

**UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
ESCUELA DE ODONTOLOGÍA
CÁTEDRA DE CIRUGÍA ORAL Y MÁXILOFACIAL**

**“ESTUDIO CLÍNICO CONTROLADO DE REGENERACIÓN
ÓSEA CON PLASMA RICO EN PLAQUETAS”**

Seminario de Tesis Requisito para Optar al Título de Cirujano Dentista



**Alumnos: Giordana David Nazer
Fernando Ramírez Osé**

Docente Guía: Dr. Máximo Hernández

**Docentes Colaboradores: Dr. Pablo Quiroz
Dr. Bernardo Venegas**

Valparaíso, octubre de 2004

A mis padres, hermana y tata por su apoyo incondicional durante mi etapa de formación universitaria, los quiero mucho.

Giordana David Nazer

A mis padres, por apoyarme cada vez que empecé de nuevo y por su incansable paciencia.

A mi hermana Karem, por enseñarme a soñar y creer que siempre puedo llegar más allá.

A ti, Natacha por amarme incondicionalmente y estar a mi lado todos estos años a pesar de todas las dificultades, simplemente gracias y te amo.

Al Dr. Quiroz por apoyarme en mi formación académica desde hace mucho tiempo.

Fernando Ramírez Osé

AGRADECIMIENTOS

Doctor Pablo Quiroz, le agradecemos su apoyo, dedicación y compromiso entregados durante todo el desarrollo de nuestra tesis. Por ser el pilar fundamental para que esta tesis fuera realizada exitosamente, MUCHAS GRACIAS!

Doctor Bernardo Venegas, sin tener una obligación con nosotros invirtió gran parte de su tiempo, debemos agradecer su gran ayuda entregada sin otro interés más que el de traspasarnos sus conocimientos.

Al servicio de Cirugía Máxilofacial del Hospital Naval Almirante Neff.

A la doctora María de los Ángeles Rodríguez.

A la señora María Ángela, tecnólogo médico del banco de sangre del Hospital Naval Almirante Neff.

A Yaris, Paula y Gabriela, paramédicos del pabellón de Cirugía Menor del Hospital Naval Almirante Neff.

A Verónica, tecnólogo médico del Hospital Carlos Van Buren.

ÍNDICE

Contenido	Página
INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS	3
OBJETIVO GENERAL	4
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
MARCO TEÓRICO	6
CONSTITUYENTES DEL P. R. P.	10
REPARACIÓN TISULAR ÓSEA NORMAL	12
REGENERACIÓN ÓSEA DESDE INJERTOS	14
INJERTO DE HUESO MEDULAR AUTÓGENO	15
ROL DEL PLASMA RICO EN PLAQUETAS EN EL PROCESO DE CURACIÓN DE LA HERIDA	18
RESPUESTA BIOLÓGICA AL GEL DE P. R. P.	19
OBTENCIÓN DEL P. R. P.	19
APLICACIONES CLÍNICAS DEL P. R. P.	20
MATERIALES Y MÉTODOS	21
COLECCIÓN SANGUÍNEA	22
OBTENCIÓN DEL P. R. P.	22
PROTOCOLO QUIRÚRGICO	22
ESTUDIO IMAGENOLÓGICO	24
ESTUDIO HISTOLÓGICO	24
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	27
RESULTADOS	28
DISCUSIÓN	36
CONCLUSIONES	39
SUGERENCIAS	40
RESUMEN	41
BIBLIOGRAFÍA	42
ANEXOS	44

INTRODUCCIÓN

Desde la aparición de los primeros estudios científicos sobre el plasma rico en plaquetas o, como se le llama actualmente, plasma rico en factores de crecimiento tisular, se ha desarrollado una vertiginosa carrera por la utilización de esta sustancia, que se describe con maravillosas cualidades, variedad de usos y su potencia para participar en la regeneración de tejidos.

Sin embargo, es muy importante analizar detalladamente los antecedentes aportados por la literatura y la forma en que se han desarrollado estos estudios. Para nosotros es fundamental mostrar que a la vista de estos antecedentes, actualmente no podemos decir con la rigurosidad deseada que todas las cualidades nombradas para el plasma rico en factores de crecimiento tisular sean tan aplicables como se ha descrito.

Tanto la literatura reciente como la encontrada desde los años ochenta, no nos permite aseverar que, clínicamente, el aporte de plasma rico en factores de crecimiento en un injerto óseo sea un factor que mejore la calidad o cantidad de los tejidos a regenerar. Creemos que el análisis crítico de esta literatura y, fundamentalmente, de la metodología para realizar los estudios, nos permite plantear dudas que aparecen al revisar estos trabajos. Hemos estudiado acuciosamente la forma en que se produce la regeneración ósea en un injerto y cómo participan las plaquetas en un proceso normal de reparación, pero aún no podemos decir que el aumento de la cantidad de factores de crecimiento liberados por las plaquetas, al aportar un concentrado durante este periodo regenerativo, permita una mejoría significativa en la respuesta tisular.

Queremos plantear una discusión alrededor de la utilización de esta sustancia con el fin de poder aclarar si realmente estamos frente a una sustancia maravillosamente activa en la regeneración tisular o solamente se trata de un aglutinante de partículas y muy buen hemostático en la práctica clínica.

Es de gran importancia para nosotros poder describir con certeza si la utilización de un concentrado plaquetario es un aporte real a nuestro resultado clínico en nuestros pacientes, estamos absolutamente convencidos y lo hemos ratificado en la literatura que el plasma rico en factores de crecimiento actúa como un muy buen hemostático gracias a su alto contenido de plaquetas y que con gran habilidad es capaz de formar una malla de fibrina que se puede utilizar de diferentes maneras en las actividades clínicas, hemos visto cómo con sofisticados estudios inmunohistoquímicos se ha encontrado la presencia de altos contenidos de factores de crecimiento que pueden regular la regeneración tisular, sin embargo, cuando profundizamos en la química y la biología de la respuesta tisular a la reparación, nos encontramos con situaciones que no tienen hasta la fecha respuesta en los planteamientos de la literatura científica.

La complejidad de las reacciones químicas y la forma en que se desarrolla la respuesta biológica entre la matriz extracelular y las células es un punto fundamental para plantear en estos momentos una duda en la efectividad de las reacciones que se espera de estos concentrados

plaquetarios y su acción en la regeneración de los tejidos, sobre todo del tiempo que pueden estas sustancias ser biológicamente activas frente a tan complejas reacciones, como es la regeneración ósea.

Creemos que mediante la utilización de estudios clínicos controlados de regeneración ósea, es la única forma de poder afirmar si realmente las cualidades descritas para estos concentrados plaquetarios son capaces de expresarse en una mejoría real de la calidad o cantidad de tejidos regenerados; la biología y la química de la regeneración está descrita en este estudio para enmarcar nuestra discusión, creemos en los estudios inmunohistoquímicos que describen la presencia de factores de crecimiento tisular en las plaquetas y sabemos las cualidades de éstos en la reparación y regeneración tisular, sin embargo, queremos comprobar si esta aplicación concentrada de sustancias bioactivas es capaz de estimular a tal magnitud como para acelerar o mejorar la formación de estructuras óseas.

MARCO TEÓRICO

El plasma rico en plaquetas (P. R. P.) es el componente básico del gel de plaquetas. El P.R.P. se define como aquel hemoderivado que posee un recuento de plaquetas que varía entre 500.000 y 1.000.000 por mL (Whitman y cols., 1997; Sánchez y cols., 2003) y que se obtiene mediante la centrifugación y separación de los componentes básicos de la sangre. Este P. R. P., en combinación con trombina y cloruro de calcio, da origen al gel de plaquetas.

El gel de plaquetas es una modificación del sellante de fibrina (“fibrin glue”), realizado a partir de sangre autóloga y que es utilizado para entregar factores de crecimiento en altas concentraciones a sitios que recibirán injertos óseos (Sánchez y cols., 2003).

El sellante de fibrina es un biomaterial que fue desarrollado en respuesta a la necesidad de proveer un agente con propiedades hemostáticas y de adhesión quirúrgica (Whitman y cols., 1997; Sánchez y cols., 2003). Está descrito clásicamente, como una mezcla de componentes en la que el fibrinógeno, factor XIII (factor estabilizante de la fibrina) y fibronectina son añadidas a la unión de trombina, cloruro de calcio y un inhibidor de la fibrinólisis formando, de este modo, un tapón de fibrina. La trombina, en presencia de calcio, transforma el fibrinógeno en fibrina (en la vía común de la cascada de la coagulación); adicionalmente, la trombina activa al factor XIII, transformando la fibrina en un coágulo organizado. El fibrinógeno utilizado es obtenido desde una variedad de fuentes, las que incluyen a donantes aleatorios, donantes únicos, o fuentes autólogas (Whitman y cols., 1997).

La diferencia crítica entre el sellante de fibrina y el gel de plaquetas es la alta concentración de plaquetas y concentración nativa de fibrinógeno en el gel de plaquetas. Las plaquetas, una vez que son activadas en presencia de trombina, liberan una gran cantidad de factores de crecimiento, los que comienzan la formación de un andamiaje para el desarrollo del tapón de fibrina (Sánchez y cols., 2003).

La gran cantidad de potenciales usos del sellante de fibrina en el campo de la cirugía oral y máxilofacial, fue introducida en la literatura de habla inglesa por Matras en 1982. Ella describió el sellante de fibrina como poseedor de cualidades de sellado de tejidos, hemostasia, y promoción de la curación de heridas. En su artículo de 1982 y en una actualización de 1985, Matras presentó reportes de casos de su uso para anastomosis microvasculares y microneurales, como agente hemostático de tejidos blandos dañados, como reemplazo de materiales de sutura, en pequeñas heridas de la piel y en injertos de piel, en reducción de fracturas conminutas y en cierres duros. El sellante de fibrina desarrollado por Matras y sus colaboradores es actualmente comercializado en Europa bajo la marca de Tisseel, sin embargo, nunca ha sido aprobado por la F. D. A. debido a la posibilidad de riesgo de transmisión viral asociada a su uso, reportándose al menos un caso documentado de transmisión de VIH por usar una base crioprecipitada homóloga de sellante de fibrina. (Whitman y cols., 1997).

En 1994, Tayapongsak y cols. introdujeron la idea de añadir adhesivo de fibrina autóloga (A. F. A.) al hueso medular durante los procedimientos de reconstrucción mandibular. Ellos identificaron una consolidación radiográfica temprana de hueso en 33 casos; lo que fue atribuido al mejoramiento en la osteoconducción producido por células osteogénicas del injerto en virtud de la malla de fibrina desarrollada por el A. F. A. También reportaron una destacable adhesión al ligar las partículas porosas de hueso medular, durante la colocación del injerto. Tayapongsak y cols. produjeron su A. F. A. en un banco de sangre, separando una unidad sanguínea en los componentes de células rojas y fracción plasmática, para ser usada dentro de las siguientes dos a tres semanas como crioprecipitado. Esto fue descongelado por un periodo de 24 horas, obteniendo un concentrado rico en fibrinógeno, de 10 a 15 mL (Marx y cols., 1998).

Desde principios de los 90's se ha explorado la obtención y concentración de plaquetas autólogas en el plasma (plasma rico en plaquetas o P. R. P.) y estudiado los factores de crecimiento contenidos en estas plaquetas, en relación al mejoramiento biológico en la continuidad del injerto óseo (Marx y cols., 1998).

En el año 1998, Marx y cols. propusieron un modelo de regeneración ósea a partir de injertos, basado en la acción del gel de plaquetas. En este modelo se puede ejemplificar cómo los factores de crecimiento PDGF y TGF- β , pueden influenciar la regeneración ósea normal, y cómo el incremento de las cantidades de cada factor, añadiendo P. R. P., produce una más rápida tasa de hueso formado y una mayor cantidad de éste (Marx y cols., 1998).

En el año 2003, Lacoste y cols. enunciaron lo siguiente: "... El proceso osteogénico no ocurre antes de la segunda semana después del trauma, y algunos factores de crecimiento administrados durante la cirugía son degradados antes de que ellos sean necesarios. Este problema fue solucionado con el uso de factores de crecimiento de liberación controlada, reforzando la importancia de la obtención de concentraciones óptimas de factores de crecimiento a través del tiempo...".

En el año 2003, Zechner y cols. realizaron un estudio histológico e histomorfométrico en cerdos, en el cual aplicaron P. R. P. en la superficie de implantes dentarios con superficies tratadas de diferente manera, que posteriormente fueron colocados en la zona de premolares mandibulares. El porcentaje de falla durante el proceso de oseointegración no fue significativamente diferente para los implantes con P. R. P. que para aquéllos sin éste. El análisis de los datos histomorfométricos no pudo mostrar una interrelación entre el factor P. R. P. y el factor diseño del implante.

Para el año 2003 sólo seis estudios basados en humanos han sido hallados en la literatura de implantología, y cinco de ellos fueron series o reportes de casos; otros dos reportes de casos fueron encontrados en la literatura médica general, lo que manifiesta una clara carencia de evidencia científica que avale la utilización de P. R. P. durante los procedimientos de aumento óseo. Esta brillante y potencialmente promisoría técnica requiere de estudios bien diseñados y controlados para proveer evidencia de su eficacia (Sánchez y cols., 2003).

Debido a lo anterior, se hace necesario realizar una revisión de la bibliografía existente para comprobar la escasa evidencia con la que son obtenidos los datos y las conclusiones de las diversas investigaciones. Esta comparación se detalla en la tabla I:

Tabla I: Análisis Crítico de la Literatura

ESTUDIO	AUTOR	TIPO DE ESTUDIO	GRUPO ESTUDIADO	EVIDENCIA	APORTE
Platelet Plasma	Rich Marx y cols., 1998	Casos y controles	<u>Humanos</u>	Radiográfica Histológica	La evidencia histológica no está explicada de forma clara y detallada. Conclusiones basadas en inferencias teóricas.
Comparison of Platelet-rich plasma, Bovine 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.	Lekovic y cols., 2002	Comparativo de reentrada A doble ciego	<u>Humanos</u>	Examen clínico para determinar profundidad de sondaje.	La medición de sondaje carece totalmente de rigor científico y no puede ser reproducido al ser altamente subjetiva.
Platelet-rich plasma derived fibrin clot formation stimulates collagen synthesis in periodontal ligament and osteoblastic cells in vitro	Kawase y cols., 2003	Descriptivo experimental	Celulas vitro	in Inmuno-histoquímica	No realizado en humanos
Platelet rich plasma contains high levels of platelet-derived growth factor and transforming growth factor- β and modulates the proliferation of periodontal related cells in vitro.	Okuda y cols., 2003	Descriptivo experimental	Células vitro	in Inmuno-citoquímica	No realizado en humanos

Platelet concentrates: effects of calcium and trombin on endothelial cell proliferation and growth factor release	Lacoste cols., 2003	y	Descriptivo experimental	Células in vitro	in	Recuento de factores de crecimiento	de	No realizado en humanos	en
Alveolar ridge and sinus augmentation utilizing platelet rich plasma in combination with freeze dried bone allograft: case series.	Kassolis cols., 2000	y	Reporte casos	de <u>Humanos</u>		Evaluación histológica		Reporte de casos que no entregan evidencia confiable.	
Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants	Anitua, 1999		Casos controles	y <u>Humanos</u>		Histológica		Descripción clínica adecuada, pero confusa metodología científica y falta de claridad en los resultados.	
Is platelet rich plasma the perfect enhancement factor? A current review	Sánchez cols., 2003	y	Revisión bibliográfica	-----		-----		Extenso y relevante estudio bibliográfico.	
Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and Maxillofacial surgery.	Whitman y cols., 1997		Descriptivo	<u>Humanos</u>		No registrada		Al no registrar evidencia, no puede realizar aportes.	
Influence of platelet rich plasma on osseous healing of dental implants: a histologi and histomorphometric study in minipigs	Zechner cols., 2003	y	Experimental	Cerdos		Histomorfométrica		No realizada en humanos.	
Stimulation of repair in chronic, nonhealing, cutaneous ulcers using platelet derived wound healing formula	Knighton cols., 1990	y	Casos controles	y <u>Humanos</u>		Clínica		Aporta evidencia sólo en el campo de regeneración de tejidos blandos.	

Autologous fibrin adhesive mandibular reconstruccion with particulate cancellous bone and marrow glue from intraoperatively collected platelet-rich plasma	Tayapongsak y cols., 1994	Reporte de casos	de <u>Humanos</u>	Radiográfica (panorámicas)	La evidencia radiográfica no es concluyente y carece de rigor científico
Autologous fibrin glue from intraoperatively collected platelet-rich plasma	Mehmet y cols., 1992	Reporte de un caso	de un <u>Humanos</u>	Clínica.	La evidencia de un caso clínico no puede ser considerada concluyente.

CONSTITUYENTES DEL P. R. P.

El P. R. P. es activado por la adición de clorhidrato de calcio y trombina, lo que resulta en la liberación de una cascada de factores de crecimiento desde los gránulos alfa contenidos en las plaquetas. Estos factores son un grupo de polipéptidos, que tienen importantes roles en la regulación del crecimiento y desarrollo de muchos tejidos (Sánchez y cols., 2003).

Los factores contenidos en el P. R. P. son:

- Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF)
- Factor transformante beta (TGF- β)
- Factor de crecimiento insulínico 1 (IGF 1)
- Factor de crecimiento epidermal derivado de plaquetas (PDEGF)
- Factor angiogénico derivado de plaquetas (PDAF), y
- Factor 4 plaquetario (PF4)

Los siguientes factores de crecimiento descritos son los que juegan un rol más importante en el proceso de regeneración ósea.

Factor de crecimiento derivado de plaquetas: Existen dos genes responsables de la codificación del PDGF: la cadena A, ubicada en el cromosoma 7, y la cadena B, ubicada en el cromosoma 22. Debido a lo anterior, existen dos isoformas de PDGF (A y B), que actúan en dos estructuras diferentes a nivel de las células blanco, receptores α y receptores β , para la isoforma A y la isoforma B, respectivamente. La unión a receptores α y β inducen la respuesta mitogénica; mientras que los receptores β , pero no los α , median la estimulación de la quimiotaxis (Marx y cols., 1998; Anitua, 1999). El PDGF es almacenado en los gránulos alfa de las plaquetas y liberado durante la cascada de la coagulación, se encuentra también en monocitos, macrófagos, células musculares lisas y células endoteliales (Sánchez y cols., 2003; Anitua, 1999). La acción del PDGF es estimular la síntesis de ADN y proteínas en hueso, como también la reabsorción ósea. Actúa también, como un potente mitógeno en el suero para células mesenquimáticas, incluyendo fibroblastos y células musculares lisas. El efecto del PDGF está basado en la

presencia de otros factores de crecimiento y también sirve como un poderoso quimioatrayente para células musculares lisas, fibroblastos, macrófagos y leucocitos. En adición a sus propiedades angiogénicas, estimula la formación de colágeno y matriz in vivo (Sánchez y cols., 2003). Además, la aplicación tópica de PDGF ha demostrado acelerar la curación de heridas en tejido blando, así como la administración de PDGF exógeno ha mejorado la diferenciación osteogénica y la reparación ósea en fracturas. Estudios recientes concluyeron que este factor puede mejorar la reparación y regeneración del ligamento periodontal (Kassolis y cols., 2000).

Factor de crecimiento transformante β : Existen tres tipos diferentes de TGF- β , TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3. El TGF- β 1 se encuentra en altas concentraciones en hueso y plaquetas (Sánchez y cols., 2003; Anitua, 1999). El TGF- β es liberado por las plaquetas o secretado por los macrófagos, ejerciendo su acción sobre las células adyacentes, dentro de las cuales se incluyen fibroblastos, células medulares, células endoteliales y preosteoblastos. El TGF- β estimula la angiogénesis y la producción de fibronectina, glicosaminoglicanos y colágeno en el tejido conectivo. Una de las más importantes funciones del TGF- β es de ser un agente mitogénico y quimiotáctico de precursores osteoblásticos (Sánchez y cols., 2003). Además, inhibe la formación de osteoclastos y la reabsorción, favoreciendo la formación ósea (Sánchez y cols., 2003; Anitua, 1999). Un mecanismo catabólico fundamental en la acción del TGF- β es su habilidad para ser antagonista de los efectos mitogénicos de otros factores de crecimiento, como PDEGF y PDGF. Incluso, en una célula tipo la acción de los factores de crecimiento puede depender de la presencia de otras sustancias, por ejemplo, TGF- β in vitro estimula la acción de PDGF sobre los fibroblastos, pero inhibe la acción del PDEGF; en tanto que in vivo TGF- β aumenta la proliferación y migración de macrófagos, fibroblastos y células endoteliales, mientras que in vitro, inhibe la proliferación de células vasculares endoteliales (Sánchez y cols., 2003).

Factor de crecimiento insulínico 1: El IGF 1 estimula el crecimiento de cartílago, la formación de matriz ósea y la replicación de preosteoblastos y osteoblastos. El IGF 1 posee función autocrina mediante el aumento de la actividad de la fosfatasa alcalina en las células osteoblásticas. El IGF 1 ha sido aislado desde los macrófagos en heridas, lo que sugiere que este factor de crecimiento puede actuar como un mensajero local (función paracrina). El IGF 1 en combinación con PDGF puede mejorar el porcentaje y la calidad de la curación de la herida (Sánchez y cols. 2003).

Factor angiogénico derivado de plaquetas: El PDAF tiene la capacidad de inducir la vascularización in vivo. Estimula a las células vasculares endoteliales por acción directa e indirecta y está involucrado en los procesos mediante los cuales nuevos vasos sanguíneos invaden los tejidos no vascularizados. Variadas citoquinas y factores de crecimiento regulan al PDAF, incluyendo a IGF 1, TGF α y β , PDGF, bFGF (factor de crecimiento básico de fibroblastos), PDEGF e interleuquina 1 β . Este factor es ampliamente expresado por la inducción de hipoxia (Sánchez y cols., 2003).

Los siguientes factores de crecimiento también están asociados al proceso de regeneración ósea, pero su rol es de menor importancia que el de los anteriormente descritos.

Factor epidermal derivado de plaquetas: Estimula la regeneración epidermal, promueve la curación de la herida por estimulación de la proliferación de queratinocitos y fibroblastos dermales, y aumenta los efectos y la producción de otros factores de crecimiento (Sánchez y cols., 2003).

Factor plaquetario 4: El PF-4 es un quimioatrayente para neutrófilos, es liberado desde los gránulos α de las plaquetas, siendo probablemente responsable del flujo inicial de los neutrófilos hacia la herida. También actúa como atrayente para fibroblastos y es un potente agente antiheparínico (Sánchez y cols., 2003).

Los factores de crecimiento anteriormente descritos participan en el proceso normal de regeneración ósea, ya sea a partir de una fractura o de un injerto óseo medular. Por tanto, es necesario conocer los mecanismos por los cuales se verifican estos procesos.

REPARACIÓN TISULAR ÓSEA NORMAL

El organismo regenera principalmente sobre la base de dos grandes mecanismos, dependiendo del órgano afectado y del tipo de lesión:

- 1) *Regeneración:* La reparación se efectúa por proliferación de elementos del parénquima, pudiendo resultar una reconstitución casi perfecta de la estructura (Jurlow, 1996).
- 2) *Cicatrización:* Es la reparación propiamente tal, en la cual el aporte principal viene del estroma del tejido conectivo y los elementos parenquimatosos son sustituidos por tejido fibroso permanente, no especializado (Jurlow, 1996).

El tejido óseo es el único tejido que cicatriza logrando un tejido homólogo al original en un proceso denominado consolidación ósea. La cicatriz, en un comienzo fibrosa, evoluciona hacia la osificación. En sujetos jóvenes incluso puede recuperar su forma primaria a través del proceso de remodelación (Jurlow, 1996).

Desde antes de 1960, se conocían las cinco primeras etapas de la secuencia básica de la consolidación ósea (Jurlow, 1996):

- 1) Injuria
- 2) Granulación
- 3) Callo
- 4) Remodelación

5) Modelación

Actualmente, se incluye, además, el concepto de “regional accleratory phenommenom” (RAP).

- 1) *Injuria*: Daña el hueso, el periostio, la médula ósea, y los tejidos blandos adyacentes. Al producirse esta injuria, ocurren dos fenómenos básicos para iniciar la consolidación ósea, que corresponden a las fases de un proceso inflamatorio y en las cuales participan una serie de células. Estos procesos son: a) liberación de mensajeros biofísicos y bioquímicos que determinan respuestas de las células que sobreviven a la injuria, b) se sensibilizan las células sobrevivientes para responder a estos mensajeros locales y sistémicos. Esta etapa dura alrededor de siete días (Jurlow, 1996).
- 2) *Granulación*: O etapa de tejido blando temporal, donde las células precursoras, sensibilizadas y estimuladas por los factores mediadores locales, comienzan a producir células que se diferencian, dando origen a vasos sanguíneos, fibroblastos, células de sostén y otras. Así, se forma un tejido blando de granulación que puentea el defecto. Junto a esto, los osteoclastos remueven el coágulo inicial. Esta etapa puede durar aproximadamente dos semanas (Jurlow, 1996).
- 3) *Callo*: O tejido duro temporal, en el tejido de granulación comienzan a aparecer condroblastos y osteoblastos derivados de la diferenciación de las células presentes en el tejido de granulación. Esta diferenciación está mediada por diversos factores locales, dentro de los cuales los más importantes son proteínas no colágenas (osteocalcina, osteonectina y BMP), factor activador de osteoclastos, prostaglandinas y factores de crecimiento (como IGF-1 y PDGF). Estas células sintetizan la matriz orgánica extracelular de cartílago y hueso esponjoso (Jurlow, 1996).

Alrededor de una semana después, la matriz comienza a mineralizarse. Este proceso de mineralización finaliza después de algunas semanas. Entonces, en las radiografías se evidencia el callo fracturario y, por lo general, ya hay suficiente resistencia como para una actividad progresiva y cuidadosa del hueso afectado. En una fractura, el callo óseo crece principalmente desde el periostio (callo periostal) y el endosito (callo endostal). La formación de callo es más rápida en el hueso esponjoso, depende de la edad y es más rápida en niños. El adulto puede requerir de 4 a 16 semanas para completar el proceso de formación del callo (Jurlow, 1996).

- 4) *Remodelación*: Dentro del callo comienza el proceso de remodelación, reemplazándolo por hueso nuevo, siendo el hecho aislado más importante en este proceso la formación de colágeno tipo I a partir de colágeno tipo III por parte de los osteoblastos. Al parecer, la formación del callo estimularía a las RBMU (remodelling bone multicellular units) (Jurlow, 1996).

Dentro de la remodelación ocurren 4 fenómenos, 1) reemplazo de cartílago remineralizado por hueso no laminillar, 2) reemplazo del hueso no laminillar por hueso laminillar, 3) reemplazo del callo entre los fragmentos fracturados con osteones

secundarios de acuerdo con requerimientos biomecánicos, 4) remoción del callo que ocupa la cavidad medular (Jurlow, 1996).

Este proceso en total demora de 1 a 4 años (Jurlow, 1996).

- 5) *Modelación*: Consiste en reabsorción de hueso y modelación de la superficie cortical endostal y periostal, restituyendo al hueso su forma normal. Este proceso se completa sólo en niños y adolescentes, nunca en adultos (Jurlow, 1996).

La modelación es paralela al proceso de remodelación y el principal factor que lo modela son las fuerzas musculares. Así, aumenta la masa ósea en un hueso sometido a fuerzas compresivas y de tensión, y disminuye en huesos no sometidos a carga (Jurlow, 1996).

- 6) *Proceso aceleratorio regional (RAP)*: Descrito en 1983, consiste básicamente en que la injuria origina la aceleración de los procesos locales normales entre 2 a 10 veces su velocidad basal. Sin ello, los osteoblastos de un fémur necesitarían de 200 a 1.000 años para consolidar una fractura (Jurlow, 1996).

El RAP comienza a producirse a los pocos días de producida la fractura en un máximo de 2 a 10 meses, decreciendo paulatinamente entre los 6 a 24 meses. El RAP es un fenómeno que ocurre siempre y su existencia se hace evidente cuando no se produce, habiendo, por lo tanto, patología (Jurlow, 1996).

REGENERACIÓN ÓSEA DESDE INJERTOS

La regeneración ósea a partir de un injerto se verifica en distinto grado a través de los procesos de osteogénesis, osteoinducción y osteoconducción (Ribbans y Chinchawala, 1999).

La osteogénesis se refiere a la formación de hueso desde un origen no celular. Esto puede ser injerto u otro material. El hueso medular, con su porción de células que lo cubren y osteoblastos activos, tiene gran potencial para formar nuevo hueso, tanto medular como cortical. Simplemente, la osteogénesis se refiere al aumento de la formación de hueso (Ribbans y Chinchawala, 1999).

La osteoinducción se refiere al suministro de células troncales desde los alrededores del injerto, las cuales se diferencian en células que formarán hueso y cartílago. La osteoinducción es mediada por factores de crecimiento derivados del injerto. La matriz ósea desmineralizada es osteoinductiva. Los agentes responsables de esta osteoinducción son (Ribbans y Chinchawala, 1999):

- Proteína morfogenética de hueso (BMP)
- Factor de crecimiento transformante β (TGF- β)

- Factores de crecimiento similares a insulina 1 y 2
- Factores de crecimiento, ácido y básico, de fibroblastos
- Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)
- Interleuquinas

La BMP merece una especial mención, ya que es el principal factor relacionado con la osteoinducción. La BMP es una proteína de bajo peso molecular que inicia la formación de hueso endocondral, presumiblemente por estimulación local de células osteoblásticas y por un mejoramiento en la síntesis de colágeno. Trece BMP's, nombradas del uno al trece, han sido identificadas. Puede ser que exista una BMP catorce que esté clasificada dentro de la súper familia TGF (Ribbans y Chinchawala, 1999).

La osteoconducción se refiere al proceso tridimensional de crecimiento desde el lecho hacia el interior del injerto, de capilares, tejido perivascular y células osteoprogenitoras. Esto puede ser un proceso activo o pasivo. Simplificadamente, el injerto funciona como un enrejado o un andamio para el crecimiento de nuevo hueso (Ribbans y Chinchawala, 1999).

INJERTO DE HUESO MEDULAR AUTÓGENO

La ventaja del hueso medular autógeno radica en ser altamente osteogénico, fácilmente revascularizable y generar rápidamente hueso nuevo. La hidroxiapatita y el colágeno, otros materiales utilizados como injerto, presentan, en cambio, sólo propiedades osteoconductoras y no osteoinductivas. Estos materiales no proveen un soporte estructural para la regeneración del nuevo hueso formado, pero contribuyen a la estabilidad de la estructura ya establecida (Ribbans y Chinchawala, 1999).

El mayor sitio donante para hueso medular autógeno es la cresta ilíaca, sin embargo, su obtención se asocia con una morbilidad significativa, una limitada cantidad disponible y un incremento del tiempo anestésico intraoperatorio (Ribbans y Chinchawala, 1999).

La actividad biológica del injerto resulta de su histocompatibilidad, de la amplia superficie cubierta por osteoblastos y sus precursores, y de la arquitectura trabecular (Ribbans y Chinchawala, 1999).

El hueso cortical autógeno molido y fragmentado no es tan biológicamente activo, pero cuando se mezcla con hueso medular colabora aumentando el volumen del material a injertar (Ribbans y Chinchawala, 1999).

La respuesta del hospedero al injerto se verifica en cinco etapas (Ribbans y Chinchawala, 1999):

- Hemorragia e inflamación.
- Infiltración de vasos sanguíneos al interior del injerto, osteoblastos y precursores de osteoblastos (dos días del posoperatorio).
- Actividad osteoblástica y formación osteoide.
- Remodelación.
- Integración del injerto.

Esto se da a través de una lenta sustitución, que se refiere al proceso por medio del cual el hueso necrótico es reabsorbido y reemplazado por nuevo tejido a lo largo de los canales creados por la invasión de vasos sanguíneos. Esto es análogo a la reparación de una fractura. El proceso es adecuado luego de seis meses, y completo luego de un año (Ribbans y Chinchawala, 1999).

Marx y cols. propusieron un modelo de regeneración para injertos óseos medulares que mantiene el esquema del modelo anterior, pero que además considera la participación de niveles aumentados de factores de crecimiento aportados por medio del gel de plaquetas, lo que conlleva una más rápida tasa de hueso formado y una mayor cantidad de éste.

Este modelo se describe a continuación:

“Un injerto óseo medular, ya sea para corregir un defecto en la continuidad mandibular, una fisura mandibular, o utilizado en una cirugía de levantamiento de seno maxilar, es ubicado dentro del defecto llenado con sangre coagulada. La lesión o el defecto es hipóxico (pO_2 5 - 10 mg. Hg) y acidótico (pH 4 - 6), y contiene plaquetas, leucocitos, eritrocitos y fibrina en un coágulo adyacente a la transferencia de osteocitos, osteoblastos endostales y células medulares troncales. Las células medulares troncales, las que son las primeras células del hueso en regeneración, normalmente existen en un número muy pequeño (aproximadamente 1 por 400.000 células estructurales en un ser humano de 50 años). Justo por fuera del nivel de cierre quirúrgico del periostio, el tejido es fisiológicamente normal. El tejido es normóxico (pO_2 45 - 55 mm Hg) y con pH fisiológico (7,42), y contiene una población de células estructurales, células troncales viables (también en pequeño número) y capilares cortados con coágulos y células endoteliales expuestas. Este ambiente complejo, simplificado en el modelo, comienza, mantiene, y promueve la reparación de hueso maduro relacionado con la injuria y puede ser aprovechado actualmente por cirujanos para promover una regeneración de hueso a partir de un injerto (Marx y cols., 1998).

La regeneración ósea comienza con la liberación de PDGF y TGF- β luego de la degranulación de las plaquetas en el injerto. El PDGF estimula la mitogénesis de las células troncales medulares y los osteoblastos endostales transferidos en el injerto para incrementar su número en gran magnitud. Esto también comienza una angiogénesis de capilares en el injerto por inducción de la mitosis de las células endoteliales. El TGF- β , inicialmente, activa a los fibroblastos y a los preosteoblastos a dividirse e incrementar su número, así como promueve su

diferenciación hacia osteoblastos funcionalmente maduros. La continua secreción de TGF- β influencia a los osteoblastos a entregar matriz ósea y a los fibroblastos a entregar matriz colágena para darle soporte a los capilares en crecimiento. Estas actividades comienzan inmediatamente después de que la herida es cerrada. Al tercer día, los capilares pueden comenzar a penetrar en el injerto. La completa penetración de los capilares al injerto se observa durante los días 14 a 17 (Marx y cols., 1998).

El proceso de evolución de los mamíferos mantiene sólo un pequeño número de células troncales viables; los factores de crecimiento incrementan rápidamente el número de estas células y promueven su actividad durante el tiempo de la injuria. La actividad celular inicial, es pensada como el resultado de algunos factores de crecimiento, principalmente de la acción directa de PDGF y TGF- β . El período de influencia directa de los factores de crecimiento es menor a 5 días, debido a la vida media de las plaquetas en una herida. La regeneración ósea es completada por 2 mecanismos. El primero es el incremento y la activación de la células troncales medulares a osteoblastos, los cuales secretan TGF- β . El segundo, y más dominante mecanismo, parece ser la quimiotaxis y activación de macrófagos que reemplazan a las plaquetas como la fuente primaria de factores de crecimiento después del tercer día. El macrófago es atraído al injerto por la acción de PDGF y por un gradiente de oxígeno entre el injerto y el tejido normal adyacente que es mayor a 20 mm Hg. En efecto, la hipoxia inherente del injerto de 5 a 10 mm Hg establece un gradiente de O₂ de 30 a 40 mm Hg con el tejido normosómico adyacente, el cual tiene una presión de 45 a 55 mm Hg (Marx y cols., 1998).

A medida que el PDGF ejerce su influencia gradualmente, los factores de crecimiento derivado de macrófagos y angiogénico desaparecen. Sin embargo, el factor de crecimiento derivado de macrófagos y el factor angiogénico, sólo sintetizados por macrófagos, pueden ser idénticos al PDGF. Las células troncales medulares secretarán TGF- β para continuar una autoestimulación de formación ósea a modo de respuesta autocrina. Por 4 semanas la revascularización del injerto elimina el gradiente de O₂ necesaria para mantener la actividad macrofágica. Así, el macrófago deja el área, no siendo más requerido por el injerto, que es ahora autosustentable aún inmaduro, constituido por tejido osteoide más que por hueso laminillar maduro (Marx y cols., 1998).

La actual maduración del injerto desde un hueso desorganizado a un hueso laminillar maduro con sistemas haversianos involucra al tercer y final grupo de agentes, los cuales no fueron parte de este estudio y no están contenidos en el P. R. P. Éstos corresponden a la familia de la proteína morfogenética de hueso (BMP). Esta proteína ácido insoluble es liberada por la reabsorción osteoclástica del hueso normal en remodelación, la cual progresa a una proporción de 0,7% por día en un hueso normal, pero puede ocurrir tan rápido como 5% a 8% por día en el injerto de hueso maduro. La liberación de BMP une la reabsorción ósea a una nueva formación ósea por acción de células troncales adyacentes que incrementan su número y se diferencian a osteoblastos funcionales que secretan activamente matriz ósea. Así, al ciclo del injerto desde un trasplante celular, que es colocado dentro de un complejo ambiente bioquímico, progresa a hueso funcional maduro que es autosustentado a través de el ciclo normal de reabsorción - remodelación." (Marx y cols., 1998).

ROL DEL PLASMA RICO EN PLAQUETAS EN EL PROCESO DE CURACIÓN DE LA HERIDA

El proceso de reparación de la herida puede ser dividido en tres diferentes etapas: activación bioquímica, activación celular y respuesta celular (Sánchez y cols., 2003).

La activación bioquímica involucra la transducción de la injuria mecánica a una señal bioquímica que pueda ser entendida por el organismo. El gatillo que activa la cascada es el factor Hagemann encontrado en el suero. Cuando la injuria causa ruptura de la microcirculación, el plasma entra en contacto con las proteínas tisulares y la membrana basal. Esto activa al factor Hagemann y a las plaquetas circulantes. El factor Hagemann activado, a su vez, comienza diferentes cascadas que amplifican la respuesta inicial y resultan en activación celular. La activación de la cascada de la coagulación produce fibrina, que ayuda en la hemostasia, y trombina que causa la máxima liberación de gránulos alfa desde las plaquetas. La cascada del complemento produce muchas moléculas biológicamente activas, incluyendo la C5a, un poderoso quimioatrayante para neutrófilos y monocitos que son también importantes en la curación de la herida. La cascada de las cininas resulta en la formación de bradicinina, que causa dilatación microvascular en la periferia de la herida, y la activación de plasminógeno, que produce plasmina, la cual degrada a la fibrina. Los productos de degradación de la fibrina que resultan del quiebre enzimático de ésta son, asimismo, moléculas biológicamente activas que pueden causar migración de monocitos y vasodilatación (Sánchez y cols., 2003).

La etapa de activación celular resulta en el flujo de células hacia la herida. La primera respuesta celular involucra neutrófilos, monocitos y plaquetas. Las plaquetas se acumulan en la herida como respuesta a la injuria inicial; en respuesta a la trombina, las plaquetas liberan gránulos alfa, que contienen factores de crecimiento de acción local. Estos factores indican a las células mesenquimáticas y epidermales locales a migrar, dividirse y aumentar su síntesis de colágeno y glicosaminoglicanos. Esta liberación inicial está pensada para acentuar la respuesta reparativa (Sánchez y cols., 2003).

Los monocitos transformados en macrófagos están involucrados en la respuesta celular final. Estas células asisten a los neutrófilos en su rol defensivo y producen una variedad de factores de crecimiento, los que dirigen la reparación hasta que la herida es sanada (Sánchez y cols., 2003).

RESPUESTA BIOLÓGICA AL GEL DE P. R. P.

El P. R. P. entrega un recuento plaquetario de un 338% superior al obtenido en la sangre normal. Al ser un preparado autólogo, minimiza el riesgo de transmisión de enfermedades, así como la posibilidad de reacción inmunológica (Sánchez y cols., 2003).

Las propiedades del P. R. P. están basadas en la producción y liberación de múltiples factores de crecimiento y diferenciación luego de la activación plaquetaria. Estos factores son críticos en la regulación y estimulación de curación de heridas, y juegan un importante rol en procesos celulares como mitogénesis, quimiotaxis, diferenciación y metabolismo (Sánchez y cols., 2003).

Por esta razón, los factores de crecimiento contenidos y liberados desde el P. R. P. mejorarían y acelerarían la curación de tejidos blandos y el proceso de regeneración ósea. Estudios con aplicación de factores de crecimiento únicos o combinados, usando PDGF o PDGF/IGF-1 han sido propuestos para mejorar la cascada de reparación de tejidos, tanto in vitro como in vivo (Sánchez y cols., 2003).

Reportes recientes han sugerido, que una epitelización más rápida, hueso más denso y maduro con trabeculado mejor organizado y una mejor regeneración ósea tienen lugar cuando el gel de plaquetas es añadido a los injertos de hueso alógenos y autógenos. La mayor parte de estos estudios también sugieren que el gel de plaquetas mejora las propiedades de manipulación del material a injertar, facilitando la colocación y estabilidad del injerto. El P. R. P. entrega una dosis altamente concentrada de plaquetas autólogas, las que contienen una variedad de mediadores biológicos que pueden ser aplicados directamente al sitio de la herida. (Sánchez y cols., 2003).

OBTENCIÓN DEL P. R. P.

Existen tres técnicas básicas para obtener P. R. P. descritas en la literatura. La primera considera la obtención de éste a partir una elevada cantidad de sangre (entre 450 mL y 2.500 mL) (Whitman y cols., 1997; Sánchez y cols., 2003; Marx y cols., 1998; Kassolis y cols., 2000.) y requiere de doble centrifugación. La segunda considera una cantidad de sangre menor (entre 10 mL y 20 mL), realizándose una sola centrifugación (Anitua, 1999; Lekovic y cols., 2002; Kawase y cols., 2003; Okuda y cols., 2003). La tercera considera una cantidad de sangre intermedia, de 150 mL, y requiere doble centrifugación (Lacoste y cols., 2003).

La primera técnica de obtención de P. R. P. autólogo requiere el uso de una separación mediante ultracentrifugación y gradiente de densidad. Aproximadamente, desde 450 mL a 2.500 mL de sangre son extraídos del paciente y directamente depositados en una bolsa para colección sanguínea que contiene citrato – fosfato – dextrosa como anticoagulantes. El uso de EDTA como anticoagulante no es recomendado durante los procedimientos de obtención de P. R. P. porque causa fragmentación de las plaquetas, aunque da un gran campo de plaquetas. Primero, la sangre

es centrifugada a 5.600 revoluciones por minuto (rpm) para separar el plasma pobre en plaquetas (P. P. P.) de las células rojas y de un componente llamado “buffy coat”, que corresponde a una mezcla de plaquetas y leucocitos. Luego se centrifuga el “buffy coat” a 2.400 rpm para obtener por separado 30 mL de P. R. P. desde la bolsa que contenía las células rojas sanguíneas. La obtención de P. R. P. mediante esta técnica se completa en 30 minutos. Esta técnica considera la reincorporación de las células rojas al paciente, mediante un proceso de autotransfusión (Whitman y cols., 1997; Sánchez y cols., 2003; Marx y cols., 1998; Kassolis y cols., 2000.).

La segunda técnica de obtención de P. R. P. utiliza de 10 mL a 20 mL de sangre colectados en un tubo de vidrio que contiene 10% de citrato trisódico como anticoagulante. Se someten los tubos a una sola centrifugación, pudiendo ser a 5.600 rpm (Lekovic y cols., 2002; Kawase y cols., 2003; Okuda y cols., 2003) o a 160 G (Anitua, 1999), ambas por un período de seis minutos a temperatura ambiente. Cualquiera sea el procedimiento de separación efectuado, se obtiene las células rojas en el fondo del tubo, el P. R. P. en la parte media y el P. P. P. en la parte superior. Con esto se obtiene 1 mL a 2 mL de P. R. P.

La tercera técnica considera la extracción de 150 mL de sangre, de los cuales 54 mL son mezclados con 6 mL de citrato dextrosa como anticoagulante y centrifugados a 850 G por 225 segundos. Después de la eliminación de la fracción de células rojas, el remanente es sometido a una nueva centrifugación a 850 G por 13 minutos, obteniéndose por separado P. P. P. y P. R. P. A partir de esta técnica, comúnmente se obtienen 7 mL de P. R. P (Lacoste y cols., 2003).

APLICACIONES CLÍNICAS DEL P. R. P.

Injertos óseos para implantes dentales, procedimientos de levantamiento de senos maxilares, lateralización del nervio alveolar, injertos onlay, reparación de fisuras palatinas, reparación de fistulas oro/nasales y oro/antrales, hemostasia postoperatoria de sitios donantes de hueso, pacientes hemofílicos sometidos a cirugía, reparación de heridas crónicas y úlceras cutáneas (Keenan, 2000).

HIPÓTESIS

El aporte de Plasma Rico en Plaquetas no acelera la velocidad de formación ósea, así como tampoco entrega una mejor calidad del hueso regenerado.

OBJETIVO GENERAL

Determinar, histológicamente, si la aplicación de plasma rico en plaquetas (P. R. P.) al tejido óseo influye en su velocidad de regeneración y en la calidad de éste.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar una revisión crítica a la bibliografía existente.
- Conocer el aporte del P. R. P. a la regeneración ósea.
- Sugerir aplicaciones clínicas para el uso del P. R. P.

MATERIALES Y MÉTODOS

El universo de este estudio correspondió a los pacientes que consultaron al servicio de Cirugía Máxilofacial del Hospital Naval Almirante Neff, para extracción de terceros molares durante el periodo comprendido entre enero y junio de 2004. De éste, se extrajo una muestra de 9 pacientes.

Fueron incluidos en el estudio pacientes de ambos sexos, entre 15 y 23 años de edad, sanos, sin antecedentes mórbidos, con indicaciones de extracción de los 4 terceros molares, con los dos inferiores incluidos simétricamente (óseo y/o submucoso).

A los pacientes se les proporcionó información en forma verbal y escrita sobre el estudio, y una vez que aceptaron formar parte de éste, se les solicitó la firma de un consentimiento informado (ver anexos), el que fue previamente analizado y aprobado para su uso por parte del comité de ética del Hospital Naval Almirante Neff.

Luego de ingresados al estudio, los pacientes fueron sometidos a una serie de exámenes hematológicos para luego extraérseles una unidad sanguínea (450 mL), la cual fue sometida a un proceso de doble centrifugación para obtener aproximadamente 50 mL de P. R. P.

Cada paciente fue sometido a dos procedimientos quirúrgicos, el primero de ellos consistió en la extracción de los dos terceros molares inferiores y la confección de una cavidad ósea, por distal del alvéolo de cada tercer molar extraído. En una de estas cavidades se condensó una mezcla de hueso autógeno más gel de P. R. P. (caso), en tanto que en el lado contrario sólo se condensó hueso autógeno (control). Intraoperatoriamente, el paciente fue autotransfundido con los glóbulos rojos obtenidos de la centrifugación, según protocolo quirúrgico del banco de sangre del Hospital Naval Almirante Neff.

Durante el segundo acto quirúrgico, que fue realizado luego de 12 a 14 semanas del primero, se extrajeron los terceros molares superiores y se tomó una biopsia del tejido óseo de las cavidades confeccionadas durante la primera cirugía. La muestra extraída fue sometida a estudio histológico.

Inicialmente el estudio contempló un total de 20 pacientes, de éstos 3 fueron descartados del estudio debido a que fueron sometidos a la primera cirugía sin la administración endovenosa de corticoides, que sí fueron aplicados a los restantes 17 pacientes, de estos últimos, 7 pacientes decidieron no someterse a la segunda cirugía, haciendo uso de la posibilidad de abandonar el estudio en cualquier momento sin expresión de causa, la cual estaba contemplada en el consentimiento informado firmado por cada paciente, y 1 paciente fue descartado ya que resultó ser positivo para la prueba de laboratorio del HTLV1.

Por otra parte, cabe destacar que, a pesar de lo reducida de la muestra, ésta fue bastante homogénea ya que fue realizada, en su mayoría, a marineros alumnos, los cuales presentaban óptimas condiciones de salud y eran sometidos a un mismo régimen de vida y hábitos.

COLECCIÓN SANGUÍNEA

A cada paciente se le extrajo una unidad sanguínea (450 mL), a partir de la cual se obtuvo P. R. P. y glóbulos rojos, estos últimos fueron autotransfundidos durante la primera cirugía. Dado lo anterior, y cumpliendo con el protocolo para transfusiones sanguíneas, el paciente fue sometido inicialmente a la siguiente batería de exámenes:

1. Inmunohematología: grupo sanguíneo, Rh, Anticuerpos irregulares (test de coombs indirecto).
2. Infectología: anticuerpos anti VIH., antígenos de superficie hepatitis B, anticuerpos antihepatitis C, test coombs directo (enfermedad de Chagas), anticuerpos anti HTLV1.
3. Laboratorio: VDRL, hemograma.

OBTENCIÓN DEL P. R. P.

Una vez aprobados los exámenes hematológicos y con un tiempo máximo de dos días previos a la cirugía, cada paciente fue citado al laboratorio de banco de sangre del Hospital Naval Almirante Neff, para la obtención de una unidad sanguínea (450 mL). Esta unidad fue sometida a una doble centrifugación; inicialmente a 5.600 rpm (Whitman y cols., 1997), desde donde se obtuvo plasma pobre en plaquetas (P. P. P.) y eritrocitos con buffy coat. Esto último fue sometido a 2.400 rpm (Whitman y cols., 1997), obteniendo P. R. P. y glóbulos rojos. Ambos hemoderivados fueron enviados a pabellón para su utilización. El concentrado plaquetario, así obtenido, entregó un promedio de 730.000 plaquetas/ mL.

PROTOCOLO QUIRÚRGICO

Previo a la cirugía se instaló una vía venosa al paciente, a través de la cual se realizó la autotransfusión de los glóbulos rojos obtenidos de la muestra sanguínea. Además, se administró, por la misma vía, 8 mg de betametasona preoperatorios. Fue requisito realizar un control de ciclos vitales cada 30 minutos hasta que se completara la autotransfusión.

Los pacientes fueron anestesiados bilateralmente con anestesia de lidocaína al 2% mediante técnica de spix directa y bloqueo al nervio bucal.

Una vez extraído el primero de los terceros molares inferiores, se procedió a realizar una cavidad ósea por distal del alvéolo, cuyas dimensiones fueron, aproximadamente, de 4 mm de diámetro y 6 mm de profundidad. Para su posterior localización (segunda cirugía), se tomaron

medidas de referencia desde la línea oblicua externa, el surco vestibular central del segundo molar y la parte más distal del alvéolo del tercer molar.

Para la confección de esta cavidad, se utilizaron las fresas y la pieza de mano del sistema de implantes Branemark®, a una velocidad de 1.500 rpm, con refrigeración de suero fisiológico, usando, además, aspiración central con un sistema de filtro para atrapar las limallas óseas provenientes de la cavidad.

Para realizar la mezcla que fue condensada en esta primera cavidad se utilizó 6 mL de P. R. P, 1 mL de gluconato de calcio, que evita coagulación de la mezcla en la jeringa, 2 mL de sangre fresca del paciente (aporte de trombina), 1 mL de aire para facilitar la mezcla (Marx y cols., 1998); 1mL de esta mezcla fue combinado con el hueso obtenido desde el filtro de la aspiración. Esta mezcla final fue condensada en la cavidad preparada en el hueso; para efectos del estudio esta zona fue designada con la letra A y correspondió al lado derecho del paciente.

Una vez suturado el sitio de la primera extracción, se procedió a la extracción del tercer molar contralateral y la realización de una cavidad ósea de similares características que la anterior, en esta cavidad no se utilizó P. R. P. y sólo se rellenó con el hueso obtenido desde el filtro; esta zona fue designada con la letra B y correspondió al lado izquierdo del paciente.

Luego de la cirugía, el paciente fue informado de manera verbal y escrita acerca de las indicaciones posoperatorias y se le prescribieron los siguientes medicamentos: Amoval (amoxicilina) 1 g. 1 comprimido cada 12 horas por 7 días, Syndol (Ketorolaco) 10 mg. 1 comprimido cada 6 horas en caso de dolor, Eurogesic (Naproxeno sódico) 550 mg. 1 comprimido cada 12 horas por 5 días.

El paciente fue citado a los siguientes controles: a las 48 horas, y a los 7 días para el retiro de suturas.

Luego de 12 a 14 semanas, el paciente fue citado para ser sometido al segundo procedimiento quirúrgico.

Durante el segundo acto quirúrgico, el paciente fue sometido a la extracción de los terceros molares superiores y a la toma de muestra del tejido óseo en el lugar donde fue realizada la cavidad ósea. Esta biopsia fue realizada mediante el uso de una trefina de 6 mm de diámetro por 6 mm de longitud, lo que entregó un margen de seguridad, es decir, de hueso propio del paciente, de 2 mm aproximadamente. El trozo óseo obtenido fue transportado en un frasco estéril que contenía formol neutralizado con carbonato de calcio.

ESTUDIO IMAGENOLÓGICO

Las técnicas imagenológicas fueron descartadas en este estudio, dado que tras realizar dentascan de prueba fue imposible obtener certeramente la ubicación de la zona injertada, debido al pequeño tamaño de la cavidad realizada. Por otra parte, la radiografía panorámica fue desechada, debido a que la ubicación del injerto impedía una correcta y fiel obtención de la imagen, además que el grado de subjetividad generado en su análisis hace que éste carezca absolutamente de rigor científico.

ESTUDIO HISTOLÓGICO

De cada cilindro óseo pertenecientes a los lados A y B, se obtuvieron 5 zonas de observación, tres de las cuales fueron estudiadas con Hematoxilina Eosina y dos, con tinción de Van Gieson; de ambas zonas se obtuvo un número de entre dos a cuatro cortes dependiendo de la calidad de la muestra biopsiada. Los cortes fueron numerados como HE 1 hasta HE 9 (A o B), I, II o III según la lámina histológica a la que correspondiese; y como VG 1 hasta VG 9 (A o B) I o II según la lámina histológica a la que correspondiese. Cada corte fue, a su vez, dividido en 4 campos de observación diferentes nombrados con letras *p*, *q*, *r*, *s*, siendo *p* y *q* hueso propio del paciente, y *r* y *s* hueso injertado tratado con P. R. P. (lado A) y no tratado (lado B).

La observación fue realizada por un histopatólogo experto, quien cumplió la condición de ciego para el estudio, y asignó un valor para cada una de las mediciones, el que fue registrado numéricamente como:

- 0: AUSENCIA
- 1: LEVE
- 2: MODERADO
- 3: ABUNDANTE

Para efectos de este estudio, se consideró como tejido óseo maduro aquél que tuviese una estructura laminillar de valor 3, cantidad de osteoblastos 0 a 1, capilares 0 a 1, tanto para cantidad como para tamaño, grado de compactación 3, cantidad de osteocitos 3, cantidad de colágeno 0 a 1, y cantidad de fibroblastos 0 a 1.

Este valor fue asignado por el propio patólogo, basado en un referente ideal de maduración ósea bajo el cual se comparó los campos *p* y *q* de cada lado, para luego comparar los niveles de maduración ósea de *r* y *s* con las cifras obtenidas desde *p* y *q*. Los datos así obtenidos fueron registrados en una tabla para su posterior análisis.

Los parámetros histológicos a examinar fueron: tipo de tejido óseo o grado de compactación, estructura laminillar, presencia de osteoblastos, osteocitos, colagenización, fibroblastos, capilares (número y tamaño).

Las muestras obtenidas desde los lados A y B fueron sometidas a observación bajo microscopio óptico, previa tinción con dos técnicas diferentes: Hematoxilina Eosina para la detección del tipo de tejido óseo, estructura laminillar, presencia de osteoblastos, osteocitos, fibroblastos, capilares (número y tamaño); en tanto que para observar colágeno se utilizó tinción de Van Gieson por la especificidad de esta tinción para dicha estructura.

De este modo, la técnica utilizada para tratar las muestras teñidas con hematoxilina eosina fue:

- 1) Descalcificación con ácido nítrico al 5% durante tres días.
- 2) Procesamiento en autotécnico para deshidratación con alcohol de 70° durante una hora, alcohol de 96° durante dos tiempos de una hora cada uno, alcohol de 100° durante tres tiempos de una hora cada uno, y xilol durante tres tiempos de una hora cada uno.
- 3) Molde de inclusión.
- 4) Corte en micrótopo rotatorio.
- 5) Secado de muestras en estufa a 60° C durante dos horas.
- 6) Desparafinización en xilol e hidratación, mediante técnica de alcoholes descendentes. Bañar la muestra en xilol durante tres tiempos de diez minutos cada uno, luego en alcohol de 100° durante dos tiempos de cinco minutos cada uno, alcohol de 96° durante un tiempo de cinco minutos, y finalmente, en alcohol de 70° durante un tiempo de cinco minutos.
- 7) Lavado en agua corriente.
- 8) Teñir en hematoxilina de Harris durante ocho minutos.
- 9) Lavado en agua corriente.
- 10) Diferenciación en mezcla de alcohol de 70° y ácido clorhídrico durante treinta segundos. Esto se realiza para extraer el colorante de las estructuras citológicas que no sean del núcleo.
- 11) Lavado en agua corriente.
- 12) Azulamiento en agua corriente con gotas de amoníaco puro.
- 13) Lavado en agua corriente.
- 14) Tinción en eosina durante tres minutos para teñir citoplasma.
- 15) Lavado en agua corriente.

16) Deshidratación en alcoholes ascendentes. Bañar la muestra en alcohol de 70° durante un tiempo de dos minutos, luego en alcohol de 96° durante dos tiempos de cinco minutos cada uno, alcohol de 100° durante dos tiempos de cinco minutos cada uno, y finalmente, en xilol durante tres tiempos de cinco minutos cada uno.

17) Montaje en resina sintética Flotexx.

Las muestras que fueron sometidas a tinción de Van Gieson se trataron de la siguiente manera:

- 1) Descalcificación con ácido nítrico al 5% durante tres días.
- 2) Procesamiento en autotécnico para deshidratación con alcohol de 70° durante una hora, alcohol de 96° durante dos tiempos de una hora cada uno, alcohol de 100° durante tres tiempos de una hora cada uno, y xilol durante tres tiempos de una hora cada uno.
- 3) Molde de inclusión.
- 4) Corte en micrótopo rotatorio.
- 5) Secado de muestras en estufa a 60° C durante dos horas.
- 6) Desparafinización en xilol e hidratación, mediante técnica de alcoholes descendentes. Bañar la muestra en xilol durante tres tiempos de diez minutos cada uno, luego en alcohol de 100° durante dos tiempos de cinco minutos cada uno, alcohol de 96° durante un tiempo de cinco minutos, y finalmente, en alcohol de 70° durante un tiempo de cinco minutos.
- 7) Lavado en agua corriente.
- 8) Teñir en hematoxilina férrica de Weigert durante cinco minutos.
- 9) Lavado en agua corriente.
- 10) Teñir en Picro – ponceau durante dos minutos.
- 11) Lavar en alcohol de 96°.
- 12) Bañar la muestra en alcohol de 100° durante dos tiempos de cinco minutos cada uno, y en xilol durante tres tiempos de cinco minutos cada uno.
- 13) Montaje en resina sintética Flotexx.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para realizar el análisis estadístico, se debió unificar el número de cortes de las muestras, dado que algunas de ellas sólo presentaban dos cortes y otras, cuatro. Esto debido a que la calidad de algunas muestras sólo permitía realizar dos cortes. Por esto, sólo fueron considerados para el análisis los primeros dos cortes de cada muestra, correspondientes a las zonas más coronales y representativas del tejido biopsiado.

Todos los datos fueron agrupados en una misma tabla, sin considerar si provenían desde el estudio con tinción de hematoxilina eosina o con tinción de Van Gieson, esto debido a que la tinción de hematoxilina eosina no es específica para detectar colágeno, por lo que los datos de la variable colagenización obtenidos desde los cortes teñidos con hematoxilina y eosina, fueron descartados.

Los datos obtenidos fueron sometidos al test estadístico no paramétrico de Kruskal-Wallis. Este test fue elegido porque no eran conocidos los parámetros del universo y por el reducido tamaño de la muestra. Este test prueba la hipótesis nula de que los efectos de los tratamientos son los mismos o que las muestras son idénticas.

RESULTADOS

El análisis de los datos fue dividido en tres ítems:

- I. Comparación de hueso propio del paciente del lado A con hueso propio del lado B, con esto buscamos confirmar la homogeneidad de la muestra ($p < 0,01$).
- II. Comparación entre hueso propio e injertado para cada lado, con esto se busca demostrar el grado de maduración del injerto comparado con el hueso propio del paciente ($p < 0,05$).
- III. Comparación entre hueso injertado del lado A y hueso injertado del lado B ($p < 0,01$).

Se deben considerar las siguientes premisas:

- Se utilizó una muestra de 9 pacientes.
- Cada paciente presentó la letra A, que correspondió al lado que poseía la sustancia a investigar, y la letra B, para el lado que no la poseía.
- Análisis de 8 variables a medir por separado, las cuales correspondieron a :
 - V1: Tipo
 - V2: Estructura laminillar
 - V3: Osteocitos
 - V4: Osteoblastos
 - V5: Colágeno
 - V6: Fibroblastos
 - V7: Capilares Número
 - V8: Capilares Tamaño
- Para cada paciente se realizó la subdivisión X e Y, donde:
 - X: p y q , correspondiente al hueso propio del paciente, tanto para lado A como para lado B.
 - Y: r y s , correspondiente al hueso injertado, tanto para lado A como para lado B.
- Con el objeto de tener una mejor visión de los datos, se estimó que graficar los promedios estadísticos era más representativo que los datos en forma individual.
- Se fijaron errores del 1% y del 5%, en forma arbitraria, dependiendo de la precisión con que la que se buscaba interpretar los datos.

ITEM I: COMPARACIÓN ENTRE VARIABLE X DEL LADO A CON VARIABLE X DEL LADO B

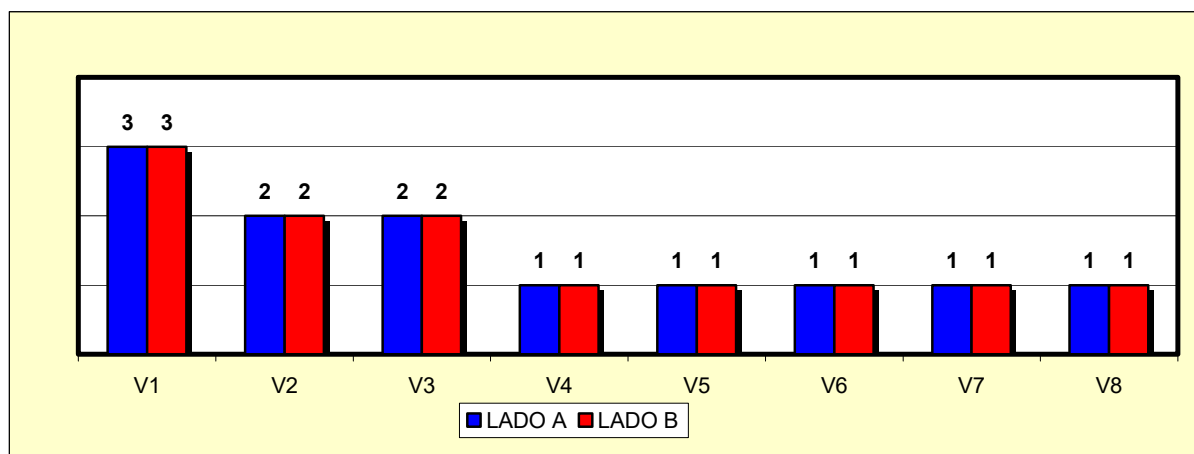
TABLA II: “Frecuencia de las variables del hueso propio en el lado A”

Categoria	V1		V2		V3		V4		V5		V6		V7		V8	
	Cant.	%	Cant.	%	Cant.	%	Cant.	%	Cant.	%	Cant.	%	Cant.	%	Cant.	%
3	51	71%	38	53%	6	8%	0	0%	0	0%	0	0%	3	4%	5	7%
2	21	29%	31	43%	44	61%	6	8%	17	24%	9	13%	6	8%	15	21%
1	0	0%	3	4%	22	31%	43	60%	49	68%	62	86%	63	88%	52	72%
0	0	0%	0	0%	0	0%	23	32%	6	8%	1	1%	0	0%	0	0%
TOTAL	72	100%	72	100%	72	100%	72	100%	72	100%	72	100%	72	100%	72	100%
Promedio	3		2		2		1		1		1		1		1	

TABLA III: “Frecuencia de las variables del hueso propio en el lado B”

Categoria	V1		V2		V3		V4		V5		V6		V7		V8	
	Cant.	%	Cant.	%	Cant.	%	Cant.	%	Cant.	%	Cant.	%	Cant.	%	Cant.	%
3	48	67%	33	46%	5	7%	0	0%	2	3%	2	3%	0	0%	3	4%
2	21	29%	31	43%	47	65%	4	6%	21	29%	9	13%	7	10%	6	8%
1	3	4%	8	11%	20	28%	44	61%	45	63%	60	83%	64	89%	62	86%
0	0	0%	0	0%	0	0%	24	33%	4	6%	1	1%	1	1%	1	1%
TOTAL	72	100%	72	100%	72	100%	72	100%	72	100%	72	100%	72	100%	72	100%
Promedio	3		2		2		1		1		1		1		1	

Las tablas II y III muestran el análisis del hueso propio del paciente, tanto para lado A como para lado B. De ésta, se puede apreciar que los promedios de las frecuencias son los mismos para ambos lados.

GRÁFICO 1: “Promedio de frecuencias de las variables para hueso propio (A y B)”

El gráfico 1 confirma los resultados obtenidos a partir de las tablas II y III, es decir, que los promedios de las frecuencias son los mismos para ambos lados.

Los datos anteriormente registrados fueron sometidos al test estadístico no paramétrico de Kruskal – Wallis, el cual confirmó que no existe diferencia significativa entre el hueso propio de los pacientes en los lados A y B, con un 99% de confiabilidad ($p < 0,01$).

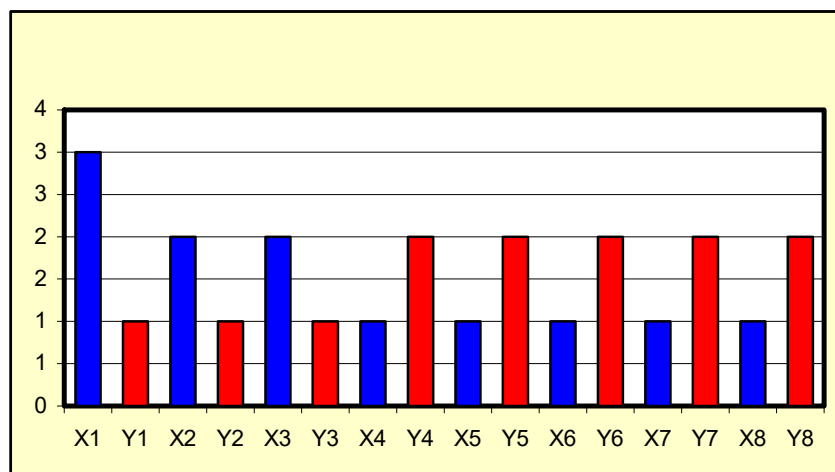
ITEM II: ANÁLISIS DE X VERSUS Y PARA CADA LADO

TABLA IV: “Frecuencia de las variables del hueso propio y del hueso injertado en los lados A y B”

	V1				V2				V3				V4				V5				V6				V7				V8			
	X		Y		X		Y		X		Y		X		Y		X		Y		X		Y		X		Y		X		Y	
Categoría	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B		
3	51	48	0	0	38	33	0	0	6	5	4	3	0	0	3	7	0	2	4	5	0	2	5	3	3	0	11	4	5	3	23	7
2	21	21	15	21	31	31	6	6	44	47	21	30	6	4	47	33	17	21	39	35	9	9	33	31	6	7	43	46	15	6	39	43
1	0	3	38	44	3	8	24	27	22	20	47	39	43	44	22	30	49	45	29	31	62	60	34	38	63	64	18	22	52	62	10	22
0	0	0	19	7	0	0	42	39	0	0	0	0	23	24	0	2	6	4	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
TOTAL	72	72	72	72	72	72	72	72	72	72	72	72	72	72	72	72	72	72	72	72	72	72	72	72	72	72	72	72	72	72	72	72
Promedio	3	3	1	1	2	2	1	1	2	2	1	2	1	1	2	2	1	1	2	2	1	1	2	2	1	1	2	2	1	1	2	2

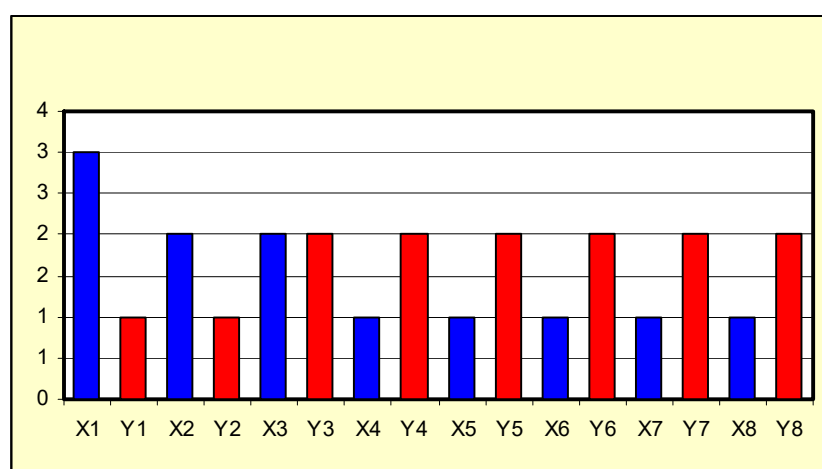
Observando la tabla IV, se puede afirmar que existe evidencia descriptiva que comprueba la diferencia entre las variables X e Y para ambos lados.

GRÁFICO 2: “Promedio de frecuencias de variables de X lado A versus Y lado A”



El gráfico 2 muestra la gran diferencia entre los resultados al comparar X versus Y para el lado A.

GRÁFICO 3: “Promedio de frecuencias de las variables de X lado B e Y lado B”



El gráfico 3 muestra la gran diferencia de los resultados al comparar X versus Y para el lado B.

El análisis de Kruskal – Wallis para los datos anteriormente expuestos, confirma con un 95% de confiabilidad ($p < 0.05$) que el hueso propio del paciente difiere del hueso injertado, tanto para el lado A como para el lado B.

ITEM III: ANÁLISIS DE Y LADO A VERSUS Y LADO B

TABLA V: “Frecuencias de las variables del hueso injertado en el lado A”

Categoría	V1		V2		V3		V4		V5		V6		V7		V8	
	Cant.	%	Cant.	%	Cant.	%	Cant.	%	Cant.	%	Cant.	%	Cant.	%	Cant.	%
3	0	0%	0	0%	4	6%	3	4%	4	6%	5	7%	11	15%	23	32%
2	15	21%	6	8%	21	29%	47	65%	39	54%	33	46%	43	60%	39	54%
1	38	53%	24	33%	47	65%	22	31%	29	40%	34	47%	18	25%	10	14%
0	19	26%	42	58%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
TOTAL	72	100%	72	100%	72	100%	72	100%	72	100%	72	100%	72	100%	72	100%
Promedio	1		1		1		2		2		2		2		2	

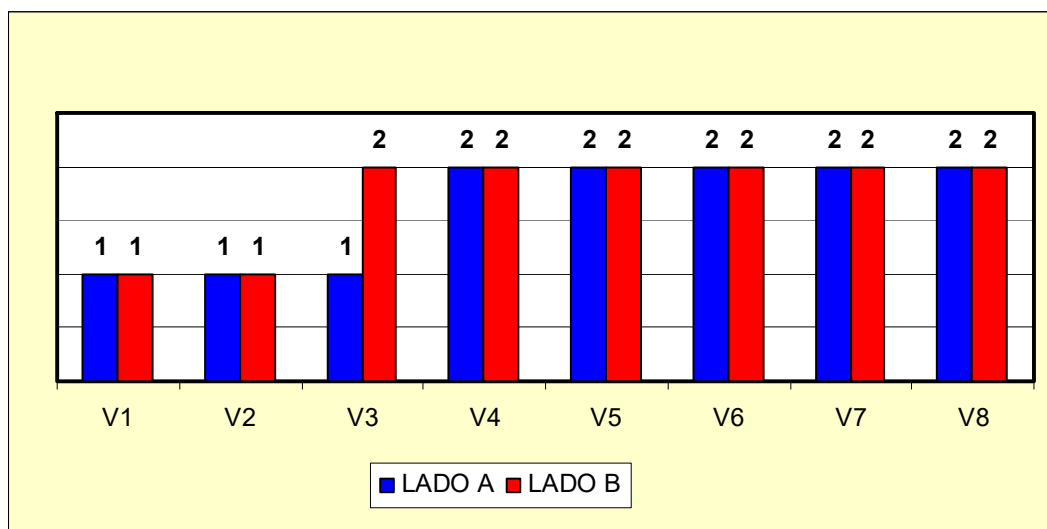
La tabla V contiene las frecuencias de las variables histológicas observadas en el hueso injertado del lado A. Asimismo, se indica el promedio estadístico para cada una de las variables.

TABLA VI: “Frecuencias de las variables del hueso injertado en el lado B”

Categoría	V1		V2		V3		V4		V5		V6		V7		V8	
	Cant.	%	Cant.	%	Cant.	%	Cant.	%	Cant.	%	Cant.	%	Cant.	%	Cant.	%
3	0	0%	0	0%	3	4%	7	10%	5	7%	3	4%	4	6%	7	10%
2	21	29%	6	8%	30	42%	33	46%	35	49%	31	43%	46	64%	43	60%
1	44	61%	27	38%	39	54%	30	42%	31	43%	38	53%	22	31%	22	31%
0	7	10%	39	54%	0	0%	2	3%	1	1%	0	0%	0	0%	0	0%
TOTAL	72	100%	72	100%	72	100%	72	100%	72	100%	72	100%	72	100%	72	100%
Promedio	1		1		2		2		2		2		2		2	

La tabla VI contiene las frecuencias de las variables histológicas observadas para el hueso injertado del lado B. Asimismo, se indica el promedio estadístico para cada una de las variables.

GRÁFICO 4: “Promedio de la frecuencia de las variables del hueso injertado para los lados A y B”



El gráfico 4 muestra la semejanza entre el lado A y el lado B, excepto para la variable 3, donde se produce una diferencia a favor del lado B.

El test de Kruskal – Wallis determinó, con un 99% de confiabilidad ($p < 0.01$), que no existe diferencia estadísticamente significativa entre el hueso injertado con aporte de P. R. P. y el hueso injertado sin este aporte, incluso para la variable 3.

De manera arbitraria, el histopatólogo asignó una ponderación para cada variable observada. Esta ponderación refleja la importancia estimada para cada una de ellas en el proceso de regeneración y maduración ósea. Así, los valores asignados fueron:

- Estructura laminillar, 20%.
- Osteoblastos, 20%.
- Número de capilares, 15%.
- Tamaño de los capilares, 15%.
- Colágeno 15%.
- Grado de compactación, 5%.
- Fibroblastos, 5%.
- Osteocitos, 5%.

Debido a su mayor importancia, analizaremos las primeras cuatro variables.

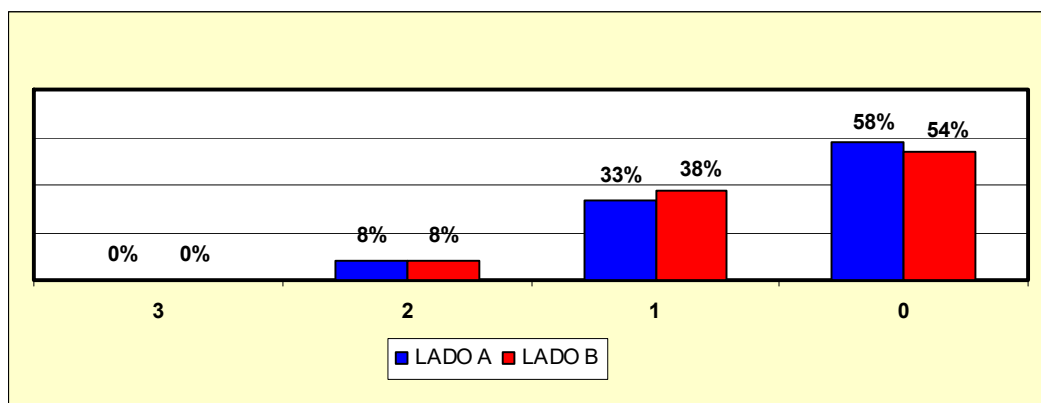
Debe destacarse, que los datos arrojados para número de capilares y tamaño de éstos fueron analizados juntos.

TABLA VII: “Análisis de las variables 2, 5, 7 y 8 del hueso injertado en los lados A y B”

Categoría	V2				V5				V7 Y V8			
	LADO A	%	LADO B	%	LADO A	%	LADO B	%	LADO A	%	LADO B	%
3	0	0%	0	0%	4	6%	5	7%	34	24%	11	8%
2	6	8%	6	8%	39	54%	35	49%	82	57%	89	62%
1	24	33%	27	38%	29	40%	31	43%	28	19%	44	31%
0	42	58%	39	54%	0	0%	1	1%	0	0%	0	0%
TOTAL	72	100%	72	100%	72	100%	72	100%	144	100%	144	100%
Promedio	1		1		2		2		2		2	

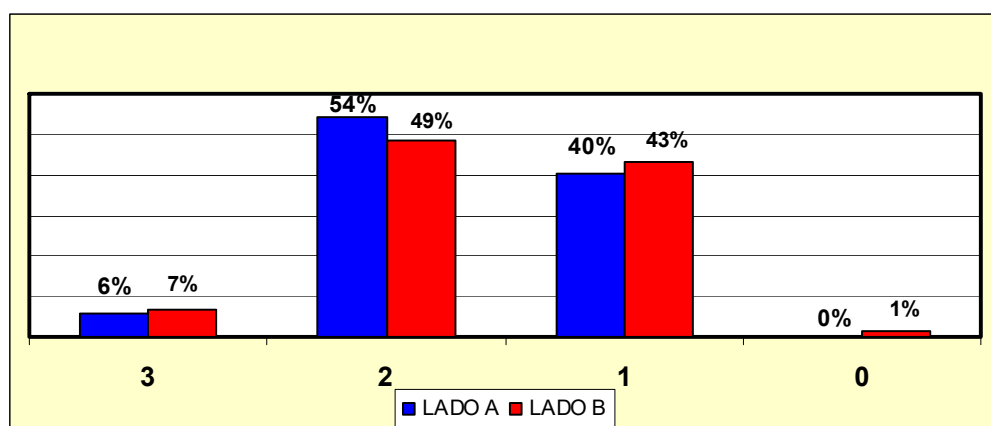
En la tabla VII se puede observar, luego del análisis descriptivo de las primeras cuatro variables, que éstas poseen semejanza en porcentaje de frecuencias, tanto para el lado A como para el lado B.

GRÁFICO 5: “Porcentaje de frecuencias para la variable 2 en los lados A y B”



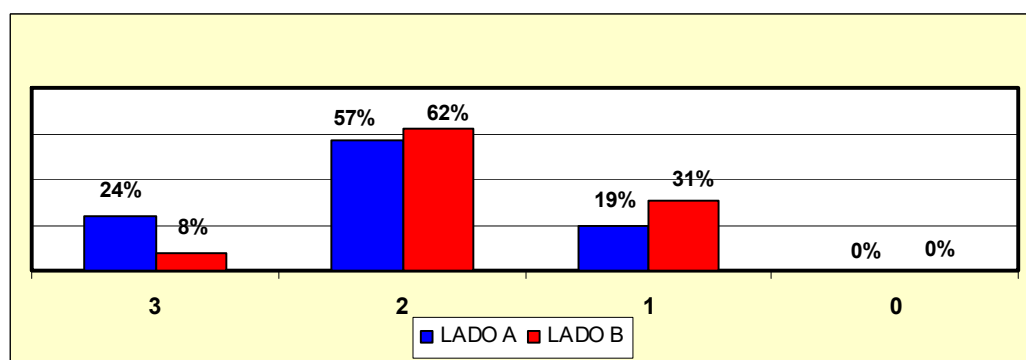
El gráfico 5 muestra una clara tendencia de los datos a acumularse en la categoría 0 para ambos lados.

GRÁFICO 6: “Porcentaje de frecuencias para la variable 5 en los lados A y B”



El gráfico 6 muestra un mayor porcentaje en la categoría 2, aún cuando en la categoría 1 también se observa un porcentaje significativo.

GRÁFICO 7: “Porcentaje de frecuencias para las variables 7 y 8 en los lados A y B”



El gráfico 7 muestra que el porcentaje de frecuencias de la categoría 3 presenta una diferencia de 16 % a favor del lado A. Sin embargo, existe una clara tendencia de la información a acumularse en la categoría 2.

DISCUSIÓN

Desde los primeros trabajos realizados por Matras en 1982 hasta los últimos estudios realizados en el año 2004 por Yasawa y cols., se han estudiado diversos materiales en busca de mejorar la capacidad de hemostasia, adhesión quirúrgica y regeneración de heridas, tanto para tejidos blandos como para tejidos duros.

Muchos de los resultados obtenidos en la literatura difieren en diversos aspectos con los obtenidos en este estudio.

En 1994 Tayapongsak y cols. añadieron adhesivo de fibrina al hueso medular durante procedimientos de reconstrucción mandibular, e identificaron una consolidación radiográfica temprana de hueso en 33 casos. En cambio, en este estudio no fue posible identificar una consolidación ósea radiográfica, la que se intentó medir a través de radiografía panorámica y de dentascan; esta dificultad no es atribuible a las propiedades del material en estudio, sino más bien, a las reducidas dimensiones de la cavidad ósea y a la zona anatómica en la que fue realizado el injerto. Tayapongsak y cols., además, reportaron una destacable adhesión al ligar las partículas porosas de hueso medular durante la colocación del injerto. Esta misma cualidad fue encontrada en el presente estudio, para la utilización del gel de P. R. P.

En 1998 Marx y cols., en su modelo de regeneración ósea a partir de injertos, ejemplificaron cómo los factores de crecimiento PDGF y TGF- β pueden influenciar la regeneración ósea normal y cómo el incremento de las cantidades de cada factor, añadiendo P. R. P., produce una más rápida tasa de hueso formado y una mayor cantidad de éste. En nuestro trabajo, no fue posible encontrar, en el hueso injertado al cual se le añadió gel de plaquetas, tales resultados. Esta formación de hueso de mayor calidad y en menor tiempo, descrita por Marx y cols., se basó en el hecho de agregar mayor cantidad de factores de crecimiento derivados de las plaquetas; sin embargo, a partir del estudio de las propiedades de los factores de crecimientos, en la literatura encontrada, no se le atribuye a ninguna factor de crecimiento derivado de las plaquetas alguna propiedad osteogénica, sino más bien propiedades angiogénicas y de formación de tejido conjuntivo. Marx y cols., citan en su trabajo que "...La actual maduración del injerto desde un hueso desorganizado a un hueso laminillar maduro con sistemas haversianos, involucra el tercer y final grupo de agentes, los cuales no fueron parte de este estudio y no están contenidos en el P. R. P. Éstos corresponden a la familia de la proteína morfogenética de hueso BMP...". Con esta afirmación Marx y cols., contradicen su teoría de velocidad y calidad de hueso regenerado, ya que la maduración de este tejido no depende de los factores de crecimiento contenidos en las plaquetas.

En el estudio realizado el 2003 por Kawase y cols., se demostró que el P. R. P es capaz de regular la formación de matriz extracelular, lo cual no concuerda con la similar cantidad de colágeno encontrada, tanto en el lado caso como en el lado control de nuestro estudio. Sin embargo, debe destacarse que esta investigación se realizó en ligamento periodontal y osteoblastos in vitro.

Lacoste y cols., en el año 2003, a partir de su estudio realizado en células in vitro, concluyeron que "...Debido a que la angiogénesis precede a la osteogénesis en el proceso de curación de la herida y los osteoblastos son células perivasculares, nosotros anticipamos una ventaja al estimular la formación de vasos sanguíneos a partir de la cual se obtendrá una mejor formación de hueso...". En nuestro trabajo encontramos una mayor cantidad de vasos sanguíneos y de mayor tamaño, en los sitios donde se aplicó el gel de plaquetas, pero sin ser esta diferencia estadísticamente significativa. Esto nos indicaría que ese hueso está con mayor actividad tisular, pero no podemos afirmar que esta mayor cantidad de vasos nos llevará, necesariamente, a obtener un hueso maduro de mejor calidad.

Dentro de la totalidad de la literatura estudiada, nos encontramos con un único trabajo experimental de casos y controles, realizado por Zechner y cols. en el año 2003; debemos destacar que esta investigación fue realizada en cerdos, planteándose el estudio de la cicatrización del hueso periférico al implante y, además, incluyó el análisis de distintos tipos de superficies para los implantes fijados. Desde nuestro punto de vista, consideramos que la metodología para calificar este estudio como de casos y controles no es repetible debido a que en su artículo no expone esta información. A pesar de esta apreciación, los resultados obtenidos por Zechner y cols. indican que a las doce semanas posfijación de los implantes, la regeneración ósea alrededor de éstos no fue histológicamente distinguible entre los lados control y con aporte de P. R. P. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en nuestro estudio, dado que no se encontró diferencias histológicas significativas en la maduración ósea para los lados caso y control.

Nuestra motivación inicial para el estudio de este tema fue el planteamiento de extraordinarias cualidades regenerativas titulares en el uso del P. R. P. Sin embargo, al comenzar nuestro análisis de la literatura (desde 1982 hasta 2004), no encontramos estudios clínicos controlados que respaldaran las utilización clínica de esta sustancia, además nuestro análisis crítico de esta revisión nos hace observar debilidades metodológicas serias en la realización de estos estudios. Por ejemplo, Anitua en 1999 realizó un estudio clínico comparativo con 20 pacientes, de los cuales 10 eran casos y 10 control, en 5 de los 10 pacientes caso fue injertado hueso autólogo en combinación con P. R. P. y para los otros 5 no describe la técnica. El análisis de los tejidos se realizó en un tiempo que variaba entre 10 a 16 semanas de cicatrización y debemos reparar en el hecho que metodológicamente no es ideal utilizar casos y controles en pacientes diferentes, dado que la capacidad fisiológica de reparación difiere en todos los individuos. De esta forma, queremos ejemplificar el modo en que se han realizado los estudios clínicos descritos en la literatura, hecho que se confirma por el extenso análisis bibliográfico realizado por Sánchez y cols. en 2003, que abarcó la revisión desde el año 1960 hasta 2002, donde confirma nuestra inquietud sobre el rigor científico que respalda la utilización del concentrado de plaquetas.

Debido a que la literatura existente no respalda las extraordinarias características regenerativas propuestas para el P. R. P, decidimos desarrollar una metodología científica adecuada para comprobar la real influencia que ejerce este concentrado plaquetario sobre el tejido óseo en regeneración, lo que fue plasmado en este estudio experimental de tipo clínico controlado, que contempló al caso y el control en un mismo paciente, eliminando así, cualquier variación en las capacidades de regeneración entre los distintos pacientes. Nuestros resultados confirman las dudas sobre los limitados efectos que produce el P. R. P en la calidad y velocidad

de la maduración ósea, sin embargo, no podemos desconocer diferencias en la cicatrización entre los casos y controles que, sin ser estadísticamente significativas ($p < 0,01$) podrían ser un aporte a la regeneración tisular, como por ejemplo el mayor tamaño y número de vasos sanguíneos encontrados en los sitios donde se aportó P. R. P.

De acuerdo a nuestros resultados, creemos que es de gran importancia la presencia de vasos sanguíneos de mayor tamaño y en mayor número, ya que esto se puede interpretar como una mejor capacidad basal para la estimulación y maduración de cualquier tejido. A pesar de este relevante hallazgo, nos habría gustado encontrar un aumento del número de osteoblastos en el tejido que recibió el aporte de P. R. P para, así, poder inferir que vamos a obtener una mejor calidad del tejido óseo.

CONCLUSIONES

Los trabajos revisados presentan una pobre metodología, basando sus conclusiones en deducciones teóricas del aporte de los factores de crecimiento a la regeneración de tejidos, sin entregar evidencia científica que avale estas afirmaciones. Además, gran parte de estos estudios fueron realizados in vitro o en animales, por lo que, aunque sus resultados sean a favor de la utilización del P. R. P, éstos no pueden ser extrapolados a seres humanos.

No existe evidencia estadísticamente significativa, en nuestro estudio, para afirmar que el P. R. P sea un aporte a la regeneración de tejido óseo.

Sugerimos que las reales aplicaciones clínicas del P. R. P comprobadas en nuestro estudio son la hemostasia y la capacidad de ligar el hueso particulado, mejorando su manipulación.

Confirmamos nuestra hipótesis nula dado que no es posible afirmar que la calidad del hueso, en proceso de maduración, sea superior, así como tampoco podemos aseverar que la velocidad de regeneración ósea sea acelerada por el aporte del P. R. P.

SUGERENCIAS

En nuestro estudio se intentó entregar evidencia histológica para el uso clínico del gel de P. R. P., sin embargo, el pequeño tamaño de la muestra no permite que los resultados obtenidos puedan ser representativos para el universo. Para que se logre esta representatividad, la muestra debería ser de al menos 20 pacientes, pero dado que trabajamos con una muestra altamente homogénea, se podría disminuir su tamaño a 12 pacientes.

En cuanto a la recolección de los datos histológicos, podemos sugerir que un método más preciso que el que utilizamos, sería el uso de histomorfometría que nos entregaría un número exacto de los constituyentes histológicos, disminuyendo así el grado de subjetividad de la medición. Otro modo de obtener objetividad en la recolección de los datos sería aumentar el número de observadores.

Podemos sugerir la realización de un estudio con similar metodología que el nuestro para analizar el uso de diferentes volúmenes aportados de P. R. P para, así, determinar si existe relación entre efectividad del producto y cantidad de éste.

A su vez, la realización de estudios que analicen el uso del P. R. P. en hueso alterado o en hueso de pacientes con alguna enfermedad sistémica, es altamente recomendable dado que los resultados obtenidos nos sugieren que el P. R. P. mejora las condiciones vasculares de los tejidos en los cuales es aplicado.

El principal aporte de nuestro estudio radica en que la comprobación de la regeneración ósea se mide a través de análisis histológico, siendo éste un método directo para la determinación del grado de maduración del tejido óseo.

RESUMEN

El presente estudio intenta continuar la línea de investigación sobre el P. R. P., que se considera el sucesor del sellante de fibrina propuesto por Matras en el año 1982. A partir del estudio clásico de Marx y cols. del año 1998 hasta los últimos estudios realizados en el año 2004, no hemos podido encontrar una clara evidencia científica que avale sus propiedades y aplicaciones clínicas en el campo de la regeneración ósea.

Este estudio fue realizado con un total de nueve pacientes sometidos a cirugía de terceros molares mandibulares bilateral, a los cuales se les confeccionó cavidades óseas por distal del alvéolo de cada tercer molar extraído; en ellas se injertó hueso particulado con aporte de P. R. P. en el lado derecho y sin éste en el lado izquierdo. Al cabo de un período de entre doce a catorce semanas, se realizó una biopsia de las zonas previamente injertadas, siendo éstas sometidas a análisis histológico para comparar su grado de maduración ósea.

No se encontró un aporte estadísticamente significativo en la maduración, tanto para tiempo de formación como para calidad del hueso en regeneración, que pueda ser atribuible al aporte de P. R. P.

Podemos concluir que el aporte de P. R. P. a hueso injertado mejora la vascularización, pero que esto no necesariamente asegura la obtención de un hueso maduro de mejor calidad y en menor tiempo.

BIBLIOGRAFÍA

Anitua Eduardo (1999): Plasma Rich in Growth Factor: Preliminary Results of Use in the Preparation of Future Sites for Implants, *Int J Oral Maxillofac Implants*, 14: 529 - 535.

Froum S.; Tarnow D.; Wallace S.; Rohrer M.; Cho S. (1998): Sinus floor elevation using Anorganic Bovine Bone Matrix (Osteograf/N) with and without Autogenous Bone: A clinical, histologic, Radiographic, and Histomorphometric Analysis- part 2 of an Ongoing Prospective Study, *Int J Oral and Maxillofac Implants*, 18: 529 - 541.

Green D.; Klink B. (1998): Platelet gel as an intraoperatively procured platelet-based alternative to fibrin glue, *Plast Reconstr Surg*, 101: 1161 - 1162.

Jurlow E. (1996), Reparación Tisular. En: *Inflamación y Reparación Tisular*, Ancic P.; Armas R.; Atías A.; Blanco R.; Ruffani C.; Jaimovic E.; Muñoz A.; Pinto M.; Silva J.; Spotorno A.; Walton R., Santiago de Chile: Serie Científica Básica, Centro de Extensión Biomédica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Primera Edición, pp. 47 - 63.

Kassolis J.; Rosen P.; Reynolds M. (2000): Alveolar Ridge and Sinus Augmentation Utilizing Platelet – Rich Plasma in Combination with Freeze – Dried Bone Allograft: Case Series, *J Periodontol*, 71: 1654 - 1661.

Kawase T.; Okuda K.; Wolff L.; Yoshie H. (2003): Platelet - Rich - Plasma – Derived Fibrin Clot Formation Stimulated Collagen Syntesis in Periodontal Ligament and Osteoblastic Cells In Vitro, *J Periodont*, 74: 858 - 864.

Keenan (2000): Platelet Rich Plasma Factor
www.seattle-implants.com/articles/platelet.htm

Knighton D.; Ciresi K.; Fiegel V.; Schumerth S.; Butler E.; Cerra F. (1990): Stimulation of Repair in Chronic, Nonhealing, cutaneous Ulcers Using Platelet-Derived Wound Healing Formula, *Surg Gyn Obst*, 170: 56 - 59.

Lacoste E.; Martineau I.; Gagnon G. (2003): Platelet Concentrates: Effects of Calcium and Thrombin on Endothelial Cell Proliferation and Growth Factor Release, *J Periodontol*, 74: 1498 - 1507.

Lekovic V.; Camargo P.; Weinlaender M.; Vasilic N.; Kenney B. (2002): Comparison of Platelet Rich Plasma, Bovine 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*, 73: 198 - 205.

Lorenz P.; Hedrick M.; Chang J.; Mehrara B.; Longaker M.: The Impact Of Biomolecular Medicine and Tissue Engineering on Plastic Surgery in the 21st Century, *Plast Reconstr Surg*, 105: 2467 - 2478.

Marx R.; Carlson E.; Eichstaedt R.; Schimmele S.; Strauss J.; Georgeff K. (1998): Platelet-Rich Plasma, Growth factor Enhancement for Bone Grafts, *Oral Surg Oral Med Oral Patol*, 85: 638 - 646.

Matras H. (1982): The Use of Fibrin Sealant in Oral and Maxillofacial Surgery, *J Oral Maxillofac Surg*, 40: 617 - 622.

Matras H. (1985): Fibrin Seal: The State of the Art, *J Oral and Maxillofac Surg*, 43: 605 - 611.

Okuda K.; Kawase T.; Momose M.; Murata M.; Saito Y.; Suzuki I.; Wolff L.; Yoshie H. (2003): Platelet – Rich Plasma Contains High Levels of Platelet – Derived Growth Factor and Transforming Growth Factor – β and Modulates the Proliferation of Periodontally Related Cells In Vitro, *J Periodontol*, 74: 849 - 856.

Oz M.; Jeevanandam V.; Smith C.; Williams M.; Kaynar M.; Frank R.; Mosca R.; Reiss R.; Rose E. (1992): Autologous Fibrin Glue From Intraoperatively Collected Platelet- Rich Plasma, *Ann Thorac Surg*, 53: 530 - 531.

Ribbans W., Chinchawala S (1999): Bone Grafting.
www.orthoteers.co.uk/Nrujp~ij33lm/Bonegrafting.htm

Sánchez A.; Sheridan P.; Kupp L. (2003): Is Platelet – Rich Plasma the Perfect Enhancement Factor? A Current Review, *Int J Oral and Maxillofac Implants*, 18: 93 - 103.

Schmitz J.; Hollinger J. (2001): The Biology of Platelet Rich Plasma, *J Oral Maxillofac Surg*, 59: 1119 - 1121.

Tayapongasak P.; O'brien D.; Monteiro C. (1994): Auotologous Fibrin Adhesive in Mandibular Reconstroccion UIT Particulate Cancellous Bone and Marrow, *J Maxillofac Surg*, 52: 161-165.

Whitman D.; Berry R.; Green D. (1997): Platelet Gel: An Autologous Alternative in Oral and Maxillofacial Surgery, *J Oral Maxillofac Surg*, 55: 1294 - 1299.

Yazawa M.; Ogata H.; Nakajima T.; Watanabe N. (2004): Influence of Antiplatelet Substances on Platelet Rich Plasma, *J Oral Maxillofac Surg*, 62: 714 - 718.

Zechner W.; Tangl. S.; Tepper G.; Fürst G.; Bernhart T.; Haas R.; Mailath G.; Watzek G. (2003): Influence of Platelet-rich Plasma on Osseous Healing of dental Implants: A Histologic and Histomorphometric Study in Minipigs, *Int J Oral Maxillofac Implants*, 62: 15 - 23.

ANEXOS

ANEXO 1: INFORMACIÓN AL PACIENTE

El objetivo de la investigación, de la cual le solicitamos ser parte, es comprobar que la aplicación de plasma rico en plaquetas mejora la calidad del hueso regenerado y aumenta su velocidad de formación disminuyendo, de este modo, las complicaciones postoperatorias.

Para el cumplimiento de este objetivo, es necesario que usted participe en dos procedimientos quirúrgicos, según el siguiente orden:

1. Extracción de una muestra sanguínea, que será utilizada durante la primera cirugía (extracción de las muelas del juicio).
2. Extracción de los terceros molares y relleno cavitario con hueso molido y plaquetas obtenidas de la muestra sanguínea anteriormente mencionada.
3. Dos (2) a tres (3) meses después, se le realizará un control por medio de radiografías y/o scanner, sin costo para usted.
4. Segundo procedimiento quirúrgico, consistente en la toma de una pequeña muestra de la zona intervenida con anterioridad. Este segundo procedimiento es totalmente necesario para la investigación y no reviste ningún riesgo para usted.
- 5.- Todos los procedimientos descritos son realizados en forma ambulatoria, es decir, no requieren hospitalización.

ANEXO 2: CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, C. I.:....., Declaro :

- 1.- Haber recibido información en forma escrita y verbal sobre la investigación “*Estudio Clínico Controlado de Regeneración Ósea con Plasma Rico en Plaquetas*”.
- 2.- Estar en pleno conocimiento sobre los procedimientos quirúrgicos, imagenológicos y de laboratorio en los que participaré voluntariamente.
- 3.- Aceptar ser sometido (a) a un segundo procedimiento ambulatorio de control.
- 4.- Que en el caso de presentar alguna complicación o deseo de abandonar el estudio, me comunicaré con Giordana David (9-1654177), Fernando Ramírez (9-2118832), o al servicio de cirugía máxilofacial con Dr. Quiroz (573498).

En total conocimiento, otorgo mi acuerdo para:

- 1.- Formar parte del “*Estudio Clínico Controlado de Regeneración Ósea con Plasma Rico en Plaquetas*”.
- 2.- Permitir que la información obtenida sea utilizada con fines científicos y académicos.

FECHA:

.....
Firma y C. I. Paciente

.....
Firma co-investigador

Folio:

ANEXO 3: FOTOGRAFÍAS



Foto 1: Centrífuga, conteniendo las unidades sanguíneas previo a su procesamiento.



Foto 2: Máquina donde se almacena el P. R. P. luego de ser obtenido para que decante por un tiempo mínimo de 2 horas.



Foto 3: Bolsa que contiene el P. R. P.



Foto 4: Paciente siendo autotransfundido con los glóbulos rojos.



Foto 5: Limalla ósea obtenida desde el filtro para hueso ubicado en la aspiración central.



Foto 6: Ampolla de gluconato de calcio de 10 mL.



Foto7: Jeringa que contiene P. R. P, sangre fresca, gluconato de calcio y aire, según protocolo de preparación del gel de plaquetas.



Foto 8: Recipiente que contiene la mezcla entre la limalla ósea y el gel de plaquetas.



Foto 9: Muestra la cavidad realizada por distal del alvéolo del tercer molar inferior derecho, rellena con injerto óseo particulado y gel de P. R. P. (lado A).



Foto 10: Muestra la cavidad realizada por distal del alvéolo del tercer molar inferior izquierdo, rellena sólo con injerto óseo particulado (lado B).



Foto 11: Muestra la toma de la biopsia de la zona injertada.



Foto 12: Fijación del hueso biopsiado en tubos estériles que contienen formol neutro.

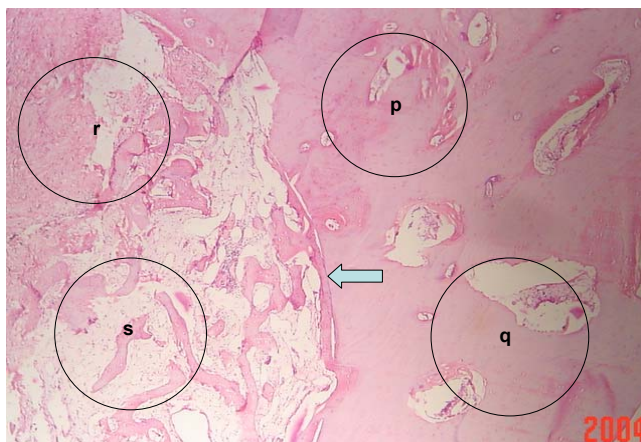


Foto 13: Se indican los campos microscópicos de observación *p* y *q*, correspondientes a la zona de tejido óseo normal del paciente (control), y campos *r* y *s*, correspondientes al injerto óseo, delimitados claramente (flecha) (HE x 10).



Foto 14: Campo de observación con presencia de vasos sanguíneos aumentados en cantidad y en tamaño (VS), y campo con marcado tejido conjuntivo (TC).

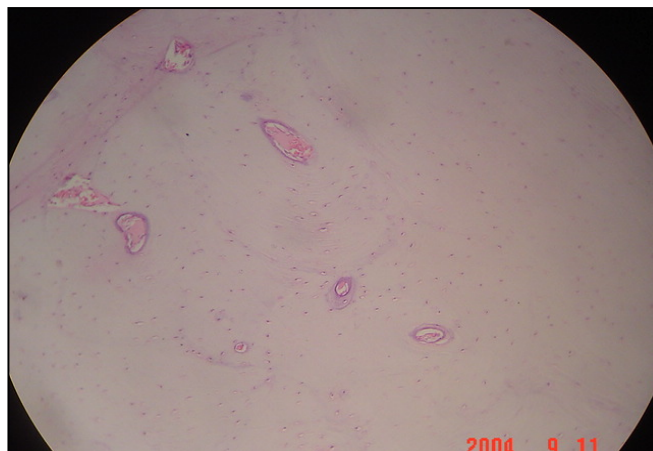


Foto 15: Campo de observación correspondiente a tejido óseo control, compacto, abundantes osteocitos, sin osteoblastos y escaso tejido conjuntivo.

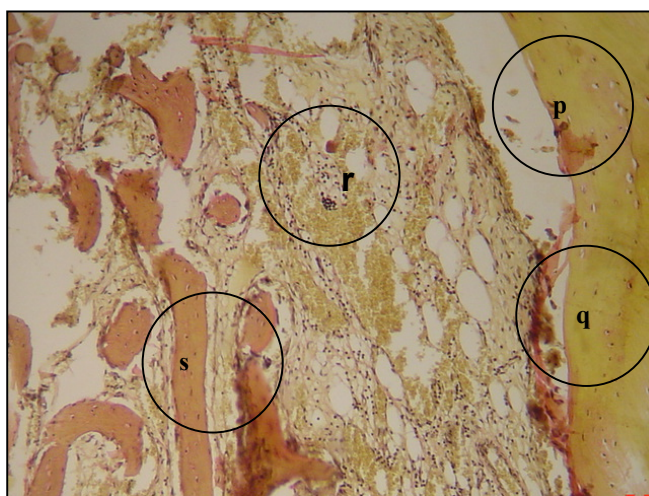


Foto 16: Campos de observación con técnica de Van Gieson. Nótese mayor presencia de matriz colágena en el tejido óseo del campo *s*, con aspecto trabecular, a diferencia del aspecto compacto en los campos *p* y *q*.

ANEXO 4: ESTADÍSTICA

MÉTODOS NO PARAMÉTRICOS

Los procedimientos inferenciales que se estudian generalmente en estadística necesitan de la especificación de una distribución para la población de interés, de esta forma, los resultados que se obtienen representan estimaciones con respecto a los parámetros de la población. Este tipo de análisis recibe el nombre de “métodos paramétricos”, los cuales son más sensibles a muestras de tamaño pequeño y de carácter cuantitativo en un intervalo de tiempo.

Sin embargo, se han desarrollado procedimientos inferenciales que no se encuentran sujetos a la forma de la distribución de la población de interés y no requieren que las observaciones se definan en una escala de intervalo, es decir, los números no tienen un significado físico más allá de representar alguna categorización. Estos procedimientos se conocen como “métodos no paramétricos”. En un sentido relativo, éstos requieren de pocas suposiciones, son más fáciles de aplicar que los métodos paramétricos y representan mejor la muestra cuando ésta es pequeña.

PRUEBA DE KRUSKAL-WALLIS

Este test prueba la hipótesis nula de que los efectos de los tratamientos son los mismos, o que las muestras son idénticas.

Sean las observaciones de las k muestras aleatorias dadas en la tabla VIII, donde n_j es el tamaño de la j -ésima muestra y N es el número total de observaciones para todas las muestras.

MUESTRA					
1	2	...	j	...	k
Y_{11}	Y_{12}		Y_{1j}		Y_{1k}
Y_{21}	Y_{22}		Y_{2j}		Y_{2k}
...
Y_{n1}	Y_{n2}		Y_{nj}		Y_{nk}

Tabla VIII: Observaciones de k muestras aleatorias para la prueba de Kruskal-Wallis.

Esta prueba se basa en la combinación de todas las observaciones de las muestras aleatorias para formar un solo conjunto de N observaciones; entonces éstas se arreglan en orden creciente de magnitud y se asigna un rango a cada observación, comenzando con un rango 1 y terminando con un rango N . Cuando el rango de todas las observaciones está completo, se determina la suma de los rangos de cada muestra. Sea R_j la suma de los rangos de la j -ésima muestra. En esencia, la prueba de Kruskal-Wallis determina si la disparidad entre las R_j con respecto a los tamaños n_j de las muestras es suficiente para garantizar el rechazo de la hipótesis nula.

La estadística de Kruskal-Wallis es:

$$H = \frac{12}{N(N+1)} \sum_{j=1}^k R_j^2 - 3(N+1)$$

Esta estadística se encuentra aproximada por una distribución chi-cuadrada con $k-1$ grados de libertad. Por lo que se rechaza la hipótesis nula para valores grandes de la estadística de la prueba de Kruskal-Wallis.

El procedimiento que se recomienda para manejar los empates es obtener el promedio de las ubicaciones que los datos ocupan. Si bien, esta corrección generalmente incrementa el valor de la estadística, se considera este efecto despreciable.