa de trefina quirúrgica de 4 mm de diámetro montada en un contraángulo quirúrgico con abundante irrigación con suero fisiológico (*Figura 27*).

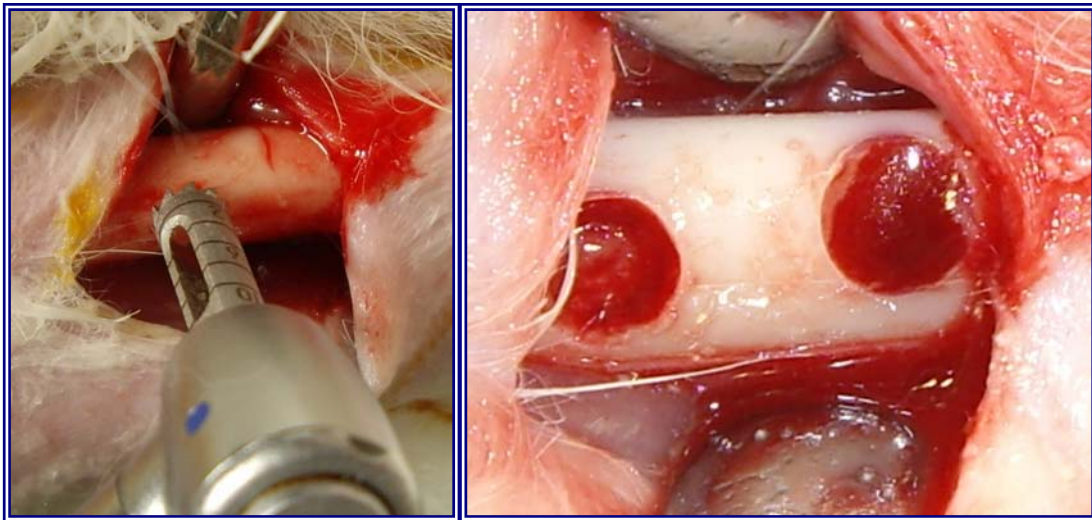


Figura 27: Realización de los defectos óseos con la trefina. Aspecto inicial y final.

Una vez conseguido el lecho apropiado procedimos al lavado abundante con suero fisiológico con el que procuramos arrastrar todas las partículas óseas producidas durante la perforación ósea. El hueso obtenido tras la realización de las osteotomías, fue triturado con un triturador de hueso tipo “tenaza” (Figura 28), para su posterior colocación en los defectos óseos de la tibia izquierda, sólo o mezclado con el gel del plasma rico en factores de crecimiento.



Figura 28: Trituración del hueso obtenido tras la osteotomía en un triturador tipo “tenaza”. Aspecto inicial y final.

Por tanto, los defectos óseos quedarían:

- En la tibia derecha (*Figura 29*):
 - o El defecto superior sería rellenado con el PRFC en forma de gel.
 - o El defecto inferior quedaría vacío, como control.

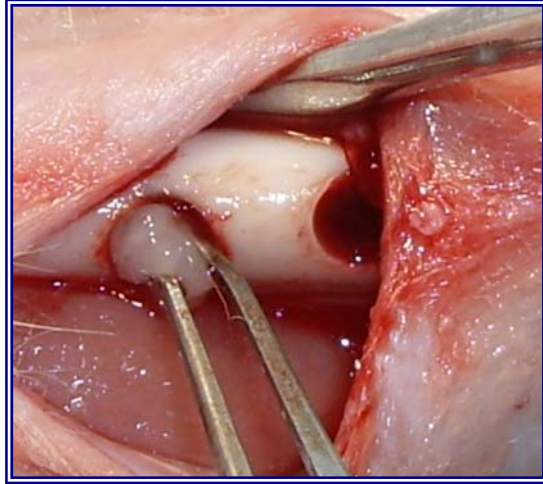


Figura 29: Colocación del PRGF en gel en el defecto superior de la tibia derecha.

- En la tibia izquierda (*Figura 30*):
 - o El defecto superior sería rellenado con el PRFC en forma de gel mezclado con el hueso triturado obtenido de las osteotomías.
 - o El defecto inferior quedaría rellenado únicamente con el hueso triturado obtenido tras la realización de los defectos óseos.

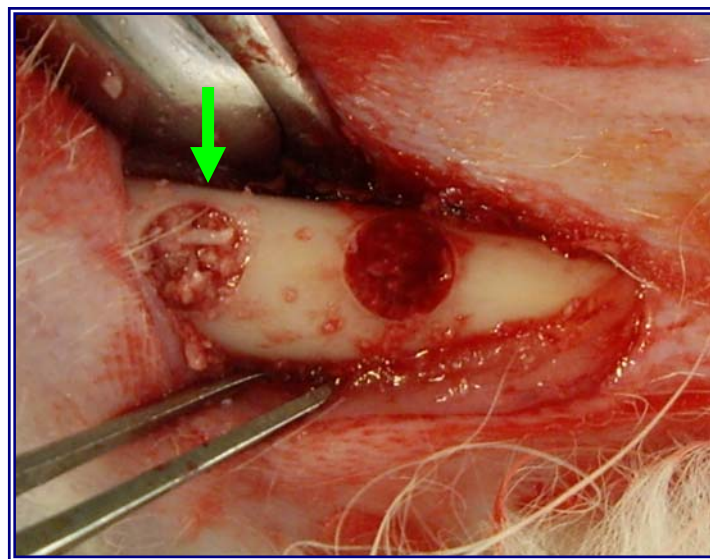


Figura 30: Aspecto final de la tibia izquierda. El defecto superior (marcado con la flecha) fue rellenado con PRFC en gel mezclado con el hueso autólogo. El defecto inferior fue rellenado con hueso autólogo.

A continuación procedimos al cierre cuidadoso de la herida con puntos sueltos de sutura de seda de 4/0 (*Figura 31*). Finalmente fue lavada con suero fisiológico y desinfectada con povidona yodada (Betadine®).



Figura 31: Aspecto tras finalizar la cirugía.

MONITORIZACIÓN: Los animales fueron depositados en las jaulas inmediatamente después de la intervención para realizar el control y seguimiento del animal tras la cirugía.

DIETA: Se les alimentó con una dieta completa de mantenimiento (Pienso 112 U.A.P, PANLAB) y durante el período de adaptación, los animales bebieron y comieron “ad libitum”. Tras la cirugía, los animales fueron alimentados mediante dieta semiblanda nutricionalmente completa. Para conseguir este alimento semiblando, el pienso de los animales fue triturado (Robot Coupe® R 3 plus. Robot Coupe®, S.A. Monceau en Bourgogne. France) (*Figura 32*).



Figura 32: En la imagen de la izquierda, Robot Coupe® para triturar el alimento de los animales. A la derecha, aspecto final del pienso una vez triturado.

ESTUDIO RADIOLÓGICO

Una vez obtenida la tibia del animal, se procedió a realizar el estudio radiológico mediante un equipo de radiología intraoral Kodak ® 2100 (60 kVp, 7 mA, 0,05s) obteniendo la imagen con el sistema RVG de Trophy y procesadas en un ordenador convencional Pentium IV, 80 Gb de disco duro, y con software Trophy Windows v. 5.06 (Trophy ©) (Figura 33).



Figura 33: Equipo de radiografías intraorales y captador digital.

Para que todas las imágenes fueran paralelas a la dirección de la trefina, realizamos un soporte con silicona de adición (Normosil® condensación. Laboratorios Normon S.A. Madrid (España)), sobre la que colocábamos la tibia, tal y como aparece en la Figura 34.



Figura 34: Soporte de silicona realizado para soportar las tibias.

Una vez obtenida la imagen, los defectos fueron clasificados de acuerdo con los siguientes criterios (Pryor, 2006):

- **0: No/limitado relleno óseo:** el defecto de la osteotomía aparecería radiolúcido con la excepción de la aposición de hueso neoformado en los márgenes del defecto.
- **1: Relleno óseo parcial:** el defecto de la osteotomía era parcialmente radiopaco, exhibiendo regiones de radiolucidez y radiopacidades que sugieren la formación de nuevo hueso desde los márgenes del defecto sin establecer una continuidad.
- **2: Relleno óseo completo:** el defecto de la osteotomía apareció radiopaco completamente.

ESTUDIO MORFOLÓGICO

TOMA DE BIOPSIAS.

Los conejos fueron sacrificados mediante inhalación de CO₂ introduciendo al animal en una campana de CO₂ y activando el gas durante 1 minuto a 2-3 atmósferas; una vez desactivado el CO₂ los animales permanecieron en la campana, completamente sellada, durante 2-3 minutos más.

Procedimos a la toma de biopsias de la lengua y la piel del animal con punch de 8 mm de diámetro con un espesor suficiente para obtener todo el grosor del epitelio y parte del tejido conectivo inferior a este. Para ello, traccionamos la lengua con una pinza mosquito para así favorecer su exposición y facilitar la toma de biopsias.

La toma de las muestras de piel y lengua se realizó en el siguiente orden cronológico en todos los grupos (cada grupo formado por n=5 animales):

- Grupo A1: en los que aplicamos PRFC en gel, fueron biopsiados a los 7 días de la intervención quirúrgica.
- Grupo A2: PRFC en gel, y biopsiados a los 28 días de la cirugía.
- Grupo B1: PRFC infiltrado y biopsiados a los 7 días.
- Grupo B2: PRFC infiltrado, y biopsiados a los 28 días de la cirugía.

Las muestras fueron fijadas en formol neutro tamponado al 10% para su procesamiento posterior por el método habitual de inclusión en parafina.

Las muestras de hueso, fueron recogidas tras el sacrificio del animal, en dos grupos (n=10) dependiendo del tiempo transcurrido desde la cirugía: A: 1 mes o B: 2 meses tras la cirugía.

Para obtener las muestras de hueso, procedimos a la exposición completa de las tibias del animal, y posteriormente con la ayuda de un disco de diamante montado en una pieza de mano quirúrgica con abundante irrigación con suero fisiológico, realizamos el corte de la tibia, dejando un margen de seguridad entre los dos defectos realizados de aproximadamente 5 mm, tanto superior como inferior, obteniendo así el fragmento de tibia que incluía los dos defectos, que eran fijadas en formol. (*Figura 35*)



Figura 35: Exposición completa de la tibia del animal y posterior corte para obtener el fragmento en el que se encontraban los dos defectos óseos a estudiar.

Antes del procesado se procedió a descalcificar los bloques de hueso con Osteomol[®] (ácido hipoclorhídrico + formaldehído) durante una semana.

Finalmente, las muestras fueron incluidas en parafina por el método habitual y seccionadas por el plano perpendicular a la incisión, obteniendo bloques de entre 5 y 7 μm de espesor. Las secciones histológicas fueron teñidas con hematoxilina-eosina y con la tinción del Tricrómico de Masson, para su posterior estudio al microscopio óptico.

ESTUDIO MICROSCOPIO ÓPTICO

Todas las secciones histológicas fueron estudiadas por dos observadores, en los que se midieron los siguientes parámetros histopatológicos:

*Grado de reepitelización del epitelio (medido a los 7 y 28 días de aplicar cada una de las técnicas y que valoramos de acuerdo con los criterios propuestos por **Sinha & Gallagher, 2003**).*

- Grado 0: reepitelización en el borde de la herida.
- Grado 1: la reepitelización cubre menos de la mitad de la herida.
- Grado 2: la reepitelización cubre más de la mitad de la herida.
- Grado 3: la reepitelización cubre la herida completa, pero el espesor es irregular.
- Grado 4: la reepitelización cubre la herida completa y el espesor es normal.

*Grado de inflamación (medido a los 7 y 28 días de aplicar cada una de las técnicas, según el estudio de **Cotran, 2000**).*

- Grado 1: Fase de inflamación aguda.
 - Formación del coágulo de fibrina, leucocitos y polinucleares neutrófilos.
 - Observación de neogénesis vascular.
- Grado 2: Fase con predominio de inflamación aguda difusa (perivascular de polinucleares)
 - Predominio de tejido de granulación, aunque todavía puede observarse membrana piógena.
 - Destaca la neogénesis vascular.
- Grado 3: Fase con predominio de inflamación crónica: reducción de polinucleares y aumento de células redondas:
 - Comienzo de la proliferación fibroblástica.
- Grado 4: Fase resolutive o cicatrización.
 - Proliferación de fibroblastos y colágeno.
 - Reducción de vasos sanguíneos.
 - Reducción o desaparición de la inflamación crónica, aunque pueden persistir ocasionalmente células redondas.

ESTUDIO HISTOMORFOMÉTRICO

Consiste en la valoración cuantitativa a través del recuento de células, la medición bidimensional (longitud, perímetro y área) y tridimensionales (volumen superficie) en diferentes tejidos vivos (Revell, 1983).

El estudio se llevó a cabo en el servicio de Análisis de Imagen (SAI) de la Universidad de Murcia, sobre las preparaciones histológicas teñidas con hematoxilina-eosina.

1.- Antes de comenzar, debíamos captura la imagen, mediante una cámara de video adaptada a una lupa a 5 aumentos, colocando la fuente luminosa por arriba, a una intensidad constante número 1, y todo colocado en un soporte de macroscópica a una altura constante de 43 centímetros (Figura 36).

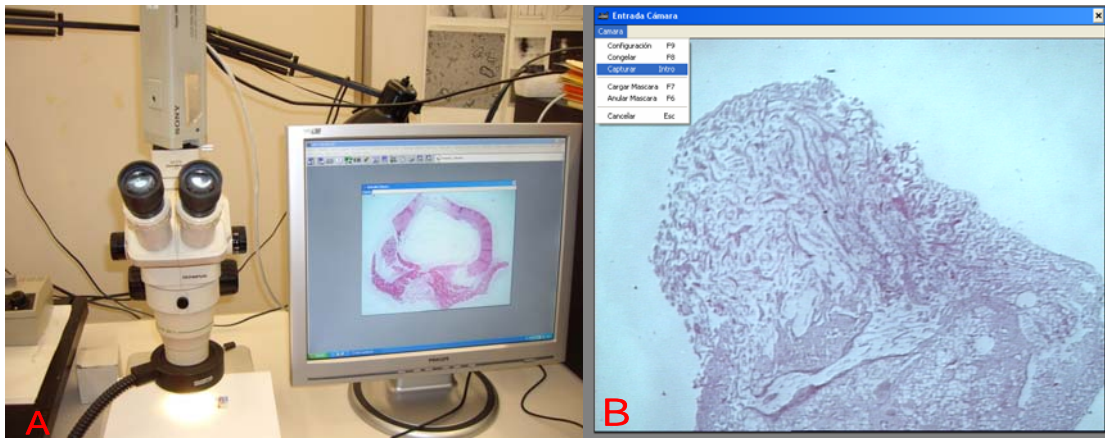


Figura 36: A.-Equipo utilizado; B.- Imagen capturada.

2.- Una vez capturada la imagen, procedimos a convertirla en tonos de grises, y se seleccionó el área en el que habíamos realizado el defecto óseo, previamente localizado en el microscopio óptico (Figura 37).

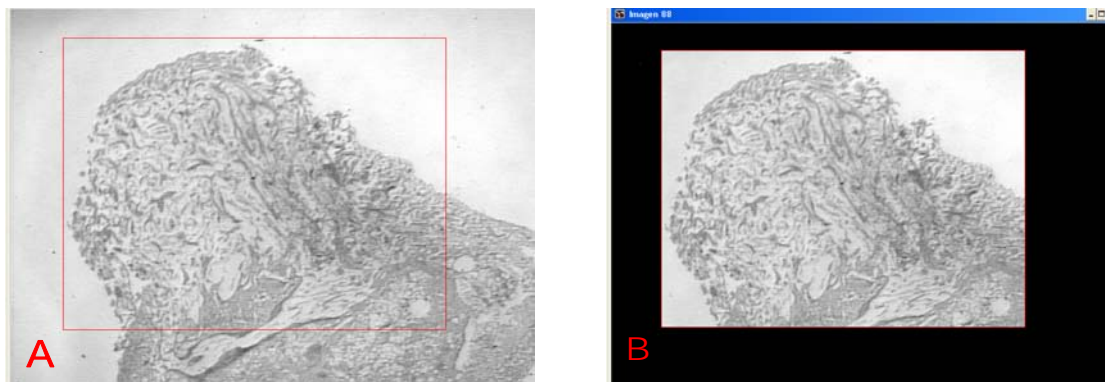


Figura 37: A.- Imagen convertida en tonos de grises y área a seleccionar. B.- Área seleccionada.

3.- Tras esto, se procedió a una delimitación y segmentación de tonos de grises de la zona de estudio, para así diferenciar el tejido óseo del tejido circundante, en función de las diferencias de tonos de grises, y comparándolas al mismo tiempo con el color de la tinción original (*Figura 38*).

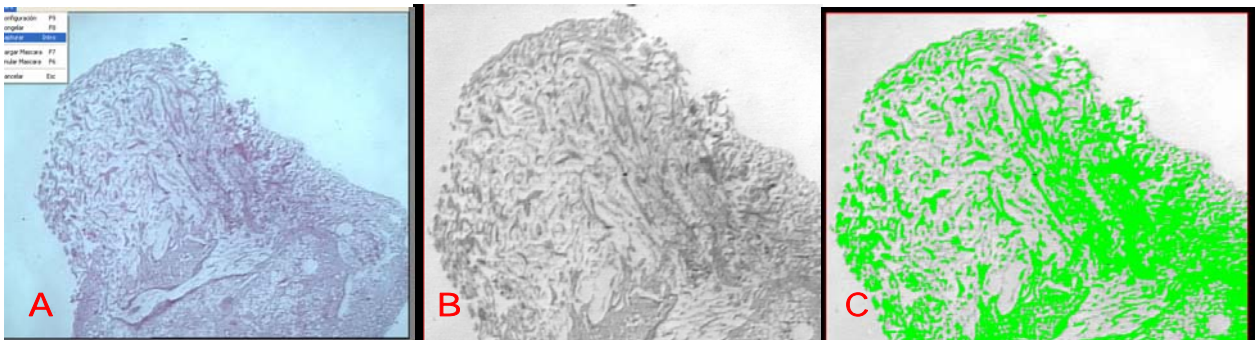


Figura 38: Morfometría de Densidad de Área ósea. A.- Muestra capturada (x5). B.- Delimitación con líneas de zonas de estudio y conversión en grises. C.- Segmentación.

4.- El valor final se obtuvo al comparar el área seleccionada frente al área total del defecto óseo realizado en el hueso, según la fórmula, y expresado en tanto por cien. (*Figura 39*)

$$B.Ar/Tt.Ar = \frac{\text{área ósea}}{\text{área total}} \times 100$$

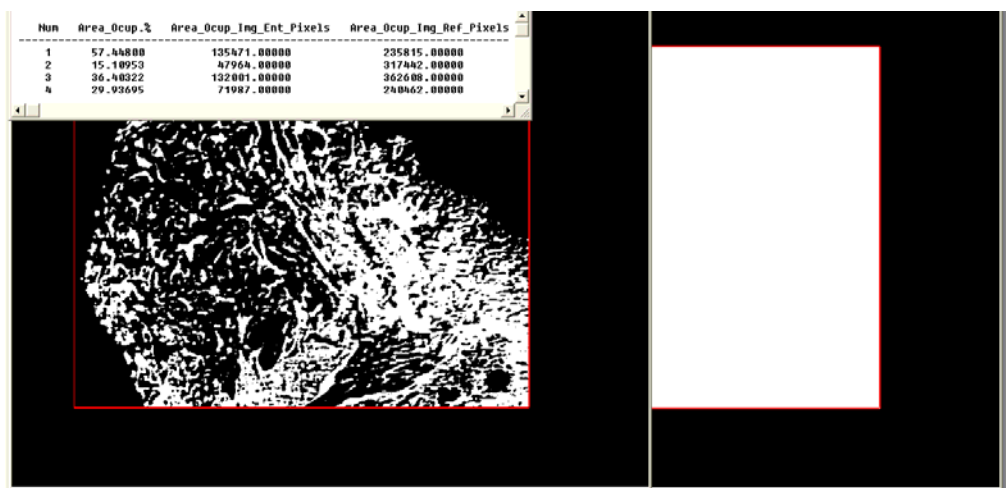


Figura 39: Imagen final donde se calcula el área de hueso neoformado.

ESTUDIO ESTADÍSTICO.

Analizamos los datos estadísticos con el paquete de software SPSS[®] (versión 12.0) para Windows, en el cual hemos efectuado los siguientes procedimientos estadísticos:

Estadística descriptiva:

En primer lugar, para el análisis descriptivo de la distribución general de la muestra, así como para el análisis de cada una de las variables (tanto en conjunto como para cada uno de los subgrupos); se han hallado valores tales como: media, desviación típica y los valores máximos y mínimos (rango).

Estadística inferencial:

En segundo lugar, para el análisis comparativo de las variables se consideró que la hipótesis nula (existencia de una relación de independencia entre las variables), se debería rechazar (cuando esta se rechaza, se considera que la relación entre las variables es de dependencia), cuando la probabilidad mínima de rechazo (el llamado “p-valor”) no sea superior al nivel crítico estándar de 0.05. Para ello, se han realizado los siguientes contrastes:

1º. Estudio de las asociaciones entre las variables cuantitativas continuas:

- Test «t de Student»: Los datos cuantitativos fueron analizados con el test «t de Student» para comparar dos medias (de muestras independientes), cuando eran dos las variables que se comparaban.
- En caso de muestras pequeñas, comprobamos la normalidad en la distribución de la muestra mediante el test de normalidad de Kolmogorov-Smirnov y el test de homogeneidad de la varianza de Levene, y si los datos no mostraban una distribución normal fueron analizados mediante test no paramétricos. Los test no paramétricos utilizados fueron el test U-de Mann-Whitney (para comparar dos muestras) y el test Kruskal-Wallis (para más de dos muestras).

2º. Estudio de las asociaciones entre las variables cualitativas:

- El estudio de las asociaciones entre las variables cualitativas, se llevó a cabo mediante la elaboración de tablas de contingencia; utilizando la prueba de χ^2 de Pearson para establecer los contrastes de hipótesis (ya que este tipo de χ^2 es la recomendada para tablas de contingencia con cualquier número de filas y columnas).

PROTOCOLOS UTILIZADOS.

PROTOCOLO DE LA CICATRIZACIÓN DE HERIDAS PROVOCADAS EN CONEJOS

N°	Fecha cirugía	Lugar cirugía	Instrumento quirúrgico	Peso el día de la cirugía	Peso día sacrificio	Biopsia	Reepit.	Inflam	Rx	Histomor fometria

*CODIFICACIÓN PARA EL PROTOCOLO DE LA CICATRIZACIÓN DE HERIDAS
PROVOCADAS EN CONEJOS ALBINOS DE NUEVA ZELANDA.*

1. N° Animal:

2. Fecha de la cirugía:

3. Lugar cirugía:

- Código 0: Lengua anterior
- Código 1: Lengua posterior
- Código 2: Piel anterior
- Código 3: Piel posterior

4. Instrumento quirúrgico:

- Código 0: Bisturí frío y sutura control
- Código 1: Bisturí frío y PRGF gel y sutura
- Código 3: Bisturí frío y PRGF infiltrado y sutura

5. Peso día de la cirugía.

6. Peso día sacrificio.

7. Biopsia:

- Código 1: La biopsia se toma 7 días después de provocar la herida.
- Código 2: La biopsia se toma 28 días después de provocar la herida.

8. Grado de reepitelización:

- Código 0: Reepitelización en el borde de la herida
- Código 1: Reepitelización cubre menos de la mitad de la herida.
- Código 2: Reepitelización cubre más de la mitad de la herida.
- Código 3: Reepitelización cubre la herida completa, pero el espesor es irregular.
- Código 4: Reepitelización cubre la herida completa y el espesor es normal.

9. Grado de inflamación:

- Código 1: Fase de inflamación aguda.
 - Se forma la membrana piógena: por fibrina y polinucleares.
 - Empieza a aparecer neogénesis vascular.
- Código 2: Fase de inflamación aguda difusa.
 - Predomina el tejido de granulación, aunque todavía puede existir membrana piógena.
 - Se produce una gran neogénesis vascular.

- Código 3: Fase con predominio de inflamación crónica:
 - Reducción de polinucleares y aumento de células redondas.
 - Comienza la proliferación fibroblástica.
- Código 4: Fase resolutive o cicatrización.
 - Proliferación de fibroblastos y colágeno
 - Reducción de vasos sanguíneos.
 - Reducción o desaparición de la inflamación crónica aunque puede existir una persistencia ocasional de células redondas.

10. Criterios radiológicos:

- 0: No/Limitado relleno óseo: el defecto de la osteotomía aparece radiolúcido con la excepción de la aposición de hueso neoformado en los márgenes del defecto.
- 1: Relleno óseo parcial: el defecto de la osteotomía es parcialmente radiopaco, exhibiendo regiones de radiolucidez y radiopacidades que sugieren la formación de nuevo hueso desde los márgenes del defecto sin establecer una continuidad.
- 2: Relleno óseo completo: el defecto de la osteotomía aparece radiopaco completamente.

11. Histomorfometría: % de hueso neoformado.

IV. RESULTADOS

RESULTADOS EN TEJIDOS BLANDOS.

REEPITELIZACIÓN EN LA MUCOSA DEL DORSO LINGUAL

El grado de reepitelización de las heridas se estudio a los 7 y 28 días de la cirugía. Para ello se tomaron las biopsias de 10 conejos por grupo (5 cada uno de esos días) y se comparó el grado de reepitelización de las heridas, provocadas por las distintas técnicas quirúrgicas utilizadas.

Como consecuencia de incidencias o alteraciones en el proceso de inclusión de las muestras histopatológicas, debidas a: la orientación del corte; tras la reinclusión del mismo, no apareció la zona a interpretar en 2 muestras de lengua. Por lo tanto, los parámetros o variables histopatológicas (grado de reepitelización e inflamación) se estudiaron en 18 muestras de la lengua, y en 20 de la piel.

Grado de reepitalización a los 7 días de provocar las heridas en la lengua.

El grado de reepitelización a los 7 días de provocar las heridas en la lengua, se estudió en 18 muestras (1 muestra de cada grupo se perdió en la fase de procesamiento en el laboratorio) y están reflejados en la Tabla 7.

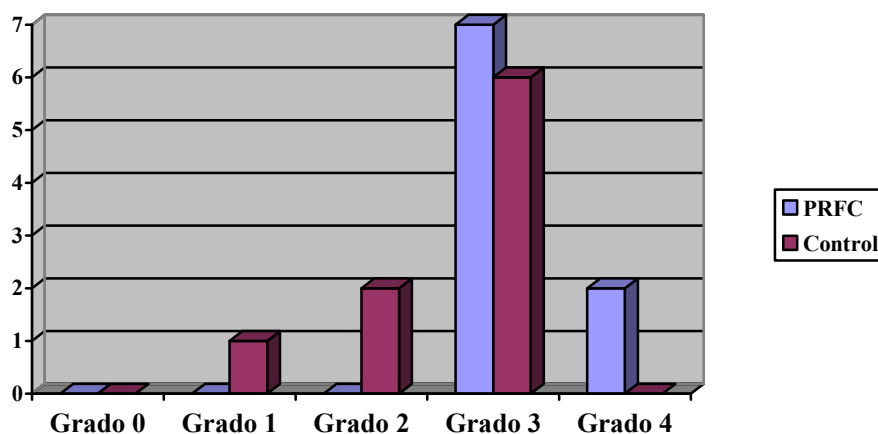
A los 7 días (*Figura 40*), todos los animales mostraban reepitelización de la mucosa lingual, en siete era de grado 3 y los dos restantes de grado 4; sin embargo en el grupo control aunque todos los animales presentaban también reepitelización, ésta era de menor intensidad (uno grado 1, dos grado 2 y seis grado 3).

Tabla 7: Grado de reepitelización a los 7 días de provocar las heridas en la lengua, en los grupos con y sin PRFC (n= 18 muestras).

GRUPOS	GRADO DE REEPITELIZACIÓN A LOS 7 DÍAS DE PROVOCAR LAS HERIDAS EN LENGUA n (%)					p-valor
	Grado 0	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4	
Aplicación de PRFC (n = 9)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	7 (77.77)	2 (22.23)	0.166
Control (n = 9)	0 (0)	1 (11.12)	2 (22.22)	6 (66.66)	0 (0)	

Grado 0: reepitelización en el borde de la herida; Grado 1: reepitelización cubre menos de la mitad de la herida; Grado 2: reepitelización cubre más de la mitad de la herida; Grado 3: reepitelización cubre la herida completa, pero el espesor es irregular; Grado 4: reepitelización cubre la herida completa y el espesor es normal.

Figura 40: Grado de reepitalización de las heridas en la lengua a los 7 días de realizar la cirugía.



Grado 0: reepitelización en el borde de la herida; Grado 1: reepitelización cubre menos de la mitad de la herida; Grado 2: reepitelización cubre más de la mitad de la herida;Grado 3: reepitelización cubre la herida completa, pero el espesor es irregular; Grado 4: reepitelización cubre la herida completa y el espesor es normal.

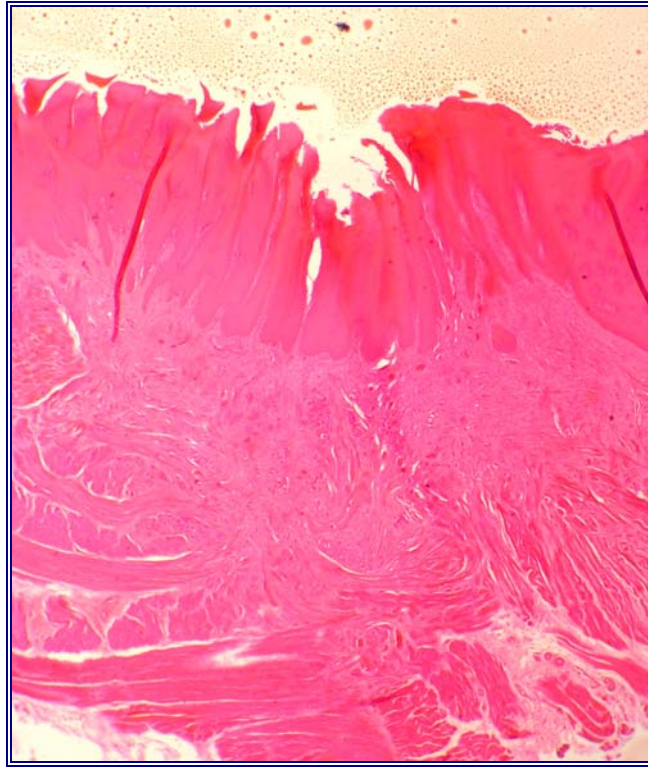


Figura 41: Control 7 días. Imagen panorámica de la mucosa del dorso lingual. Grado reepitelización 3: Reepitelización completa pero de espesor irregular (H-E 200x).

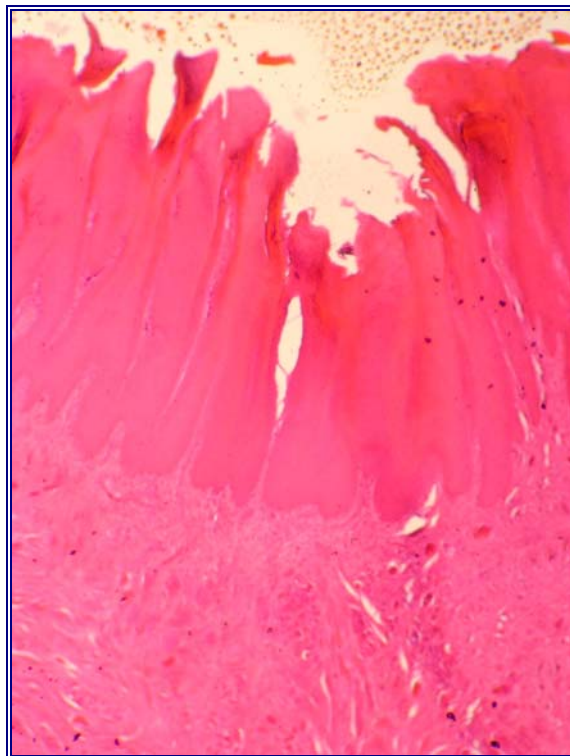


Figura 42: Control 7 días. Imagen panorámica mucosa del dorso lingual. Grado reepitelización 3: Reepitelización completa pero de espesor irregular (H-E 312.5x).

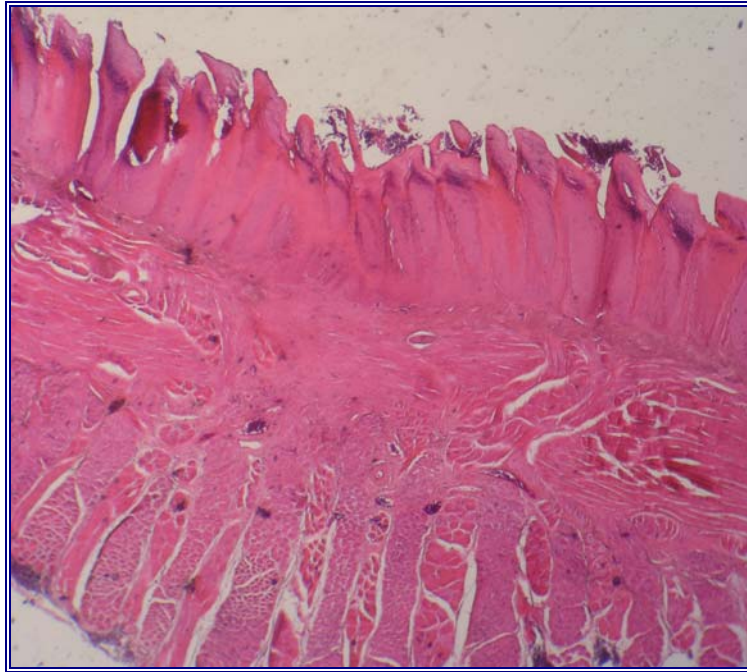


Figura 43: PRFC gel 7 días. Imagen panorámica mucosa del dorso lingual. Grado reepitelización 3: reepitelización total pero espesor irregular (H-E 200x).

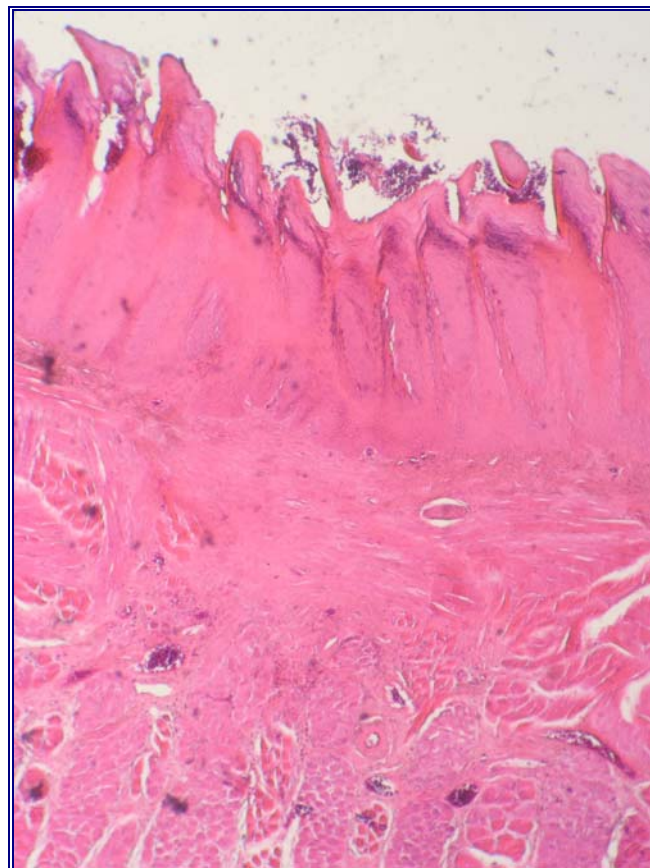


Figura 44: PRFC gel 7 días. Imagen panorámica mucosa del dorso lingual. Grado reepitelización 3: reepitelización total pero espesor irregular (H-E 312.5x).

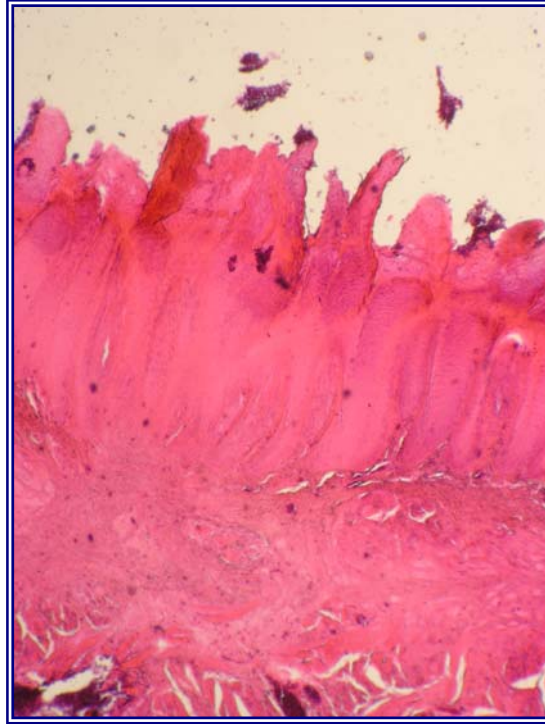


Figura 45: PRFC infiltrado 7 días. Imagen panorámica mucosa del dorso lingual. Grado reepitelización 3: reepitelización total pero espesor irregular (H-E 312,5x).

Grado de reepitelización a los 28 días de provocar las heridas en la lengua.

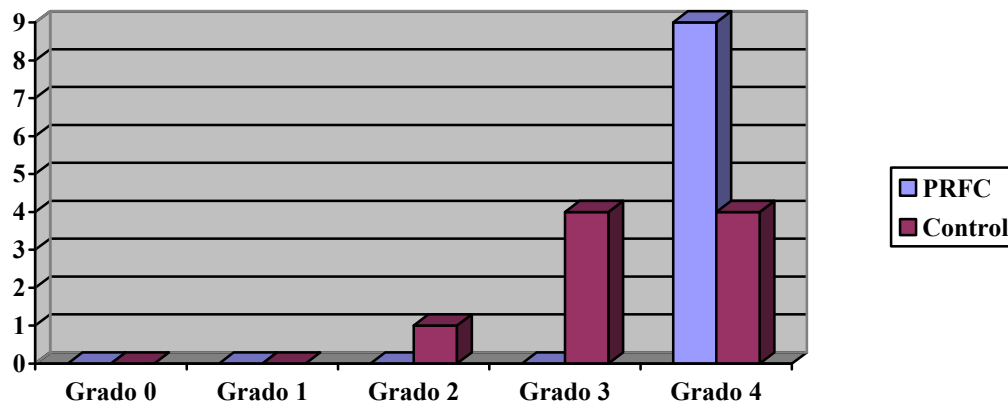
El grado de reepitelización de las heridas provocadas en la mucosa del dorso lingual a los 28 días de la cirugía, se estudió en un total de 18 muestras (1 muestra de cada grupo se perdió en la fase de procesamiento de las muestras en el laboratorio) y aparece descrito en la tabla 7.

A los 28 días, la reepitelización fue mejor en el grupo en el que se aplicó el PRFC frente al grupo control, con diferencias estadísticamente significativas ($p=0,031$) frente al grupo control (*Tabla 7*), ya que todas las heridas en las que aplicábamos el PRFC (*Figura 46*) estaban completamente reepitelizadas, mientras que en el grupo control, sólo estaban completamente reepitelizadas un 44,44% de las heridas.

Tabla 7: Grado de reepitelización a los 28 días de provocar las heridas en lengua, entre aquellas en las que se aplicó el PRFC y aquellas en las que no se aplicó (n= 18 muestras).

GRUPOS	GRADO DE REEPITELIZACIÓN A LOS 28 DÍAS DE PROVOCAR LAS HERIDAS EN LENGUA n (%)					p-valor
	Grado 0	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4	
Aplicación de PRFC (n = 9)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	9 (100)	0.031
Control (n = 9)	0 (0)	0 (0)	1 (11.12)	4 (44.44)	4 (44.44)	

Figura 46: Grado de reepitelización de las heridas en la mucosa del dorso lingual a los 28 días de realizar la cirugía.



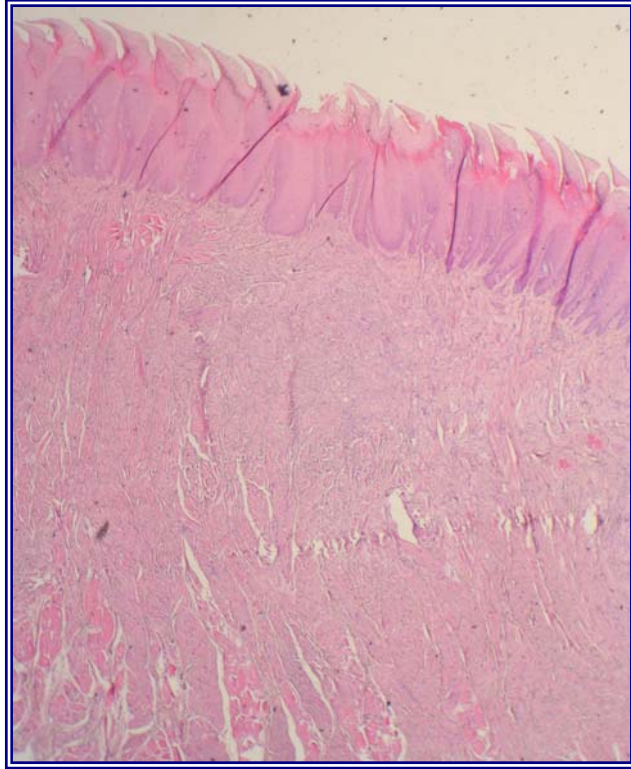


Figura 47: Control 28 días. Imagen panorámica de la mucosa del dorso de la lengua. Grado reepitelización 4: Reepitelización completa y espesor regular (H-E 125x).

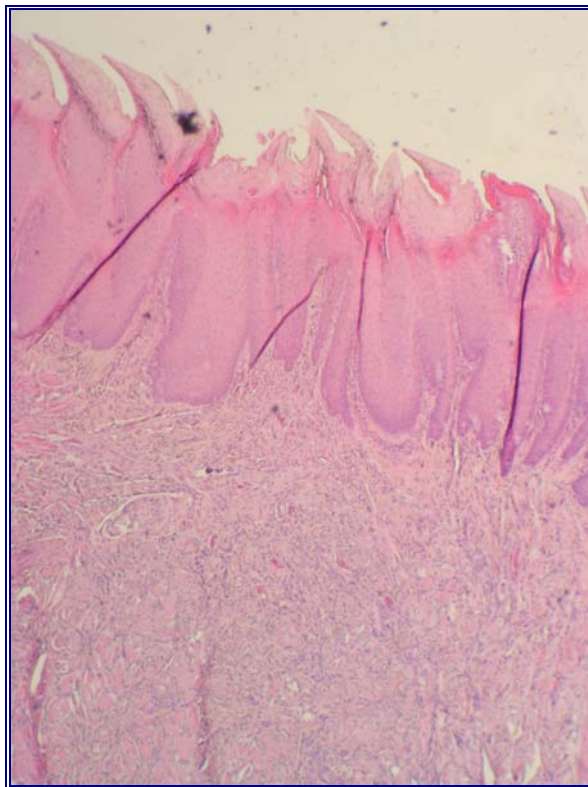


Figura 48: Control 28 días. Imagen panorámica de la mucosa del dorso de la lengua. Grado reepitelización 4: Reepitelización completa y espesor normal (H-E 312.5x).

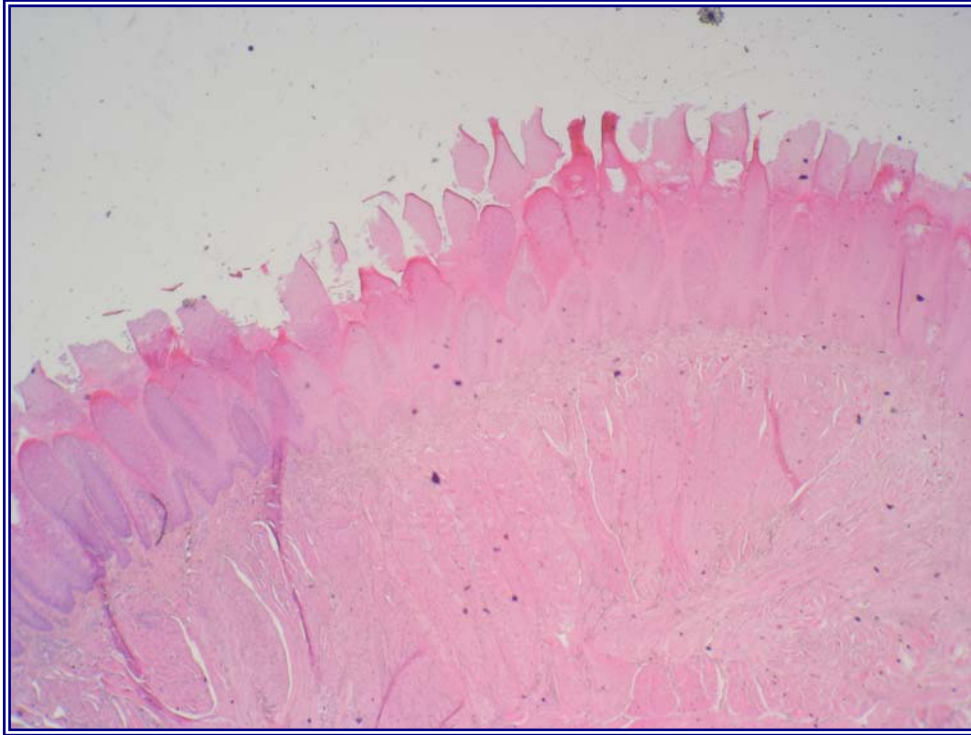


Figura 49: PRFC gel 28 días. Imagen panorámica del dorso de la lengua. Grado reepitelización 4: Reepitelización completa y espesor normal (H-E 125x).

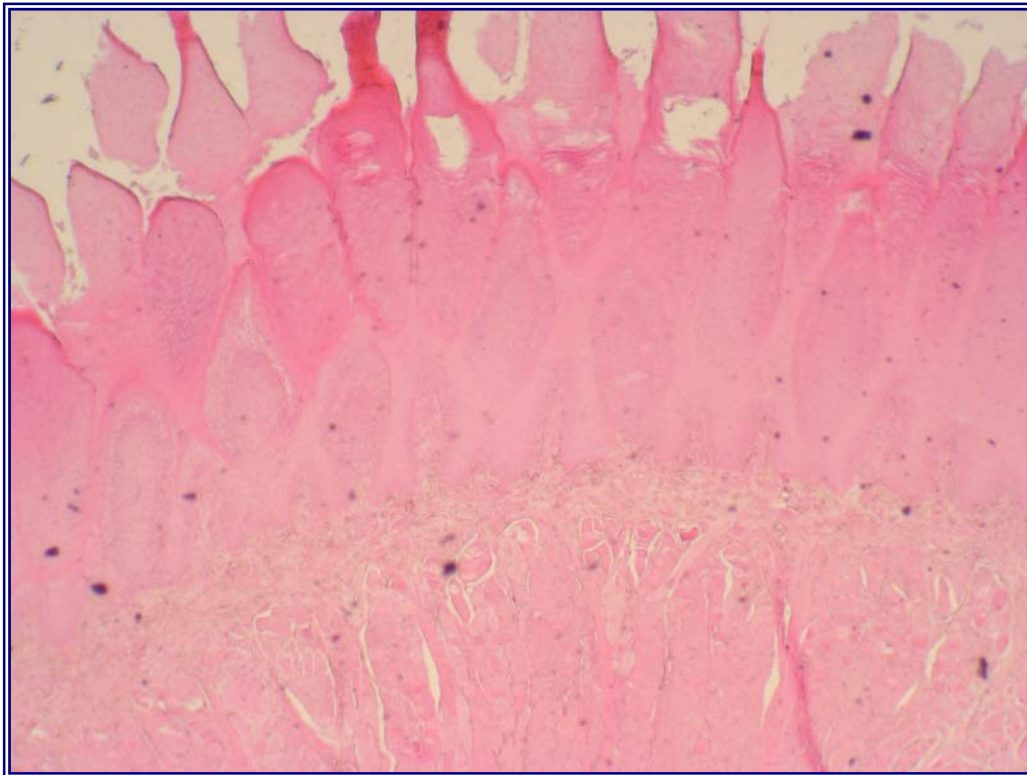


Figura 50: PRFC gel 28 días. Imagen panorámica de la mucosa de la lengua. Grado reepitelización 4: Reepitelización completa y espesor normal (H-E 312.5x).

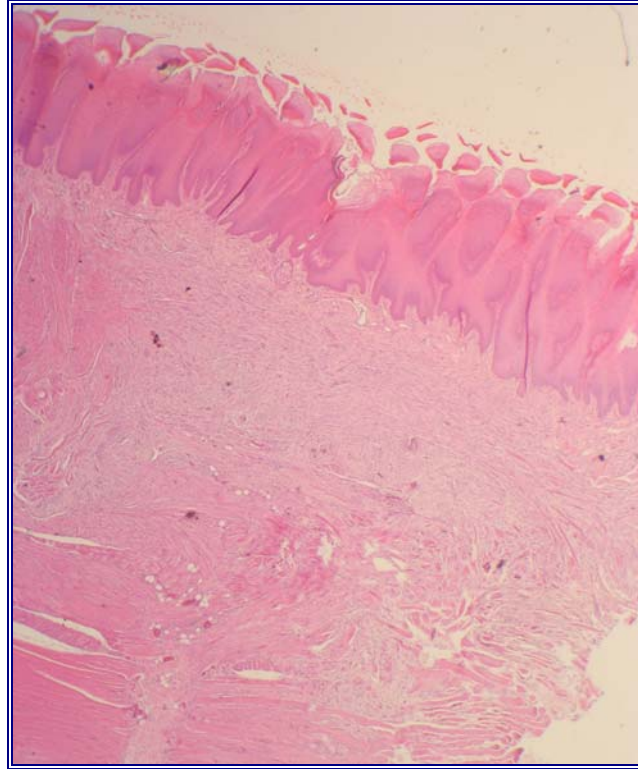


Figura 51: PRFC infiltrado 28 días. Imagen panorámica de la mucosa del dorso de la lengua. Grado reepitelización 4: Reepitelización completa y espesor normal (H-E 200x).

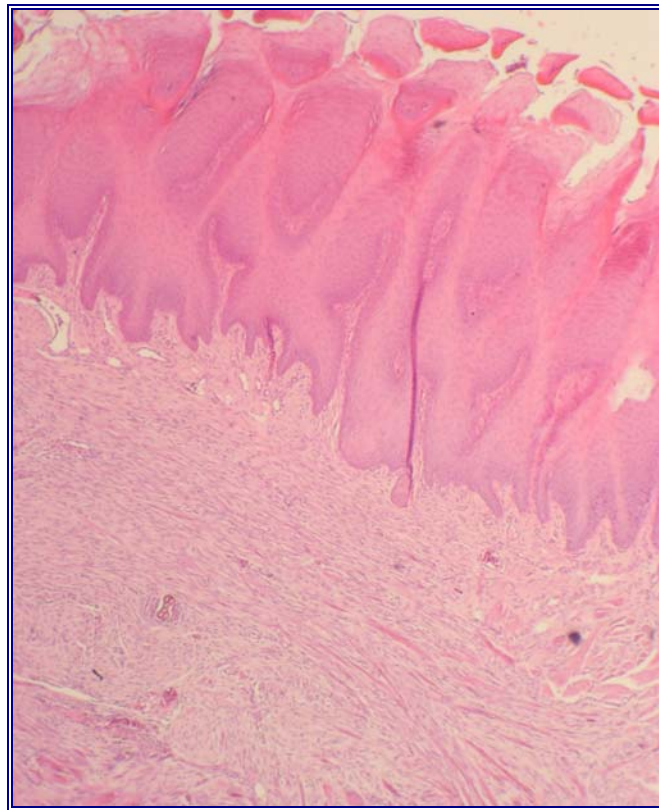


Figura 52: PRFC infiltrado 28 días. Imagen panorámica de la mucosa del dorso de la lengua. Grado reepitelización 4: Reepitelización completa y espesor normal (H-E 312.5x).

REEPITELIZACIÓN DE LA PIEL

Grado de reepitelización a los 7 días de provocar las heridas en la piel

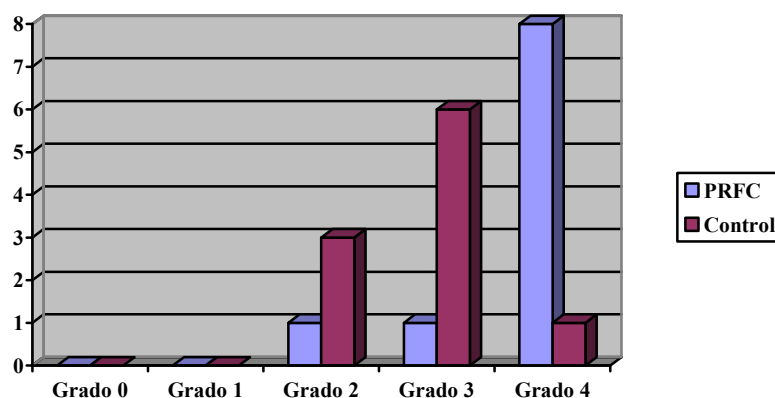
El grado de reepitelización de las heridas a los 7 días de provocar las heridas en la piel, se estudió en 20 muestras, 10 correspondían a heridas tratadas con el PRFC, y el resto a los controles.

La reepitelización fue mayor en el grupo en el que se aplicó el PRFC con diferencias estadísticamente significativas respecto al control ($p=0,007$) (Tabla 9). Obsérvese en el gráfico 3, que un 80% de las heridas en las que se aplicó el PRFC estaban completamente reepitelizadas.

Tabla 9: Grado de reepitelización a los 7 días de provocar las heridas en piel, entre aquellas en las que se aplicó el PRFC y aquellas en las que no se aplicó ($n = 20$ muestras).

GRUPOS	GRADO DE REEPI TELIZACIÓN A LOS 7 DÍAS DE PROVOCAR LAS HERIDAS EN PIEL n (%)					p-valor
	Grado 0	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4	
Aplicación de PRFC (n = 10)	0 (0)	0 (0)	1 (10)	1 (10)	8 (80)	0.007
Control (n = 10)	0 (0)	0 (0)	3 (30)	6 (60)	1 (10)	

Figura 53: Grado de reepitelización de las heridas en la piel a los 7 días de la cirugía.



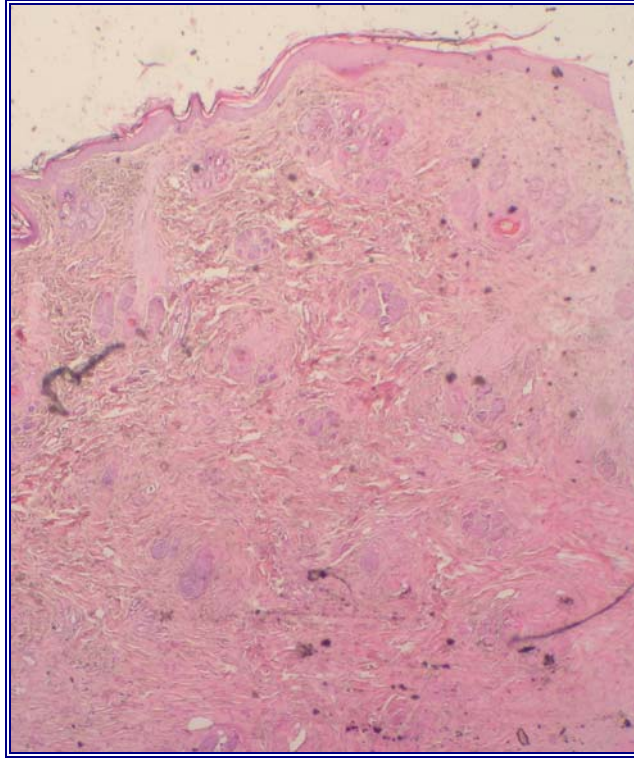


Figura 54: Control 7 días. Imagen panorámica de la piel. Grado reepitelización 3: reepitelización total pero espesor irregular (H-E 125x).

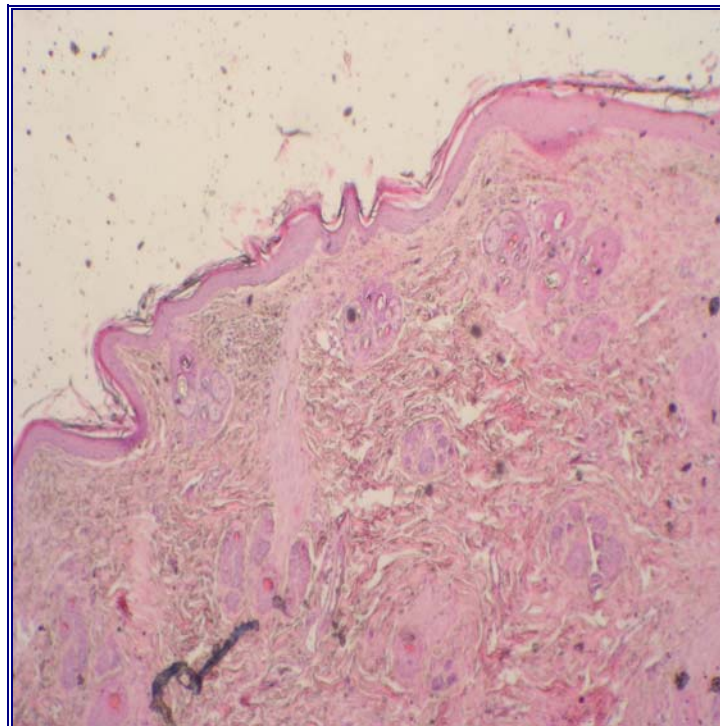


Figura 55: Control 7 días. Imagen panorámica de la piel. Grado reepitelización 3: reepitelización completa pero espesor irregular (H-E 125x).

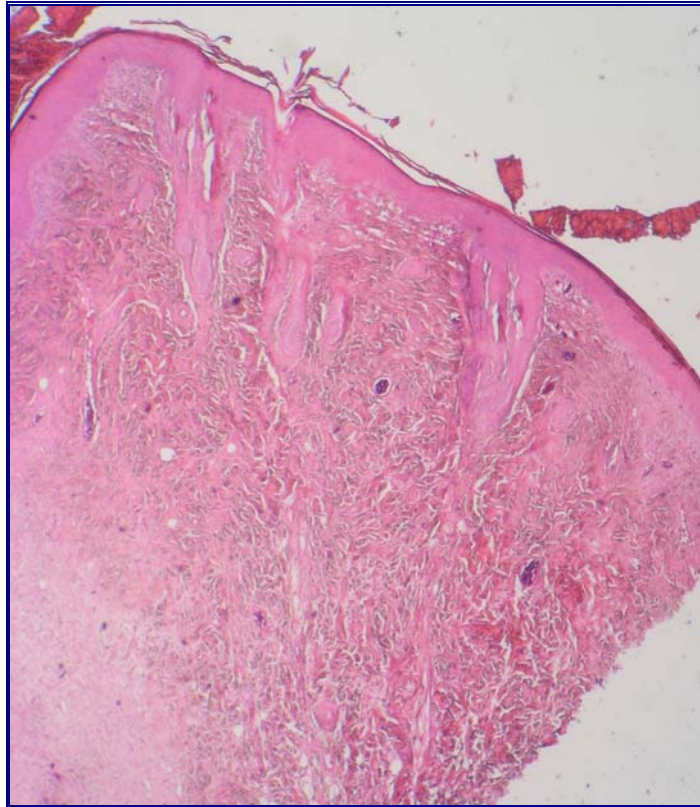


Figura 56: PRFC gel 7 días. Imagen panorámica piel. Grado reepitelización 4: Reepitelización completa y espesor regular (H-E 200x).

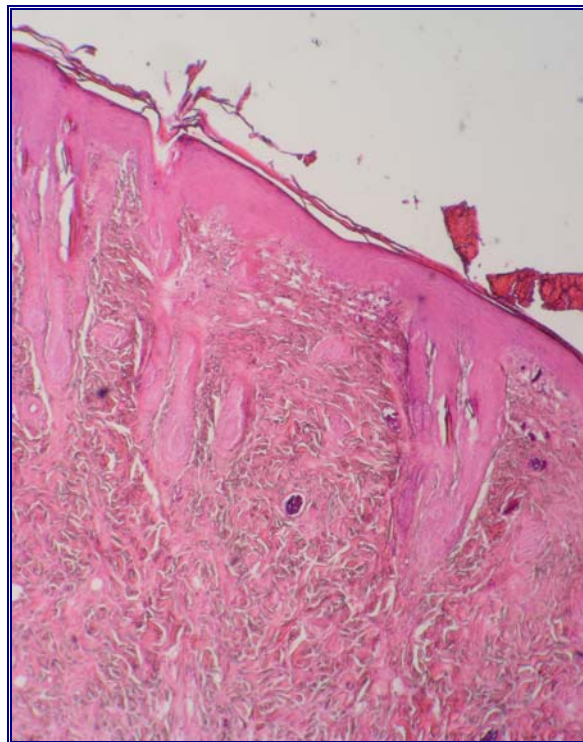


Figura 57: PRFC gel 7 días. Imagen panorámica piel. Grado reepitelización 4: Reepitelización completa y espesor regular (H-E 200x).

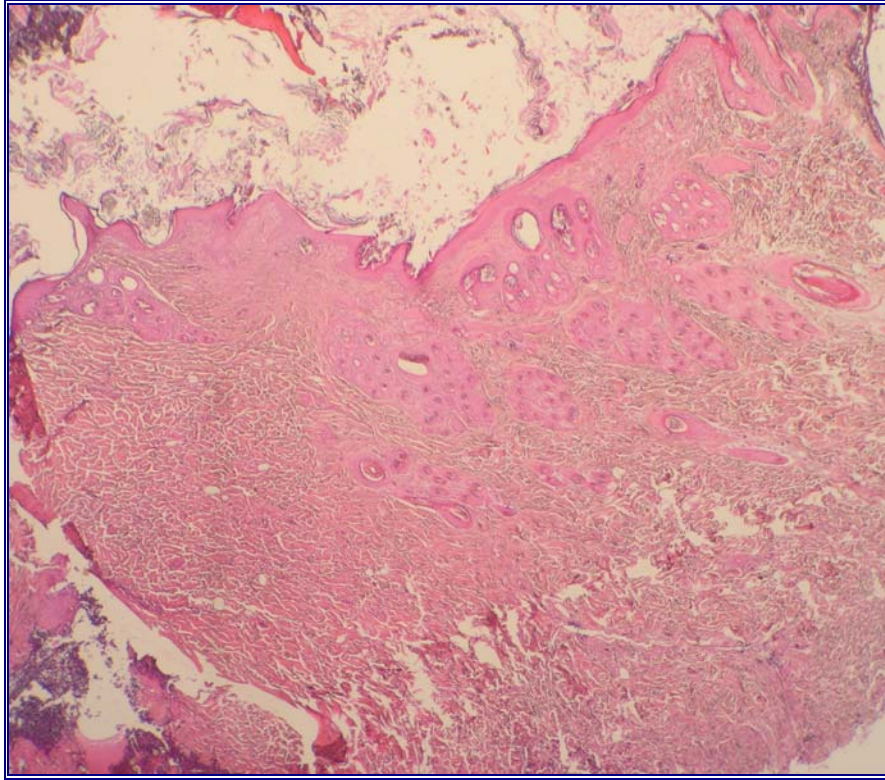


Figura 58: PRFC infiltrado 7 días. Imagen panorámica piel. Grado reepitelización 4: Reepitelización completa y espesor regular (H-E 125x).

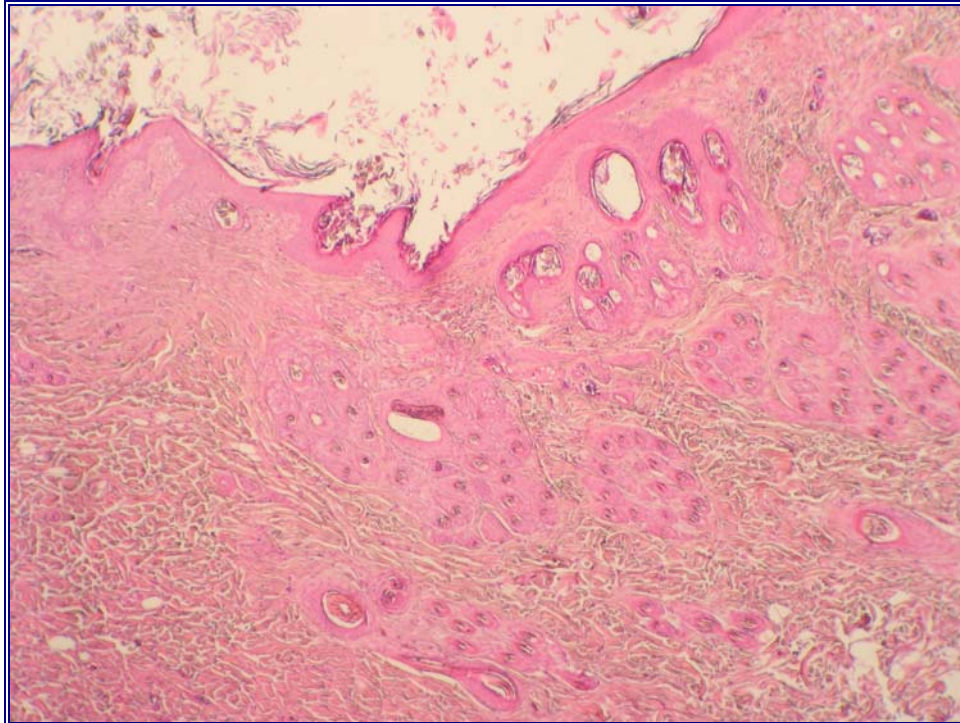


Figura 59: PRFC infiltrado 7 días. Imagen panorámica piel. Grado reepitelización 4: Reepitelización completa y espesor regular (H-E 200x).

Grado de reepitelización a los 28 días de provocar las heridas en la piel

El grado de reepitelización de las heridas a los 28 días de provocar las heridas en la piel, se estudió en 16 muestras, ya que un animal que iba a ser biopsiado a los 28 días de provocarle dos heridas en la piel: una con PRFC y otro control, murió durante el estudio y dos muestras se perdieron en la fase de procesamiento de las mismas en el laboratorio.

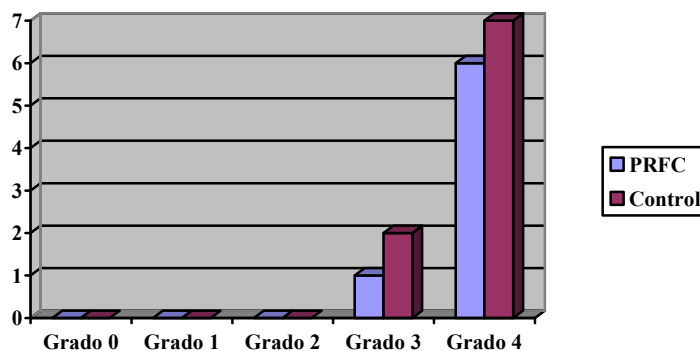
A los 28 días, la reepitelización fue mayor en el grupo en el que se aplicó el PRFC sin diferencias estadísticamente significativas ($p=0,687$) (Tabla 10).

En la figura 60 se observa que un 85,71% de las heridas estaban totalmente reepitelizadas.

Tabla 10: Grado de reepitelización a los 28 días de provocar las heridas en piel, entre aquellas en las que se aplicó el PRFC y aquellas en las que no se aplicó ($n= 16$ muestras).

GRUPOS	GRADO DE REEPITELIZACIÓN A LOS 28 DÍAS DE PROVOCAR LAS HERIDAS EN PIEL n (%)					p-valor
	Grado 0	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4	
Aplicación de PRFC (n = 7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (14.29)	6 (85.71)	0.687
Control (n = 9)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (22.23)	7 (77.77)	

Figura 60: Grado de reepitelización de las heridas en la piel a los 28 días de la cirugía.



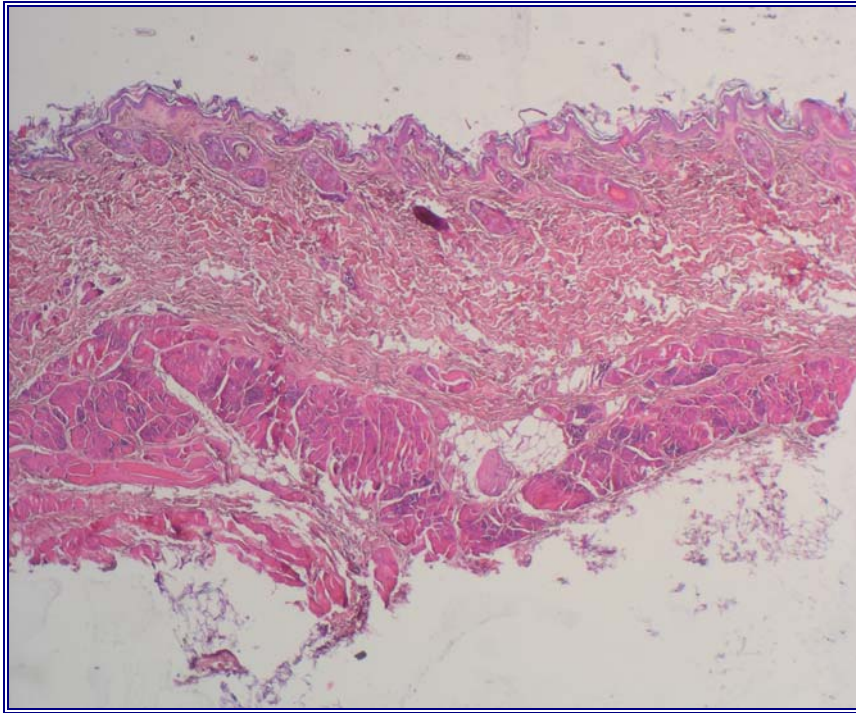


Figura 61: Control 28 días. Imagen panorámica de piel. Grado reepitelización 3: Reepitelización completa pero espesor irregular (H-E 125x).

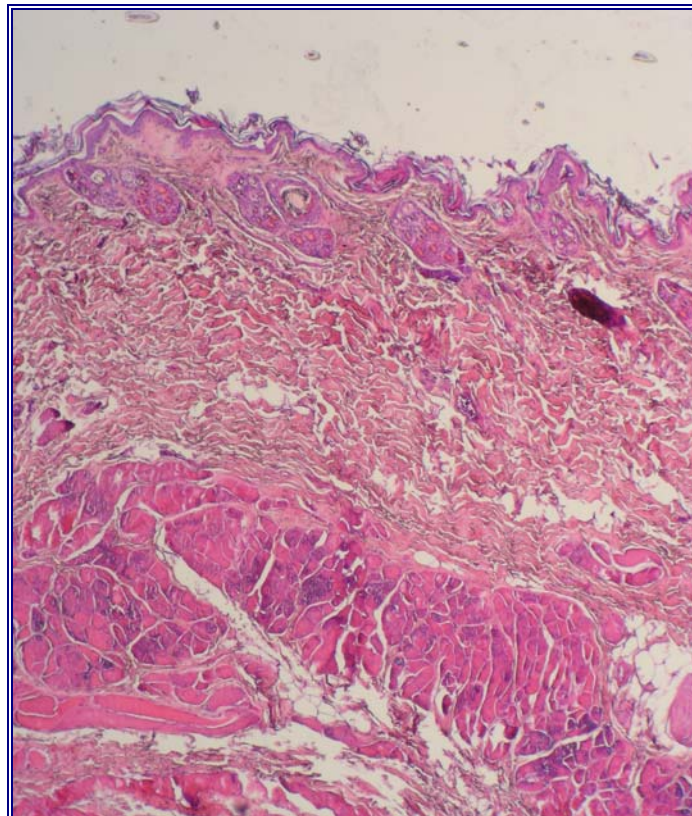


Figura 62: Control 28 días. Imagen panorámica de piel. Grado reepitelización 3: Reepitelización completa pero espesor irregular (H-E 200x).

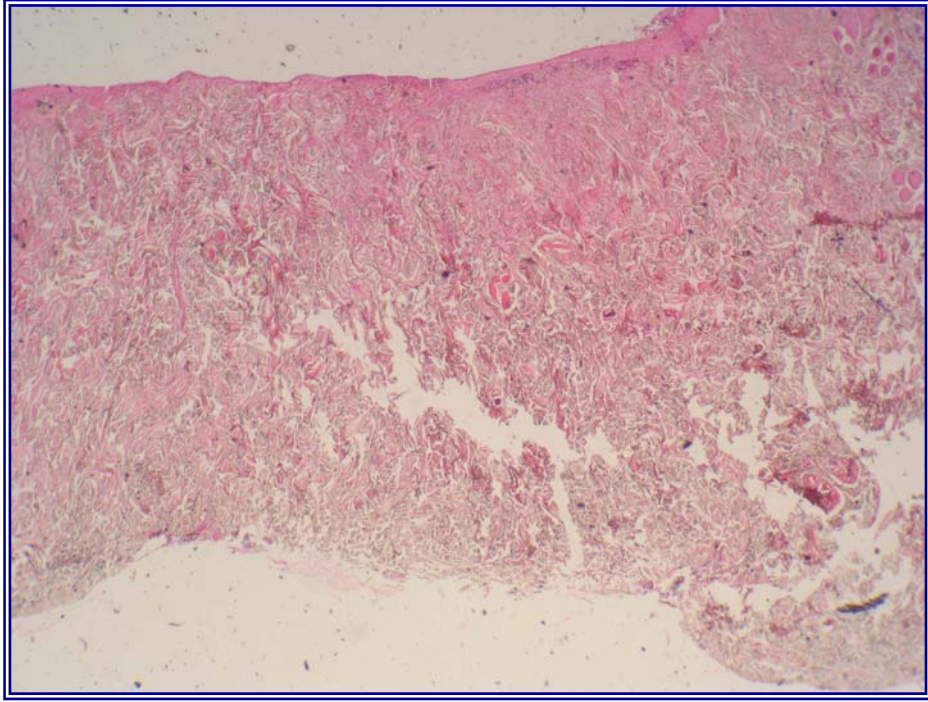


Figura 63: PRFC gel 28 días. Imagen panorámica de piel. Grado reepitelización 4: Reepitelización completa y espesor regular (H-E 125x).

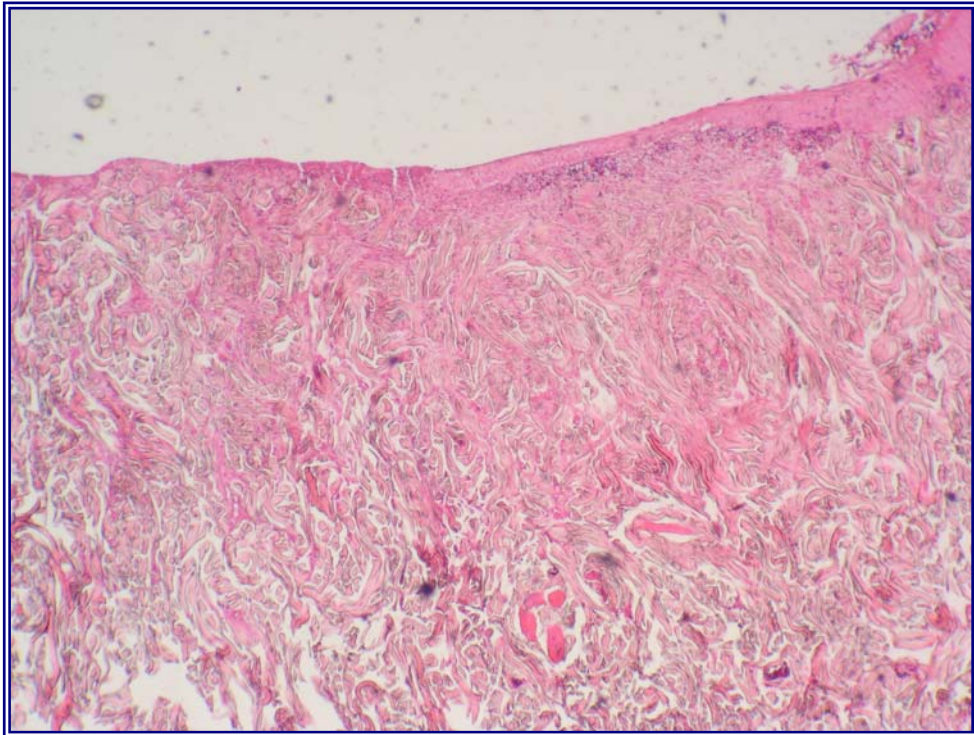


Figura 64: PRFC gel 28 días. Imagen panorámica de piel. Grado reepitelización 4: Reepitelización completa y espesor regular (H-E 125x).

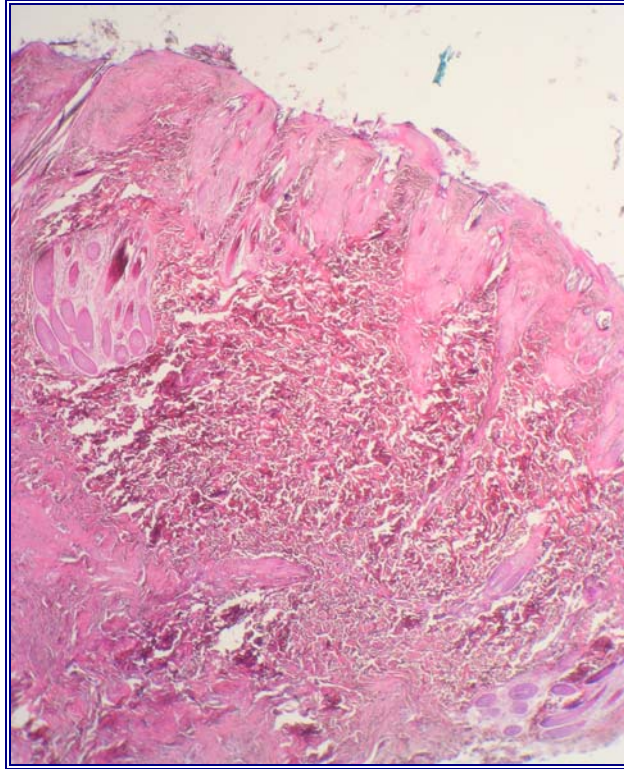


Figura 65: PRFC infiltrado 28 días. Imagen panorámica de piel. Grado reepitelización 4: Reepitelización completa y espesor normal (H-E 125x).

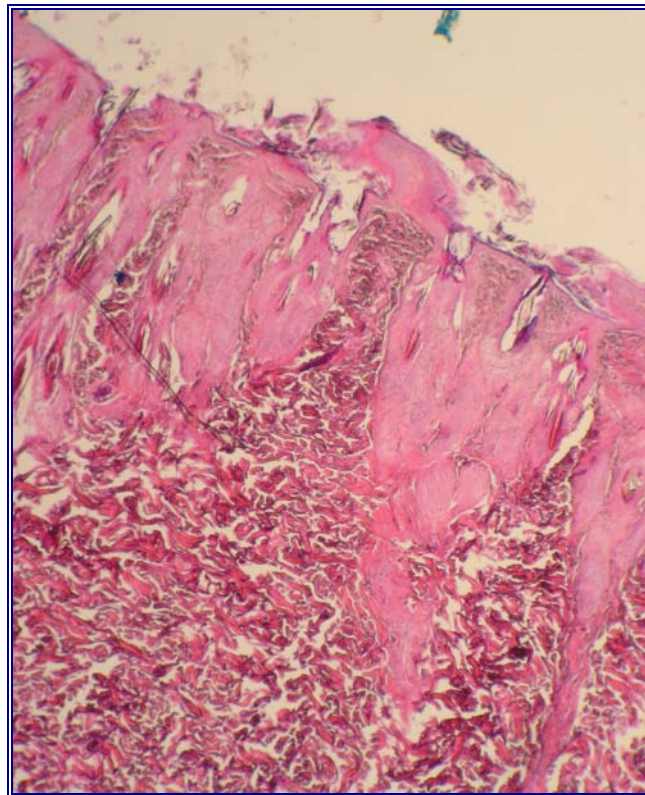


Figura 66: PRFC infiltrado 28 días. Imagen panorámica de piel. Grado reepitelización 4: Reepitelización completa y espesor regular (H-E 200x).

INFLAMACIÓN EN LA MUCOSA DEL DORSO LINGUAL

El grado de inflamación de las heridas se estudió a las 7 y 28 días de la cirugía. Para ello se tomaron las biopsias de 10 conejos por grupo, y se comparó el grado de inflamación de las heridas.

Grado de inflamación a los 7 días de provocar las heridas en la lengua.

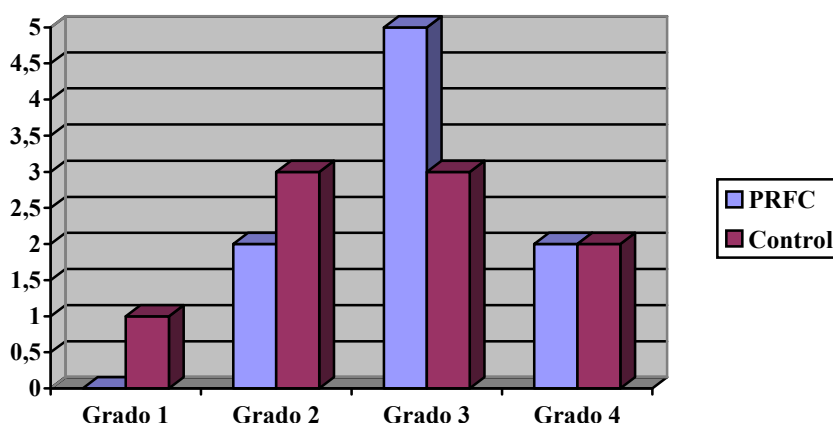
El grado de inflamación de las heridas a los 7 días de aplicar cada una de las técnicas quirúrgicas, se estudió en 18 muestras (n=9 conejos por grupo), ya que 2 muestras (n=1 por grupo) se perdieron en la fase de procesamiento de las muestras en el laboratorio.

En ambos grupos en el 22,22% de las heridas el proceso inflamatorio se había resuelto completamente (*Tabla 11*), pero en el grupo en el que se aplicó el PRFC presentó un porcentaje mayor (55,56%) de heridas con resolución completa de la inflamación aguda (grado 3), respecto al control (33,33%), aunque no observamos diferencias estadísticamente significativas ($p=0,637$).

Tabla 11: Grado de inflamación a los 7 días de provocar las heridas en lengua, entre aquellas en las que se aplicó el PRFC y aquellas en las que no se aplicó (n=18 muestras).

GRUPOS	GRADO DE INFLAMACIÓN A LOS 7 DÍAS DE PROVOCAR LAS HERIDAS EN LENGUA n (%)				p-valor
	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4	
Aplicación de PRFC (n = 9)	0 (0)	2 (22.22)	5 (55.56)	2 (22.22)	0.637
Control (n = 9)	1 (11.12)	3 (33.33)	3 (33.33)	2 (22.22)	

Figura 67: Grado de inflamación de las heridas a los 7 días de la cirugía.



Grado de inflamación a los 28 días de provocar las heridas en la lengua.

El grado de inflamación de las heridas a los 28 días de aplicar cada una de las técnicas quirúrgicas, se estudió en 18 muestras, ya que un animal que iba a ser biopsiado a los 28 días de provocarle las dos heridas en la lengua: una con PRFC y otra control murió durante el estudio.

El 100% de las heridas en las que se aplicó el PRFC el proceso inflamatorio se había resuelto completamente, con diferencias estadísticamente significativas respecto al control. (Tabla 12).

Tabla 12: *Grado de inflamación a los 28 días de provocar las heridas en lengua, entre aquellas en las que se aplicó el PRFC y aquellas en las que no se aplicó (n= 18 muestras).*

GRUPOS	GRADO DE INFLAMACIÓN A LOS 28 DÍAS DE PROVOCAR LAS HERIDAS EN LENGUA n (%)				p-valor
	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4	
Aplicación de PRFC (n = 9)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	9 (100)	0.023
Control (n = 9)	0 (0)	0 (0)	4 (44.45)	5 (55.55)	

INFLAMACIÓN EN PIEL

El grado de inflamación de las heridas a los 7 días de provocar las heridas en la piel se estudió en 20 muestras (n=10 conejos por grupo).

El 40% de las heridas en las que aplicamos el PRFC el proceso inflamatorio se habían resuelto completamente, mientras que ninguna de las heridas del grupo control presentaba resolución completa, existiendo diferencias significativas entre ambos grupos (*Tabla 13*).

Tabla 13: Grado de inflamación a los 7 días de provocar las heridas en piel, entre aquellas en las que se aplicó el PRFC y aquellas en las que no se aplicó (n = 20 muestras).

GRUPOS	GRADO DE INFLAMACIÓN A LOS 7 DÍAS DE PROVOCAR LAS HERIDAS EN PIEL n (%)				p-valor
	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4	
Aplicación de PRFC (n = 10)	0 (0)	1 (10)	5 (50)	4 (40)	0.051
Control (n = 10)	1 (10)	5 (50)	4 (40)	0 (0)	

Grado de inflamación a los 28 días de provocar las heridas en la piel.

El grado de inflamación de las heridas a los 28 días de aplicar cada una de las técnicas quirúrgicas, se estudió en 16 muestras (n=7 conejos en el grupo en el que se aplicó el PRC y n=9 conejos en el grupo control), ya que un animal que iba a ser biopsiado a los 28 días de provocarle dos heridas en piel: una con PRFC y otra control, murió durante el estudio y dos muestras se perdieron en la fase de procesamiento de las mismas en el laboratorio.

El porcentaje de heridas que habían resuelto el proceso inflamatorio era mayor en el grupo control (88,88%), frente al grupo en el que aplicamos el PRFC (85,71%), sin diferencias significativa (*Tabla 14*).

Tabla 14: Comparación del grado de inflamación a los 28 días de provocar las heridas en piel, entre aquellas en las que se aplicó el PRFC y aquellas en las que no se aplicó (n=16 muestras).

GRUPOS	GRADO DE INFLAMACIÓN A LOS 28 DÍAS DE PROVOCAR LAS HERIDAS EN PIEL n (%)				<i>p-valor</i>
	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4	
Heridas en las que se aplicó el PRFC (n = 7)	0 (0)	0 (0)	1 (14.29)	6 (85.71)	0.849
Heridas en las que no se aplicó el PRFC (n = 9)	0 (0)	0 (0)	1 (11.12)	8 (88.88)	

FORMA DE APLICACIÓN DEL PRFC: GEL O INFILTRADO.

MUCOSA DEL DORSO LINGUAL

A los 7 y 28 días de provocar las heridas en el dorso lingual, no observamos diferencias estadísticamente significativas respecto a la forma de aplicar el PRFC en relación a la reepitelización y resolución del proceso inflamatorio; sólo existen ciertas diferencias al aplicar el PRFC en forma de gel o en forma de infiltrado, a los 7 días, pero sin ser estadísticamente significativas. (Tabla 15; 16; 17; 18).

Tabla 15: Grado de reepitelización a los 7 días de provocar las heridas en lengua, en relación a la forma de aplicar el PRFC (n= 9 muestras).

GRUPOS	GRADO DE REEPITELIZACIÓN A LOS 7 DÍAS DE PROVOCAR LAS HERIDAS EN LENGUA n (%)					p-valor
	Grado 0	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4	
Aplicación del PRFC en gel (n = 5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (80)	1 (20)	0.858
Aplicación del PRFC infiltrado (n = 4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (75)	1 (25)	

Tabla 16: Grado de reepitelización a los 28 días de provocar las heridas en lengua, en relación a la forma de aplicar el PRFC (n=9 muestras).

GRUPOS	GRADO DE REEPITELIZACIÓN A LOS 28 DÍAS DE PROVOCAR LAS HERIDAS EN LENGUA n (%)					p-valor
	Grado 0	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4	
Aplicación del PRFC en gel (n = 5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	5 (100)	-----
Aplicación del PRFC infiltrado (n = 4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (100)	

Tabla 17: Grado de inflamación a los 7 días de provocar las heridas en lengua, en relación a la forma de aplicar el PRFC (n= 9 muestras).

GRUPOS	GRADO DE INFLAMACIÓN A LOS 7 DÍAS DE PROVOCAR LAS HERIDAS EN LENGUA n (%)				p-valor
	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4	
Aplicación del PRFC en gel (n = 5)	0 (0)	2 (40)	2 (40)	1 (10)	0.347
Aplicación del PRFC infiltrado (n = 4)	0 (0)	0 (0)	3 (75)	1 (25)	

Tabla 18: Grado de inflamación a los 28 días de provocar las heridas en lengua, en relación a la forma de aplicar el PRFC (n= 9 muestras).

GRUPOS	GRADO DE INFLAMACIÓN A LOS 28 DÍAS DE PROVOCAR LAS HERIDAS EN LENGUA n (%)				p-valor
	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4	
Aplicación del PRFC en gel (n = 5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	5 (100)	-----
Aplicación del PRFC infiltrado (n = 4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (100)	

PIEL

A los 7 y 28 días de provocar las heridas en la piel, no observamos diferencias significativas respecto a la forma de aplicar el PRFC en relación a la reepitelización y resolución del proceso inflamatorio. (Tabla 19; 20; 21; 22).

Tabla 19: Grado de reepitelización a los 7 días de provocar las heridas en piel en relación a la forma de aplicar el PRFC (n = 10 muestras).

GRUPOS	GRADO DE REEPITELIZACIÓN A LOS 7 DÍAS DE PROVOCAR LAS HERIDAS EN PIEL n (%)					p-valor
	Grado 0	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4	
Aplicación del PRFC en gel (n = 5)	0 (0)	0 (0)	1 (20)	0 (0)	4 (80)	0.368
Aplicación del PRFC infiltrado (n = 5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (20)	4 (80)	

Tabla 20: Grado de reepitelización a los 28 días de provocar las heridas en piel en relación a la forma de aplicar el PRFC (n=7 muestras).

GRUPOS	GRADO DE REEPITELIZACIÓN A LOS 28 DÍAS DE PROVOCAR LAS HERIDAS EN PIEL n (%)					p-valor
	Grado 0	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4	
Aplicación del PRFC en gel (n = 4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (25)	3 (75)	0.350
Aplicación del PRFC infiltrado (n = 3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (100)	

Tabla 21: Grado de inflamación a los 7 días de provocar las heridas en piel en relación a la forma de aplicar el PRFC (n = 10 muestras).

GRUPOS	GRADO DE INFLAMACIÓN A LOS 7 DÍAS DE PROVOCAR LAS HERIDAS EN PIEL n (%)				p-valor
	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4	
Aplicación del PRFC en gel (n = 5)	0 (0)	1 (20)	3 (60)	1 (20)	0.333
Aplicación del PRFC infiltrado (n = 5)	0 (0)	0 (0)	2 (40)	3 (60)	

Tabla 22: Grado de inflamación a los 28 días de provocar las heridas en piel en relación a la forma de aplicar el PRFC (n=7 muestras).

GRUPOS	GRADO DE INFLAMACIÓN A LOS 28 DÍAS DE PROVOCAR LAS HERIDAS EN PIEL n (%)				p-valor
	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4	
Aplicación del PRFC en gel (n = 4)	0 (0)	0 (0)	1 (25)	3 (75)	0.350
Aplicación del PRFC infiltrado (n = 3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (100)	

RESULTADOS RADIOLÓGICOS

PLASMA RICO EN FACTORES DE CRECIMIENTO FRENTE GRUPO CONTROL.

Grado radiológico de regeneración ósea 1 mes después postcirugía.

El grado de regeneración de los defectos óseos en los que se aplicaba PRFC frente a los defectos óseos controles, 1 mes después de la cirugía, se estudió en 16 defectos óseos (se realizaron 20 defectos óseos en 10 tibias, pero se perdieron 2 tibias por sepsis de origen desconocido acompañada de fractura ósea, durante el periodo de seguimiento postoperatorio).

Radiológicamente, la mayoría de los defectos en los que se aplicaba el PRFC se encontraban parcial (50%) o totalmente cerrados (37,5%), mientras que en el grupo control la mayoría de los defectos permanecían parcialmente abiertos (62,5%), existiendo diferencias significativas entre ambos grupos (*Tabla 23*).

*Tabla 23: Grado radiológico de la regeneración del defecto óseo 1 mes después de la cirugía
(n=16 muestras)*

GRUPOS	GRADO RADIOLÓGICO DE LA REGENERACIÓN DEL DEFECTO ÓSEO 1 MES DESPUÉS n (%)			p-valor
	Grado 1	Grado 2	Grado 3	
Defectos óseos en los que se aplicó el PRFC (n=8)	1 (12,50)	4 (50)	3(37,50)	0,055
Defectos óseos control (n=8)	5 (62,50)	3 (37,50)	0 (0)	
<i>Nota: Grado 1: No cerrado; Grado 2: Parcialmente cerrado; Grado 3: Totalmente cerrado.</i>				

Figura 67: Grado radiológico de regeneración del defecto óseo 1 mes después de la cirugía

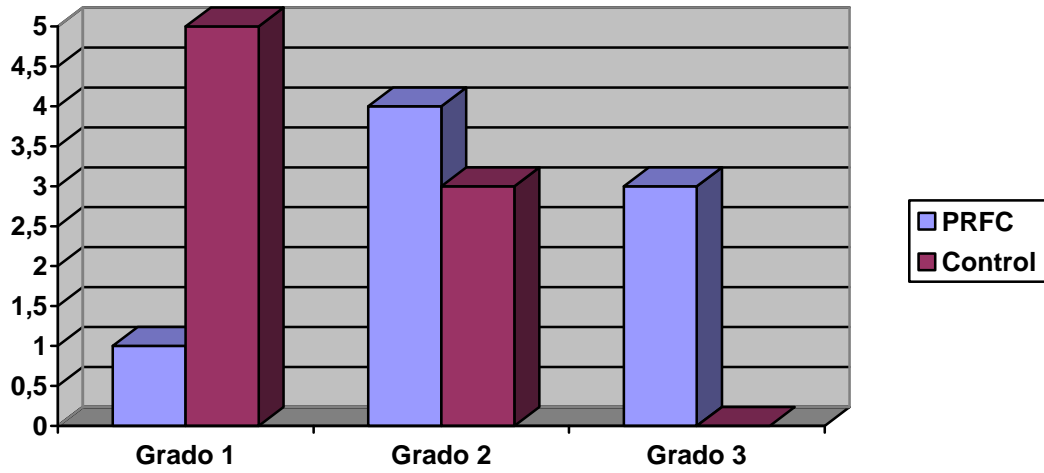


Figura 68: Aspecto radiológico de una tibia 1 mes después de la cirugía. El defecto superior fue rellenado con el gel de PRFC y presentó un cierre completo del defecto óseo (grado radiológico 3) (marcado con la flecha roja), mientras que el inferior se dejaba vacío como control, observando un cierre parcial del defecto (grado radiológico 2).

Grado radiológico de regeneración ósea 2 meses después de la cirugía.

El estudio de la regeneración ósea a los dos meses de la cirugía se realizó sobre 12 defectos óseos (se realizaron 20 defectos óseos en 10 tibias, pero se perdieron 4 tibias con 8 defectos óseos por sepsis de origen desconocido acompañada de fractura ósea, durante el periodo de seguimiento postoperatorio).

A los 2 meses, la mayoría de los defectos en los que se aplicaba el PRFC estaban totalmente cerrados observando diferencias significativas, respecto al grupo control.

Tabla 24: Grado radiológico de la regeneración del defecto óseo 2 meses después (n=12 muestras)

GRUPOS	GRADO RADIOLÓGICO DE LA REGENERACIÓN DEL DEFECTO ÓSEO 2 MESES DESPUÉS n (%)			p-valor
	Grado 1	Grado 2	Grado 3	
Defectos óseos en los que se aplicó el PRFC (n=6)	0 (0)	2 (33,33)	4(66,67)	0,036
Defectos óseos control (n=6)	2 (33,33)	4 (66,67)	0 (0)	

Nota: Grado 1: No cerrado; Grado 2: Parcialmente cerrado; Grado 3: Totalmente cerrado.

Figura 68: Grado radiológico de regeneración de los defectos óseos 2 meses después de la cirugía

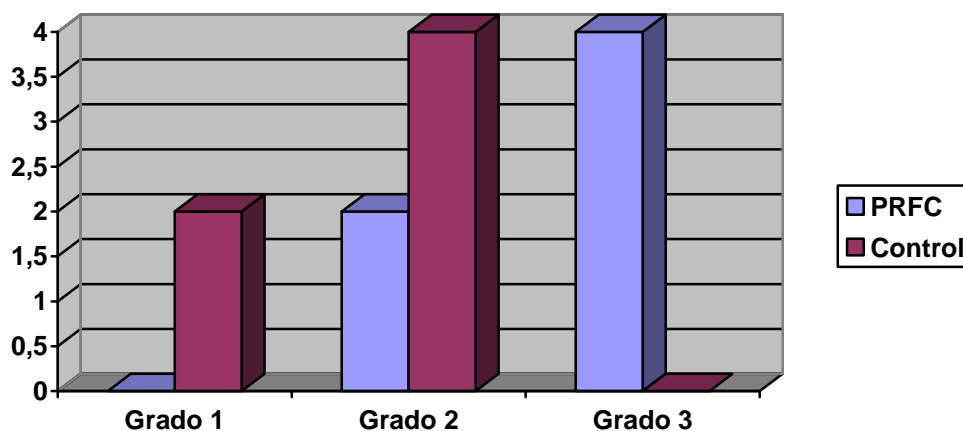




Figura 69: Radiografía de una tibia, 2 meses después de la cirugía. El defecto superior fue rellenado con el gel de PRFC, observando un cierre completo del defecto (grado radiológico 3) (marcado con la flecha roja), mientras que el inferior se dejaba vacío como control, y se puede observar como no está completamente cerrado (grado radiológico 2).

PRFC MEZCLADO CON INJERTO ÓSEO AUTÓLOGO FRENTE INJERTO ÓSEO AUTÓLOGO.

Grado radiológico de regeneración ósea 1 mes postcirugía.

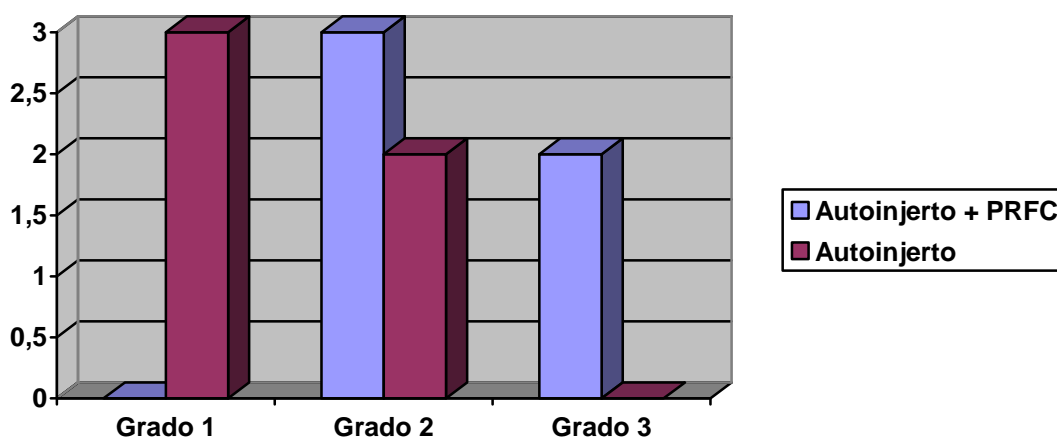
El grado de regeneración ósea de los defectos de las tibias en las que aplicábamos injerto óseo autólogo exclusivamente o mezclado con PRFC al mes de realizar la cirugía, se estudió en 10 defectos óseos (se realizan 20 defectos óseos en 10 tibias, pero se perdieron 5 tibias con 10 defectos óseos). Dos de las tibias se perdieron durante el procesamiento de las muestras en el laboratorio, mientras que las tres restantes se perdieron por una fractura ósea acompañada de una sepsis en la extremidad del animal de origen desconocido.

Un mes después de la cirugía, la mayoría de los defectos óseos en los que se aplicaba el injerto óseo mezclado con el PRFC estaban parcialmente cerrados, mientras que en el grupo control estaban abiertos, sin mostrar diferencias estadísticamente significativas (*Tabla 25*).

Tabla 25: Grado radiológico de la regeneración del defecto óseo 1 mes después (n=10 muestras)

GRUPOS	GRADO RADIOLÓGICO DE LA REGENERACIÓN DEL DEFECTO ÓSEO 1 MES DESPUÉS n (%)			p-valor
	Grado 1	Grado 2	Grado 3	
Defectos óseos en los que se aplicó autoinjerto + PRFC (n=5)	0 (0)	3 (60)	2(40)	0,074
Defectos óseos en los que se aplicó autoinjerto exclusivamente (n=5)	3 (60)	2 (40)	0 (0)	
<i>Nota: Grado 1: No cerrado; Grado 2: Parcialmente cerrado; Grado 3: Totalmente cerrado.</i>				

Figura 70: Grado radiológico de regeneración de los defectos óseos 1 mes después de la cirugía



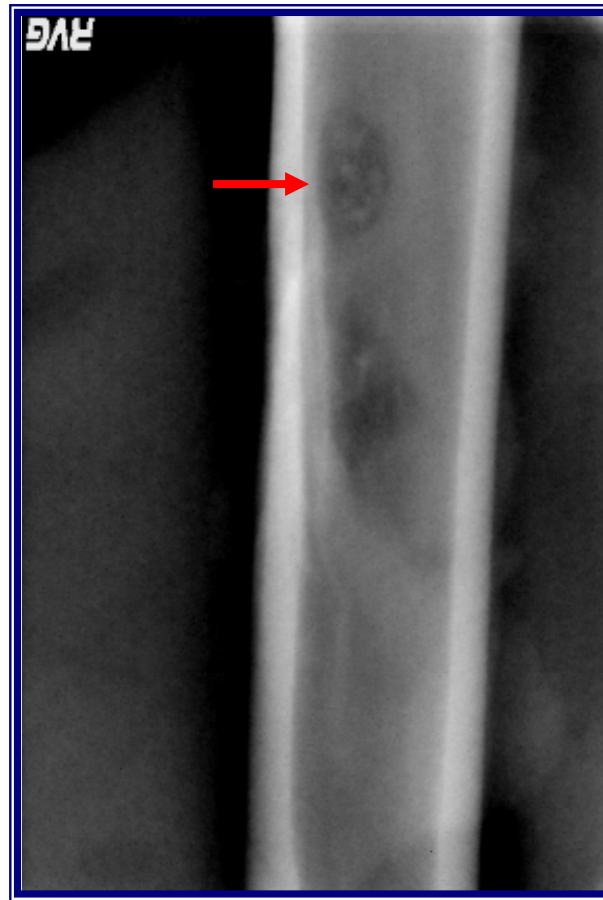


Figura 71: Aspecto radiológico de una tibia 1 mes después de la cirugía. El defecto superior se rellenaba con hueso autólogo + gel de PRFC (marcado con la flecha roja), observando un cierre completo del defecto (grado radiológico 3), mientras que el inferior fue rellenado con hueso autólogo solamente, permaneciendo parcialmente cerrado (grado radiológico 2).

Grado radiológico de regeneración ósea 2 meses postcirugía.

El grado de regeneración ósea de los defectos de las tibias en las que aplicábamos injerto óseo autólogo exclusivamente o mezclado con PRFC a los 2 meses de realizar la cirugía, se estudió en 12 defectos óseos (se realizan 20 defectos óseos en 10 tibias, pero se perdieron 4 tibias con 8 defectos óseos). Dos de las tibias que se perdieron ocurrió durante el procesamiento en el laboratorio, mientras que las otras dos se perdieron por una sepsis, de origen desconocido, en la tibia del animal que provocó la fractura ósea y, por tanto, la pérdida de los defectos óseos.

Observamos que, dos meses después de la cirugía, el 50% de los defectos óseos en los que se aplicaba el injerto óseo mezclado con el PRFC estaban totalmente cerrados, mientras que en el grupo control, el 66,67% estaban parcialmente cerrados, sin mostrar diferencias estadísticamente significativas (*Tabla 26*).

Tabla 26: Grado radiológico de la regeneración del defecto óseo 2 meses después (n=12 muestras)

GRUPOS	GRADO RADIOLÓGICO DE LA REGENERACIÓN DEL DEFECTO ÓSEO 2 MESES DESPUÉS n (%)			p-valor
	Grado 1	Grado 2	Grado 3	
Defectos óseos en los que se aplicó autoinjerto + PRFC (n=6)	0 (0)	3 (50)	3(50)	0,076
Defectos óseos en los que se aplicó autoinjerto solo (n=6)	2 (33,33)	4 (66,67)	0 (0)	
<i>Nota: Grado 1: No cerrado; Grado 2: Parcialmente cerrado; Grado 3: Totalmente cerrado.</i>				

Figura 72: Grado radiológico de regeneración de los defectos óseos 2 meses después de la cirugía

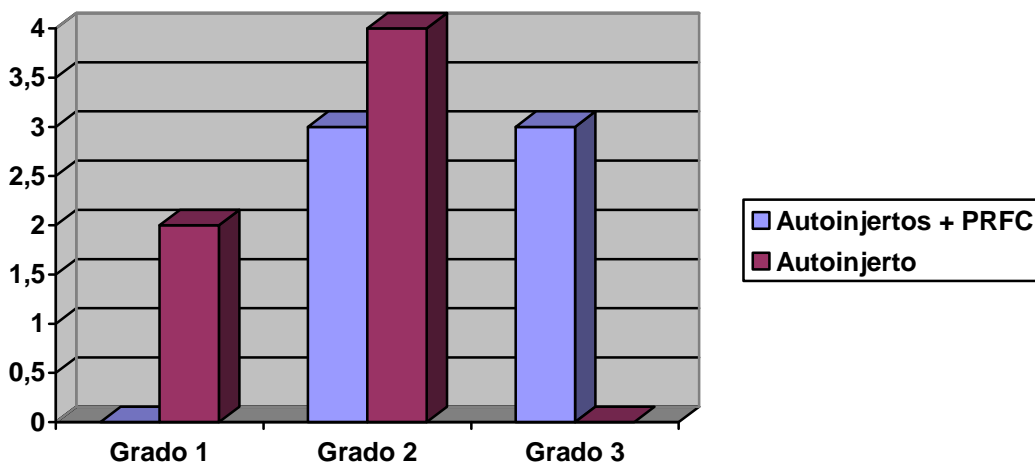




Figura 73: Aspecto radiológico de una tibia 2 meses después de la cirugía. El defecto superior fue rellenado con el hueso autólogo + gel de PRFC, produciéndose un cierre completa del defecto (grado radiológico 3) (marcado con la flecha roja), mientras que el inferior se rellenaba con hueso autólogo sólo, y permanece parcialmente cerrado (grado radiológico 2).

RESULTADOS HISTOMORFOMETRÍA

Los resultados de histomorfometría se llevaron a cabo al mes y a los dos meses de haber realizado la cirugía en los animales, usando las muestras teñidas con hematoxilina-eosina y un software de análisis de imágenes.

Estudio histomorfométrico 1 mes después de la cirugía. PRFC frente control.

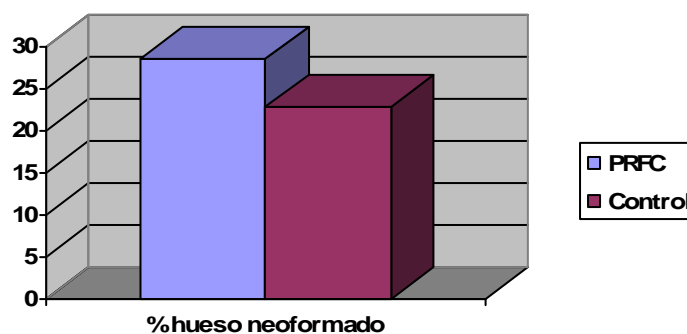
El hueso neoformado en los defectos óseos que realizábamos en las tibias, un mes después de la cirugía fue estudiado en un total de 7 defectos (4 rellenados con PRFC y 3 controles), ya que durante por la fractura de dos de las tibias y problemas durante el procesamiento de las muestras en el laboratorio se perdieron 6 defectos en los que se aplicó PRFC y 7 controles.

Observamos que, transcurrido un mes de la cirugía, en los defectos donde se aplicaba el PRFC tenía un porcentaje de hueso neoformado mayor que los controles, pero sin diferencias significativas (*Tabla 27*).

Tabla 27: Hueso neoformado en el defecto óseo 1 mes después de la cirugía ($n = 7$ muestras).

GRUPOS	HISTOMORFOMETRÍA	<i>p-valor</i>
Defectos óseos en los que se aplicó el PRFC (n = 4)	28.58 ± 11.22	0.552
Defectos óseos control (n = 3)	22.90 ± 12.23	
Nota: Histomorfometría: % de hueso que se ha formado en el área del defecto óseo provocado con la fresa trefina		

Figura 74: Porcentaje hueso neoformado 1 mes postcirugía.



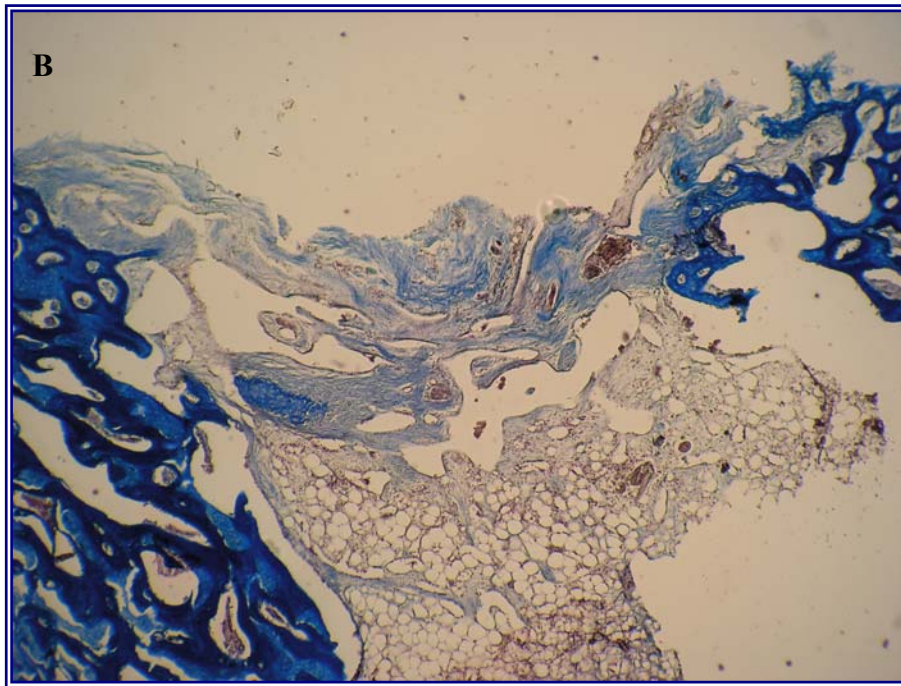
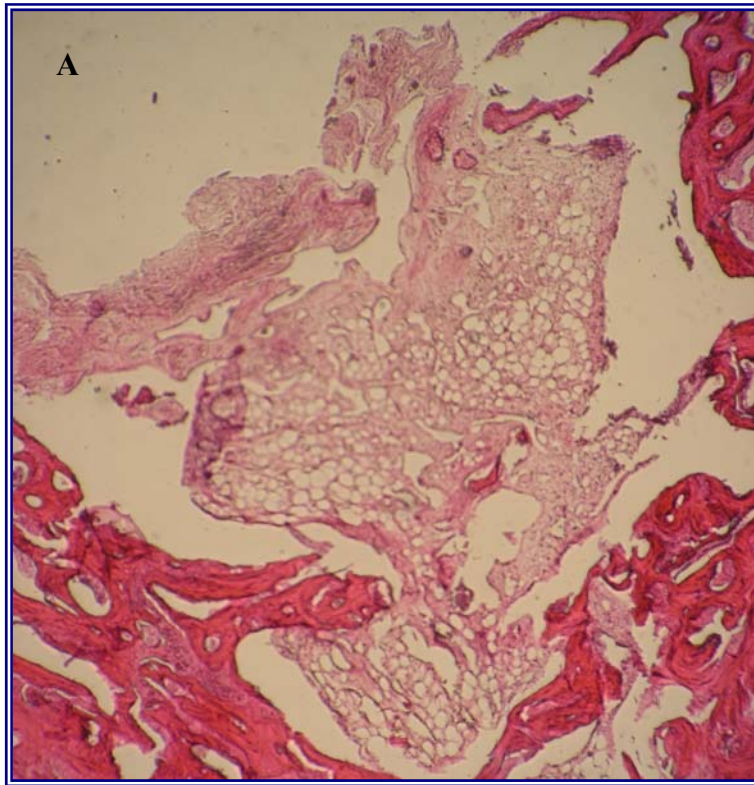


Figura 75: PRFC 1 mes: *A) Defecto completamente relleno, con médula ósea en el centro (H-E. 50x). B) Detalle del extremo superior del defecto en el que se observa hueso neoformado y fenómenos de osificación endocondral (Tricrómico Masson. 125x).*

Estudio histomorfometría 2 meses después de la cirugía. PRFC frente grupo control.

Cuando comparamos el porcentaje de hueso neoformado a los 2 meses postcirugía, observamos que los defectos rellenos con PRFC presentaban una mayor de regeneración ósea (41,02%), frente a los defectos que se usaron como controles (30,59%), sin diferencias estadísticamente significativas ($p=0,169$).

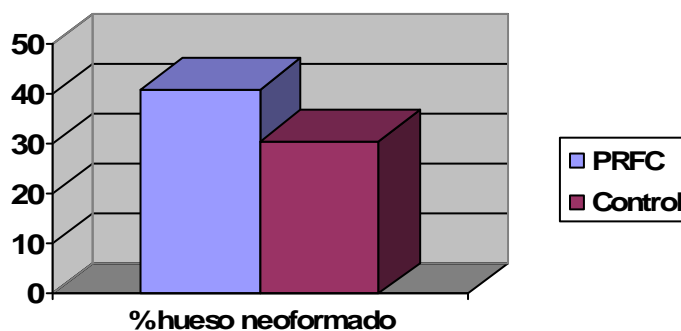
Este estudio se llevó a cabo en un total de 6 defectos óseos (3 con PRFC y 3 controles), ya que 14 defectos se perdieron durante el procesamiento de las muestras en el laboratorio (tanto en el proceso de descalcificación, como en el corte y posterior tinción) o por la fractura, durante el periodo de seguimiento postquirúrgico, de 4 de las tibias, por motivos desconocidos.

Tabla 28: Porcentaje de hueso neoformado en el defecto óseo 2 meses después de la cirugía (n=6 muestras).

GRUPOS	HISTOMORFOMETRÍA	p-valor
Defectos óseos en los que se aplicó el PRFC (n = 3)	41.02 ± 9.15	0.169
Defectos óseos control (n = 3)	30.59 ± 5.69	

Nota: Histomorfometría: % de hueso que se ha formado en el área del defecto óseo provocado con la fresa trefina

Figura 75: Porcentaje hueso neoformado 2 meses postcirugía



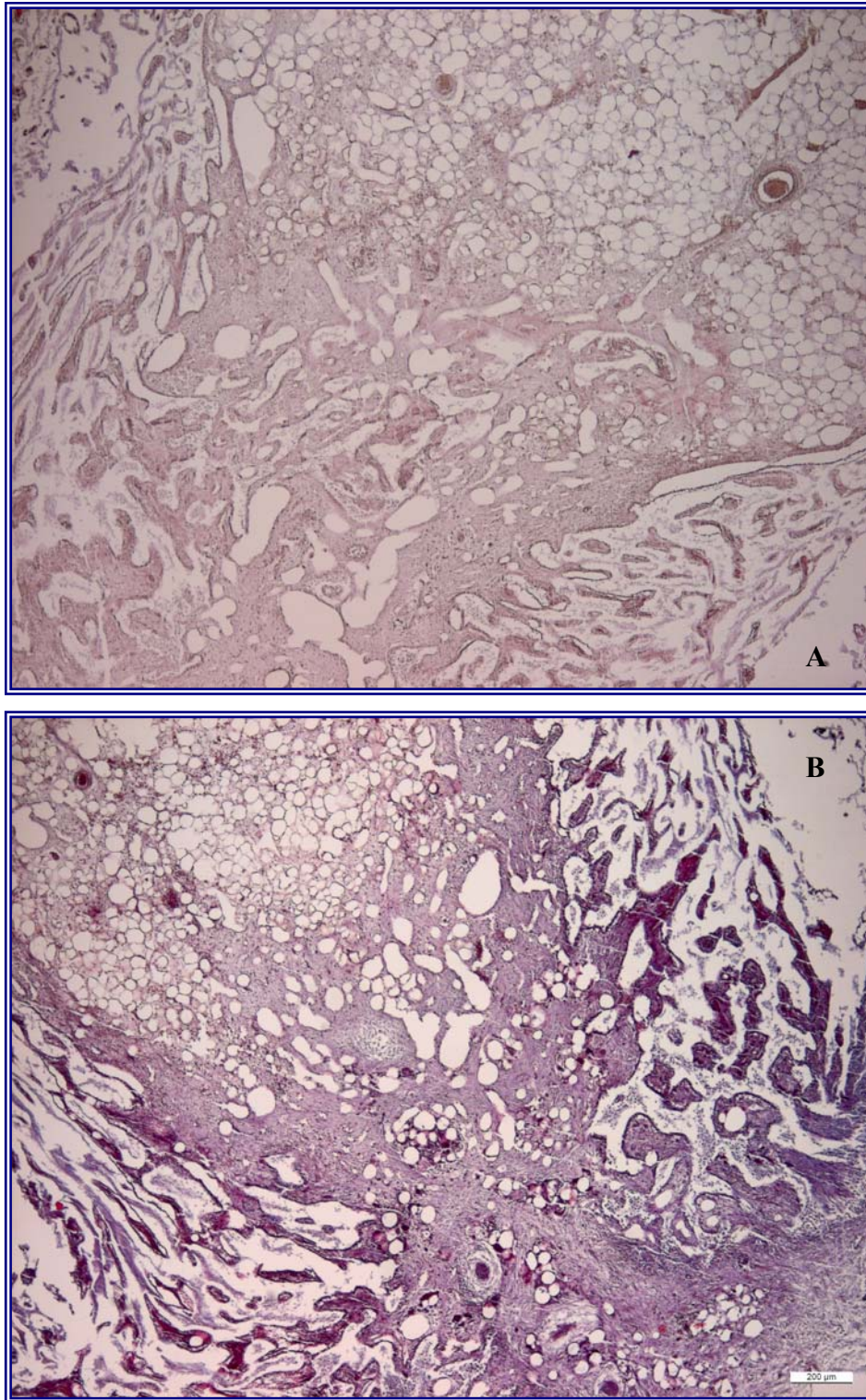


Figura 76: Estudio histomorfométrico: **A)** Tejido de granulación en el defecto óseo (H-E. 200x) .**B)** Imagen de neoformación ósea en la periferia del defecto óseo. (Tricrómico Masson. 125x).

Estudio histomorfometría 1 mes postcirugía. PRFC mezclado con injerto autólogo frente injerto autólogo exclusivamente.

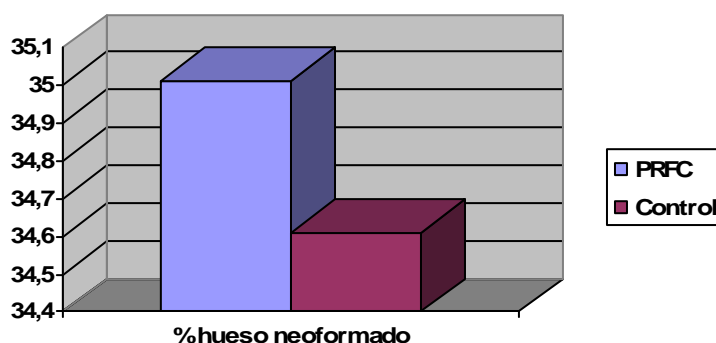
En la tibia izquierda realizamos también 2 defectos óseos con una trefina de 4 mm de diámetro, los cuales eran rellenados uno con autoinjerto de hueso triturado sólo y otro rellenado con autoinjerto de hueso triturado mezclado con PRFC.

Transcurrido un mes desde la cirugía, observamos que en los defectos óseos en los que aplicábamos el PRFC mezclado con el injerto de hueso autólogo el porcentaje de hueso neoformado en el defecto era superior al que se encontraba en los defectos rellenados con hueso autólogo, no observando diferencias estadísticamente significativas (*Tabla 29*). Se estudiaron sólo 6 defectos óseos, ya que aunque algunas muestras se perdieron durante el transcurso del procesamiento de las muestras en el laboratorio, hay que recordar que se perdieron tibias durante el periodo de seguimiento postquirúrgico por fractura ósea acompañada de sepsis.

Tabla 29: Porcentaje de hueso neoformado en el defecto óseo 1 mes después de la cirugía (n= 6 muestras).

GRUPOS	HISTOMORFOMETRÍA	p-valor
Defectos óseos en los que se aplicó autoinjerto + PRFC (n = 3)	35.01 ± 5.31	0.971
Defectos óseos en los que se aplicó autoinjerto exclusivamente (control) (n = 3)	34.61 ± 16.93	
Nota: Histomorfometría: % de hueso que se ha formado en el área del defecto óseo provocado con la fresa trefina		

Figura 77: Porcentaje hueso neoformado 1 mes postcirugía



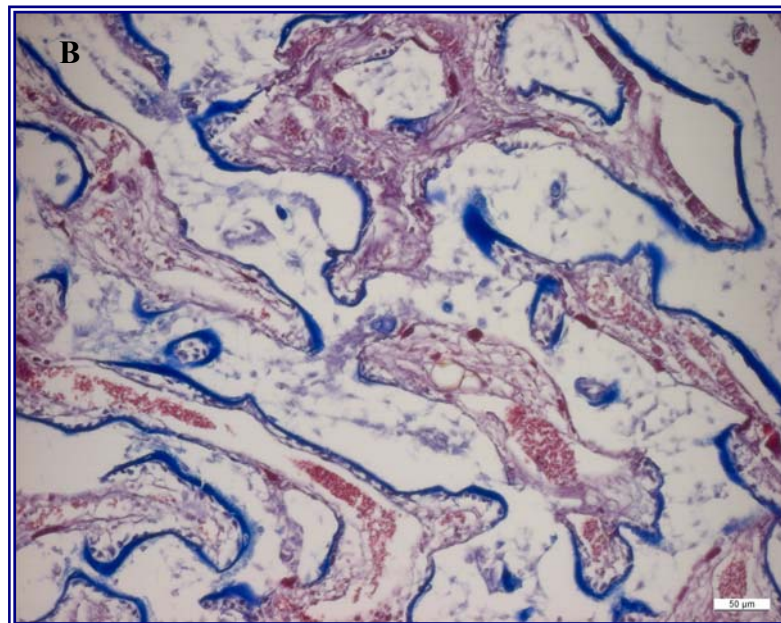
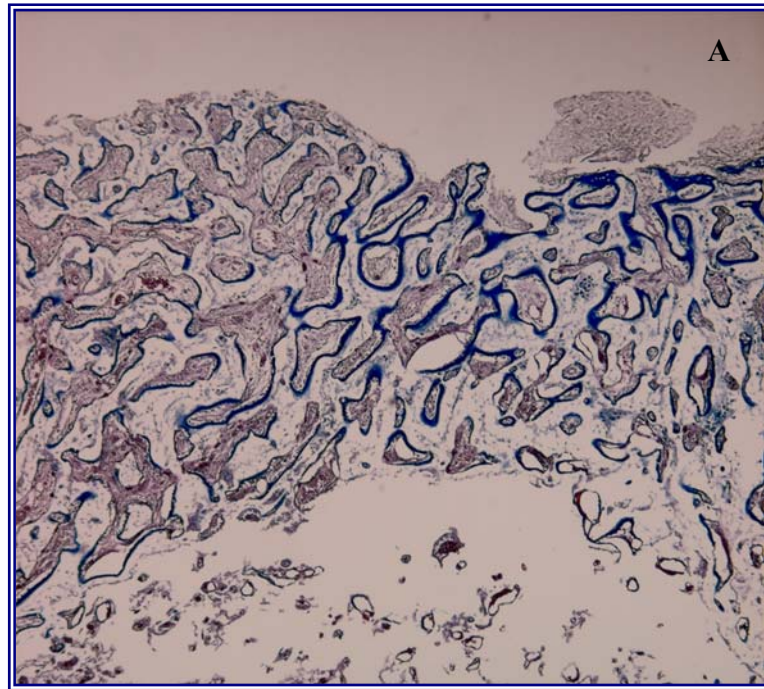


Figura 78: PRFC + Injerto hueso autógeno 1 mes postcirugía. A) Defecto cerrado por hueso neoformado (Tricrómico Masson. 125x). B) Detalle del proceso de osificación endocondral (Tricrómico Masson. 312,5x).

Estudio histomorfométrico a los 2 meses postcirugía. PRFC mezclado con injerto autólogo frente a injerto autólogo sólo.

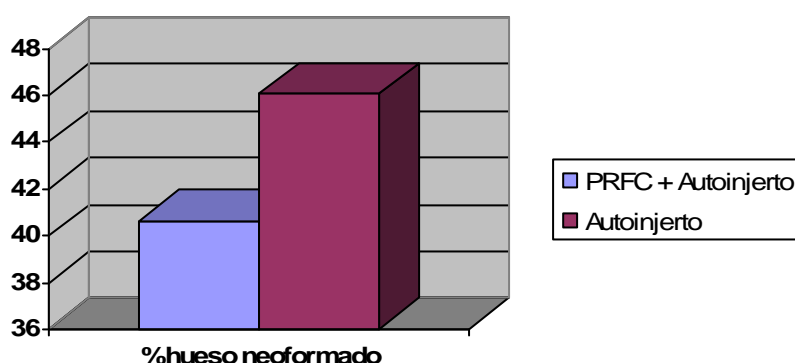
A los dos meses, los defectos donde aplicamos el PRFC mezclado con injerto de hueso autólogo mostraron menor cantidad de hueso neoformado (40.63%) con respecto a los defectos rellenados con injerto de hueso exclusivamente (46,04%), sin obtener diferencias estadísticamente significativas.

Algunas de las muestras se perdieron durante el procesamiento en el laboratorio, pero cabe recordar que perdimos 2 tibias por sepsis de origen desconocido acompañada de fractura ósea, durante el periodo de seguimiento postoperatorio.

Tabla 30: Hueso neoformado en el defecto óseo 2 meses después de la cirugía (n=6 muestras).

GRUPOS	HISTOMORFOMETRÍA	p-valor
Defectos óseos en los que se aplicó autoinjerto + PRFC (n = 3)	40.63 ± 14.74	0.631
Defectos óseos en los que se aplicó autoinjerto exclusivamente (n = 3)	46.04 ± 10.36	
Nota: Histomorfometría: % de hueso que se ha formado en el área del defecto óseo provocado con la fresa trefina		

Figura 79: Porcentaje hueso neoformado 2 meses postcirugía



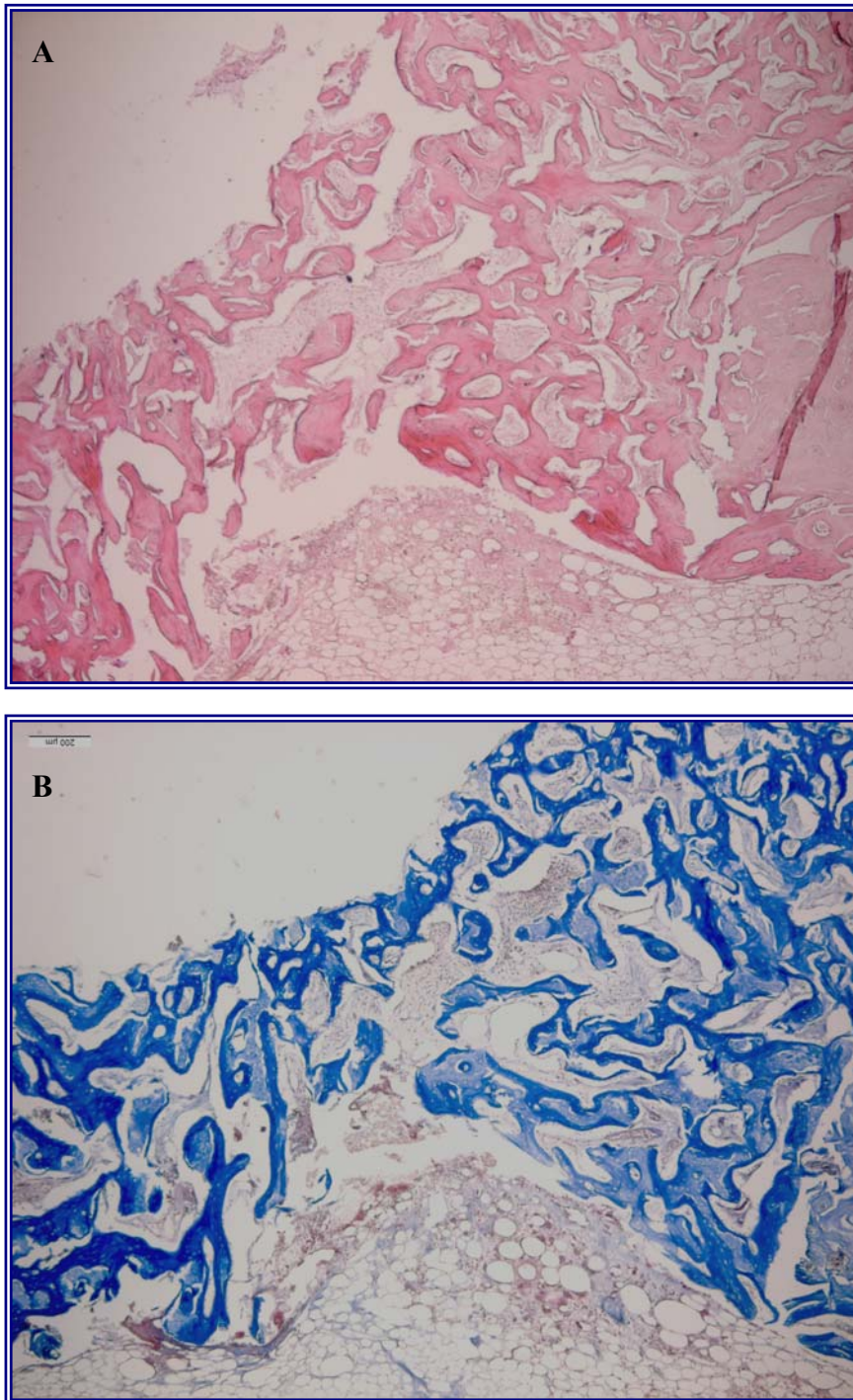


Figura 80: *A los dos meses de la cirugía: A) Trabéculas ósea de mayor tamaño (H-E. 200x). B) Detalle de la osificación (Tricrómico Masson 200x).*

V. DISCUSIÓN

La experimentación científica con animales de laboratorio no es una actividad nueva. Los estudios previos llevados a cabo con el PRFC principalmente estaban diseñados para estudiar su efecto en la regeneración de los tejidos óseos (**Aghaloo, 2002; Fürst, 2003; Jakse, 2003; Ogino, 2005**), ya sea usándolo sólo o combinados con sustitutos óseos, pero también llevan a cabo estudios sobre la aplicación del PRFC en tejidos blandos, en la mayoría de los casos, de tejidos extraorales como nervios, tendones, músculos, etc. (**Arpenberg, 2006; Anitua, 2006; Schnabel, 2007; Virchenko, 2007; Anitua, 2008**). En la actualidad, se está comenzando a utilizar en el tratamiento de úlceras en tejidos blandos intraorales (aftas) de manera satisfactoria. (**Aminabadi, 2008**).

Para este estudio usamos conejos albinos adultos, machos, de Nueva Zelanda por las siguientes razones:

- Utilizamos animales adultos, ya que tienen cartílagos de crecimiento cerrados y así evitar la participación de neoformación ósea, obteniendo resultados más fisiológicos, además permite practicar los defectos cavitarios óseos en huesos de mayor tamaño. (**Castillo, 2001**)
- La raza de Nueva Zelanda, posee un tejido óseo de estructura Haversiana y laminar, similar al hueso humano.
- Se usan animales machos, por el factor protector de las hormonas androgénicas contra la reabsorción ósea. (**Clarke, 1996**).
- Son animales que tienen una gran resistencia física y son usados en estudios científicos previos (**Kania, 1998; Eun-Seok, 2001; Aghaloo, 2002; Ohya, 2005**).
- Son fáciles de conseguir, de coste de adquisición moderado, mantenimiento sencillo y fácil manejo.
- Podíamos obtener un volumen sanguíneo suficiente para realizar el estudio, sin poner en peligro la integridad del animal como ha demostrado el estudio previo de **Morton, 1993**.
- La concentración de plaquetas y demás elementos formes que forman la sangre, podría ser similar a la de los humanos según los estudios de **Mitruka, 1981; Clemmons, 1983 y Jain, 1993**.

La elección del PRFC se realizó porque es un producto autólogo (lo que disminuye el riesgo de rechazo), es fácil de obtener y la infraestructura necesaria para su obtención es mínima. Otra ventaja que tiene es que se necesita un pequeño volumen de sangre y el activador es el cloruro cálcico, lo que evita la transmisión de enfermedades, como es el caso de coagulopatías (**Landdesberg, 2000**) que podría ocurrir al activarlo con trombina bovina como ocurre en el Plasma Rico en Plaquetas. Además, aunque en otros estudios previos han probado su eficacia sobre todo en el uso de este material junto con distintos injertos óseos (**Fuerst, 2004; Anitua, 2006**), los resultados son contradictorios con otros estudios (**Fennis, 2004; Butterfield, 2005**). El uso del PRFC en los tejidos blandos es una técnica relativamente reciente, y aunque se ha utilizado en tejidos extraorales (**Centella, 2005; Alio, 2007**), y más actualmente comienza a usarse en los tejidos intraorales. (**Aminabadi, 2008**)

Para la obtención del PRFC usamos el protocolo de una sola centrifugación (**Anitua, 1999**) a 1800 rpm durante 8 minutos, porque nos parecía una forma más sencilla y rápida, que la usada por otros autores de doble centrifugación, a muy altas revoluciones y cuya duración es de aproximadamente 30 minutos (**Aghaloo, 2002; Butterfield, 2005**). Además, esta es la única manera de obtener el Plasma Rico en Factores de Crecimiento porque si usamos la técnica de doble centrifugación, lo que obtenemos es la Plasma Rico en Plaquetas (PRP). Además nos decantamos por el uso del PRFC, porque para su activación se usa el cloruro cálcico, lo que no conlleva peligro de rechazo, mientras que para activar el PRP es necesario el uso de trombina bovina, que puede llegar a producir el rechazo del material por parte del organismo. Este protocolo necesita una cantidad de sangre mucho menor, que en nuestro caso era de 10 ml (puede variar entre 5-40 ml, según el tipo de cirugía) (**Anitua, 1999**). Por el contrario, para realizar la técnica del doble centrifugado hace falta un volumen sanguíneo mayor (mínimo 50 ml) (**Marx, 1998; Butterfield, 2005**), lo cual era inviable en nuestro estudio sobre conejos.

Para el estudio radiológico, utilizamos un equipo radiológico dental intraoral convencional, con un kilovotaje fijo (60 kVp) y un miliamperaje fijo (7 mA), por lo que para obtener las imágenes solamente podíamos jugar con el tiempo de exposición, que fijamos en 0,05 segundos. **Kim**, en el año **2001**, realizaron un estudio también en conejos, a los cuales les realizaron radiografías, pero en este caso, utilizaban un

kilovoltaje menor incluso que Swennen y col. (35 kVp), pero el tiempo de exposición era más elevado (12 segundos). Otros autores, como es el caso de **Pryor**, en el año **2005**, realizaron un estudio radiológico usando una unidad de radiología intraoral también, pero en este caso usaron un kilovoltaje más alto (70 kVp), un miliamperaje idéntico (7 mA), pero el tiempo de exposición era mayor (0,083 segundos), aunque también es cierto que las radiografías las realizaban a cráneos de ratas, que era el lugar donde realizaban las osteotomías, mientras que en nuestro caso las realizábamos en las tibias de los conejos. **Swennen**, en el año **2005**, realizaron otro estudio radiológico en cabras, usando un kilovoltaje y un miliamperaje menor (40 kV y 1.25 mA).

En la bibliografía internacional, existen estudios relacionados con la aplicación del PRFC en la piel (**Steed, 1995; Margolis, 2001; Escotto, 2001; Martí-Mestre, 2005**), y en mucosa oral (**Pertrungaro, 2001; Huang, 2005; Rozman, 2007**). El dorso lingual lo escogimos por ser una zona de fácil acceso cuando abríamos la boca del animal con un portaagujas y teníamos una buena visibilidad una vez que traccionamos de ella con unas pinzas mosquito. La zona de la piel escogida fue la piel del dorso en la región cervical, para evitar que el animal pudiera rascarse y producirse heridas que alteraran nuestros resultados, además, de evitar que las heridas se contaminaran. Sin embargo, tras la revisión de la literatura, no hemos encontrado trabajos que usen la mucosa del dorso lingual para realizar el estudio del PRFC.

El período de tiempo para el estudio de la cicatrización de heridas de los tejidos blandos usado en nuestro estudio fue de 7 y 28 días, porque son períodos estándar descritos por otros autores para la reepitelización e inflamación de las heridas (**Cotran, 2000**). En el caso del estudio de las heridas producidas en el hueso, este se produjo al mes y a los dos meses, ya que en las primeras cuatro semanas se produce la neoformación ósea cuantitativamente importante, y entre la cuarta y la octava semana se produce la remodelación ósea, aunque la extrapolación de estos datos es discutible, ya que el proceso de regeneración ósea es más rápido en el conejo. Normalmente, en el estudio de heridas provocadas en tejidos blandos, se suelen usar períodos de tiempo que abarcan los 7, 14, 21 y 28 días (**Camacho-Alonso, 2005; Camacho-Alonso, 2007**).

Para medir la reepitelización tuvimos en cuenta los criterios utilizados para el estudio de la cicatrización de heridas en mucosa oral de cerdos por **Sinha y Gallagher**

(2003), mientras que para la medición del grado de resolución del proceso inflamatorio usamos los criterios propuestos por **Cotran** en el año **2000**. Además, estos protocolos, han servido como modelo para otros estudios posteriores sobre la cicatrización en mucosa oral de ratas. (**Camacho-Alonso, 2005; Camacho-Alonso, 2007**).

Hemos observado que el PRFC mejora la reepitelización y acelera la resolución del proceso inflamatorio con respecto al grupo control. En este sentido, **Pierce (1992)** encontró que el PRFC aceleraba el cierre primario de la herida. Recientes estudios sugieren que el PRFC posee potentes efectos angiogénicos (**Anitua, 2006**), lo cual favorece también la cicatrización de los tejidos. En relación al efecto antiinflamatorio, autores como **El-Sharkawy (2007)** han descrito que el PRFC produce el bloqueo de la Proteína Quimiotáctica de Miocitos tipo 1 (MCP-1), liberada por los monocitos, lo que reduce el efecto inflamatorio.

En el tratamiento de la estomatitis aftosa, **Aminabadi (2008)**, ha observado que el PRFC es un buen candidato para la resolución de estas úlceras, por el efecto antiinflamatorio y cicatrizador que poseen los factores de crecimiento, como es el caso del TGF β . En úlceras crónicas cutáneas se ha observado también la capacidad reparadora del PRFC, ya que además de las características previamente comentadas, al elaborar el gel de PRFC, este actúa como una membrana hemostática de gran elasticidad que favorece la curación de los tejidos de alrededor. (**Anitua, 2008**)

En un estudio realizado también en conejos albinos de Nueva Zelanda, **Lee y col. (2008)**, obtuvieron diferencias aunque no estadísticamente significativas al aplicar PRP infiltrada en heridas producidas en piel. Sí pudieron observar que la aplicación del PRP aceleraba la reepitelización y la neogénesis vascular en las heridas.

Debemos destacar que la mejor reepitelización se produjo en aquellas heridas en las que aplicamos el Plasma Rico en Factores de Crecimiento respecto al grupo control, sobre todo a los 28 días, donde sí encontrábamos diferencias significativas. En relación a la inflamación, la aplicación del PRFC acelera la resolución del proceso inflamatorio tanto en mucosa oral como en piel, respecto a las heridas en las que no se aplica. Si tenemos en cuenta la forma de aplicar el PRFC, observamos que no existen diferencias entre aplicar el PRFC en forma de gel y en forma de infiltrado.

Hemos comparado las posibles formas de aplicación del PRFC (gel e infiltrado), y hemos observado que la forma de infiltrado es más efectiva en la reepitelización y resolución de la inflamación, aunque no existen diferencias significativas.

En relación a la aplicación del PRFC en forma de gel, diversos autores, tras su aplicación en heridas, han observado buenos resultados en distintos campos de la medicina. En cardiología, se ha observado que acelera la cicatrización en heridas profundas. **(Centella, 2005)**. En cirugía artroscópica, **Sánchez (2003)**, observó que minimiza los hematomas y signos inflamatorios postquirúrgicos. El tratamiento de úlceras crónicas de origen vascular o las úlceras neuropáticas, ha sido uno de los retos en la medicina actual. Diversos autores **(Steed, 1995; Margolis, 2001; Escotto, 2001; Martí-Mestre, 2005; Anitua, 2008)**, han conseguido estimular la curación de estas úlceras con la aplicación tópica del PRFC en gel, además de conseguir una menor inflamación y menos sintomatología en los pacientes en los que se aplicaba este biomaterial.

El PRFC en forma líquida está siendo ampliamente utilizado en distintos campos de la medicina. En implantología oral, autores como Eduardo Anitua, han conseguido una mejor estabilidad primaria y osteointegración de los implantes tras humedecer la superficie del implante con PRFC **(Anitua, 2005)**. En Oftalmología, ha sido utilizado con éxito en el tratamiento de la xeroftalmia u ojo seco, y como cicatrizante postquirúrgico en las cirugías con láser de CO₂ **(Alio, Pastor, 2007; Alio, Colecha, 2007)**. En la actualidad, en medicina estética, el PRFC se usa en inyecciones subcutáneas para disminuir la profundidad de las arrugas faciales y acelerar la cicatrización. Se usa para disminuir la inflamación postoperatoria, obteniendo muy buenos resultados en cirugía estética **(García-Gimenez, 2005; Hernández, 2005)**.

Se ha observado que en las células tumorales se produce un aumento de formas normales de receptores de los factores de crecimiento que podrían favorecer el crecimiento y la invasión de estas. En una amplia variedad de tumores mesenquimales, como lipomas, hemangiomas, angiosarcoma, etc, se ha observado una sobreexpresión del factor de crecimiento derivado de plaquetas **(Palman, 1992)**. Además, dichas células producen una sobreexpresión de factores de crecimiento, que estimulan la

proliferación de las células estromales (fibroblastos y células endoteliales) necesarias para el crecimiento de tumores sólidos (**Woodburn., 1999**). Otro fenómeno a tener en cuenta es la capacidad de las plaquetas para facilitar el proceso de metástasis de las células tumorales, y además, se ha observado que estas células tumorales facilitan la agregación plaquetaria liberando el VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) que las plaquetas necesitan para su invasión celular.

A algunos factores de crecimiento incluidos en el PDGF se les han asignado capacidades antiapoptóticas, como el IGF (Factor de crecimiento similar a la insulina) o el VEGF (Factor de crecimiento vascular endotelial) (**Katoh, 1995; Pollak, 2000**). Otros factores como el PDGF o factor de crecimiento derivado de plaquetas, estimula la activación de una proteína quinasa C, que está implicada en la progresión del ciclo celular en el paso G₂/M (**Caelles y Muñoz, 1999**).

Por tanto y aunque no hay evidencias científicas que relacionen la aplicación terapéutica del PRFC o factores de crecimiento con la transformación carcinomatosa de tejidos normales o displásicos, sí que se aconseja evitar su utilización en tejidos con condiciones precancerosas y en la proximidad de lesiones precancerosas (**Martínez, 2002**).

El estudio de los efectos del PRFC en el hueso, lo realizamos transcurrido 1 mes y 2 meses tras la cirugía, para poder obtener una idea de la biología de la regeneración ósea. Estos períodos de estudio fueron utilizados con anterioridad por otros autores (**Kim, 2001; Aghaloo, 2002; Pryor, 2005; Gerard, 2006**) ya que es el período en el que se comienza a formar el nuevo hueso inmaduro y se va produciendo la osificación endocondral hasta formar el hueso maduro (**Garces, 1993**), además, el recambio óseo en los conejos albinos de Nueva Zelanda es mucho mayor, además de poseer una gran capacidad osteoformadora (**Sommerfeldt, 2001**), por lo que el remodelado óseo del injerto óseo autólogo ocurre entre las primeras 6 y 8 semanas postcirugía (**Roberts, 1984; Bogoch, 1993; Watanabe, 1999**). **Gerard y col.**, en el **2006** observaron que el PRP aumentaba la formación de hueso y la remodelación en el primer y segundo mes, mientras que este beneficio disminuía a los 3 y 6 meses. Estos efectos tempranos están causados por dos procesos diferentes: a) el PRP incrementa la formación de nuevo hueso probablemente por el incremento del número de osteoblastos que eran activos en

el lugar del injerto y b) la cantidad del injerto de hueso no viable que fue eliminado del lugar del injerto incrementaba, posiblemente por el aumento del número de osteoclastos activados en el lugar del injerto.

Hemos utilizado las tibias de los animales y no el fémur, porque el acceso quirúrgico a las tibias es más fácil, se produce un menor trauma al animal, evitamos grandes pérdidas sanguíneas, la localización es más sencilla, producimos un menor daño tisular a músculos o tendones y las tensiones que deben soportar las tibias son menores a las que deberían soportar ambos fémur.

Otra de las principales ventajas del PRFC es que nos permite compactar el injerto, creando una masa que permite su resistencia a los movimientos durante el cierre del colgajo sobre el injerto durante la cirugía. Además, actúa como adhesivo biológico y disminuye la hemorragia en la zona del defecto óseo quirúrgico (**Freimiller y Aghaloo, 2004**).

Nosotros usamos un injerto de hueso autólogo del propio animal y así evitar incorporar un cuerpo extraño, que aunque biocompatible, pudiera interferir en los resultados. Este hueso autólogo lo obteníamos al realizar las osteotomías en ambas tibias.

Con respecto al estudio radiológico de la regeneración ósea en las tibias de los animales, hemos observado que se produce una mejor regeneración en los defectos rellenados con PRFC sólo o mezclado con hueso autólogo, tanto al mes como a los dos meses de realizar la cirugía, encontrando diferencias significativas solamente comparando el PRFC sólo y el grupo control, en los dos periodos de tiempo utilizados en el estudio. Cuando comparábamos los defectos rellenados con PRFC y autoinjerto o con autoinjerto exclusivamente, no observamos diferencias significativas ni al mes, ni a los dos meses de realizar la cirugía. Estos resultados contrastan con otros estudios realizados con anterioridad.

Un estudio realizado por **Kim (2001)** en conejos albinos de Nueva Zelanda, observó que tras un período de tiempo de 1 mes y dos meses, los defectos óseos que realizaban en el cráneo de los animales, que rellenaban con injerto de hueso bovino

mezclado con el PRP, radiológicamente, presentaban una mayor densidad ósea que los defectos que rellenaban solamente con el injerto de hueso bovino, además, con diferencias significativas. Nuestros resultados son similares a los obtenidos por **Kim (2001)** ya que, aunque también conseguimos una mayor densidad ósea en los defectos rellenados con el injerto de hueso autólogo y el PRFC frente a los rellenados con hueso autólogo sólo, sin embargo no encontramos diferencias estadísticamente significativas.

En el año **2002**, **Aghaloo** realizó un estudio piloto en el que realizaban cuatro osteotomías con trefinas en el cráneo de 15 conejos blancos de Nueva Zelanda, los cuales rellenaban con PRP, PRP + injerto óseo, injerto óseo sólo, y un defecto usado como control. Estos autores encontraron que al comparar los defectos control o rellenados con PRP sólo, no existían diferencias significativas ni al mes, ni a los dos meses. Cuando compararon los defectos rellenados con autoinjerto mezclado con PRP o autoinjerto sólo, tampoco encontraron diferencias significativas ni al mes ni a los dos meses, lo cual coincide con nuestros resultados.

El grupo de trabajo de **Wiltfang (2004)**, realizaron un estudio en minipig, a los cuales realizaban defectos en la zona frontal del cráneo y les colocaban PRP mezclado con hueso autólogo, gránulos de fosfato tricálcico, gránulos de hueso bovino esponjoso (BioOss[®]), esponjas de colágeno inductoras de hueso bovino. Les realizaron radiografías y observaron que a las dos semanas, el grupo tratado con PRP y hueso autólogo presentaba diferencias significativas en la remineralización comparado con el grupo tratado con hueso autólogo exclusivamente. A las 4 semanas, no observaron diferencias significativas entre la aplicación de hueso autólogo o hueso autólogo mezclado con PRP.

Raghoobar (2005) realizó elevaciones de seno en humanos usando injertos de hueso autólogo y PRP, y observaron que no existían diferencias estadísticamente significativas en la radiología, entre las zonas en las que se había aplicado PRP o hueso autólogo sólo. En un trabajo realizado en ovejas adultas por **Swennen (2005)**, en las que realizó distracciones óseas, concluyó que no existían diferencias estadísticamente significativas entre la aplicación o no de PRP con hueso autólogo en los procesos de distracción. **Pryor (2005)**, realizaba osteotomías en el cráneo de 32 ratas Sprague-Dawley, y rellenaba los defectos con PRP mezclado con esponjas de colágeno

reabsorbible o con estas esponjas solamente. Observó que las 4 y las 8 semanas de realizar la cirugía, radiológicamente no existían diferencias significativas estadísticamente en cuanto a la aplicación o no del PRP en la regeneración ósea.

El grupo de estudio de **Gerard (2006)** realizó defectos en el cuerpo mandibular de perros Beagle, y rellenaron la mitad con injertos autólogos de hueso sólo y la otra mitad el hueso autólogo mezclado con PRP. Realizaron radiografías y observaron que al mes, la zona de injerto sólo tenía una mayor densidad radiológica que la zona del injerto mezclado con PRP y, además, con diferencias estadísticamente significativas. En cambio a los dos meses, aunque la zona de injerto sólo seguía siendo más densa, estas diferencias no eran estadísticamente significativas. Este estudio se continuó hasta los 3 y los 6 meses, periodo en el cual no existían diferencias entre los grupos.

La histomorfometría corresponde al análisis histológico de los diferentes elementos que integran el tejido óseo, es decir, células y sustancia intercelular (**Serrano, 1990**). Los fundamentos de la histomorfometría ósea se basan en el hecho que el hueso vivo normal está sometido a una serie de procesos dinámicos como crecimiento, modelado, remodelación y reparación; y se usa para obtener una estimación del volumen proporcional y de superficie ocupada por diferentes componentes óseos (**Revell, 1983**). El estudio histomorfométrico de las muestras permite conocer con detalle la regeneración ósea de los diferentes grupos. En estudios de regeneración ósea, ya sea usando el PRFC o sin él, es una técnica muy usada. (**Kim, 2001; Aghaloo, 2002; Pryor, 2005; Butterfield, 2005; Mooren, 2007; You, 2007; Lioubavina-Hack, 2008**)

Los elementos que integran el hueso pueden cuantificarse mediante histomorfometría ósea. El estudio de histomorfometría estática se compone de la cuantificación de numerosos parámetros tales como volumen, superficies con osteoide, con erosión activa e inactiva, número de células activas, etc. La histomorfometría dinámica comprende el estudio de la mineralización en un período de tiempo predeterminado, dicho estudio se realiza mediante la utilización de marcadores fluorescentes que se depositan en los frentes de mineralización.

Nuestros resultados en relación a la histomorfometría nos sugieren que la aplicación del PRFC sólo o mezclado con hueso autólogo aunque sí parece aumentar la formación de hueso en los defectos en los que se aplica, ésta diferencia no es significativa en relación al aplicar hueso autólogo sólo o no aplicar nada. Transcurridos dos meses de la cirugía la aplicación de hueso autólogo triturado en el defecto quirúrgico producía una mayor cantidad de hueso neoformado respecto a su utilización mezclado con el PRFC, sin diferencias estadísticamente significativas.

Existen numerosos estudios de regeneración ósea que utilizan, como nosotros, el PRFC o el PRP junto con hueso autólogo o con sustitutos de hueso. En el año **2001**, **Kim**, realizó un estudio en conejos albinos de Nueva Zelanda. Tras realizarle osteotomía craneales con una trefina, los rellenaba con una mezcla de concentrado de plaquetas y Bio-Oss[®] o Bio-Oss[®] sólo. Cuatro y ocho semanas después de la cirugía realizaron la histomorfometría y obtuvieron que aunque el área mineralizada en la zona rellenada con Bio-Oss[®] y PRP era mayor, al mes y a los dos meses, pero esta diferencia no era estadísticamente significativa.

Un año después (**Aghaloo, 2002**) se realizó otro estudio también en conejos, en los que tras realizar cuatro defectos óseos en el cráneo se rellenaban con PRP sólo, PRP más hueso autólogo, hueso autólogo sólo, o vacíos. Este grupo realizó el estudio al mes, a los dos y a los cuatro meses. Al realizar la histomorfometría, observaron que en las zonas en las que dejaron vacías, la densidad de hueso era mayor con respecto a las que se aplicaba el PRP pero sin diferencias significativas en los tres períodos de estudio. Cuando compararon los defectos rellenados con PRP + hueso y hueso sólo, observaron que en los primeros existía una mayor densidad ósea pero sin diferencias significativas en los tres períodos del estudio.

Jensen (2004) realizó un estudio en este caso en perros Beagle, colocando unos implantes junto al PRP o aloinjerto de hueso sólo o mezclado. Transcurridas tres semanas desde la cirugía observó que no existía una influencia en la formación de hueso entre los grupos en los que se aplicaba el PRP. Sí observaron que la aplicación del aloinjerto incrementaba significativamente la formación ósea tanto sólo como mezclado con el PRP.

En el año 2005, se realizaron varios estudios en los que se aplicaba el PRP sólo o mezclado con distintos sustitutos óseos, **Pryor (2005)** en un estudio en ratas Sprague-Dawley mezclaba esponjas de colágeno reabsorbibles con o sin PRP y las colocaba en defectos óseos en el cráneo de los animales. Observó que no existían diferencias significativas en la formación de hueso entre los distintos grupos. Similares resultados obtuvo **Butterfield (2005)**, que realizó un estudio en conejos albinos de Nueva Zelanda, a los que les realizaban elevaciones del seno maxilar, tras lo que lo rellenaban con hueso autólogo solamente o hueso autólogo mezclado con PRP. Tras un período que iba desde las 2 hasta las 4 y 8 semanas, realizó un estudio histomorfométrico en el que no encontró diferencias significativas entre la aplicación o no del PRP, respecto al porcentaje de hueso neoformado.

Klongnoi (2006) realizó un estudio en el que empleó hueso autólogo y Algipore® (fluorhidroxiapatita), mezclado o no con PRP en elevaciones de seno en minicerdos. Tras el seguimiento de 1, 2, 8 y 12 meses, obtuvieron que no existían diferencias significativas entre la utilización del PRP o no en la neoformación ósea. **Gerard (2006)** observó que no existía una mayor formación ósea con la aplicación del PRP, sino al contrario, incluso se formaba una menor cantidad de hueso en los defectos en los que se aplicaba el PRP, además, en algunos casos con diferencias significativas.

En estudios más recientes, **Mooren (2007)** no encontró diferencias significativas entre la aplicación del PRP o no en la regeneración ósea. **You (2007)** utilizó el PRP con BioOss® mezclado o BioOss® exclusivamente, para rellenar el alveolo donde colocaba los implantes, y observó transcurridos 4 meses, que obtenía mejores resultados en relación al contacto del injerto con el hueso neoformado en los casos en los que no se usaba el PRP y además, con diferencias significativas.

En la actualidad, uno de los últimos estudios que usan el PRP, en este caso en regeneración tisular guiada, con el Bio-Oss® como material de injerto (**Lioubavina-Hack, 2008**), pero no obtienen diferencias significativas entre la aplicación o no del PRP en la formación de hueso.

Respecto a nuestros resultados, debemos tomar precauciones por el bajo número de muestras obtenidas, sí podemos decir, que histomorfométricamente la aplicación del PRFC no favorece la regeneración ósea, al igual que ocurre en otros estudios realizados anteriormente.

No hay que olvidar que este estudio está realizado en animales de experimentación. Podemos decir que los resultados obtenidos son esperanzadores en la aplicación en piel y mucosas, aunque es necesario realizar estudios clínicos y experimentales más amplios, mientras que en la aplicación del plasma rico en factores de crecimiento en el hueso, coincidimos con otros autores en que no influye la aplicación de este producto en la mayor formación de hueso.

VI. CONCLUSIONES

1. El plasma rico en factores de crecimiento (PRFC) aceleró la reepitelización y resolución del proceso inflamatorio a los 7 y 28 días en las heridas del dorso lingual respecto al grupo control, con diferencias estadísticamente significativas a los 28 días, sin observar diferencias significativas entre la aplicación del PRFC en forma de gel o infiltrado.
2. En las heridas provocadas en la piel el PRFC aceleró la reepitelización y resolución del proceso inflamatorio a los 7 y 28 días de realizar la cirugía, con diferencias significativas a los 7 días, respecto al grupo control; y sin observar diferencias significativas entre la aplicación del PRFC en forma de gel o infiltrado.
3. Radiológicamente, observamos diferencias significativas en la aplicación del PRFC en el hueso al mes y a los dos meses de la cirugía respecto al grupo control. La aplicación del hueso autólogo con o sin el PRFC, no mostró diferencias significativas en ningún periodo de tiempo estudiado.
4. Respecto a la regeneración ósea, histomorfométricamente, no observamos diferencias significativas respecto a la aplicación del plasma en relación al grupo control en ninguno de los periodos de tiempo estudiados, ni en la aplicación de hueso autólogo con o sin el PRFC.

Por lo tanto, la aplicación del PRFC en conejos albinos de Nueva Zelanda, mejoró la reepitelización y disminuyó la inflamación a los 7 y 28 días de provocar las heridas en mucosa del dorso lingual y piel, mientras que su aplicación en el hueso no mostraba diferencias significativas.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- **Acosta-Feria M, Infante-Cossío P, Hernández-Guisado JM, Torres-Carranza E, García-Perla A, et al.** Obliteración del seno frontal mediante injerto de tibia y plasma rico en plaquetas para el tratamiento de la osteomielitis crónica. *Neurocirugía* 2006;17:351-356.
- **Adriaens PA.** Preservation of bony sites. En: Lang NP, Karring T, Lindhe J (eds). *Proceeding of the 3rd European workshop on periodontology. Implant dentistry.* Berlin: Quintessence, 1999:266-280.
- **Aghaloo TL, Moy PK, Freymiller EG.** Investigation of Platelet-rich plasma in rabbit cranial defects: a pilot study. *J Oral Maxillofac Surg* 2002;60:1176-1181.
- **Alexander A.** Técnica quirúrgica en animales. 3^a ed. México: Interamericana; 1974; p, 23-29
- **Alio JL, Colecha JR, Pastor S, Rodríguez A, Artola A.** Symptomatic dry eye treatment with autologous platelet-rich plasma. *Ophthalmic Res* 2007;39:124-129.
- **Alio JL, Pastor S, Ruiz Colecha J, Rodríguez A, Artola A.** treatment of ocular surface syndrome after LASIK with autologous platelet-rich plasma. *J Refract Surg* 2007;23:617-619.
- **Aminabi N.** Plasma rich in growth factors as a potential therapeutic candidate for treatment of recurrent aphthous stomatitis. *Medical Hypotheses* 2008;70:529-531.
- **Anitua E, Aguirre JJ, Algorta J, Ayerdi E, Cabezas AI, et al.** Effectiveness of autologous preparation rich in growth factors for the treatment of chronic cutaneous ulcers. *J Biomed Mater Res B Appl Biomat.* 2008;84B:415-521.
- **Anitua E, Andía I, Sanchez M, Azofra J, Zalduendo M, et al.** Autologous preparations in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in cultura. *J Orthop Res* 2005;123;281-286.
- **Anitua E, Sánchez M, Nurden AT, Nurden P, Orive G, et al.** New insights into and novel applications for platelet rich fibrin therapies. *Trends in Biotech* 2006;24;227-234.
- **Anitua E, Sanchez M, Nurden AT, Zalduendo M, de la Fuente M et al.** Autologous fibrin matrices: a potencial source of biological mediators that modulate tendon cell activities. *J Biomed Mater Res* 2006;77A;285-293.

- **Anitua E, Sanchez M, Nurden AT, Zalduendo M, de la Fuente M et al.** Reciprocal actions of platelet-secreted TGF- β 1 on the production of VEGF and HGF by human tendon cells. *Plast Reconstr Surg* 2007;119:950-959.
- **Anitua E, Sánchez M, Orive G, Andía I.** The potencial impact of the preparation rich in growth factors (PRGF) in different medical fields. *Biomaterials* 2007; 28: 4551-4560.
- **Anitua E.** La utilización de los factores de crecimiento plasmáticos en cirugía oral, maxilofacial y periodoncia (PRGF). *RCOE* 2001;6:305-315.
- **Anitua E.** Plasma-rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *J Oral Maxillofac Imp* 1999;14:529-535.
- **Anitua E.** Un nuevo enfoque en la regeneración ósea. Plasma rico en factores de crecimiento (PRGF). Puesta al Día publicaciones, SL. Vitoria, 2000.
- **Anitua EMP.** The use of plasma rich growth factors (PRGF) in oral surgery. *Prad Proced Aesthet Dent* 2001;13:487-493.
- **Arpornmaeklong P, Kochel M, Depprich R, Kubler NR, Wurzler KK.** Influence of platelet-rich plasma (PRP) on osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells. An in vitro study. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004;33:60-70.
- **Arriaza R, Fernández JC, Aizpurua J, Couceiro G.** Resultados del tratameitno de retardos de consolidación en huesos largos con ondas de choque extracorpóreas y plasma rico en factores de crecimiento. *Acta Ortoped Gallega* 2005:1:41-44.
- **Aspenberg P, Lohmander LS, Thorngren KG.** Failure of bone induction by bone matrix in adult monkeys. *J Bone Joint Surg* 1988;70:625-627.
- **Banks RE, Forbes MA, Kinsey SE, Stanley A, Ingham E, Walters C, Selby PJ.** Release of the angiogenic cytokine vascular endothelial growth factor (VEGF) from platelet: significance for VEGF measurement and cancer biology. *Br J Cancer* 1998;77:956-964.
- **Barnes G, Kostenuik P, Gerstenfeld L, Einhorn TA.** Growth factor regulation of fracture repair. *J Bone Min Res* 1999;14:1805-1815.
- **Bielecki TM, Gazdzik TS, Arendt J, Szczepanski T, Krol W, Wielkoszynski T.** Antibacterial effect of autologous platelet gel enriched with growth factors and other active substances. *J Bone Joint Surg* 2007;89:417-420.
- **B.O.E. nº 268, 8 de noviembre de 2007.** pp. 45914-45920.

- **Bogoch E, Gschwend N, Rahn B, Moran E, Perren S.** Healing of cancellous bone osteotomy in rabbits- Part I. Regulation of bone volume and the regional acceleratory phenomenon in normal bone. *J Orthop Res* 1993;11:285-291.
- **Bolufer P.** Factor de crecimiento epidérmico y su papel en el desarrollo tumoral. *Oncología* 1988;11:1-7.
- **Bostrom MPG, Yang X, Koutras I.** Biologics in bone healing. *Curr Op Orthp* 2000;11:403-412.
- **Bourchardt H.** The biology of bone graft repair. *Clin Orthop* 1983;174:28-33.
- **Bowler PG, Duerden BI, Armstrong DG.** Wound microbiology and a associated approaches to wound management. *Clinical Microbiology Reviews* 2001;14:244-269.
- **Butterfield KJ, Bennett J, Gronowicz G, Adams D.** Effect of platelet-rich plasma with autogenous bone grafts for maxillary sinus augmentation in a rabbit model. *J Oral Maxillofac Surg* 2005; 63: 370-376.
- **Caelles C, Muñoz A.** Oncogenes nucleares. *Rev Cancer* 1999;13:27-40.
- **Camacho Alonso F, López Jornet P, Bermejo Fenoll A.** Effects of scalpel (with and without tissue adhesive) and cryosurgery on wound healing in rat tongues. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005;100:E58-63.
- **Camacho Alonso F, López Jornet P.** Clincial-pathological study of the healing of wounds provoked on the dorso-lingual mucosa in 186 albino rats. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2007;136:119-124.
- **Carew JF, Ward RF, LaBruna A, Torzilli PA, Schley WS.** Effects of scalpel, electrosurgery, and CO₂ and KTP lasers on wound healing in rats tongues. *Laryngoscope* 1998; 108:373-380.
- **Carlson NE, Roach RB.** Platelet Rich Plasma. Clinical applications in dentistry. *JADA* 2002;133:1383-1386.
- **Castillo F.** Evaluación del potencial osteogénico de los polímeros bioabsorbibles derivados del ácido láctico utilizados como sustitutivos óseos. Estudio experimental en conejos. **PhD Thesis** 2001. Universidad de Barcelona.
- **Centella T, Oliva E, García JC, Huélamo T, Lamas MJ, Maseda R, Epeldegui A.** Tratamiento de las heridas infectadas tras cirugía cardíaca con la utilización de plasma rico en factores de crecimiento. Resultados preliminares. *Anales de Cirugía Cardíaca y Vasculat* 2005;11:208-213.

- **Chao JCJ, Liu KY, Chen SH, Fang CL, Tsao CW.** Effect of oral epidermal growth factor on mucosal healing in rats with duodenal ulcer. *World J Gastroenterol* 2003; 9:2261-2265.
- **Cherry GW, Hughes M.** Increased healing of the disrupted wound-A myth or simply enhanced angiogenesis following wounding? Personal discussions with Tom Hunt from the 1960s to the present. *Wound Repair and Regeneration* 2003; 11:401-404.
- **Childs CB, Proper JA, Tucker RF, Moses HL.** Serum contains a platelet-derived transforming growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79:5312-6
- **Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, Girard MO, Schoeffler C, Dohan SL, et al.** Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part V: Histologic evaluation of PRF effects on bone allograft maturation in sinus lift. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;101:299-303
- **Clarke BL, Ebeling PR, Jones JD, Wahner HW, O'Fallon WM, Riggs L et al.** Changes in quantitative bone histomorphometry in aging healthy men. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:2264-2270.
- **Clemmons RM, Bliss EL, Dorsey Lee MR, Seachord CL, Meyers KM.** Platelet function, size and yield in whole blood and in platelet-rich plasma prepared using differing centrifugation force and time in domestic and food-producing animals. *Thromb Haemost* 1983;50:838-843.
- **Cohen IK, Diegelmann RF, Crossland MC.** Wound care and wound healing. In: Schwartz SI, editor. *Principles of Surgery* (6th ed). New York: McGraw-Hill; 1994.
- **Colhaun TR, Kitten CM.** Polypropylene suture- is it safe?. *Journal of Vascular Surgery Online* 1986; 4:1-5.
- **Cotran RS, Kumar V, Collins T.** Reparación de los tejidos: regeneración celular y fibrosis. En: Robbins, editor. *Patología estructural y funcional* (6a edición). Madrid: McGraw-Hill Interamericana; 2000.p.112-7.
- **Coulombe PA.** Wound Epithelation: accelerating the pace of discovery. *Dermatology Foundation* 2003;37:219-30.
- **Davies JE, Hosseini MM.** Histodynamics of endosseous wound healing. En: Davies JE (ed). *Bone engineering*. Toronto: Em squared, 2000; 1-14.

- **De Obarrio LL, Aruz Dutari JL, Chamberlain TM, Croston A.** The use of autologous growth factors in periodontal ligament and osteoblastic cells in vitro. *J Periodontol* 2003;74:858-864.
- **Díaz JB, De la Piedra C.** Reguladores hormonales sistémicos y marcadores bioquímicos del remodelado óseo. En: Cannata JB (ed). *Actualizaciones en metabolismo óseo*. Madrid: Jarpyo, 1992:41-46.
- **DiGiovanni J, Bol DK, Wilker E, Beltran L, Carvajal S, Motas S et al.** Constitutive expression of insulin-like growth factor-1 in epidermal basal cells of transgenic mice leads to spontaneous tumor promotion. *J Cancer Res* 2000;60:1561-1570.
- **Directiva 98/81/CEE de 26 de octubre de 1997.**
- **D.O.C.E. 5 de diciembre de 1998.**
- **Dugrillon A, Eichler H, Kern S, Kluter H.** Autologous concentrated platelet rich plasma for local application in boen regeneration. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2002;31:615-619
- **Duncan RL, Turner CH.** Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain. *Calcif Tissue Int* 1995;57:344-358.
- **El-Sharkawy H, Kantarci A, Deady J, Hasturk H, Liu H, Alshahat M, et al.** Platelet rich plasma: growth factors and pro and anti-inflammatory properties. *J Periodontology* 2007;78:661-669.
- **Eriksern EF, Axelrod DW, Melsen F (eds).** *Bone histomorphometry*. New Cork: Raven Press. 1994.
- **Escotto I, Rodríguez JM, Padilla L, Rodríguez N.** Factores de crecimiento en el tratamiento de úlceras en pacientes diabéticos. *Rev Mex Angiol* 2001;29:75-82.
- **Esnaola MM.** Diagnóstico y tratamiento de las coagulopatías, 1998. www.neurología.rediris.es/congreso-1/conferencia/vascular-2.htm.
- **Eun-Seok K, Eun-Jin P, Pill-Hoon C.** Platelet concentration and its effect on bone formation in calvarial defects: An experimental study in rabbits. *J Prosthet Dent* 2001;86:428-433.
- **Everts PAM, Devilee RJJ, Brown Mahoney C, Eeftinck-Schattenkerk M, Box HAM, Knape JTA, van Zundert A.** Platelet gel and fibrin sealant reduce allogeneic blood transfusions in total knee arthroplasty. *Acta Anaesthesiol Scand* 2006;50:593-599.

- **Farrag TY, Lehar M, Verhaegen P, Carson KA, Byme PJ.** Effect of platelet rich plasma and fibrin sealant on facial nerve regeneration in a rat model. *Laryngoscope.* 2007;117:157-165
- **Fennis JPM, Stoelinga PJ, Jansen JA.** Mandibular reconstruction: a histological and histomorphometric study on the use of autogenous scaffolds, particulate cortico-cancellous bone grafts and platelet rich plasma in goats. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004;33:48-55.
- **Fernández-Tresguerres-Hernandez Gil I, Alobera Gracia JM, del Canto Pingarrón M, Blanco Jerez L.** Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2006;11:E47-51.
- **Frank JD, Ryan M, Kalscheur VL, Ruaux-Mason CP, Hozak RR, Muir P.** Aging and accumulation of microdamage in canine model. *Bone* 2002;30:201-206.
- **Freymiller EG, Aghaloo TL.** Platelet-Rich Plasma: Ready or not? *J Oral Maxillofac Surg* 2004;62:484-488.
- **Fuerst G, Reinhard G, Tangl S, Mittlbock M, Sanroman F, Watzek G.** Effects of platelet-released growth factors and collagen type I on osseous regeneration of mandibular defects. A pilot study in minipigs. *J Clin Periodontol* 2004; 31: 784-790.
- **Fürts G, Gruber R, Tangl S, Zechner W, Haas R, Mailath G, et al.** Sinus grafting with autogenous platelet-rich plasma and bovine hydroxyapatite. A histomorphometric study in minipigs. *Clin Oral Impl Res* 2003;14:500-508.
- **Garces CL.** Fisiopatología del callo de fractura. En: De Pedro JA, Perez AJ. *Fractura.* Buenos Aires: Panamericana, 1999:3-12.
- **García-Gimenez J, González JA.** Tratamiento del envejecimiento cutáneo mediante estimulación con factores de crecimiento autógenos. Parte I y II. *Int J Cosmetic Surg Med.* 2005;7;8-17.
- **Garg AK.** The use of platelet rich plasma to enhance the success of bone grafts around dental implants. *Dent Impl Update* 2000;11:17-20.
- **Garthick JA, Taichman LB,** Fate of human keratinocytes during reepithelization in an organotypic cultur model. *Lab Invest* 1994; 70:916-24.

- **Gemmell CH, Park JY.** Inicial blood interactions with endosseous implant materials. En: Davies JE (ed). Bone engineering. Toronto: em square, 2000:108-117.
- **Gerard D, Carlson ER, Gotcher JE, Jacobs M.** Effects of platelet-rich plasma on the healing of autologous bone grafted mandibular defects in dogs. J Oral Maxillofac Surg 2006;64:443-451.
- **Giannobile WV.** Periodontal tissue engineering by growth factors. Bone 1996;19:23S-37S.
- **Gibble J, Ness P.** Fibrin glue: the perfect operative sealant? Transfusion 1990;30:741-747.
- **Glowacki J.** Angiogenesis in fracture repair. Clin Orthop Rel Res 1998;35:82-89.
- **Gonzalez J, Serrano S, Nolla JM, Carbonell J, Cannata JB, Torres A et al.** Enfermedades óseas. En Farrera P, Rozman C (eds). Medicina interna. Madrid: Harcourt Brace, 13ª ed 1995:1064-1090.
- **Gotcher JE, Gerard DA.** Fracture repair in the facial skeleton. Oral Maxillofac Surg Clin North Am 1998;10:519-530.
- **Gruber R, Varga F, Fischer MB, Watzek G.** Platelet stimulate proliferation of bone cells: involvement of platelet-derived growth factor, microparticles and membranes. Clin Oral Implants Res 2002;13:529-535.
- **Hernández I, Rozan G, Dávila M.** Reingeniería de tejidos. Plasma rico en plaquetas como inductor de reparación en la paniculopatía edematofibroesclerótica. Int J Cosmetic Surg Med 2005;7:18-24.
- **Hernández-Alfaro F, Pages CM, Garcia E, Corchero G, Arranz C.** Patalat core graft for alveolar reconstruction: a new donor site. Int J Oral Maxillofac Implants. 2005;20:777-783.
- **Hollinger JO, Buck DC, Bruder SP.** Biology of bone healing:its impact on clinical therapy. En Lynch SE, Genco RJ, Marx RE (eds). Tissue engineering. Aplicaciones in maxillofacial surgery and periodontics. Illinois:Quintessence, 1999:17-53.
- **Hollinger JO, Winn SR, Hu Y, Sipe R, Buck DC, Xi G.** Assembling a bone regeneration therapy. En: Davies JE (ed). Bone engineering. Toronto; em squared, 2000:435-440.
<http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/MoreAbout/bonedynamics.html>.

- **Huang LH, Neiva RE, Soehren SE, Giannobile WV, Wang HL.** The effect of Platelet rich plasma on the coronally advanced flap root coverage procedure: a pilot human study. *J Periodontol* 2005;76:1768-1777.
- **Jain NC.** Essentials of veterinary haematology. 1st ed. Philadelphia (PA):Lea & Febiger; 1993. p.105-132.
- **Jakse N, Tangl S, Gilli R, Berghold A, Lorenzoni M, Eskici A, et al.** Influence of PRP on autogenous sinus grafts. An experimental study on sheep. *Clin Oral Impl Res* 2003;14:578-583.
- **Kania RE, Meunier A, Hamadouche M, Sedel L, Petite H.** Addition of fibrin sealant to ceramic promotes bone repair: long-term study in rabbit femoral defect model. *J Biomed Mater Res* 1998;43:38-45.
- **Kannus P, Natri A.** Etiology and pathophysiology of tendon ruptures in sports. *Scan J Med Sci Sports* 1997;7:107-112.
- **Katoh O, Tauchi H, Kawaishii K, Kimura A, Satow Y.** Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor gene, KDR, in hematopoietic cells and inhibitory effect of VEGF on apoptotic cell death caused by ionizing radiation. *Cancer Res* 1995;55:5687-5692.
- **Kawase T, Okuda K, Wolff LF, Yoshie H.** Platelet rich plasma derived clot formation stimulates collagen synthesis in periodontal ligament and osteoblastic cells in vitro. *J Periodontol* 2003;74:858-864.
- **Knighton DR, Hunt TK, Thakral KK, Goodson WH.** Role of platelet and fibrin in the healing sequence: an in vivo study of angiogenesis and collagen synthesis. *Ann Surg* 1982;196:379-388.
- **Lakey LA, Akella R, Ranieri JP.** Angiogenesis: implications for tissue repair. En: Davies JE (ed). *Bone engineering*. Toronto: em squared, 2000; p.137-142.
- **Lanndesberg R, Roy M, Gilckman R.** Quantification of growth factors levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. *J Oral Maxillofac Surg.* 2000; 58:297-300.
- **Lax A.** Respuesta ósea al implante de espuma de hidroxiapatita: estudio experimental en conejos. **PhD Thesis** 2004. Universidad de Murcia.
- **Lee HW, Reddy MS, Geurs N, Palcanis KG, Lemons JE, Rahemtulla FG et al.** Efficacy of Platelet-Rich Plasma on wound healing in rabbits. *J Periodontol* 2008;79:691-696.

- **Lekovic V, Camargo PM, Weinlaender M, Vasilic N, Kenney EB.** Comparison of platelet rich plasma, bovinous porous bone mineral and guided tissue regeneration versus platelet rich plasma and bovine porous bone mineral in the treatment of intrabony defects: a reentry study. *J Periodontol* 2002; 73:198-205.
- **Ley 5/1995, de 21 de junio,** por la cual se regula la protección de los animales utilizados para la experimentación y otras finalidades científicas. Boletín Oficial del Estado, 10 de agosto de 1995.
- **Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA.** The role of growth factors in the repair of the bone. Biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg Am* 2002;84:1032-1044.
- **López-Oliva Muñoz F, Vicario Espinosa C, Almoguera Villacañas JR.** Platelet-rich plasma. A comparative análisis of four comercial presentations. *Patología del Aparato Locomotor* 2003;1:59-66.
- **Luginbuehl V, Meinel L, Merkle HP, Gander B.** Localized delivery of growth factors for bone repair. *Eur J Pharm Biopharm* 2004;58:197-208.
- **Luo JC, Shin VY, Liu ESL, So WHL, Ye YN, Chang FY, Cho CH.** Non-Ulcerogenic dose of dexamethasone delays gastric ulcer healing in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 307:692-698.
- **Mancuso, Bennion, Hull.** Platelet rich plasma: a preliminary report in routine impacted third molar surgery and the prevention of alveolar osteitis. *J Oral Maxillofac Surg* 2003; 61:36.
- **Manolagas SC, Jilka BL.** Bone marrow, cytokines and bone remodeling. *New Engl J Med* 1995;332:305-311.
- **Margolis DJ, Kantor J, Santanna J, Strom BL, Berlin JA.** Effectiveness of platelet releasate for the treatment of diabetic neuropathic foot ulcers. *Diabetes Care* 2001;24:483-488.
- **Mármol F.** Consideraciones éticas y legales sobre la utilización de animales con fines experimentales. *Med Clin* 2004; 123:385-388.
- **Martí-Mestre FX, Acosta-Gómez M, Bonell-Pascual A, Linarez-Ruiz P, Romera A, Iñiguez-Navas C, Lapiedra-Mur, O.** Resultados preliminares de la aplicación de factores de crecimiento en el tratamiento de las úlceras vasculares. *Angiología* 2005;57:335-343.

- **Martín D.** Activación oncogénica de receptores tirosina quinasa. *Rev Cancer* 1995;9:202-18.
- **Martin RB.** Toward a unifying theory of bone remodeling. *Bone* 2000;26:1-6.
- **Martínez JM, Cano J, Gonzalo JC, Campo J, Esparza GC, Seoane JM.** ¿Existen riesgos al utilizar los concentrados de Plasma Rico en Plaquetas (PRP) de uso ambulatorio? *Med Oral* 2002;7:375-390.
- **Martínez-Valverde AM, Lorenzo M.** Transducción de señales mitogénicas y de diferenciación celular. *Rev Cancer* 1999;13:100-109.
- **Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR.** Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998; 85: 638-646.
- **Marx RE.** Platelet rich plasma: a source of multiple autologous growth factors for bone grafts. En: Lynch SE, Genco RJ, Marx RE (eds). *Tissue engineering. Applications in maxillofacial surgery and periodontics.* Illinois: Quintessence, 1999;71-82.
- **Mazoch JB, Schow SR, Triplett RG.** Proximal tibia bone harvest: review of technique, complications, and use in maxillofacial surgery. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2004;19:586-593.
- **Millbourn D, Israelsson LA.** Wound complications and stitch length. *Hernia* 2004; 8:39-41.
- **Minkin C, Marinho VC.** Role of the osteoclast at the bone implant interface. *Adv Dent Res* 1999;13:49-56.
- **Misch CE, Sotereanos G, Dietsch F.** Injertos de hueso autógeno par implantes endoóseos: indicaciones, éxitos y fracasos. En: Misch CE, ed. *Implantología Contemporánea.* Madrid: Mosby/Doyma, 1995.
- **Mitruka BM.** Reference values in experimental animals and humans. In: B.M. Mitruka, Editor, *Clinical Biochemical and Hematological Reference Values in Normal Experimental Animals and Normal Humans* (2ª ed.), Masson Publishing, New York, NY (1981). p. 74-76.
- **Monte M, Fagundez E.** Biomateriales hoy. *Rev Esp Odontoestomatología Impl* 1995;3:55-57.
- **Moreno Reyes L, Marín González G, Enriquez Habib F, González Gómez J, Moreno Villalay L et al.** Utilización de plasma rico en plaquetas para regeneración periodontal en un perro. *Rev Odont Mex* 2004;8:64-69.

- **Morton DB, Abbot D, Barclay R, Close BS, Ewbank R, Gask D, Heath M et al.** Extracción de Sangre en los mamíferos y aves de laboratorio. *Lab Animals* 1993;27:1-22.
- **Mundy GR.** Cellular and molecular regulation of bone turnover. *Bone* 1999;24:35S-38S.
- **Mundy GR.** Factores locales en el control de la reabsorción y formación de hueso. In: Cannata JB (eds.). *Actualizaciones en metabolismo óseo*. Madrid: Jarpyo Editores 1992. p. 41-6.
- **Muschler GF, Midura RJ.** Connective tissue progenitors: practical concepts for clinical applications. *Clin Orthop Rel Res* 2002;395:66-80.
- **Naganuma K, Inoue K, Yamamura K, Hanada K, Yamada Y.** Tongue and jaw muscle activities during chewing and swallowing in freely behaving rabbits. *Brain Research* 2001;915:185-194.
- **Oakley RME, Wright JE.** Postoperative mediastinitis classification and management. *Ann Thorac Surg* 1999;11;1030-1036.
- **Ogino Y, Ayukawa Y, Tsukiyama Y, Koyano K.** The effect of platelet-rich plasma on the cellular response of rat bone marrow cells in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005;100:302-307.
- **Ohlstein B, Kai T, Decotto E, Spradling A.** The stem cell niche: theme and variations. *Curr Opin Cell Biol* 2004;26:693-699.
- **Okuda K, Kawase T, Mornose M, Murata M, Saito Y et al.** Platelet rich plasma contains high levels of platelet derived growth factors and transforming growth factor beta and modulates the proliferation of periodontal related cells in vitro. *J Periodontol* 2003;74:849-857.
- **Ortonne JP, Loning T, Schmitt D, Thivolet J.** Immunomorphological and Ultrastructural aspects of keratinocyte migration in epidermal wound healing. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 1981; 392:217-230.
- **Paladini RD, Takahashi K, Bravo NS, Coulombe PA.** Onset of reepithelialization after skin injury correlates with a reorganization of keratin filaments in wound edge keratinocytes: denining a potential role for keratin 16. *J Cell Biol* 1996; 132:381-397.
- **Palman C, Bowen Pope DF, Brooks JJ.** Platelet derived growth factor receptor (β subunit) immunoreactivity in soft tissue tumors. *Lab Invest* 1992;66:108-115.

- **Pardo Zamora G.** Respuesta biológica de un implante de hidroxiapatita y colágeno de origen porcino: Estudio experimental en conejos de Nueva Zelanda de 15 meses. **PhD Thesis** 2006. Universidad de Murcia.
- **Parell GJ, Becker GD.** Comparison of absorbable with nonabsorbible sutures in closure of facial skin wounds. *Ach Facial Plast Surg* 2003; 5:488-490.
- **Parfitt AM, Drezner MK, Gloriex FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier et al.** Bone histomorphometry : standarization of nomenclature, symbols and units. *J Bone Min Res* 1987;2:595-610.
- **Parfitt AM.** Targeted and nontargeted bone remodeling: relationship to basic multicellular unit origination and progression. *Bone* 2002;30:5-7.
- **Peñarrocha Diago M, Sánchez Garcés MA, Guarín Carbó J.** Regeneración ósea. En: Peñarrocha Diago, M. *Implantología Oral* (1ª ed) Barcelona. Ars Medica. 2006. p. 129-166.
- **Pertrungaro PS.** Using platelet rich plasma to accelerate soft tissue maturation in esthetic periodontal surgery. *Compend Contin Educ Dent.* 2001;22:729-732,734,736.
- **Pierce GF, Tarpley JE, Yanagihara D, Mustoe TA, Fox GM, Thomason A.** Platelet derived growth factor (BB homodimer), transforming growth factor beta 1, and basic fibroblastic growth factors in dermal wound healing: neovassel and matriz formation and cessation of repair. *Am J Pathol* 1992;140:1375-1388.
- **Pietrzak WS, An YH, Kang QK, Demos HA, Ehrens KH.** Platelet-rich and platelet-poor plasma: development of an animal model to evaluate hemostatic efficacy. *J Craniofac Surg* 2007;18;559-567.
- **Plachokova AS, van den Dolder J, Stoelinga PJ, Jansen JA.** The bone regenerative effect of platelet-rich plasma in combination with an osteoconductive material in rat cranial defects. *Clin Oral Impl Res* 2006;17:305-311.
- **Pollak M.** Insulin-like growth factor physiology and cancer risk. *Eur J Cancer* 2000;36:1224-8.
- **Ponseti IV, Morcuended JA.** Introducción a las lesiones traumáticas en la infancia. En: Burgos J, González P, Amaya S (eds). *Lesiones traumáticas del niño.* Buenos Aires:Panamericana, 1995:5-19.
- **Praemer AF, et al.** *Musculoskeletal conditions in the United States*, 2nd ed. Rosemont, III: American Academy of Orthopaedic Surgeons.

- **Pryor ME, Polimeni G, Koo KT, Hartman MJ, Gross H, April M, et al.** Analysis of rat calvaria defects implanted with a platelet-rich plasma preparations: histologic and histometric observations. *J Clin Periodontol* 2005; 32: 966-972.
- **Quinn J, Lowe L, Mertz M.** The effect of a new tissue-adhesive wound dressing on the healing of traumatic abrasions. *Dermatology* 2000; 201:343-6.
- **Rapuri PB, Gallagher JC, Balhorn KE, Ryschon KL.** Smoking and bone metabolism in elderly women. *Bone* 2000;27:429-436.
- **Rauch F, Lauzier D, Croteau S, Travers R, Glorieux FH, Hamdy R.** Temporal and spatial expression of bone morphometric protein-2,-4, and -7 during distraction osteogenesis in rabbits. *Bone* 2000;26:611-617.
- **Ridderstolpe L, Gill H, Granfeldt H, Ahlfeldt H et al.** Superficial and deep sternal wound complications: incidence, risk factors and mortality. *Eur J Cardiothoracic Surg* 2001;20:1168-1175.
- **Rivera JA, Riaño CH, Echevarría A, Monsalve PA, Alzate GJ, Restrepo LF, et al.** Injertos óseos. Nueva alternativa. Fase III. Obtención, caracterización y evaluación de hidroxiapatita sintética y el compuesto de hidroxiapatita sintética porosa. Proteínas Morfogenéticas Óseas en un modelo experimental lapino. *Rev Col Cienc Pec.* 2004;17:20-28.
- **Rivera JA, Riaño CH, Monsalve PA, Restrepo LF, Aranzazu DA, Giraldo GE et al.** Injertos óseos. Nueva alternativa. Fase II. Evaluación de las propiedades osteoinductoras de las proteínas morfogenéticas óseas parcialmente purificadas, implantadas en tejidos subcutáneo de un modelo experimental lapino. *Rev Col Cienc Pec.* 2003;16:249-256.
- **Roach HI (2000).** Bone anatomy and cell biology. http://www.ectsoc.org/reviews/011_roac.htm.
- **Roberts WE, Garetto LP, Brezniak N.** Fisiología y metabolismo óseo. En: Misch C (ed). *Implantología contemporánea.* Madrid: Mosby, 1995:324-350.
- **Roberts WE, Smith RK, Zilberman Y, Mozsary PG, Smith RS.** Osseous adaptation to continuous loading of rigid endosseous implants. *Am J Orthod* 1984;86:95-111.
- **Rodgers KE, Roda N, Felix JC, Espinoza T, Maldonado S, diZerega G.** Histological evaluation of effects of angiotensin peptides on wound repair in diabetic mice. *Exp Dermatol* 2003; 12:784-790.

- **Ross R, Raines EW, Bowen-Pope DF.** The biology of platelet-derived growth factor. *Cell* 1986;46:155-169.
- **Rozman P, Bolta Z.** Use of platelet growth factors in treating wounds and soft tissue injuries. *Act Dermatovenerol Alp Panonica Adriat* 2007;16;156-165.
- **Rutkowski JL, Fennell JW, Kern JC, Madison DE, Johnson DA.** Inhibition of alveolar osteitis in mandibular tooth extraction sites using platelet rich plasma *J Oral Impl* 2007;33:116-121.
- **Sammartino G, Tia M, Marenzi G, di Lauro AE, D'Agostino E, Claudio PP.** Use of autologous platelet-rich plasma (PRP) in periodontal defect treatment after extraction for impacted mandibular third molar. *J Oral Maxillofac Surg* 2005; 63: 766-770.
- **Sánchez M, Azofra J, Aizpurúa B, Elorriaga R, Anitua E, Andía I.** Aplicación de plasma autólogo rico en factores de crecimiento en cirugía artroscópica. *Cuadernos de Artroscopia* 2003;10:12-19.
- **Schilephake H.** Bone growth factors in maxillofacial skeletal reconstruction. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2002;31:469-484.
- **Schnabel LV, Mohammed HO, Miller BJ, McDermott WG, Jacobson MS, Santangelo KS, et al.** Platelet rich Plasma (PRP) enhances anabolic gene expression patterns in flexor digitorum superficialis tendons. *J Orthop Res* 2007;25:230-240.
- **Semjonow A, Brandt M, Reul H, Rathert P.** Suture surface and strength of polypropylene monofilaments. *Biomed Tech* 1993; 38:21-24.
- **Serrano S (1998).** Estructura y función del hueso normal. <http://www.conganat.org/iicongress/conf/018/index.htm>.
- **Serrano S, Mariñoso ML.** Bases histológicas de la histomorfometría ósea. En: Serrano S, Aubia J, Mariñoso ML (eds). *Patología ósea metabólica*. Barcelona: Sandoz, 1990:56-69.
- **Sharma P, Mafulli N.** Tendon injury and tendinopathy: healing and repair. *J Bone Joint Surg Ann* 2005;87;187-202.
- **Shepel GC, Woodward SC.** Reparación, regeneración y fibrosis. En: **Rubin E, Gorstein F, Rubin R, Schwarting R, Strayer D. In:** *Patología estructural. Fundamentos clínico-patológicos en Medicina*. Mc Graw Hill (4ª ed) Interamericana 2006. p.79-108.

- **Sheridan JF, Padgett DA, Avistur R, Marucha PT.** Experimental models of stress and wound healing. *World J Surg* 2004; 28:327-330.
- **Singer AJ, McClain SA.** Development of a porcine excisional wound model. *Acad Emerg Med* 2003; 10:1029-1033.
- **Sinha UK, Gallagher LA.** Effects of steel scalpel, ultrasonic scalpel, CO₂ laser, and monopolar and bipolar electrosurgery on wound healing in guinea pig oral mucosa. *Laryngoscope* 2003;113:228-236.
- **Soffer E, Ouhayoun JP, Anagnostou F.** Fibrin sealant and platelet preparations in bone an peridental healing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003;95:521-528.
- **Soleri JJ.** El tejido óseo en implantodoncia (I). *Rev Esp Odont Implant* 1995; 3:3-10.
- **Sommerfeldt DW, Rubin CT.** Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. *Eur Spine J* 2001;10:S86-S95.
- **Soybir G, Topuzlu C, Odabas Ö, Dolay K, Bilir A, Köksoy F.** The effects of melatonin on angiogenesis and wound healing. *Surg Today* 2003; 33:896-901.
- **Stedd DL and the Diabetic Ulcer Study Group.** Clinical evaluation of recombinant human platelet-derived growth factor for the treatment of lower extremity diabetic ulcers. *J Vasc Surg* 1995;21:71-81.
- **Storozhuk VT, Vol'f LA, Klinina TN, Zhukovskii VA, Amrenov MT, Imangazinov SB, Sadovskii AR.** Use of polypropylene single thread as the suture material. *Khirurgiia* 1991; 12:132-135.
- **Swennen G, Dempf R, Schliephake H.** Craniofacial distraction osteogenesis: a review of the literature. Part II: experimental studies. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2002;31:123-135.
- **Swennen GRJ, Schutyser F, Mueller MC, Kramer FJ, Eulzer C, Schliephake H.** Effect of platelet-rich-plasma on cranial distraction osteogenesis in sheep: preliminary clinical and radiographic results. *Int J Oral Maxillofac Srg* 2005;34:294-304.
- **Tabata Y.** Tissue regeneration based on growth factors release. *Tissue Eng* 2003;9:505-515.
- **Teitelbaum SL.** Bone resorption by osteoclasts. *Science* 2000;289:1504-1508.
- **Tischler M.** Platelet rich plasma. The use of autologous growth factors to enhance bone and soft tissue grafts. *N Y State Dent J* 2002;68:22-24.

- **Ueng SW, Lin SS, Wang CR, Liu SJ, Tai CL, Shih CH.** Bone healing of tibial lengthening is delayed by cigarette smoking: study of bone mineral density and torsional strength on rabbits. *J Trauma* 1999;46:110-115.
- **Vang SN, Brady CP, Christensen KA, Allen KR, Anderson JE, Isler JR, Holt DW, Smith LM.** Autologous platelet gel in coronary artery bypass grafting effects on surgical wound healing. *J Extra Corpor Technol* 2007;39; 31-38.
- **Vázquez Autón JM, Gil Cano F, Latorre Reviriego R, Ramírez Zarzosa G, López Albors O, et al.** Texto guía para las prácticas de anatomía II y anatomía aplicada. Ed Diego Marín. (2ª ed). 1999. p.127-143.
- **Verna C, Melsen B, Melsen F.** Differences in static bone remodelling parameters in human mandible and iliac crest. *Bone* 1999;25:577-583.
- **Watanabe W, Niimi A, Ueda M.** Autogenous bone grafos in the rabbit maxillary sinus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1999;88; 26-32.
- **Werner S, Grose R.** Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev* 2003;83;835-870.
- **Wheater PR, Burkitt HG, Daniels VG.** Funcional histology. New York: Churchill Livingstone ed;1987.p.142-60.
- **Wiltfang J, Kloss FR, Kessler P, Nkenke E, Schultze-Mosgau S, et al.** Effects of platelet-rich plasma on bone healing in combination with autogenous bone and bone substitutes in critical-size defects. An animal experiment. *Clin Oral Impl Res* 2004;15:187-193.
- **Woodburn JR.** The epidermal growth factor receptor and its inhibition in cancer therapy. *Pharmacol Ther* 1999;82;241-250.
- **Wozney JM.** Biology and clinical applications of rhBMP-2. En Lynch SE, Genco RJ, Marx RE (eds). *Tissue engineering. Aplications in maxillofacial surgery and periodontics.* Illinois: Quintessence, 1999:103-123.
- **Yücel EA, Oral O, Olgac V, Oral CK.** Effects o fibrin glue on wound healing in oral cavity. *J Dent* 2003; 31:569-575.
- **Zhu SJ, Choi BH, Jung JH, Lee SH, Huh JY et al.** A comparative histologic analysis of tissue-engineered bone using platelet-rich plasma and platelet-rich fibrin glue. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;102:175-179.

VIII. APÉNDICE ESTADÍSTICO

APÉNDICE ESTADÍSTICO

- 1. TEJIDOS BLANDOS (MUCOSA ORAL Y PIEL)
- 2. TEJIDOS DUROS (RADIOLOGÍA DE LAS TIBIAS)
- 3. TEJIDOS DUROS (HISTOPATOLOGÍA DE LAS TIBIAS)

1. TEJIDOS BLANDOS (MUCOSA ORAL Y PIEL)

ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA

Muestra total

- 1. Animales en los que se estudia el efecto del PRFC en la cicatrización de heridas a los 7 o 28 días.
- 2. Animales en cuyas heridas provocadas por bisturí frío se colocó PEFC en gel y se sacrificaron a 1-2 días, para su observación al microscopio electrónico (en ellos no se estudió los efectos en la evolución de las heridas del PRFC).

Estadísticos

Estudio evolución cicatrización estudio microscopía electrónica

N	Válidos	22
	Perdidos	0

Estudio evolución cicatrización estudio microscopía electrónica

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos 1	20	90,9	90,9	90,9
2	2	9,1	9,1	100,0
Total	22	100,0	100,0	

Peso de la muestra total antes de provocar las heridas (n = 22)

Estadísticos descriptivos

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
pesocirugia	22	2700	5200	3679,09	739,813
N válido (según lista)	22				

Grupos de estudio para la evolución de sus heridas, en relación a la forma en la que fue aplicado el PRFC (n = 20)

- 1. Heridas provocadas con bisturí frío, en las que se aplicó el PRFC en gel y fueron suturadas con polipropileno de 4/0.
- 2. Heridas provocadas con bisturí frío, en las que se aplicó el PRFC en infiltrado y fueron suturadas con polipropileno de 4/0.

instrumentoquirurgico

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos 1	10	50,0	50,0	50,0
2	10	50,0	50,0	100,0
Total	20	100,0	100,0	

Evolución del peso de los animales en los que se estudió la evolución de la cicatrización de las heridas (n = 20)

Peso antes de provocar las heridas, de la muestra total (n = 20)

Estadísticos descriptivos

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
pesocirugia	20	2700	5200	3662,00	767,241
N válido (según lista)	20				

Peso antes de provocar las heridas, en cada grupo de estudio

- 1. Heridas provocadas con bisturí frío, en las que se aplicó el PRFC en gel y fueron suturadas con polipropileno de 4/0.
- 2. Heridas provocadas con bisturí frío, en las que se aplicó el PRFC en infiltrado y fueron suturadas con polipropileno de 4/0.

Estadísticos de grupo

	instrumentoquirurgico	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
pesocirugia	1	10	3824,00	840,941	265,929
	2	10	3500,00	690,813	218,454

Peso el día de la toma de biopsia una vez finalizado el estudio, de la muestra total (n = 19, ya que un animal cuyas heridas fueron provocadas con bisturí frío, en las que se aplicó el PRFC en infiltrado y fueron suturadas con polipropileno de 4/0, murió durante el estudio)

Estadísticos descriptivos

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
pesobiopsia	19	2300	4750	3519,47	639,283
N válido (según lista)	19				

Peso el día de la toma de biopsia una vez finalizado el estudio, en cada grupo (n = 19, ya que un animal cuyas heridas fueron provocadas con bisturí frío, en las que se aplicó el PRFC en infiltrado y fueron suturadas con polipropileno de 4/0, murió durante el estudio)

- 1. Heridas provocadas con bisturí frío, en las que se aplicó el PRFC en gel y fueron suturadas con polipropileno de 4/0.
- 2. Heridas provocadas con bisturí frío, en las que se aplicó el PRFC en infiltrado y fueron suturadas con polipropileno de 4/0.

Estadísticos de grupo

instrumentoquirurgico	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
pesobiopsia 1	10	3603,00	649,257	205,313
2	9	3426,67	653,376	217,792

Número total de heridas provocadas en lengua en relación a la aplicación o no de PRFC

- 1. Heridas provocadas con bisturí frío, en las que se aplicó el PRFC y fueron suturadas con polipropileno de 4/0.
- 2. Heridas provocadas con bisturí frío y suturadas con polipropileno de 4/0 (grupo control).

PRFCcontrol

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos 1	19	50,0	50,0	50,0
2	19	50,0	50,0	100,0
Total	38	100,0	100,0	

Número de biopsias a los 7 y 28 días de provocar las heridas en lengua

- 1. Biopsias tomadas a los 7 días de provocar las heridas.
- 2. Biopsias tomadas a los 28 días de provocar las heridas.

diabiopsia

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos 1	20	52,6	52,6	52,6
2	18	47,4	47,4	100,0
Total	38	100,0	100,0	

Número de biopsias tomadas a los 7 y 28 días de provocar las heridas en lengua, en función de la aplicación o no de PRFC

Día de biopsia

- 1. Biopsias tomadas a los 7 días de provocar las heridas.
- 2. Biopsias tomadas a los 28 días de provocar las heridas.

Grupo PRFC y control

- 1. Heridas provocadas con bisturí frío, en las que se aplicó el PRFC y fueron suturadas con polipropileno de 4/0.
- 2. Heridas provocadas con bisturí frío y suturadas con polipropileno de 4/0 (grupo control).

Tabla de contingencia diabiopsia * PRFCcontrol

Recuento		PRFCcontrol		Total
		1	2	
diabiopsia	1	10	10	20
	2	9	9	18
Total		19	19	38

Grado de reepitelización a los 7 días de provocar las heridas en lengua (n = 20 biopsias pero 18 muestras, ya que dos se perdieron en la fase de procesamiento de las muestras en el laboratorio)

Grupo PRFC y control

- 1. Heridas provocadas con bisturí frío, en las que se aplicó el PRFC y fueron suturadas con polipropileno de 4/0.
- 2. Heridas provocadas con bisturí frío y suturadas con polipropileno de 4/0 (grupo control).

Grado de reepitelización de las heridas

- 0. Código 0: reepitelización en el borde de la herida.
- 1. Código 1: reepitelización cubre menos de la mitad de la herida.
- 2. Código 2: reepitelización cubre más de la mitad de la herida.

- 3. Código 3: reepitelización cubre la herida completa, pero el espesor es irregular.
- 4. Código 4: reepitelización cubre la herida completa y el espesor es normal.

Tabla de contingencia PRFCcontrol * reepitlengua

Recuento		reepitlengua				Total
		1	2	3	4	
PRFCcontrol	1	0	0	7	2	9
	2	1	2	6	0	9
Total		1	2	13	2	18

Grado de inflamación a los 7 días de provocar las heridas en lengua (n = 20 biopsias pero 18 muestras, ya que dos se perdieron en la fase de procesamiento de las muestras en el laboratorio)

Grupo PRFC y control

- 1. Heridas provocadas con bisturí frío, en las que se aplicó el PRFC y fueron suturadas con polipropileno de 4/0.
- 2. Heridas provocadas con bisturí frío y suturadas con polipropileno de 4/0 (grupo control).

Grado de inflamación

- 1. Código 1: Fase de inflamación aguda
 - Se forma la membrana piógena: por fibrina y polinucleares
 - Empieza a aparecer neogénesis vascular
- 2. Código 2: Fase de inflamación aguda difusa
 - Predomina el tejido de granulación, aunque todavía puede existir membrana piógena
 - Se produce una neogénesis vascular
- 3. Código 3: Fase con predominio de inflamación crónica
 - Reducción de polinucleares y aumento de células redondas
 - Comienza la proliferación fibroblástica
- 4. Código 4: Fase resolutive o de cicatrización
 - Proliferación de fibroblastos y colágeno
 - Reducción de vasos sanguíneos
 - Reducción o desaparición de la inflamación crónica aunque puede existir una persistencia ocasional de células redondas

Tabla de contingencia PRFCcontrol * gradoinflamlengua

Recuento		gradoinflamlengua				Total
		1	2	3	4	
PRFCcontrol	1	0	2	5	2	9
	2	1	3	3	2	9
Total		1	5	8	4	18

Grado de reepitelización a los 28 días de provocar las heridas en lengua (n = 18 muestras, ya que un animal que iba a ser biopsiado a los 28 días de provocarle dos heridas en lengua: una con PRGF y otra control, murió durante el estudio)

Grupo PRFC y control

- 1. Heridas provocadas con bisturí frío, en las que se aplicó el PRFC y fueron suturadas con polipropileno de 4/0.
- 2. Heridas provocadas con bisturí frío y suturadas con polipropileno de 4/0 (grupo control).

Grado de reepitelización de las heridas

- 0. Código 0: reepitelización en el borde de la herida.
- 1. Código 1: reepitelización cubre menos de la mitad de la herida.
- 2. Código 2: reepitelización cubre más de la mitad de la herida.
- 3. Código 3: reepitelización cubre la herida completa, pero el espesor es irregular.
- 4. Código 4: reepitelización cubre la herida completa y el espesor es normal.

Tabla de contingencia PRFCcontrol * reepitlengua

Recuento		reepitlengua			Total
		2	3	4	
PRFCcontrol	1	0	0	9	9
	2	1	4	4	9
Total		1	4	13	18

Grado de inflamación a los 28 días de provocar las heridas en lengua (n = 18 muestras, ya que un animal que iba a ser biopsiado a los 28 días de provocarle dos heridas en lengua: una con PRGF y otra control, murió durante el estudio)

- 1. Heridas provocadas con bisturí frío, en las que se aplicó el PRFC y fueron suturadas con polipropileno de 4/0.
- 2. Heridas provocadas con bisturí frío y suturadas con polipropileno de 4/0 (grupo control).

Grado de inflamación

- 1. Código 1: Fase de inflamación aguda
 - Se forma la membrana piógena: por fibrina y polinucleares
 - Empieza a aparecer neogénesis vascular
- 2. Código 2: Fase de inflamación aguda difusa
 - Predomina el tejido de granulación, aunque todavía puede existir membrana piógena
 - Se produce una neogénesis vascular
- 3. Código 3: Fase con predominio de inflamación crónica
 - Reducción de polinucleares y aumento de células redondas
 - Comienza la proliferación fibroblástica
- 4. Código 4: Fase resolutive o de cicatrización
 - Proliferación de fibroblastos y colágeno
 - Reducción de vasos sanguíneos
 - Reducción o desaparición de la inflamación crónica aunque puede existir una persistencia ocasional de células redondas

Tabla de contingencia PRFCcontrol * gradoinflamlengua

Recuento		gradoinflamlengua		Total
		3	4	
PRFCcontrol	1	0	9	9
	2	4	5	9
Total		4	14	18

Número total de heridas provocadas en piel en relación a la aplicación o no de PRFC

- 1. Heridas provocadas con bisturí frío, en las que se aplicó el PRFC y fueron suturadas con polipropileno de 4/0.
- 2. Heridas provocadas con bisturí frío y suturadas con polipropileno de 4/0 (grupo control).

PRFCcontrol

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	1	19	50,0	50,0	50,0
	2	19	50,0	50,0	100,0
	Total	38	100,0	100,0	

Número de biopsias a los 7 y 28 días de provocar las heridas en piel

- 1. Biopsias tomadas a los 7 días de provocar las heridas.
- 2. Biopsias tomadas a los 28 días de provocar las heridas.

diabiopsia

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	1	20	52,6	52,6	52,6
	2	18	47,4	47,4	100,0
	Total	38	100,0	100,0	

Número de biopsias tomadas a los 7 y 28 días de provocar las heridas en piel, en función de la aplicación o no de PRFC

Día de biopsia

- 1. Biopsias tomadas a los 7 días de provocar las heridas.
- 2. Biopsias tomadas a los 28 días de provocar las heridas.

Grupo PRFC y control

- 1. Heridas provocadas con bisturí frío, en las que se aplicó el PRFC y fueron suturadas con polipropileno de 4/0.
- 2. Heridas provocadas con bisturí frío y suturadas con polipropileno de 4/0 (grupo control).

Tabla de contingencia diabiopsia * PRFCcontrol

Recuento		PRFCcontrol		Total
		1	2	
diabiopsia	1	10	10	20
	2	9	9	18
Total		19	19	38

Grado de reepitelización a los 7 días de provocar las heridas en piel (n = 20 muestras)

Grupo PRFC y control

- 1. Heridas provocadas con bisturí frío, en las que se aplicó el PRFC y fueron suturadas con polipropileno de 4/0.
- 2. Heridas provocadas con bisturí frío y suturadas con polipropileno de 4/0 (grupo control).

Grado de reepitelización de las heridas

- 0. Código 0: reepitelización en el borde de la herida.
- 1. Código 1: reepitelización cubre menos de la mitad de la herida.
- 2. Código 2: reepitelización cubre más de la mitad de la herida.
- 3. Código 3: reepitelización cubre la herida completa, pero el espesor es irregular.
- 4. Código 4: reepitelización cubre la herida completa y el espesor es normal.

Tabla de contingencia PRFCcontrol * reepitpiel

Recuento		reepitpiel			Total
		2	3	4	
PRFCcontrol	1	1	1	8	10
	2	3	6	1	10
Total		4	7	9	20

Grado de inflamación a los 7 días de provocar las heridas en piel (n = 20 muestras)

Grupo PRFC y control

- 1. Heridas provocadas con bisturí frío, en las que se aplicó el PRFC y fueron suturadas con polipropileno de 4/0.
- 2. Heridas provocadas con bisturí frío y suturadas con polipropileno de 4/0 (grupo control).

Grado de inflamación

- 1. Código 1: Fase de inflamación aguda
 - Se forma la membrana piógena: por fibrina y polinucleares
 - Empieza a aparecer neogénesis vascular
- 2. Código 2: Fase de inflamación aguda difusa
 - Predomina el tejido de granulación, aunque todavía puede existir membrana piógena
 - Se produce una neogénesis vascular

- 3. Código 3: Fase con predominio de inflamación crónica
 - Reducción de polinucleares y aumento de células redondas
 - Comienza la proliferación fibroblástica
- 4. Código 4: Fase resolutive o de cicatrización
 - Proliferación de fibroblastos y colágeno
 - Reducción de vasos sanguíneos
 - Reducción o desaparición de la inflamación crónica aunque puede existir una persistencia ocasional de células redondas

Tabla de contingencia PRFCcontrol * gradoinflampiel

Recuento		gradoinflampiel				Total
		1	2	3	4	
PRFCcontrol	1	0	1	5	4	10
	2	1	5	4	0	10
Total		1	6	9	4	20

Grado de reepitelización a los 28 días de provocar las heridas en piel (n = 16 muestras, ya que un animal que iba a ser biopsiado a los 28 días de provocarle dos heridas en lengua: una con PRGF y otra control, murió durante el estudio y dos muestras se perdieron en la fase de procesamiento de las mismas en el laboratorio)

Grupo PRFC y control

- 1. Heridas provocadas con bisturí frío, en las que se aplicó el PRFC y fueron suturadas con polipropileno de 4/0.
- 2. Heridas provocadas con bisturí frío y suturadas con polipropileno de 4/0 (grupo control).

Grado de reepitelización de las heridas

- 0. Código 0: reepitelización en el borde de la herida.
- 1. Código 1: reepitelización cubre menos de la mitad de la herida.
- 2. Código 2: reepitelización cubre más de la mitad de la herida.
- 3. Código 3: reepitelización cubre la herida completa, pero el espesor es irregular.
- 4. Código 4: reepitelización cubre la herida completa y el espesor es normal.

Tabla de contingencia PRFCcontrol * reepitpiel

Recuento		reepitpiel		Total
		3	4	
PRFCcontrol	1	1	6	7
	2	2	7	9
Total		3	13	16

Grado de inflamación a los 28 días de provocar las heridas en piel (n = 16 muestras, ya que un animal que iba a ser biopsiado a los 28 días de provocarle dos heridas en lengua: una con PRGF y otra control, murió durante el estudio y dos muestras se perdieron en la fase de procesamiento de las mismas en el laboratorio)

Grupo PRFC y control

- 1. Heridas provocadas con bisturí frío, en las que se aplicó el PRFC y fueron suturadas con polipropileno de 4/0.
- 2. Heridas provocadas con bisturí frío y suturadas con polipropileno de 4/0 (grupo control).

Grado de inflamación

- 1. Código 1: Fase de inflamación aguda
 - Se forma la membrana piógena: por fibrina y polinucleares
 - Empieza a aparecer neogénesis vascular
- 2. Código 2: Fase de inflamación aguda difusa
 - Predomina el tejido de granulación, aunque todavía puede existir membrana piógena
 - Se produce una neogénesis vascular
- 3. Código 3: Fase con predominio de inflamación crónica
 - Reducción de polinucleares y aumento de células redondas
 - Comienza la proliferación fibroblástica
- 4. Código 4: Fase resolutive o de cicatrización
 - Proliferación de fibroblastos y colágeno
 - Reducción de vasos sanguíneos
 - Reducción o desaparición de la inflamación crónica aunque puede existir una persistencia ocasional de células redondas

Tabla de contingencia PRFCcontrol * gradoinflampiel

Recuento		gradoinflampiel		Total
		3	4	
PRFCcontrol	1	1	6	7
	2	1	8	9
Total		2	14	16

Número total de heridas provocadas en lengua en relación a la aplicación del PRFC en forma de gel o infiltrado (un animal del grupo en el que se aplicó el PRFC infiltrado murió durante el estudio)

- 1. Heridas provocadas con bisturí frío, en las que se aplicó el PRFC en gel y fueron suturadas con polipropileno de 4/0.
- 2. Heridas provocadas con bisturí frío, en las que se aplicó el PRFC infiltrado y fueron suturadas con polipropileno de 4/0.

instrumentoquirurgico

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos 1	10	52,6	52,6	52,6
2	9	47,4	47,4	100,0
Total	19	100,0	100,0	

Número de biopsias a los 7 y 28 días de provocar las heridas en lengua

- 1. Biopsias tomadas a los 7 días de provocar las heridas.
- 2. Biopsias tomadas a los 28 días de provocar las heridas.

diabiopsia

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos 1	10	52,6	52,6	52,6
2	9	47,4	47,4	100,0
Total	19	100,0	100,0	

Número de biopsias tomadas a los 7 y 28 días de provocar las heridas en lengua, en función de la aplicación del PRFC en forma de gel o infiltrado

Día de biopsia

- 1. Biopsias tomadas a los 7 días de provocar las heridas.

- 2. Biopsias tomadas a los 28 días de provocar las heridas.

Grupo PRFC en gel y PRFC infiltrado

- 1. Heridas provocadas con bisturí frío, en las que se aplicó el PRFC en gel y fueron suturadas con polipropileno de 4/0.
- 2. Heridas provocadas con bisturí frío, en las que se aplicó el PRFC infiltrado y fueron suturadas con polipropileno de 4/0.

Tabla de contingencia diabiopsia * PRFCgeloinfiltrado

Recuento

		PRFCgeloinfiltrado		Total
		1	2	
diabiopsia	1	5	5	10
	2	5	4	9
Total		10	9	19

Grado de reepitelización a los 7 días de provocar las heridas en lengua, en relación a la forma de aplicar el PRFC (n = 10 biopsias pero 9 muestras, ya que una se perdió en la fase de procesamiento de las muestras en el laboratorio)

Grupo PRFC en gel o infiltrado

- 1. Heridas provocadas con bisturí frío, en las que se aplicó el PRFC en gel y fueron suturadas con polipropileno de 4/0.
- 2. Heridas provocadas con bisturí frío, en las que se aplicó el PRFC infiltrado y fueron suturadas con polipropileno de 4/0.

Grado de reepitelización de las heridas

- 0. Código 0: reepitelización en el borde de la herida.
- 1. Código 1: reepitelización cubre menos de la mitad de la herida.
- 2. Código 2: reepitelización cubre más de la mitad de la herida.
- 3. Código 3: reepitelización cubre la herida completa, pero el espesor es irregular.
- 4. Código 4: reepitelización cubre la herida completa y el espesor es normal.

Tabla de contingencia PRFCgeloinfiltrado * reepitlengua

Recuento

		reepitlengua		Total
		3	4	
PRFCgeloinfiltrado	1	4	1	5
	2	3	1	4
Total		7	2	9

Grado de inflamación a los 7 días de provocar las heridas en lengua, en relación a la forma de aplicar el PRFC (n = 10 biopsias pero 9 muestras, ya que una se perdió en la fase de procesamiento de las muestras en el laboratorio)

Grupo PRFC en gel o infiltrado

- 1. Heridas provocadas con bisturí frío, en las que se aplicó el PRFC en gel y fueron suturadas con polipropileno de 4/0.
- 2. Heridas provocadas con bisturí frío, en las que se aplicó el PRFC infiltrado y fueron suturadas con polipropileno de 4/0.

Grado de inflamación

- 1. Código 1: Fase de inflamación aguda
 - Se forma la membrana piógena: por fibrina y polinucleares
 - Empieza a aparecer neogénesis vascular
- 2. Código 2: Fase de inflamación aguda difusa
 - Predomina el tejido de granulación, aunque todavía puede existir membrana piógena
 - Se produce una neogénesis vascular
- 3. Código 3: Fase con predominio de inflamación crónica
 - Reducción de polinucleares y aumento de células redondas
 - Comienza la proliferación fibroblástica
- 4. Código 4: Fase resolutive o de cicatrización
 - Proliferación de fibroblastos y colágeno
 - Reducción de vasos sanguíneos
 - Reducción o desaparición de la inflamación crónica aunque puede existir una persistencia ocasional de células redondas

Tabla de contingencia PRFCgeloinfiltrado * gradoinflamlengua

Recuento		gradoinflamlengua			Total
		2	3	4	
PRFCgeloinfiltrado	1	2	2	1	5
	2	0	3	1	4
Total		2	5	2	9

Grado de reepitelización a los 28 días de provocar las heridas en lengua, en relación a la forma de aplicar el PRFC (n = 9 biopsias ya que un animal que iba

a ser biopsiado a los 28 días de provocarle dos heridas en lengua: una con PRGF y otra control, murió durante el estudio)

Grupo PRFC en gel o infiltrado

- 1. Heridas provocadas con bisturí frío, en las que se aplicó el PRFC en gel y fueron suturadas con polipropileno de 4/0.
- 2. Heridas provocadas con bisturí frío, en las que se aplicó el PRFC infiltrado y fueron suturadas con polipropileno de 4/0.

Grado de reepitelización de las heridas

- 0. Código 0: reepitelización en el borde de la herida.
- 1. Código 1: reepitelización cubre menos de la mitad de la herida.
- 2. Código 2: reepitelización cubre más de la mitad de la herida.
- 3. Código 3: reepitelización cubre la herida completa, pero el espesor es irregular.
- 4. Código 4: reepitelización cubre la herida completa y el espesor es normal.

Tabla de contingencia PRFCgeloinfiltrado * reepitlengua

Recuento		reepitlengua	
		4	Total
PRFCgeloinfiltrado	1	5	5
	2	4	4
Total		9	9

Grado de inflamación a los 28 días de provocar las heridas en lengua, en relación a la forma de aplicar el PRFC (n = 9 biopsias ya que un animal que iba a ser biopsiado a los 28 días de provocarle dos heridas en lengua: una con PRGF y otra control, murió durante el estudio)

Grupo PRFC en gel o infiltrado

- 1. Heridas provocadas con bisturí frío, en las que se aplicó el PRFC en gel y fueron suturadas con polipropileno de 4/0.
- 2. Heridas provocadas con bisturí frío, en las que se aplicó el PRFC infiltrado y fueron suturadas con polipropileno de 4/0.

Grado de inflamación

- 1. Código 1: Fase de inflamación aguda
 - Se forma la membrana piógena: por fibrina y polinucleares
 - Empieza a aparecer neogénesis vascular

- 2. Código 2: Fase de inflamación aguda difusa
 - Predomina el tejido de granulación, aunque todavía puede existir membrana piógena
 - Se produce una neogénesis vascular
- 3. Código 3: Fase con predominio de inflamación crónica
 - Reducción de polinucleares y aumento de células redondas
 - Comienza la proliferación fibroblástica
- 4. Código 4: Fase resolutive o de cicatrización
 - Proliferación de fibroblastos y colágeno
 - Reducción de vasos sanguíneos
 - Reducción o desaparición de la inflamación crónica aunque puede existir una persistencia ocasional de células redondas

**Tabla de contingencia PRFCgeloinfiltrado *
gradoinflamlengua**

Recuento		gradoinflamlengua	
		4	Total
PRFCgeloinfiltrado	1	5	5
	2	4	4
Total		9	9

Número total de heridas provocadas en piel en relación a la aplicación del PRFC en forma de gel o infiltrado (un animal del grupo en el que se aplicó el PRFC infiltrado murió durante el estudio)

- 1. Heridas provocadas con bisturí frío, en las que se aplicó el PRFC en gel y fueron suturadas con polipropileno de 4/0.
- 2. Heridas provocadas con bisturí frío, en las que se aplicó el PRFC infiltrado y fueron suturadas con polipropileno de 4/0.

instrumentoquirurgico

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos 1	10	52,6	52,6	52,6
2	9	47,4	47,4	100,0
Total	19	100,0	100,0	

Número de biopsias a los 7 y 28 días de provocar las heridas en piel

- 1. Biopsias tomadas a los 7 días de provocar las heridas.
- 2. Biopsias tomadas a los 28 días de provocar las heridas.

diabiopsia

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos 1	10	52,6	52,6	52,6
2	9	47,4	47,4	100,0
Total	19	100,0	100,0	

Número de biopsias tomadas a los 7 y 28 días de provocar las heridas en piel, en función de la aplicación del PRFC en forma de gel o infiltrado

Día de biopsia

- 1. Biopsias tomadas a los 7 días de provocar las heridas.
- 2. Biopsias tomadas a los 28 días de provocar las heridas.

Grupo PRFC en gel y PRFC infiltrado

- 1. Heridas provocadas con bisturí frío, en las que se aplicó el PRFC en gel y fueron suturadas con polipropileno de 4/0.
- 2. Heridas provocadas con bisturí frío, en las que se aplicó el PRFC infiltrado y fueron suturadas con polipropileno de 4/0.

Tabla de contingencia diabiopsia * PRFCgeloinfiltrado

Recuento

	PRFCgeloinfiltrado		Total
	1	2	
diabiopsia 1	5	5	10
2	5	4	9
Total	10	9	19

Grado de reepitelización a los 7 días de provocar las heridas en piel, en relación a la forma de aplicar el PRFC (n = 10 muestras)

Grupo PRFC en gel o infiltrado

- 1. Heridas provocadas con bisturí frío, en las que se aplicó el PRFC en gel y fueron suturadas con polipropileno de 4/0.

- 2. Heridas provocadas con bisturí frío, en las que se aplicó el PRFC infiltrado y fueron suturadas con polipropileno de 4/0.

Grado de reepitelización de las heridas

- 0. Código 0: reepitelización en el borde de la herida.
- 1. Código 1: reepitelización cubre menos de la mitad de la herida.
- 2. Código 2: reepitelización cubre más de la mitad de la herida.
- 3. Código 3: reepitelización cubre la herida completa, pero el espesor es irregular.
- 4. Código 4: reepitelización cubre la herida completa y el espesor es normal.

Tabla de contingencia PRFCgeloinfiltrado * reepitpiel

Recuento		reepitpiel			Total
		2	3	4	
PRFCgeloinfiltrado	1	1	0	4	5
	2	0	1	4	5
Total		1	1	8	10

Grado de inflamación a los 7 días de provocar las heridas en piel, en relación a la forma de aplicar el PRFC (n = 10 muestras)

Grupo PRFC en gel o infiltrado

- 1. Heridas provocadas con bisturí frío, en las que se aplicó el PRFC en gel y fueron suturadas con polipropileno de 4/0.
- 2. Heridas provocadas con bisturí frío, en las que se aplicó el PRFC infiltrado y fueron suturadas con polipropileno de 4/0.

Grado de inflamación

- 1. Código 1: Fase de inflamación aguda
 - Se forma la membrana piógena: por fibrina y polinucleares
 - Empieza a aparecer neogénesis vascular
- 2. Código 2: Fase de inflamación aguda difusa
 - Predomina el tejido de granulación, aunque todavía puede existir membrana piógena
 - Se produce una neogénesis vascular
- 3. Código 3: Fase con predominio de inflamación crónica
 - Reducción de polinucleares y aumento de células redondas

- Comienza la proliferación fibroblástica
- 4. Código 4: Fase resolutive o de cicatrización
 - Proliferación de fibroblastos y colágeno
 - Reducción de vasos sanguíneos
 - Reducción o desaparición de la inflamación crónica aunque puede existir una persistencia ocasional de células redondas

Tabla de contingencia PRFCgeloinfiltrado * gradoinflampiel

Recuento		gradoinflampiel			Total
		2	3	4	
PRFCgeloinfiltrado	1	1	3	1	5
	2	0	2	3	5
Total		1	5	4	10

Grado de reepitelización a los 28 días de provocar las heridas en piel, en relación a la forma de aplicar el PRFC (n = 7 muestras ya que un animal que iba a ser biopsiado a los 28 días de provocarle dos heridas en lengua: una con PRGF y otra control, murió durante el estudio y dos muestras se perdieron en la fase de procesamiento de las mismas en el laboratorio)

Grupo PRFC en gel o infiltrado

- 1. Heridas provocadas con bisturí frío, en las que se aplicó el PRFC en gel y fueron suturadas con polipropileno de 4/0.
- 2. Heridas provocadas con bisturí frío, en las que se aplicó el PRFC infiltrado y fueron suturadas con polipropileno de 4/0.

Grado de reepitelización de las heridas

- 0. Código 0: reepitelización en el borde de la herida.
- 1. Código 1: reepitelización cubre menos de la mitad de la herida.
- 2. Código 2: reepitelización cubre más de la mitad de la herida.
- 3. Código 3: reepitelización cubre la herida completa, pero el espesor es irregular.
- 4. Código 4: reepitelización cubre la herida completa y el espesor es normal

Tabla de contingencia PRFCgeloinfiltrado * reepitpiel

Recuento		reepitpiel		Total
		3	4	
PRFCgeloinfiltrado	1	1	3	4
	2	0	3	3
Total		1	6	7

Grado de inflamación a los 28 días de provocar las heridas en piel, en relación a la forma de aplicar el PRFC (n = 7 muestras ya que un animal que iba a ser biopsiado a los 28 días de provocarle dos heridas en lengua: una con PRGF y otra control, murió durante el estudio y dos muestras se perdieron en la fase de procesamiento de las mismas en el laboratorio)

Tabla de contingencia PRFCgeloinfiltrado * gradoinflampiel

Recuento		gradoinflampiel		Total
		3	4	
PRFCgeloinfiltrado	1	1	3	4
	2	0	3	3
Total		1	6	7

ESTADÍSTICA INFERENCIAL

Tabla 1: Homogeneidad del peso inicial de los grupos de estudio.

Grupo PRFC en gel o infiltrado

- 1. Heridas provocadas con bisturí frío, en las que se aplicó el PRFC en gel y fueron suturadas con polipropileno de 4/0.
- 2. Heridas provocadas con bisturí frío, en las que se aplicó el PRFC infiltrado y fueron suturadas con polipropileno de 4/0.

Estadísticos de grupo

instrumentoquirurgico	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
pesocirurgia 1	10	3824,00	840,941	265,929
2	10	3500,00	690,813	218,454

Prueba de muestras independientes

	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
								Inferior	Superior
pesocirugi: Se han asumido varianzas iguales	,913	,352	,941	18	,359	324,000	344,152	-399,036	047,036
No se han asumido varianzas iguales			,941	17,346	,359	324,000	344,152	-400,995	048,995

Tabla 2: Comparación del grado de reepitelización a los 7 días de provocar las heridas en lengua, entre aquellas en las que se aplicó el PRFC y aquellas en las que no se aplicó (n = 20 biopsias pero 18 muestras, ya que dos se perdieron en la fase de procesamiento de las muestras en el laboratorio).

Tabla de contingencia PRFCcontrol * reepitlengua

Recuento		reepitlengua				Total
		1	2	3	4	
PRFCcontrol	1	0	0	7	2	9
	2	1	2	6	0	9
Total		1	2	13	2	18

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	5,077 ^a	3	,166
Razón de verosimilitud	7,008	3	,072
Asociación lineal por lineal	4,371	1	,037
N de casos válidos	18		

a. 6 casillas (75,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,50.

Tabla 3: Comparación del grado de inflamación a los 7 días de provocar las heridas en lengua, entre aquellas en las que se aplicó el PRFC y aquellas en las que no se aplicó (n = 20 biopsias pero 18 muestras, ya que dos se perdieron en la fase de procesamiento de las muestras en el laboratorio).

Tabla de contingencia PRFCcontrol * gradoinflamlengua

Recuento		gradoinflamlengua				Total
		1	2	3	4	
PRFCcontrol	1	0	2	5	2	9
	2	1	3	3	2	9
Total		1	5	8	4	18

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	1,700 ^a	3	,637
Razón de verosimilitud	2,093	3	,553
Asociación lineal por lineal	,680	1	,410
N de casos válidos	18		

a. 8 casillas (100,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,50.

Tabla 4: Comparación del grado de reepitelización a los 28 días de provocar las heridas en lengua, entre aquellas en las que se aplicó el PRFC y aquellas en las que no se aplicó (n = 18 muestras, ya que un animal que iba a ser biopsiado a los 28 días de provocarle dos heridas en lengua: una con PRGF y otra control, murió durante el estudio).

Tabla de contingencia PRFCcontrol * reepitlenguaprfc

Recuento		reepitlenguaprfc			Total
		2	3	4	
PRFCcontrol	1	0	0	9	9
	2	1	4	4	9
Total		1	4	13	18

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	6,923 ^a	2	,031
Razón de verosimilitud	8,905	2	,012
Asociación lineal por lineal	5,667	1	,017
N de casos válidos	18		

a. 4 casillas (66,7%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,50.

Tabla 5: Comparación del grado de inflamación a los 28 días de provocar las heridas en lengua, entre aquellas en las que se aplicó el PRFC y aquellas en las que no se aplicó (n = 18 muestras, ya que un animal que iba a ser biopsiado a los 28 días de provocarle dos heridas en lengua: una con PRGF y otra control, murió durante el estudio).

Tabla de contingencia PRFCcontrol * gradoinflamlenguaprgf

Recuento

		gradoinflamlenguaprgf		Total
		3	4	
PRFCcontrol	1	0	9	9
	2	4	5	9
Total		4	14	18

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	5,143 ^b	1	,023		
Corrección por continuidad	2,893	1	,089		
Razón de verosimilitud	6,704	1	,010		
Estadístico exacto de Fisher				,082	,041
Asociación lineal por lineal	4,857	1	,028		
N de casos válidos	18				

a. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

b. 2 casillas (50,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 2,00.

Tabla 6: Comparación del grado de reepitelización a los 7 días de provocar las heridas en piel, entre aquellas en las que se aplicó el PRFC y aquellas en las que no se aplicó (n = 20 muestras).

Tabla de contingencia PRFCcontrol * reepitpielprgf

Recuento		reepitpielprgf			Total
		2	3	4	
PRFCcontrol	1	1	1	8	10
	2	3	6	1	10
Total		4	7	9	20

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	10,016 ^a	2	,007
Razón de verosimilitud	11,207	2	,004
Asociación lineal por lineal	6,549	1	,010
N de casos válidos	20		

a. 6 casillas (100,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 2,00.

Tabla 7: Comparación del grado de inflamación a los 7 días de provocar las heridas en piel, entre aquellas en las que se aplicó el PRFC y aquellas en las que no se aplicó (n = 20 muestras).

Tabla de contingencia PRFCcontrol * gradoinflampielprgf

Recuento		gradoinflampielprgf				Total
		1	2	3	4	
PRFCcontrol	1	0	1	5	4	10
	2	1	5	4	0	10
Total		1	6	9	4	20

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	7,778 ^a	3	,051
Razón de verosimilitud	9,954	3	,019
Asociación lineal por lineal	7,197	1	,007
N de casos válidos	20		

a. 8 casillas (100,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,50.

Tabla 8: Comparación del grado de reepitelización a los 28 días de provocar las heridas en piel, entre aquellas en las que se aplicó el PRFC y aquellas en las que no se aplicó (n = 16 muestras, ya que un animal que iba a ser biopsiado a los 28 días de provocarle dos heridas en lengua: una con PRGF y otra control, murió durante el estudio y dos muestras se perdieron en la fase de procesamiento de las mismas en el laboratorio).

Tabla de contingencia PRFCcontrol * reepitpiel

Recuento		reepitpiel		Total
		3	4	
PRFCcontrol	1	1	6	7
	2	2	7	9
Total		3	13	16

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	,163 ^b	1	,687		
Corrección por continuidad	,000	1	1,000		
Razón de verosimilitud	,166	1	,684		
Estadístico exacto de Fisher				1,000	,600
Asociación lineal por lineal	,153	1	,696		
N de casos válidos	16				

a. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

b. 2 casillas (50,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 1,31.

Tabla 9: Comparación del grado de inflamación a los 28 días de provocar las heridas en piel, entre aquellas en las que se aplicó el PRFC y aquellas en las que no se aplicó (n = 16 muestras, ya que un animal que iba a ser biopsiado a los 28 días de provocarle dos heridas en lengua: una con PRGF y otra control, murió durante el estudio y dos muestras se perdieron en la fase de procesamiento de las mismas en el laboratorio).

Tabla de contingencia PRFCcontrol * gradoinflampiel

Recuento

		gradoinflampiel		Total
		3	4	
PRFCcontrol	1	1	6	7
	2	1	8	9
Total		2	14	16

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	,036 ^b	1	,849	1,000	,700
Corrección por continuidad	,000	1	1,000		
Razón de verosimilitud	,036	1	,849		
Estadístico exacto de Fisher					
Asociación lineal por lineal	,034	1	,854		
N de casos válidos	16				

a. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

b. 2 casillas (50,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,88.

Tabla 10: Comparación del grado de reepitelización a los 7 días de provocar las heridas en lengua, en relación a la forma de aplicar el PRFC (n = 10 biopsias pero 9 muestras, ya que una se perdió en la fase de procesamiento de las muestras en el laboratorio).

Tabla de contingencia PRFCgeloinfiltrado * reepitlengua

Recuento

		reepitlengua		Total
		3	4	
PRFCgeloinfiltrado	1	4	1	5
	2	3	1	4
Total		7	2	9

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	,032 ^b	1	,858		
Corrección por continuidad	,000	1	1,000		
Razón de verosimilitud	,032	1	,858		
Estadístico exacto de Fisher				1,000	,722
Asociación lineal por lineal	,029	1	,866		
N de casos válidos	9				

a. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

b. 4 casillas (100,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,89.

Tabla 11: Comparación del grado de inflamación a los 7 días de provocar las heridas en lengua, en relación a la forma de aplicar el PRFC (n = 10 biopsias pero 9 muestras, ya que una se perdió en la fase de procesamiento de las muestras en el laboratorio).

Tabla de contingencia PRFCgeloinfiltrado * gradoinflamlengua

Recuento		gradoinflamlengua			Total
		2	3	4	
PRFCgeloinfiltrado	1	2	2	1	5
	2	0	3	1	4
Total		2	5	2	9

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	2,115 ^a	2	,347
Razón de verosimilitud	2,863	2	,239
Asociación lineal por lineal	,900	1	,343
N de casos válidos	9		

a. 6 casillas (100,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,89.

Tabla 12: Comparación del grado de reepitelización a los 28 días de provocar las heridas en lengua, en relación a la forma de aplicar el PRFC (n = 9 biopsias ya que un animal que iba a ser biopsiado a los 28 días de provocarle dos heridas en lengua: una con PRGF y otra control, murió durante el estudio).

Tabla de contingencia PRFCgeloinfiltrado * reepitlengua

Recuento

		reepitlengua	Total
		4	
PRFCgeloinfiltrado	1	5	5
	2	4	4
Total		9	9

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor
Chi-cuadrado de Pearson	. ^a
N de casos válidos	9

a. No se calculará ningún estadístico porque reepitlengua es una constante.

Tabla 13: Comparación del grado de inflamación a los 28 días de provocar las heridas en lengua, en relación a la forma de aplicar el PRFC (n = 9 biopsias ya que un animal que iba a ser biopsiado a los 28 días de provocarle dos heridas en lengua: una con PRGF y otra control, murió durante el estudio).

Tabla de contingencia PRFCgeloinfiltrado * gradoinflamlengua

Recuento

		gradoinflamlengua	Total
		4	
PRFCgeloinfiltrado	1	5	5
	2	4	4
Total		9	9

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor
Chi-cuadrado de Pearson	. ^a
N de casos válidos	9

a. No se calculará ningún estadístico porque gradoinflamlengua es una constante.

Tabla 14: Comparación del grado de reepitelización a los 7 días de provocar las heridas en piel en relación a la forma de aplicar el PRFC (n = 10 muestras).

Tabla de contingencia PRFCgeloinfiltrado * reepitpiel

Recuento		reepitpiel			Total
		2	3	4	
PRFCgeloinfiltrado	1	1	0	4	5
	2	0	1	4	5
Total		1	1	8	10

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	2,000 ^a	2	,368
Razón de verosimilitud	2,773	2	,250
Asociación lineal por lineal	,220	1	,639
N de casos válidos	10		

a. 6 casillas (100,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,50.

Tabla 15: Comparación del grado de inflamación a los 7 días de provocar las heridas en piel en relación a la forma de aplicar el PRFC (n = 10 muestras).

Tabla de contingencia PRFCgeloinfiltrado * gradoinflampiel

Recuento		gradoinflampiel			Total
		2	3	4	
PRFCgeloinfiltrado	1	1	3	1	5
	2	0	2	3	5
Total		1	5	4	10

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	2,200 ^a	2	,333
Razón de verosimilitud	2,634	2	,268
Asociación lineal por lineal	1,976	1	,160
N de casos válidos	10		

a. 6 casillas (100,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,50.

Tabla 16: Comparación del grado de reepitelización a los 28 días de provocar las heridas en piel en relación a la forma de aplicar el PRFC (n = 7 muestras ya que un animal que iba a ser biopsiado a los 28 días de provocarle dos heridas en lengua: una con PRGF y otra control, murió durante el estudio y dos muestras se perdieron en la fase de procesamiento de las mismas en el laboratorio).

Tabla de contingencia PRFCgeloinfiltrado * reepitpiel

Recuento		reepitpiel		Total
		3	4	
PRFCgeloinfiltrado	1	1	3	4
	2	0	3	3
Total		1	6	7

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	,875 ^b	1	,350		
Corrección por continuidad	,000	1	1,000		
Razón de verosimilitud	1,243	1	,265		
Estadístico exacto de Fisher				1,000	,571
Asociación lineal por lineal	,750	1	,386		
N de casos válidos	7				

a. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

b. 4 casillas (100,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,43.

Tabla 17: Comparación del grado de inflamación a los 28 días de provocar las heridas en piel en relación a la forma de aplicar el PRFC (n = 7 muestras ya que un animal que iba a ser biopsiado a los 28 días de provocarle dos heridas en lengua: una con PRGF y otra control, murió durante el estudio y dos muestras se perdieron en la fase de procesamiento de las mismas en el laboratorio).

Tabla de contingencia PRFCgeloinfiltrado * gradoinflampiel

Recuento

		gradoinflampiel		Total
		3	4	
PRFCgeloinfiltrado	1	1	3	4
	2	0	3	3
Total		1	6	7

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	,875 ^b	1	,350		
Corrección por continuidad ^a	,000	1	1,000		
Razón de verosimilitud	1,243	1	,265		
Estadístico exacto de Fisher				1,000	,571
Asociación lineal por lineal	,750	1	,386		
N de casos válidos	7				

a. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

b. 4 casillas (100,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,43.

2. TEJIDOS DUROS (RADIOLOGÍA DE LAS TIBIAS)

Tabla 18: Resultados radiológicos a 1 mes de producir defectos óseos en tibias derechas de conejos y rellenarlos con PRFC o nada (se realizan 20 defectos óseos en 10 tibias, pero se pierden 2 tibias con 4 defectos óseos, n = 16 defectos óseos)

Relleno del defecto óseo

- 1. Relleno con PRFC
- 2. Nada (control)

Resultados radiológicos

- 0. No cerrado
- 1. Parcialmente cerrado
- 2. Totalmente cerrado

Resumen del procesamiento de los casos

	Casos					
	Válidos		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
PRFCynada * Radiografía	16	100,0%	0	,0%	16	100,0%

Tabla de contingencia PRFCynada * Radiografía

Recuento

		Radiografía			Total
		0	1	2	
PRFCynada	1	1	4	3	8
	2	5	3	0	8
Total		6	7	3	16

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	5,810 ^a	2	,055
Razón de verosimilitud	7,213	2	,027
Asociación lineal por lineal	5,444	1	,020
N de casos válidos	16		

- a. 6 casillas (100,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 1,50.

Tabla 19: Resultados radiológicos a 2 meses de producir defectos óseos en tibias derechas de conejos y rellenarlos con PRFC o nada (se realizan 20 defectos óseos en 10 tibias, pero se pierden 4 tibias con 8 defectos óseos, n = 12 defectos óseos)

Relleno del defecto óseo

- 1. Relleno con PRFC
- 2. Nada (control)

Resultados radiológicos

- 0. No cerrado
- 1. Parcialmente cerrado
- 2. Totalmente cerrado

Resumen del procesamiento de los casos

	Casos					
	Válidos		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
PRFCynada * Radiografía	12	100,0%	0	,0%	12	100,0%

Tabla de contingencia PRFCynada * Radiografía

Recuento

		Radiografía			Total
		0	1	2	
PRFCynada	1	0	2	4	6
	2	2	4	0	6
Total		2	6	4	12

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	6,667 ^a	2	,036
Razón de verosimilitud	8,997	2	,011
Asociación lineal por lineal	5,824	1	,016
N de casos válidos	12		

- a. 6 casillas (100,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 1,00.

Tabla 20: Resultados radiológicos a 1 mes de producir defectos óseos en tibias izquierdas de conejos y rellenarlos con autoinjerto + PRFC o autoinjerto sólo (se realizan 20 defectos óseos en 10 tibias, pero se pierden 5 tibias con 10 defectos óseos, n = 10 defectos óseos)

Relleno del defecto óseo

- 1. Autoinjerto + PRFC
- 2. Autoinjerto sólo

Resultados radiológicos

- 0. No cerrado
- 1. Parcialmente cerrado
- 2. Totalmente cerrado

Resumen del procesamiento de los casos

	Casos					
	Válidos		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
Autoinjertocon PRFCyautoinjertosólo * Rqdiografía	10	100,0%	0	,0%	10	100,0%

Tabla de contingencia AutoinjertoconPRFCyautoinjertosólo * Rqdiografía

Recuento

		Rqdiografía			Total
		1	2	3	
Autoinjertocon PRFCyautoinjertosólo	1	0	3	2	5
	2	3	2	0	5
Total		3	5	2	10

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	5,200 ^a	2	,074
Razón de verosimilitud	7,133	2	,028
Asociación lineal por lineal	4,592	1	,032
N de casos válidos	10		

a. 6 casillas (100,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a

5. La frecuencia mínima esperada es 1,00.

Tabla 21: Resultados radiológicos a 2 meses de producir defectos óseos en tibias izquierdas de conejos y rellenarlos con autoinjerto + PRFC o autoinjerto sólo (se realizan 20 defectos óseos en 10 tibias, pero se pierden 4 tibias con 8 defectos óseos, n = 12 defectos óseos)

Relleno del defecto óseo

- 1. Autoinjerto + PRFC
- 2. Autoinjerto sólo

Resultados radiológicos

- 0. No cerrado
- 1. Parcialmente cerrado
- 2. Totalmente cerrado

Resumen del procesamiento de los casos

	Casos					
	Válidos		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
Autoinjertocon PRFCyautoinjertosólo * Radiografía	12	100,0%	0	,0%	12	100,0%

Tabla de contingencia AutoinjertoconPRFCyautoinjertosólo * Radiografía

Recuento		Radiografía			Total
		1	2	3	
Autoinjertocon PRFCyautoinjertosólo	1	0	3	3	6
	2	2	4	0	6
Total		2	7	3	12

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	5,143 ^a	2	,076
Razón de verosimilitud	7,075	2	,029
Asociación lineal por lineal	4,661	1	,031
N de casos válidos	12		

a. 6 casillas (100,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 1,00.

3. TEJIDOS DUROS (HISTOPATOLOGÍA DE LAS TIBIAS)

Tabla 22: Comparación de los resultados histomorfométricos a 1 mes de producir defectos óseos en tibias derechas de conejos y rellenarlos con PRFC o nada (se realizan 20 defectos óseos en 10 tibias, pero se pierden 6 defectos óseos con PRFC y 7 controles) (n = 7 defectos óseos: 4 con PRFC y 3 controles)

Relleno del defecto óseo

- 1. Relleno con PRFC
- 2. Nada (control)

Estadísticos de grupo

	PRFCynada	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
Histomorfometría	1	4	28,5800	11,22738	5,61369
	2	3	22,9067	12,23654	7,06477

Prueba de muestras independientes

	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
								Inferior	Superior
Histomorfometría	,177	,691	,638	5	,552	5,67333	8,89138	7,18269	28,52935
								18,90510	30,25177
			,629	4,205	,562	5,67333	9,02355		

Estadísticos de contraste^a

	Histomorfometría
Diferencias más extremas	Absoluta Positiva Negativa
Z de Kolmogorov-Smirnov	,546
Sig. asintót. (bilateral)	,927

a. Variable de agrupación: PRFCynada

Estadísticos de contraste^b

	Histomorfometría
U de Mann-Whitney	5,000
W de Wilcoxon	11,000
Z	-,354
Sig. asintót. (bilateral)	,724
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	,857 ^a

a. No corregidos para los empates.

b. Variable de agrupación: PRFCynada

Tabla 23: Comparación de los resultados histomorfométricos a 2 meses de producir defectos óseos en tibias derechas de conejos y rellenarlos con PRFC o nada (se realizan 20 defectos óseos en 10 tibias, pero se pierden 7 defectos óseos con PRFC y 7 controles) (n = 6 defectos óseos: 3 con PRFC y 3 controles)

Relleno del defecto óseo

- 1. Relleno con PRFC
- 2. Nada (control)

Estadísticos de grupo

	PRFCynada	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
Histomorfometría	1	3	41,0267	9,15070	5,28316
	2	3	30,5933	5,69180	3,28616

Prueba de muestras independientes

	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
								Inferior	Superior
Histomorfometría: Se han asumido varianzas iguales No se han asumid varianzas iguales	1,537	,283	1,677	4	,169	10,43333	6,22179	-6,84111	27,70778
			1,677	3,346	,183	10,43333	6,22179	-8,25754	29,12420

Estadísticos de contraste^a

		Histomorfometría
Diferencias más extremas	Absoluta	,667
	Positiva	,000
	Negativa	-,667
Z de Kolmogorov-Smirnov		,816
Sig. asintót. (bilateral)		,518

a. Variable de agrupación: PRFCynada

Estadísticos de contraste^b

	Histomorfometría
U de Mann-Whitney	2,000
W de Wilcoxon	8,000
Z	-1,091
Sig. asintót. (bilateral)	,275
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	,400 ^a

a. No corregidos para los empates.

b. Variable de agrupación: PRFCynada

Tabla 24: Comparación de los resultados histomorfométricos obtenidos a 1 mes de producir defectos óseos en tibias izquierdas de conejos y rellenarlos con autoinjerto + PRFC o autoinjerto sólo (se realizan 20 defectos óseos en 10 tibias, pero se pierden 7 defectos óseos con autoinjerto + PRFC y 7 con autoinjerto sólo) (n = 6 defectos óseos: 3 con autoinjerto + PRFC y 3 con autoinjerto sólo)

Relleno del defecto óseo

- 1. Autoinjerto + PRFC
- 2. Autoinjerto sólo

Estadísticos de grupo

	Autoinjertocon PRFCyautoinjertosólo	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
Histomorfometría	1	3	35,0067	5,31869	3,07075
	2	3	34,6167	16,93823	9,77929

Prueba de muestras independientes

	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias							
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia		
								Inferior	Superior	
Histomorfometría	Se han asumido varianzas iguales	4,301	,107	,038	4	,971	,39000	10,25007	28,06877	28,84877
	No se han asumido varianzas iguales			,038	2,391	,973	,39000	10,25007	37,47845	38,25845

Estadísticos de contraste^a

		Histomorfometría
Diferencias más extremas	Absoluta	,333
	Positiva	,333
	Negativa	-,333
Z de Kolmogorov-Smirnov		,408
Sig. asintót. (bilateral)		,996

a. Variable de agrupación: AutoinjertoconPRFCyautoinjertosólo

Estadísticos de contraste^b

	Histomorfometría
U de Mann-Whitney	4,000
W de Wilcoxon	10,000
Z	-,218
Sig. asintót. (bilateral)	,827
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	1,000 ^a

a. No corregidos para los empates.

b. Variable de agrupación:
AutoinjertoconPRFCyautoinjertosólo

Tabla 25: Comparación de los resultados histomorfométricos obtenidos a 2 meses de producir defectos óseos en tibias izquierdas de conejos y rellenarlos con autoinjerto + PRFC o autoinjerto sólo (se realizan 20 defectos óseos en 10 tibias, pero se pierden 7 defectos óseos con autoinjerto + PRFC y 7 con autoinjerto sólo) (n = 6 defectos óseos: 3 con autoinjerto + PRFC y 3 con autoinjerto sólo)

Relleno del defecto óseo

- 1. Autoinjerto + PRFC
- 2. Autoinjerto sólo

Estadísticos de grupo

	Autoinjertocon PRFCyautoinjertosólo	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
Histomorfometría	1	3	40,6333	14,74183	8,51120
	2	3	46,0433	10,36597	5,98479

Prueba de muestras independientes

	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
								Inferior	Superior
Histomorfometr	,769	,430	-,520	4	,631	-5,41000	10,40472	84,29814	23,47814
								No se han asumid varianzas iguales	-,520

Estadísticos de contraste^a

		Histomorfometría
Diferencias más extremas	Absoluta	,333
	Positiva	,333
	Negativa	-,333
Z de Kolmogorov-Smirnov		,408
Sig. asintót. (bilateral)		,996

a. Variable de agrupación: AutoinjertoconPRFCyautoinjertosólo

Estadísticos de contraste^b

	Histomorfometría
U de Mann-Whitney	4,000
W de Wilcoxon	10,000
Z	-,218
Sig. asintót. (bilateral)	,827
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	1,000 ^a

a. No corregidos para los empates.

b. Variable de agrupación:
AutoinjertoconPRFCyautoinjertosólo