

Fundamentos de los procesos de reparación tisular: factores de crecimiento

F.J. García Esteo^a, J.M. García Castellano^b y A.J. Pérez-Caballer^c

^aServicio de COT. Hospital de Madrid-Torrelodones. Dpto. Biología Molecular. Universidad Alcalá de Henares. Madrid.

^bLaboratorio de Oncología Molecular Dr. Negrín. Hospital Universitario de Gran Canaria.

^cHospital de Madrid-Torrelodones. Facultad de Medicina. Universidad San Pablo-CEU. Madrid.

Introducción. La reparación de las lesiones tisulares constituye un complejo proceso biológico que comprende la integración de diversos estadios tales como la inflamación, la quimiotaxis y división celular, la angiogénesis, la síntesis de las proteínas de la matriz extracelular y la remodelación del tejido neoformado.

Objetivo. El objetivo de este artículo es profundizar en los procesos de reparación tisular, así como analizar las distintas estirpes de factores de crecimiento y en concreto, el plasma rico en dichos factores por su amplio uso en nuestra especialidad.

Revisión de la bibliografía. Los procesos de formación de un tejido que reproduce las propiedades morfológicas y biomecánicas del tejido previo, la activación de una proliferación masiva de varias estirpes celulares en la región dañada, que el organismo sabe activar y controlar localmente una vez restituida la población celular necesaria son, en definitiva, datos que explican el interés científico creciente de diversos campos biomédicos en la reparación tisular.

Conclusión. En el campo de la Cirugía Ortopédica y la Traumatología, prácticamente todas las patologías integran procesos de reparación tisular. Además, un gran número de complicaciones médicas o quirúrgicas puede ser atribuido a deficiencias en la reparación de los tejidos. En este sentido las recientes terapias con la utilización de factores de crecimiento constituyen opciones que deben ser estudiadas y debatidas en profundidad.

Palabras clave: *reparación tisular, factores de crecimiento, cirugía ortopédica, biología.*

Basics of tissue regeneration: growth factors

Introduction. The repair of tissue damage is a complex biological process involving various integrated stages, such as inflammation, chemotaxis and cell division, angiogenesis, synthesis of extracellular matrix proteins, and remodeling of neoformed tissue.

Aim. Tissue repair processes were examined and different lines of growth factors were analyzed, specifically, growth factor-rich plasma, which is widely used in our specialty.

Literature review. The processes of formation of a tissue that reproduces the morphologic and biomechanical properties of the original tissue, and the activation of massive proliferation of various cell lines in the damaged area that the body can activate and control locally once the necessary cell population is restored are findings that explain growing scientific interest in tissue repair in various biomedical fields.

Conclusions. In the field of orthopedic surgery, almost all pathologies involve tissue repair processes. In addition, a large number of medical or surgical complications can be attributed to impaired tissue repair. Consequently, recent therapies using growth factors are options that merit study and debate in depth.

Key words: *tissue repair, growth factors, orthopedic surgery, biology.*

Correspondencia:

J.M. García Castellano.
Laboratorio de Oncología Molecular Dr. Negrín.
Hospital Universitario de Gran Canaria.
Barranco de la Ballena s/n.
35010 Las Palmas de Gran Canaria.
Correo electrónico: jmgc_61@yahoo.com

Las lesiones de los tejidos pueden afectar a todos los seres vivos pluricelulares. Un organismo capaz de reparar una lesión muestra una clara evidencia de su complejidad¹. La reparación tisular ha fascinado desde siempre en el ámbito de la investigación médica, constituyendo un complejo proceso biológico que comprende la integración de diversos estadios tales como la inflamación, la quimiotaxis y divi-

sión celular, la angiogénesis, la síntesis de las proteínas de la matriz extracelular y la remodelación del tejido neoformado. La aparición de un tejido nuevo donde previamente había una solución de continuidad, la formación de un tejido que reproduce las propiedades morfológicas y biomecánicas del tejido previo, la activación de una proliferación masiva de varias estirpes celulares en la región dañada, que el organismo sabe activar y controlar localmente una vez restituida la población celular necesaria son, en definitiva, datos que explican el interés científico creciente de diversos campos biomédicos en la reparación tisular.

La reparación tisular no es una disciplina marginal en el campo de la investigación biomédica. Casi todas las enfermedades albergan durante su evolución procesos de reparación tisular. En el campo de la Cirugía Ortopédica y la Traumatología rara es la patología, que bien en su patogenia, bien en sus alternativas terapéuticas, no integre procesos de reparación tisular. Además, un gran número de complicaciones médicas o quirúrgicas puede ser atribuido a deficiencias en la reparación de los tejidos, existiendo un amplio abanico de enfermedades (diabetes, cáncer, inmunodepresión), que influyen de forma negativa sobre la reparación de las lesiones tisulares, siendo la causa de una parte importante de la morbilidad e, indirectamente, de la mortalidad que encontramos a nivel hospitalario.

La cicatrización de heridas y la consolidación de las fracturas, por citar dos exponentes significativos, por su elevada incidencia y por los problemas que plantean en condiciones fisiológicas (lentitud del proceso de reparación) y patológicas (alteración de la calidad biológica de la reparación), precisan de nuevas aportaciones y estrategias terapéuticas. El encontrar alternativas terapéuticas que estimulen los procesos de reparación adquiere una singular importancia para la superación de múltiples patologías. Para ello es clave conocer los fundamentos biológicos y celulares de la reparación, así como las propiedades y formas de actuar de los mediadores moleculares que regulan estos procesos (factores de crecimiento, citocinas, etc.).

La reparación de los tejidos está bien caracterizada a nivel microscópico, pero no así a nivel molecular^{2,3}. No obstante, los avances científicos alcanzados en este campo en las dos últimas décadas nos permiten constatar que los factores peptídicos de crecimiento regulan los procesos clave de la reparación tisular.

FACTORES DE CRECIMIENTO

Conforme se fue vislumbrando la certeza del importante protagonismo de estas moléculas proteicas, surgió la tentación manifiesta de administrarlas de forma exógena para estimular la reparación. De hecho, esta línea de pensamiento ha llegado a constituir una de las vanguardias más prometedoras de la investigación médica actual, por la potencialidad de sus aplicaciones terapéuticas.

El desarrollo de proteínas con propiedades terapéuticas es una de las alternativas más sólidas de que dispone la industria biotecnológica. Pero si bien las proteínas reúnen numerosas y atractivas propiedades, también tienen desventajas que pueden limitar su extensa aceptación en el ámbito médico. Éstas incluyen su baja biodisponibilidad oral y transdérmica, su inestabilidad física y química y su corta vida media *in vivo*⁴. Además, la administración de factores de crecimiento (FC) por vía sistémica en muchas ocasiones provoca efectos indeseables⁵ y el descubrimiento relativamente reciente de los FC, así como sus múltiples acciones metabólicas y tisulares en el organismo, aún no bien conocidas, hacen que todavía no gocemos de una perspectiva adecuada en el tiempo e ignoremos otros efectos nocivos que su utilización pueda acarrear.

Con estas premisas es lógico aventurar que en la medida que conozcamos mejor las propiedades y funciones biológicas de estas proteínas podremos rentabilizar mejor sus acciones terapéuticas y evitar al mismo tiempo una eventual ineficacia de las mismas, así como los efectos nocivos derivados de una utilización inadecuada. Y es que, como ocurre con cualquier molécula con actividad biológica, no todo vale en la administración de principios activos, es decir, los factores de crecimiento pueden ejercer funciones moduladoras positivas, no tener eficacia alguna o incluso desarrollar acciones negativas dependiendo del modo en que se verifique su uso; incluso un mismo FC puede desarrollar acciones contrapuestas modificando su concentración en el medio extracelular.

Dos hechos trascendentales acontecidos en las dos últimas décadas precipitaron un incremento explosivo en el conocimiento que tenemos acerca de los FC y sus acciones biológicas, como fueron: el advenimiento de la clonación molecular a principios de los ochenta y la capacidad de producir FC recombinantes puros a través de las técnicas de biología molecular. La disponibilidad de grandes cantidades de FC purificados ha permitido desarrollar múltiples estudios experimentales en animales, e incluso iniciar posteriormente los primeros ensayos en humanos. El estudio de los FC será utilizado para ilustrar los efectos sistémicos y locales de los mismos con respecto a su capacidad para estimular la cicatrización de una herida⁶, la reparación musculotendinosa o la consolidación de una fractura.

Los FC son proteínas que ejercen diversos efectos sobre el crecimiento celular, metabolismo y diferenciación, regulando diferentes procesos biológicos a través de interacciones con receptores celulares que funcionan como un ligando-activador de enzimas intracelulares⁷. Son péptidos grandes o glucoproteínas y representan un sistema de señales que organiza y coordina la proliferación celular, solos o en asociación. Aunque la denominación «factor de crecimiento» fue utilizada inicialmente para describir sustancias secretadas que mejoran la división celular, el término incluye ahora a proteínas que estimulan o inhiben la progresión a

través del ciclo celular, o que actúan principalmente para regular la diferenciación celular⁸. Las sendas enzimáticas que se inician por la unión de un factor de crecimiento a su receptor conducen a largo plazo a cambios en la expresión genética y síntesis proteica que alteran el fenotipo de células individuales y tejidos, y tienen profundos efectos sobre el crecimiento y desarrollo completo del animal^{3,8}.

Los factores peptídicos de crecimiento fueron descubiertos inicialmente debido a su capacidad para estimular la mitosis continua de células quiescentes, en un medio nutricionalmente completo que carecía de suero. Esto distingue a los FC de los elementos esenciales, cofactores y nutrientes requeridos para los procesos metabólicos, pero que no son suficientes para iniciar la división celular. Tanto los nutrientes como los FC son necesarios para la mitosis, aunque sólo los FC pueden iniciar la mitosis de las células quiescentes³.

Los FC ejercen funciones distintas en pacientes catabólicos y malnutridos, así como en pacientes con cáncer. De hecho, son secretados por muchos tipos celulares como una función basal o de respuesta a un desafío, como una herida o un proceso carcinogénico. Son los mediadores del crecimiento y reparación celular, fisiológico y patológico, que incluye procesos tales como la embriogénesis, reparación de tejidos y carcinogénesis. Una interrelación compleja de lazos de *feed-back* surge en el medioambiente tisular, donde los FC se regulan a sí mismos, y los unos a los otros durante el crecimiento tisular⁶.

Los FC son producidos localmente a nivel del tejido lesionado, y sistémicamente desde diferentes fuentes, siendo sintetizados por muchos tipos celulares que intervienen en la reparación de los tejidos. Actúan sobre la célula productora de diversas formas (estimulación endocrina, paracrina, yuxtacrina, autocrina e intracrina)³. Un modo de acción endocrino acontece cuando ejerce su acción sobre células distantes. El paracrino ocurre cuando un FC que es secretado por una célula tiene un efecto sobre las células adyacentes. Un modo yuxtacrino es similar, aunque el FC cuando ejerce su efecto está unido a la membrana celular o a la matriz extracelular. Las acciones autocrinas están mediadas por un FC sobre su propia célula de origen, después de su secreción dentro del medio extracelular⁸. Una variación de la acción autocrina ha sido denominada intracrina y fue descrita por primera vez en una variante oncogénica del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) denominada *v-sis*⁹. La acción intracrina ocurre dentro de la célula de origen, y es así independiente de la secreción del FC⁸.

Un único factor de crecimiento puede dar lugar a importantes y diferentes respuestas, inhibitorias y/o estimuladoras, dependiendo de sus interacciones con otros factores y con el medio ambiente celular dentro del cual son liberados. Los FC liberados desde macrófagos, neutrófilos, linfocitos, plaquetas y fibroblastos se unen a células diana por una vía específica a través de los receptores de superficie celulares, induciendo a las células a migrar, dividirse o pro-

ducir otras proteínas (síntesis de la matriz) o factores requeridos para la reparación⁶. Los FC poseen también efectos sobre la locomoción, contractilidad y diferenciación celular, que son tan esenciales para la reparación de los tejidos como para el crecimiento. Además, las moléculas clasificadas como FC pueden tener un potencial adicional y diversos efectos sobre la síntesis de la matriz. Estas propiedades demostrables *in vitro* llevaron a la conclusión de que tales FC desempeñan un importante papel en la reparación³.

Ahora se sabe que algunas hormonas peptídicas poseen distintas cualidades, cumpliendo funciones específicas en el ámbito de la reparación. Las hormonas también regulan el crecimiento y desarrollo de las células y tejidos, y por ello podrían ser clasificadas en este sentido como FC. En general, las hormonas son sustancias producidas en glándulas endocrinas, que son secretadas dentro de la corriente sanguínea y actúan en localizaciones distantes de sus lugares de síntesis. Aunque este modo endocrino de acción es compartido por algunos FC, como por ejemplo la familia del factor de crecimiento insulínico (IGF), existen diferencias fundamentales entre estos dos tipos de moléculas. Al contrario de las hormonas, los FC son producidos por muchos tejidos en el cuerpo, y así, no son exclusivamente sintetizados por glándulas específicas. Los FC son proteínas, mientras que las hormonas pueden ser proteínas, péptidos pequeños o derivados de lípidos. Los FC también emplean modos de acción que los distinguen de las hormonas, denominados paracrino, autocrino y yuxtacrino. Las citocinas son proteínas secretadas producidas principalmente por linfocitos, macrófagos y precursores de células sanguíneas. Estas proteínas actúan regulando la función de los sistemas inmune y hematopoyético. Las citocinas son similares a los FC tradicionales en sus modos de acción⁸.

Los FC pueden también interactuar con otras células asociadas o proteínas transportadoras secretadas. En general, las proteínas transportadoras no median directamente los efectos biológicos, pero modulan la disponibilidad o estabilidad de los FC. Algunos de ellos actúan sobre diferentes tipos de células, mientras que otros son bastante específicos de algunas de ellas³.

Los efectos de los FC están mediados por la activación de receptores celulares específicos³. Los receptores son módulos de proteínas transmembrana que pueden unir FC a sus dominios extracelulares con una alta afinidad y especificidad, y pueden transmitir la información generada por la unión produciendo cambios intracelulares. Las similitudes estructurales entre los receptores celulares pueden explicar la reactividad cruzada entre sustancias⁶.

Los receptores de los FC constan de, por lo menos, tres dominios: una región extracelular que se une al factor de crecimiento con alta afinidad y especificidad, un segmento intramembrana y uno o más dominios intracelulares que interactúan con señales moleculares dentro de la célula. A pesar de la diversidad de FC y receptores caracterizados, todos

los receptores comparten estos rasgos estructurales. Cuando el mismo ligando se une a dos receptores vecinos ocurren cambios conformacionales que son transmitidos al dominio intracelular, y origina una serie de cambios citoplasmáticos que dan lugar al inicio de la transcripción de los ácidos nucleicos. Los receptores de los FC ejercen su función uniéndose a enzimas intracelulares a las que activan. Con la excepción de los receptores para la familia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), todos los receptores de los FC estudiados tienen actividad tirosina quinasa¹⁷. Así, en muchos casos, los fenómenos intracitoplasmáticos son realizados a través de esta enzima, la cual fosforila proteínas citoplasmáticas, alguna de las cuales permanecen en el citoplasma y otras pasan al núcleo donde causan una activación genética⁶. Los receptores para TGF- β y moléculas relacionadas fosforilan sustratos de serina y treonina en lugar de tirosina¹⁰.

Varios principios generales gobiernan los pasos a través de los cuales los FC activan sus receptores, aunque hay detalles específicos que difieren para cada combinación FC-receptor. La unión de un FC al dominio extracelular de su receptor, primero conduce a una dimerización u oligomerización del receptor⁸. La dimerización de los receptores sucede bien porque el FC existe como un dímero y se une a dos receptores (TGF- β , PDGF, factor de crecimiento neurotrófico [NGF]), o porque un FC monomérico tenga dos sitios de unión para su receptor (factor de crecimiento epidérmico [EGF]), o bien porque el receptor sea un dímero preformado (IGF-1). Los cambios conformacionales inducidos por la unión al ligando activan el dominio intracelular quinasa del receptor, lo cual conduce secuencialmente a una fosforilación del receptor, por un mecanismo de transfosforilación, y entonces a la fosforilación de otros sustratos. La autofosforilación, particularmente sobre residuos de tirosina, crea una serie de sitios cercenados para otras proteínas intracelulares que contienen módulos denominados dominios SH2, por su similitud con una región de aproximadamente 100 aminoácidos que fue primero identificada en el oncogén celular c-src¹¹. Recientemente, otra clase de lugar de unión a fosfotirosina, denominado dominio PTB, ha sido identificado. Aunque estructuralmente distinto del dominio SH2, es funcionalmente equivalente en mediar interacciones entre una tirosina fosforilada y una proteína de señalización. Así, los receptores de FC activados con múltiples tirosinas fosforiladas en diferentes contextos de aminoácidos, vuelven al punto focal para la agregación intracelular transitoria de muchas proteínas que contienen SH2- o PTB-. Estas proteínas incluyen una variedad de intermediarios en sendas de transducción de señal, con los últimos efectos amplificados y diversificados respecto a la señal inicial inducida por la unión del FC a su receptor¹².

En el contexto de las acciones sobre el núcleo de los FC, los cambios a largo plazo que se dan en las células inducidas por FC son secundarios a alteraciones en la expres-

sión de genes. Estos cambios no son sino un resultado de las múltiples rutas de señales inducidas después de la unión de proteínas sobre el receptor activado. Así, hay sendas que reflejan una respuesta primaria a los FC, de la que dependen una serie de interacciones proteína-proteína y pasos enzimáticos, en los que intervienen miembros de la familia MAPK (proteína activada mitogénica), que no requieren una nueva síntesis de proteínas celulares. La proteína c-fos se combina con c-jun como componentes de la proteína-1 activadora del factor de transcripción, el cual a su vez regula la actividad de una variedad de genes¹³. Así, la expresión de genes y la biosíntesis de proteínas están alteradas después de que son estimuladas las señales del factor de crecimiento.

Una senda relacionada mediada por la activación de receptores de FC, conduce a la estimulación de otros miembros de la familia MAPK denominados quinasa c-jun N-terminal (JNK). Las JNK fosforilan c-jun sobre dos residuos de serina, que son críticos para su activación como un factor de transcripción¹⁴. Así, c-jun y c-fos pueden ser inducidos a través de la ruta de señales estimuladas por el FC. Hay también otras cascadas de MAPK con diferentes efectos sobre el núcleo que son activadas por los receptores de los FC¹³. Como podemos observar la acción del FC a través de diversas rutas tiene una gran repercusión en la biología de la célula, y por ende, en la del tejido en el que se localiza.

BIOLOGÍA DE LA REPARACIÓN

Si bien la diversidad de tejidos condiciona peculiaridades distintas en el contexto de la reparación, hay fenómenos celulares y tisulares que alberga el fenómeno reparativo que son comunes, que a grandes rasgos y someramente, reflejamos a continuación.

Los avances en los últimos 10 años han contribuido a aumentar nuestros conocimientos sobre biología celular, inflamación y reparación tisular. La reparación constituye un fenómeno biológico que comprende varios procesos perfectamente ensamblados y ordenados. Desde el mismo momento en que se produce la agresión a un tejido se activa una cascada de señales moleculares que dan lugar a una secuencia concatenada de procesos que integran las siguientes fases: inflamatoria, proliferativa y reparadora y de remodelación.

Hay un considerable intervalo de tiempo en la sucesión de todas estas fases, que hasta completar todo el proceso se puede prolongar varios meses³.

Fase inflamatoria

La inflamación representa la compleja reacción de defensa del organismo ante la acción de diferentes agentes nocivos de procedencia mecánica, física, química o bacteriana. Todas las lesiones presentan algún tipo de proceso integra-

do en los variados mecanismos que componen la denominada respuesta inflamatoria. El objetivo de ésta es la eliminación de los agentes nocivos, o en su defecto su inactivación, limpiar el tejido y establecer las condiciones óptimas para los sucesivos procedimientos proliferativos.

Esta fase se inicia en el momento en que se produce la lesión y su duración alcanza en condiciones fisiológicas los primeros días del proceso.

La mayor parte de las lesiones en nuestra especialidad causan una hemorragia desde los vasos sanguíneos dañados adyacentes. El primer objetivo de los procesos reparativos es el de detener la hemorragia. Al producirse una lesión desde las células dañadas se liberan sustancias vasoactivas que provocan una constricción de los vasos (vasoconstricción), evitando una mayor pérdida de sangre, hasta que la aglomeración de trombocitos consiga una primera obliteración vascular. Los trombocitos que circulan en el plasma sanguíneo se adhieren a los vasos lesionados en el lugar de la lesión, formando un tapón que oblitera los vasos de forma provisional. El sistema de coagulación se activa a través del complejo proceso de aglomeración de trombocitos, para de ese modo cerrar de manera permanente el lugar de la lesión. En la coagulación, que transcurre en diversas etapas (cascada de coagulación), mediante la intervención de 30 factores diferentes, se forma una red de fibrina compuesta por fibrinógeno. Así se origina un coágulo que detiene la hemorragia, cierra la herida y la protege de posibles contaminaciones bacterianas y de la pérdida de humores. El coágulo constituirá un andamiaje básico para la formación del nuevo tejido cicatricial, y proporciona una matriz provisional a través de la cual las células pueden migrar durante los procesos de reparación. Está formado por plaquetas embebidas en una mezcla de fibras de fibrina entrecruzadas, junto a pequeñas cantidades de fibronectina plasmática, vitronectina y trombospondina. Además el coágulo también sirve de reservorio de citocinas y FC que son liberados en la degranulación plaquetaria. Este «cocktail» precoz de factores de crecimiento constituye «el pistoletazo de salida» de los procesos de cierre de la lesión: proporciona señales quimiotácticas para reclutar células inflamatorias circulantes hacia la zona lesionada, y estimula la característica respuesta angiogénica de la herida¹⁵.

Al mismo tiempo la aglomeración de trombocitos y los procesos de coagulación sanguínea deben permanecer localizados en el lugar de la lesión, para que los procesos trombóticos que ellos mismos originan no pongan en peligro a la totalidad del organismo. Es por ello que en la sangre en circulación se controla continuamente el proceso de coagulación mediante sustancias del sistema fibrinolítico (disolventes de coágulos).

Las arteriolas, que se constriñeron brevemente en el momento de producirse la lesión, se dilatan por medio de la acción de sustancias vasoactivas como la histamina, la serotonina y la quinina. Esto conduce a que se produzca una in-

tensa irrigación sanguínea en la zona de la lesión y un incremento del metabolismo local. La dilatación vascular (vasodilatación) provoca un aumento de la permeabilidad vascular con un aumento de la exudación de plasma sanguíneo en el intersticio. Un primer impulso exudativo tiene lugar aproximadamente 10 minutos después de que se produzca la lesión, y un segundo impulso después de transcurridas entre una y dos horas. Luego se va desarrollando un edema, a cuya formación contribuyen de forma adicional la ralentización de la circulación sanguínea, pero también la acidosis local (desplazamiento del equilibrio ácido básico hacia la banda ácida) en la región de la lesión. Actualmente se ha constatado que la acidosis local intensifica los procesos catabólicos y el aumento del humor hístico, y diluye los productos tóxicos de descomposición producidos por los tejidos y las bacterias.

La degranulación plaquetaria durante la formación del coágulo libera distintos FC, el PDGF, el VEGF, el bFGF, el IGF-1, el EGF y el TGF- β , que son potentes factores quimiotácticos de células inflamatorias, sobre todo el PDGF y el TGF- β . Los FC liberados desde las plaquetas parecen ser los iniciadores de la cascada de acontecimientos que dirigen a la curación, se difunden rápidamente desde el lugar de la lesión y son degradados por proteasas². Hay una gran variedad de señales quimiotácticas que atraen neutrófilos y monocitos al lugar de la lesión. Además de los FC hay otras señales quimiotácticas para estas células inflamatorias tan variadas como péptidos formil metionil escindidos de proteínas bacterianas cuando hay contaminación del lecho lesionado, y productos de la reacción proteolítica de la fibrina y otros componentes de la matriz¹⁵.

Entre dos y 4 horas después de que se produzca la lesión, y dentro del marco de las reacciones inflamatorias, se inicia la migración de leucocitos o fagocitos hasta la región tisular dañada, que se encuentran capacitados para fagocitar restos tisulares, además de material y gérmenes exógenos. Los leucocitos que circulan por la sangre periférica migran hacia el espacio de la herida. Esta migración es un fenómeno complejo que envuelve procesos de reconocimiento celular por parte de las células endoteliales y de los componentes de la matriz, a través de moléculas específicas de adhesión (selectinas, integrinas, etc.).

Las citocinas y los FC promueven la expresión de moléculas de adhesión sobre poblaciones endoteliales y leucocitarias. Por ejemplo, el TGF- β potencia la expresión de receptores de integrina β 1 de monocitos que modulan la interacción celular con componentes de la matriz¹⁶. Así, los neutrófilos y los monocitos son reclutados de la circulación sanguínea gracias a cambios moleculares que se originan en la superficie de las células endoteliales de los capilares que se ubican en el lugar de la herida. Inicialmente algunas moléculas de la familia de las selectinas se expresan para permitir una rápida pero ligera unión de los leucocitos a las células endoteliales, que permita enlentecer su velocidad y

verificar el rodamiento (*rolling*) por las paredes de los vasos, siendo de este modo extraídos de la rápida circulación sanguínea. Seguidamente se verifican fuertes uniones moleculares mediadas por integrinas del tipo $\beta 2$ que detienen las células, lo cual permite que se inicie la diapédesis por medio de la cual los leucocitos activados se arrastran a través de los espacios entre las células endoteliales y se extravasan, para llegar al espacio intersticial¹⁷. Diversos estudios en ratones transgénicos constituyeron los primeros en aportar información para avanzar en el conocimiento de las adhesiones cruciales que interactúan en este proceso; por ejemplo, en los ratones carentes de p-selectina, el *rolling* leucocitario y la extravasación están severamente dañados¹⁵.

Los neutrófilos llegan a la región unos minutos después de la lesión; durante largo tiempo se ha considerado que tenían un papel limitado a combatir y despejar la contaminación bacteriana inicial, pero estudios recientes nos han mostrado que los neutrófilos son también una fuente de citocinas proinflamatorias que probablemente constituyen una de las más tempranas señales para la activación local de fibroblastos y queratinocitos. En la fase inicial de la inflamación predominan pues los granulocitos neutrófilos, los cuales se encargan de liberar diversas sustancias mensajeras estimulantes de la inflamación, las llamadas citocinas (TNF- α , e IL); fagocitan bacterias, pero también liberan enzimas proteolíticas que se encargan de eliminar las regiones dañadas y sin vitalidad del tejido lesionado. Esto representa una primera limpieza de la herida. El número de neutrófilos alcanza un pico a las 24 horas y entonces cae gradualmente, cesando la infiltración de neutrófilos en unos pocos días, siendo los neutrófilos utilizados en fases previas fagocitados por macrófagos tisulares¹⁵. En ausencia de infección los neutrófilos no son requeridos más adelante para la reparación tisular normal¹⁶.

Transcurridas 24 horas se produce la migración de los monocitos a la región de la lesión reclutados desde la circulación sanguínea (gracias a factores quimiotácticos como TGF- β , sobre todo¹⁸, y también PDGF y FGF), alcanzando su pico a las 48 horas después de producirse la herida. PDGF también induce la síntesis de MCP-1/JE por las células tisulares circundantes, y esto constituye un persistente estímulo para la infiltración de monocitos¹⁶. Los monocitos se transforman en macrófagos en la zona de la lesión, de modo que al tercer día los neutrófilos han sido sustituidos en gran parte por macrófagos. Los macrófagos ocupan un papel central en la cicatrización, de hecho, ésta no sería posible sin su participación. Atraídos por estímulos quimiotácticos (FC) provocados por toxinas bacterianas, migran en densas filas desde la sangre hasta llegar a la herida. En el marco de sus funciones fagocitadoras (de microorganismos, otras células y restos de la matriz¹⁵) que representan el máximo grado de actividad de estas células, no limitan sus funciones a la mera acción directa sobre los microorganismos, sino que ayudan en la presentación de antígenos a los linfo-

citocitos; los antígenos que son capturados y parcialmente modificados por los macrófagos son puestos a disposición de los linfocitos de una forma reconocible. Si la infiltración de macrófagos es impedida, la reparación está severamente dañada¹⁹. Por ello se propuso y posteriormente se comprobó que los macrófagos liberan una batería de citocinas (que son proteínas mediadoras de la inflamación como la IL-1 y TNF- α) y FC (bFGF, TGF- α , TGF- β , VEGF, PDGF, factor de crecimiento derivado de los macrófagos [MDGF, que es una proteína similar a PDGF], MCP-1/JE y el HB-EGF) en la región lesionada que amplifican las señales precoces liberadas por la degranulación plaquetaria y los neutrófilos¹⁵, y que a su vez estimulan y controlan la deposición de proteínas de la matriz, la angiogénesis y la reepitelización en el caso de lesiones cutáneas¹⁶. Por ello son considerados en el momento actual una fuente esencial de citocinas que conducirá a la reparación de la herida^{3,16}.

La migración de leucocitos se detiene en los primeros días. Si se produjese una infección, la migración de leucocitos se mantendría, y se intensificaría la fagocitosis, prolongándose la fase inflamatoria y retrasándose la curación de la herida.

Fase proliferativa

En esta fase, que comienza aproximadamente al cuarto día, predomina la proliferación celular con el fin de alcanzar la reconstitución vascular y volver a rellenar la zona defectuosa mediante el tejido neoformado. Los FC liberados por los macrófagos estimulan la migración de fibroblastos (TGF- β y PDGF fundamentalmente), células epiteliales (EGF) y células del endotelio vascular ilesas de los márgenes de la lesión (bFGF y IGF-1)²⁰; a su vez, estas células proliferan, aumentando la celularidad, e iniciando la fase proliferativa, que a menudo dura varias semanas.

La migración de fibroblastos y su ulterior proliferación es desencadenada por TGF- β , PDGF, EGF, FGF, y las citocinas fibrogénicas (IL-1 y TNF- α)²⁰.

A partir del tercer día, los fibroblastos que derivan del tejido circundante van incrementando su número dentro de la herida. Los fibroblastos migran, se dividen y se diferencian y comienzan a depositar el colágeno¹⁶.

La formación de este tejido neoformado es iniciada, principalmente, por los fibroblastos, que producen por una parte colágeno y por otra proteoglicanos (macromoléculas de la matriz extracelular). La red de fibrina es aprovechada como matriz por los fibroblastos para la formación del colágeno. Las distintas poblaciones celulares presentes en la herida liberan varios FC (los fibroblastos concretamente bFGF, IGF-1, TGF- β , PDGF y KGF, y las células endoteliales bFGF y PDGF. Muchos de los FC que regulan la proliferación de los fibroblastos, estimulan también la síntesis del colágeno (PDGF, FGF, TGF- β). El factor de crecimiento más importante que participa en la fibrosis inflamatoria es el TGF- β ²¹.

La reparación de un tejido no puede progresar sin nuevos vasos, ya que éstos deben garantizar un aporte adecuado de sangre, oxígeno y nutrientes. El crecimiento de nuevos vasos sanguíneos es esencial para la función normal de fibroblastos y leucocitos. El oxígeno y los nutrientes permiten a los fibroblastos dividirse y sintetizar colágeno y otras proteínas de la matriz¹⁶.

Gracias a los FC, los vasos intactos del borde de la herida generan brotes vasculares que migran a la zona lesionada y al coágulo sanguíneo colindante; la degradación proteolítica de la membrana basal del vaso progenitor, la migración de las células endoteliales hacia el estímulo angiogénico (VEGF, bFGF, IGF-1), la proliferación de las células endoteliales justo detrás de las células que migran, la maduración de las células endoteliales y el reclutamiento de las células periendotheliales, son pasos sucesivos regulados por los FC²². Los macrófagos activados son parte integrante de la respuesta neovascular y liberan bFGF y VEGF. El bFGF es también liberado tras la degradación enzimática de la membrana basal subendotelial. La migración y división de células endoteliales ocurre estimulada en parte por bFGF y VEGF¹⁶. El VEGF, que es el factor más importante de la angiogénesis, uniéndose a sus receptores, estimula la proliferación de células endoteliales. Es sintetizado en los queratinocitos de los bordes de la herida y en los macrófagos, posiblemente en respuesta a KGF y a TGF- α , y simultáneamente, uno de sus receptores, flt-1, es regulado positivamente por las células endoteliales en el lugar de la lesión. La expresión del VEGF es estimulada por otros FC (como TGF- β , PDGF, TGF- α) y citocinas²³.

El bFGF es un potente factor angiogénico; cuando este factor es experimentalmente anulado con anticuerpos mono-específicos contra receptores de bFGF, la angiogénesis es bloqueada de forma casi completa²⁴. El IGF-1 es, asimismo, un potente agente quimiotáctico para las células del endotelio vascular³, existiendo además otros factores como el PDGF y el TGF- β , que son importantes en la correcta maduración y remodelación vascular⁵.

Las células endoteliales deben aumentar la expresión de integrinas como las $\alpha v \beta 3$ si quieren responder a alguna señal angiogénica de la lesión. Las $\alpha v \beta 3$ están expresadas transitoriamente en los extremos de los capilares en crecimiento del tejido neoformado, y la presencia de péptidos o anticuerpos que bloqueen estas integrinas causan un fallo de la angiogénesis, y como resultado, un tejido con un importante deterioro de su reparación²⁵. Al igual que ocurre con las demás migraciones celulares en la zona dañada, la morfogénesis capilar también depende de una severa regulación de la proteólisis de la matriz circundante durante la fase de invasión.

A través de sucesivas divisiones de las células endoteliales se origina una figura canaliculada, la cual se vuelve a dividir en su extremo adquiriendo una forma de botón. Pequeños lazos capilares se forman y canalizan, permitiendo

el flujo de la sangre¹⁶. Estos botones vasculares individuales crecen uno encima de otro y se unen formando asas vasculares, que a su vez se seguirán ramificando, hasta que se topen con un vaso aún mayor en el que pueden finalmente desembocar. Recientemente se han descubierto en la sangre células germinales endoteliales, las cuales ponen en entredicho la doctrina vigente hasta ahora⁸.

Una lesión bien irrigada se encuentra extremadamente vascularizada, incluso la permeabilidad de los nuevos capilares que se han formado es mucho más alta que la de los capilares normales, lo cual se debe al aumento del metabolismo en la región de la herida. Sin embargo, los nuevos capilares tienen una menor capacidad de resistencia ante las sobrecargas producidas de forma mecánica. Con la posterior maduración del tejido neoformado que se transforma en tejido cicatricial, también se vuelve a reducir nuevamente la densidad vascular⁸.

La matriz extracelular está formada en parte por carbohidratos glucosaminoglicanos. Muchos de estos se combinan con moléculas de naturaleza proteica para formar proteoglicanos. Los fibroblastos producen por una parte colágeno, que madura fuera de las células hasta transformarse en una fibra y que le otorga su resistencia al tejido, y por otra parte proteoglicanos. Muchos FC, incluyendo el bFGF, el VEGF y el PDGF, también se unen a las proteínas de la matriz. Así, las interacciones entre los FC de la matriz y las células son importantes para determinar el comportamiento celular y la acción de diversas citocinas¹⁶.

Los fibroblastos fusiformes no son transportados a la región lesionada mediante la circulación sanguínea, sino que proceden principalmente de los tejidos locales próximos y son atraídos por quimiotaxis. Como una respuesta temprana a la lesión, los fibroblastos dérmicos localizados en las proximidades de la herida comienzan a proliferar, y tres o 4 días después de producirse la herida comienzan a migrar hacia el interior de la matriz provisional del coágulo de la misma, donde depositan su propia matriz rica en colágeno. El retraso de la fase premigratoria parece ser principalmente debido al tiempo requerido por los fibroblastos para salir de su estado de quiescencia, y como consecuencia de esto, no acontecería en un segundo tiempo si la herida se reabriera y una nueva matriz provisional fuera depositada debajo. Muchos de los FC presentes en la lesión pueden actuar bien como mitógenos, bien como factores quimiotácticos para los fibroblastos de la herida, y algunos como ciertas isoformas de PDGF y TGF- β ¹⁵ pueden ejercer ambas acciones. La activación de las isoformas βA y βB relacionadas con el factor de crecimiento TGF- β , son inducidas en los fibroblastos que proliferan en los márgenes de la herida, y en los queratinocitos adyacentes de los bordes de la herida, respectivamente; no está claro todavía qué células responden a estas señales activadoras, pero es muy probable que su significado funcional se solape a las señales del TGF- β ²⁶.

Los fibroblastos del tejido adyacente, los cuales normalmente subyacen en una matriz rica en colágeno, deben disminuir sus receptores de colágeno y aumentar las integrinas capaces de unirse a la fibrina, fibronectina y vitronectina, para poder introducirse dentro del coágulo. Los fibroblastos se comportan de acuerdo a la doble señal que les llega desde la matriz cercana y desde los FC que se encuentran en el entorno en el cual están sumergidos. Si los fibroblastos se cultivan en un gel de fibrina-fibronectina y entonces son expuestos al PDGF, se disparará la expresión de las subunidades de integrinas de la matriz provisional $\alpha 3$ y $\alpha 5$, mientras que en un gel de colágeno el mismo FC, en cambio, impulsa la expresión de subunidades $\alpha 2$ específicas de colágeno y no la de receptores de la matriz provisional. Los fibroblastos pueden usar una fibronectina que les conduzca como en una «tubería» dentro del coágulo, en este punto es interesante considerar que la variante de unión de fibronectina expresada por los fibroblastos y macrófagos en algunas lesiones es, por otra parte, específica a los lugares de migración de células embrionarias, sugiriendo este hecho que esta fibronectina es un sustrato excepcionalmente bueno para la migración celular¹⁵.

Poco se conoce acerca de la regulación de la activación del citoesqueleto de actomiosina, el cual debe ser crucial en la migración fibroblástica, pero es casi seguro relevante el hecho de que los fibroblastos de ratones transgénicos carentes del efecto de desunión de la proteína gelsolina, tienen impedida la respuesta migratoria en cultivo. Debido a que el PDGF activa la pequeña Rac GTPasa en fibroblastos, y a que la gelsolina disminuye la Rac, parece probable que la Rac pueda ser una de las llaves de los interruptores moleculares responsables de la migración fibroblástica en la herida¹⁵.

Alrededor de una semana después de producirse la herida, el coágulo localizado en el tejido lesionado ha sido completamente invadido y reemplazado por fibroblastos activados que son estimulados por TGF- $\beta 1$ y otros FC para sintetizar y remodelar una nueva matriz rica en colágeno¹⁵.

Los aminoácidos actúan como sustrato nutritivo y se forman durante la degradación del coágulo sanguíneo. De forma simultánea, los fibroblastos utilizan la retícula de fibrina que se formó durante la coagulación sanguínea como matriz para la formación de colágeno. La estrecha relación que existe entre los fibroblastos y la retícula de fibrina condujo en el pasado a la hipótesis de que la fibrina se transformaba en colágeno. Lo cierto, sin embargo, es que con la progresiva constitución del colágeno se va degradando la retícula de fibrina, y los vasos cerrados son nuevamente re- canalizados. Este proceso, que es controlado por la enzima plasmina, se denomina fibrinólisis.

Así pues los fibroblastos migran hacia el espacio lesional cuando se hallan disponibles los aminoácidos de los coágulos parcialmente disueltos y se halla despejado el tejido necrótico de la herida. Si por el contrario existiesen todavía

hematomas, tejido necrótico, cuerpos extraños y bacterias, se retrasarán tanto la reconstitución vascular como también la migración de fibroblastos. El alcance de la neoformación tisular se corresponde de forma directa con la envergadura de la coagulación sanguínea y la dimensión del incidente inflamatorio, incluido el desbridamiento endógeno llevado a cabo con la ayuda de la fagocitosis¹⁵.

Aun cuando los fibroblastos sean definidos usualmente como un «tipo celular uniforme» cobra especial importancia para la curación de la lesión el hecho de que difieran en sus funciones y sus reacciones frente a los FC. En una lesión se pueden encontrar fibroblastos de diferentes edades, los cuales se diferencian unos de otros tanto en sus funciones de secreción como también en el tipo de reacción que tienen frente a los FC¹⁵.

Fase de diferenciación y remodelación

En esta fase comienza la maduración de las fibras de colágeno. La extensión de la lesión se reduce, disminuye cada vez más la presencia vascular y el contenido de agua en el tejido neoformado, que gana en consistencia, y se transforma finalmente en un tejido reparado¹⁵.

Para que el tejido neoformado sea sustituido por una cicatriz son necesarios cambios en la matriz extracelular; el PDGF, el FGF, y diversas citocinas (IL-1, TNF- α) inducen la secreción de metaloproteinasas (MMP) por parte de los fibroblastos, macrófagos, neutrófilos, y algunas células epiteliales, que degradan el colágeno y otras proteínas de la matriz extracelular. El metabolismo del colágeno dentro de la zona lesionada es un equilibrio entre síntesis y degradación¹⁶. La digestión del colágeno maduro resulta de la ruptura de una localización específica dentro de la triple hélice α por la colagenasa intersticial (metaloproteinasa-1 de la matriz). La colagenasa intersticial es producida por diferentes tipos celulares, incluyendo células endoteliales, monocitos y fibroblastos. Es liberada como una forma inactiva y es proteolizada por plasmina o estromelina generando la enzima activa.

Una vez formadas, las MMP son inhibidas rápidamente por sus inhibidores tisulares (TIMP). Los TIMP son importantes en la regulación de la actividad de la colagenasa. Las MMP y los TIMP son esenciales en la remodelación del tejido conjuntivo. El TGF- β inhibe las MMP, es un potente estimulador de la producción de procolágeno y TIMP-1 y bloquea la inducción de colagenasa por otras citocinas. Así, el TGF- β tiene un papel fundamental en la inhibición de la colagenólisis, dirigiendo la deposición de colágeno y de otras proteínas de la matriz¹⁶. El resultado final de los procesos de síntesis y degradación es la remodelación.

La retracción de las fibras colágenas sólo desempeña un papel secundario en la reducción del espacio lesionado en algunos tejidos (heridas cutáneas). Los fibroblastos tienen una intervención mucho más decisiva en la contracción, ya

que en ciertos tejidos una vez finalizan sus actividades de secreción se transforman en parte en fibrocitos (estado de reposo) y en parte en miofibroblastos, que al igual que las células musculares lisas contienen actomiosina, proteína muscular con capacidad para generar fuerzas contráctiles que hagan posible la contracción²⁷. Esta conversión es activada por FC tales como TGF- β ¹²⁷ y señales mecánicas relacionadas con las fuerzas que resisten la contracción. Al contraerse los miofibroblastos provocan que se tensen al mismo tiempo las fibras colágenas y que el tejido de reparación se retraiga¹⁵.

La contracción reduce la superficie de la herida considerablemente, y conduce a que la zona de reparación incompleta se mantenga lo más reducida posible¹⁵. *In vitro*, los fibroblastos se alinean a lo largo de las fibras de un gel de colágeno y promueven un proceso similar por un mecanismo energético-dependiente. El TGF- β puede aplicarse para estimular la contracción de geles de colágeno *in vitro*. La vascularización de la herida decrece hasta que queda un tejido fibrótico acelular. Los factores implicados en esta transformación son menos conocidos, y aunque hemos identificado algunos, todavía no están del todo claras las señales que participan en estos eventos¹⁵.

Las diversas fuerzas de tensión que son ejercidas por los fibroblastos antes, durante y después de la contracción de la herida, han sido estudiadas en modelos de sistemas de geles de colágeno. Por ejemplo, varios FC son potentes estimulantes de la contracción del gel conducida por los fibroblastos, y presumiblemente son señales para la contracción del tejido *in vivo*. Las señales que frenan potencialmente la contracción están siendo analizadas por liberación de las fuerzas mecánicas de los geles fijados desde su unión al sustrato, para simular la pérdida de resistencia que ocurre cuando el tejido se ha reparado. Unos minutos después de liberarse de las fuerzas de resistencia, los fibroblastos activan cAMP, que es la señal de transducción del camino que involucra la entrada de iones de Ca⁺⁺ extracelulares y la producción de ácido fosfatídico por la fosfolipasa D²⁸. Seguidamente, los receptores del PDGF y el EGF pierden sensibilidad, y las células «relajadas» retornan a un estado quiescente similar al que tenían antes de producirse la herida¹⁵.

PLASMA RICO EN PLAQUETAS

El proceso lesivo que acontece tras un traumatismo o la agresión tisular que supone una intervención quirúrgica pone en marcha los mecanismos necesarios para su curación. Esta curación se puede llevar a cabo mediante un proceso de reparación o de regeneración. La reparación es la curación de una herida mediante un tejido que no restaura totalmente la arquitectura o función del tejido afectado, mientras que la regeneración consiste en la reconstitución de una par-

te perdida o lesionada. El estudio de la curación de las heridas es un proceso complejo que involucra muchos tipos celulares y factores de crecimiento. En condiciones normales, tras la lesión tisular, las plaquetas forman un coágulo estable desde el que se liberan una variedad de FC que promueven la curación tisular. Sin embargo, diversos estudios experimentales demuestran una alteración en la actividad de los FC durante la curación de las heridas debido a su reducida síntesis, incrementada degradación e inactivación. En la curación de estas heridas las plaquetas desempeñan un papel esencial, ya que son ricas en FC almacenados en sus gránulos alfa. El uso tópico de los geles formados tras la agregación plaquetaria promueve el aporte exógeno e *in situ* de estos FC, contrarrestando con ello las alteraciones anteriormente reseñadas²⁹.

Sistemas de obtención del plasma rico en plaquetas

Existen diversos sistemas comercializados para la obtención de FC a partir de plasma rico en plaquetas (PRP). En un reciente artículo López-Oliva et al³⁰ revisan los 4 sistemas conocidos en ese momento y concluyen que las diferencias entre ellos estriban en pequeños matices, pero que todos ellos comparten la eficacia a la hora de obtener estos FC. Anitua³¹ hace una descripción detallada de uno de los métodos. Someramente, se recoge la sangre en tubos con citrato sódico al 3,8% como anticoagulante. Tras centrifugar la sangre, se procede a separar las fracciones plasmáticas pipeteando 500 μ l cada vez hasta un total de 3 o 4, dependiendo del hematocrito del paciente. Los últimos 500 μ l, inmediatamente por encima de las series blanca y roja, es la fracción más rica en plaquetas. Las plaquetas de la fracción plasmática de interés son luego activadas añadiendo cloruro cálcico al 10%, procediéndose seguidamente a aplicar en el tejido.

Mecanismo de acción del plasma rico en plaquetas

Los pegamentos de fibrina se vienen utilizando desde hace décadas en los campos de la Traumatología y de la Cirugía Oral y Maxilofacial con el fin de promover una función osteoconductor. Posteriormente, varios autores utilizaron los concentrados a base de PRP en injertos orales y maxilofaciales, con el fin de obtener la fibrina de manera autóloga, activando el PRP con trombina bovina. Observaron que además del beneficioso efecto osteoconductor que aportaba la fibrina, existía un aporte de FC beneficioso para la curación ósea³².

Los FC contenidos en diferentes tipos celulares y en la matriz extracelular (MEC), regulan diversos procesos celulares, como son la mitogénesis, quimiotaxis, diferenciación y el metabolismo celular³³. Numerosos estudios han mostrado que el PDGF (factor de crecimiento derivado de las plaquetas), VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascu-

lar), TGF- β (factor de crecimiento transformante beta) bFGF (factor de crecimiento fibroblástico básico) e IGF-1 (factor de crecimiento insulínico 1) se hallan en el PRP y, la aplicación local de FC es usada para promover la curación de los tejidos³⁴. Los FC liberados de las plaquetas activadas inician y modulan la curación de lesiones tanto óseas como de partes blandas³⁵, induciendo una diferenciación celular acelerada y produciendo un tejido bien organizado, incluso en lesiones que previamente eran consideradas como intratables³⁶.

Los FC de las plaquetas están en concentraciones y proporciones normales, lo cual resulta en una mayor y más efectiva interrelación. Esto distingue al PRP de los FC recombinantes, los cuales se aplican en solitario en dosis habitualmente supra fisiológicas. En este sentido en heridas cutáneas se ha observado que es más efectiva la combinación de FC que la acción independiente de cada una ellas sobre la curación de las mismas. Así, la combinación PDGF-2 e IGF-1 o bien la de PDGF-2 y TGF- α es más efectiva que la de cada uno de ellos^{37,38}. Es sabido que en la regeneración ósea, PDGF y TGF- β tienen un fuerte efecto sinérgico quimiotáctico sobre los osteoblastos humanos³⁹.

Problemas y limitaciones en los sistemas de obtención del plasma rico en plaquetas

No se han descrito problemas de salud tras la aplicación de esta técnica. Algunos factores limitantes han sido descritos, tales como elevados hematocritos o plaquetopenia. Es por ello que se necesitan nuevas investigaciones que precisen el número óptimo de plaquetas necesarias⁴⁰. La concentración de plaquetas aumenta hasta 8 veces en la fracción plasmática rica en plaquetas respecto del recuento en sangre total, incrementándose consecuentemente la concentración de FC con el número de plaquetas. Sin embargo, las concentraciones de estos FC puede variar de paciente a paciente³⁵. Además, algunos autores demuestran que el contenido de FC en los diferentes métodos para obtener PRP varía tremendamente, sugiriendo determinar si estos resultados conllevan un efecto biológico diferente⁴¹.

Efectos conocidos de los factores de crecimiento obtenidos del plasma rico en plaquetas

Los FC pueden estimular la formación y la curación ósea, y estos resultados los hacen candidatos para su uso en cirugía ortopédica. En la regeneración ósea, PDGF y TGF- β son los factores más importantes. PDGF induce la proliferación de células mesenquimales indiferenciadas, angiogénesis y activación de macrófagos. También incrementa la regeneración ósea en conjunción con otros FC, tales como IGF-1 y TGF- β . La TGF- β puede incrementar la quimiotaxis y mitogénesis de los precursores de los osteoblastos, e inhibe la reabsorción ósea. Marx et al³² reportaron que el PRP acelera la reparación ósea debido a las altas concentra-

ciones de PDGF, TGF- β y otros FC. Slater et al⁴², usando PRP estimulan la actividad proliferativa y funcional de células similares a osteoblastos fetales humanos.

Se han descrito diversos efectos beneficiosos tras la administración de factores de crecimiento plaquetario. Así, se ha visto un descenso en la necesidad de drenajes e incidencia de complicaciones (reducción en la tasa de infecciones) y en el número de días de hospitalización en pacientes de cirugía plástica. Se han descrito también ciertas propiedades antiinflamatorias con reducción del edema y equimosis, y hemostáticas, siendo efectivo para parar el sangrado difuso capilar en las heridas.

Esta técnica está siendo usada en pacientes que van sufrir una fusión espinal lumbar. Tras observar regeneración ósea alrededor de los implantes de titanio, se hipotetiza que las plaquetas liberan múltiples FC, los cuales poseen efectos quimiotácticos y mitogénicos sobre las células madre mesenquimales y sobre los osteoblastos, acelerando con ello la curación ósea⁴³.

En cirugía de rodilla la inyección de PRP autólogo puede facilitar la reconstrucción del ligamento cruzado anterior (LCA)⁴⁴. También es útil en el anclaje del cartílago articular humano. Así, los autores reportan un caso de reanclaje de un fragmento condral mayor de 2 cm mediante técnica artroscópica con la ayuda del PRP. Los autores encuentran una curación completa y acelerada, a pesar del pobre pronóstico inicial. El resultado funcional fue igualmente excelente⁴⁵.

En heridas de extremidades inferiores se demostró una correlación directa entre la cicatrización de las mismas y el inicio de la terapia con estos FC⁴⁶.

Como sugieren Marx et al³², en la aplicación de PRP con injerto óseo, la iniciación de la regeneración ósea comienza con la liberación de PDGF y TGF- β desde las plaquetas degranuladas. PDGF estimula la mitogénesis de las células madre de la médula ósea y transfieren osteoblastos endostales hacia el injerto. También comienza la angiogénesis induciendo la mitosis de las células endoteliales. TGF- β inicialmente activa la mitosis en los fibroblastos y pre-osteoblastos e incrementa su número, así como promueve su diferenciación hacia osteoblastos maduros funcionantes. La continuada secreción de TGF- β influencia la deposición de matriz ósea por parte de los osteoblastos y a que los fibroblastos depositen matriz colágena para mantener el crecimiento de los capilares. Zhang et al, usando compuestos de biocerámicas porosas con PRP para reparar largos defectos óseos en conejos, demuestran que la adición de los mismos acelera la formación de hueso nuevo y la curación ósea a las 12 semanas⁴⁷.

Recientemente Anitua et al, estudiando el efecto del PRP sobre células de tendón cultivado, encuentran un incremento en la proliferación de estas células, las cuales, además, sintetizan VEGF, y éste, en un sistema *in vivo*, presumiblemente promoverá la neoangiogénesis⁴⁸.

Relación entre plasma rico en plaquetas y carcinogénesis

Se sabe que los FC se hallan sobreexpresados en los tumores. ¿Podrían estos FC iniciar un tumor en los tejidos donde se aplican? La revisión de la literatura no ha permitido aportar evidencias científicas que relacionen la aplicación terapéutica de PRP o de FC recombinantes con la transformación carcinomatosa de tejidos normales o displásicos.

La formación de tumores humanos es un proceso muy complejo que necesita de la acumulación de numerosas alteraciones moleculares para que estas células escapen a los sistemas de control normal existentes. Las concentraciones terapéuticas de FC podrían actuar, más que como iniciadores, como promotores en la carcinogénesis, favoreciendo la división y promoción de células previamente mutadas. Además, el fenómeno carcinogénico necesita de dosis más continuadas en el tiempo que las que se aplican en la terapéutica con PRP, teniendo en cuenta además que los FC extracelulares se degradan a los 7-10 días.

Shi et al⁴⁹ realizaron un estudio experimental en el que observaron la repercusión de la aplicación terapéutica de PDGF-BB e IGF-1 sobre la mucosa de mejilla donde previamente se había inducido una displasia. Observaron que la aplicación de los FC no producía un efecto exacerbado sobre el tejido displásico para su transformación en carcinomas, en comparación con las muestras donde no se aplicaron FC.

En conclusión, en el campo de la Cirugía Ortopédica y la Traumatología, prácticamente todas las patologías integran procesos de reparación tisular. Además, un gran número de complicaciones médicas o quirúrgicas puede ser atribuido a deficiencias en la reparación de los tejidos. En este sentido las recientes terapias con la utilización de factores de crecimiento constituyen opciones que deben ser estudiadas y debatidas en profundidad.

BIBLIOGRAFÍA

- Saulis A, Mustoe TA. Models of wound healing in growth factors studies. *Surgical Research*. 2001;62:857-73.
- Bennet NT, Schultz GS. Growth factors and wound healing: biochemical properties of growth factors and their receptors. *Am J Surg*. 1993;165:728-37.
- Bennet NT, Schultz GS. Growth factors and wound healing: Part II. Role in normal and chronic wound healing. *Am J Surg*. 1993;166:74-81.
- Putney SD, Burke P. Improving protein therapeutics with sustained-release formulations. *Nat Biotech*. 1998;16:153-7.
- Leibowitz HM, Morello S, Stern M, Kupperman A. Effect of topically administered epidermal growth factor on corneal wound strength. *Arch Ophthalmol*. 1990;108:734-7.
- Herndon DN, Nguyen TT, Gilpin DA. Growth factors. Local and systemic. *Arch Surg*. 1993;128:1227-33.
- DeGroot LJ, Jameson JL. *Endocrinology*. Philadelphia: WB Saunders Company; 2001.
- Raff MC. Size control: The regulation of cell numbers in animal development. *Cell*. 1996;86:173-5.
- Bejcek BE, Li DY, Deue TF. Transformation by v-sis occurs by an internal autoactivation mechanism. *Science*. 1989;245:1496-9.
- Massague J. TGF- β signal transduction. *Annu Rev Biochem*. 1998;67:853-91.
- Koch CA, Anderson D, Moran MF, Ellis C, Pawson T. SH2 and SH3 domains: Elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins. *Science*. 1991;252:668-74.
- Claesson-Welsh L. PDGF receptors signals. *J Biol Chem*. 1994;269:3023-6.
- Hill CS, Treisman R. Transcriptional regulation by extracellular signals: Mechanisms and specificity. *Cell*. 1995;80:199-211.
- Sánchez I, Hugues RT, Mayer BJ, Yee K, Woodgett JR, Avruch J, et al. Role of SAPK/ERK kinase-1 in the stress activated pathway regulating transcription factor c-Jun. *Nature*. 1994;372:794-8.
- Martin P. Wound healing: The aim for perfect skin regeneration. *Science*. 1997;276:75-81.
- Slavin J. The role of cytokines in wound healing. *J Pathol*. 1996;178:5-10.
- Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*. 1994;76:301-14.
- Whal SM, Hunt DE, Wakefield LM. TGF- β induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987;84:5788-92.
- Leibovich SJ, Ross R. The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and 20antimacrophage serum. *Am J Pathol*. 1975;78:71-100.
- Grant M, Jerdan J, Merimee TJ. IGF-1 modulates endothelial cell chemotaxis. *J Clin Endocrinol Metab*. 1987;65:370-1.
- Massague J. The TGF- β family. *Annu Rev Cell Biol*. 1990;6:597-641.
- Schultz GS, Grant MB. Neovascular growth factors. *Eye*. 1991;5:170-80.
- Dvorak HF. VEGF, microvascular hypermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol*. 1995;1029-146.
- Broadley KN, Aquino AM, Woodward SC, Buckley-Sturrock A, Sato Y, Rifkin DB, et al. Monospecific antibodies implicate basic fibroblast growth factor in normal wound repair. *Lab Invest*. 1989;61:571-5.
- Folkman J, D'Amore PA. Blood vessel formation: what is its molecular basis. *Cell*. 1996;87:1153.
- Hubner G, Hu Q, Smola H, Werner S. Strong induction of activin expression after injury suggests an important role of activin in wound repair. *Dev Biol*. 1996;173:490-8.
- Desmoulière A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. TGF- β induces α -smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblast. *J Cell Biol*. 1993;122:103-11.
- He Y, Grinnell F. Stress relaxation of fibroblasts activates a cyclic AMP signaling pathway. *J Cell Biol*. 1994;126:457-64.
- Crovetti G, Martinelli G, Issi M, Barone M, Guizzardi M, Campanati B, et al. Platelet gel for healing cutaneous chronic wounds. *Transfus Apheresis Sci*. 2004;30:145-51.
- López-Oliva Muñoz F, Vicario Espinosa C, Almoguera Villacañas JR. Plasma rico en plaquetas. Análisis comparativo de cuatro presentaciones comerciales. *Patología del Aparato Locomotor*. 2003;1:59-66.
- Anitua Aldecoa E. Un nuevo enfoque en la regeneración ósea. Plasma rico en factores de crecimiento (PRGF). Vitoria: Puesta al Día Publicaciones, S.L.; 2000.

32. Marx R, Carlsson E, Eichstaedt RM, Shimmelle SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet rich plasma. Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998;85:638-46.
33. Garg AK. The use of platelet rich plasma to enhance the success of bone grafts around dental implants. *Dent Implant Update.* 2000;11:17-20.
34. Anitua E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1999;14:529-35.
35. Eppley BL, Woodell JE, Higgins J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plast Reconstr Surg.* 2004;114:1502-8.
36. Carter CA, Jolly DG, Worden CE Sr, Hendren DG, Kane CJ. Platelet-rich plasma gel promotes differentiation and regeneration during equine wound healing. *Exp Mol Pathol.* 2003;74:244-55.
37. Lynch SE, Nixon JC, Colvin RB, Antoniades HN. Role of platelet-derived growth factor in wound healing: synergistic effects with other growth factors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1987;84:7696-700.
38. Lynch SE, Colvin RB, Antoniades HN. Growth factors in wound healing: single synergistic effects on partial thickness porcine skin wounds. *J Clin Invest.* 1989;84:640-6.
39. Cochran DL, Schenk R, Buser D, Wozney JM, Jones AA. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulation of bone formation around endosseous dental implants. *J Periodontol.* 1999;70:139-50.
40. Anitua E, Andia I, Ardanza B, Nurden P, Nurden AT. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost.* 2004;91:4-15.
41. Weibrich G, Kleis WK, Hitzler WE, Hafner G. Comparison of the platelet concentrate collection system with the plasma-rich-in-growth-factors kit to produce platelet-rich plasma: a technical report. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2005;20:118-23.
42. Slater M, Patava J, Kingham K, Mason RS. Involvement of platelets in stimulating osteogenic activity. *J Orthop Res.* 1995;13:655-63.
43. Lowery DR, Kulkarni S, Pennisi A. Use of autologous growth factors in lumbar spinal fusion. *Spine.* 1999;25 2 Supl:47S-50S.
44. Sánchez M, Azofra J, Aizpurúa B, Elorriaga R, Anitua E, Andía I. Use of autologous plasma rich in growth factors in arthroscopic surgery. *Cuader Artroscopia.* 2003;10:12-9.
45. Sánchez M, Azofra J, Anitua E, Andía I, Padilla S, Santisteban J, et al. Plasma rich in growth factors to treat an articular cartilage avulsion: a case report. *Med Sci Sports Exerc.* 2003;35:1648-52.
46. Knighton DR, Ciresi K, Fiegel VD, Schumerth S, Butler E, Cerra F. Stimulation of repair in chronic, nonhealing, cutaneous ulcers using platelet-derived wound healing formula. *Surg Gynecol Obstet.* 1990;170:56-90.
47. Zhang C, Yuan T, Zeng B. Experimental study of the effect of platelet-rich plasma on osteogenesis in rabbit. *Chin Med J (Engl).* 2004;117:1853-55.
48. Anitua E, Andia I, Sánchez M, Azofra J, del Mar Zalduendo M, de la Fuente M, et al. Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture. *J Orthop Res.* 2005;23:281-6.
49. Shih SD, Rees TD, Miller EG, Wright JM, Iacopino AM. The effects of platelet-derived growth factor-BB and insuline-like growth factor on epithelial dysplasia. *J Periodont.* 1996;67:1224-32.

Conflicto de intereses. Los autores no han recibido ayuda económica para la realización de este trabajo. Tampoco han firmado ningún acuerdo por el que vayan a recibir beneficios u honorarios por parte de alguna entidad comercial por la realización de este trabajo. Por otra parte ninguna entidad ha pagado ni pagará a fundaciones, instituciones educativas u otras organizaciones sin ánimo de lucro a las que estén afiliados.