

Agentes locales en la consolidación ósea: realidades actuales

L. Munuera-Martínez^a, V. Galán-Labaca^b, I. Andia^c, M. Sánchez^d y J.L. Martínez de los Mozos^b

^aFacultad de Medicina. UAM. Madrid.

^bMUTUALIA. Clínica Indautxu. Bilbao.

^cInstituto Biotecnológico. Vitoria-Gasteiz.

^dClinica de la Esperanza. Vitoria-Gasteiz.

Los factores de crecimiento desempeñan un papel clave en la consolidación de las fracturas, así como la regeneración ósea y cartilaginosa. El plasma rico en plaquetas es una forma actual de aplicar estos conocimientos para la mejora de la consolidación. En este artículo se revisan los conocimientos actuales sobre los factores de crecimiento, así como la experiencia de los autores en el plasma rico en plaquetas.

Palabras clave: factores de crecimiento, consolidación de fracturas, plasma rico en plaquetas.

Local Agents in Bone Healing: Current Updates

Growth factors play a key factor in the healing of fractures, as well as in bone and cartilage regeneration. Platelet-rich plasma (PRP) treatment is a current way of using this knowledge to improve healing. In this article we review the state of the art on growth factors against the background of our own experience with platelet rich plasma.

Key words: growth factors, failure healing, platelet rich plasma.

En este artículo revisaremos los factores de crecimiento y nuestra experiencia con la aplicación de plasma rico en factores de crecimiento plaquetario en la curación de lesiones óseas en miembros superiores.

FACTORES DE CRECIMIENTO

Concepto y biología general

Las citoquinas constituyen un grupo de proteínas liberadas por células de los mamíferos, que actúan sobre otras células a través de receptores específicos para obtener respuestas dependientes de la célula diana y de la proteína misma. La proliferación y diferenciación celular, la hematopoyesis y la regulación de las respuestas inflamatorias son algunos resultados de estas interacciones. Entre las citoquinas se encuentran las linfoquinas, interleuquinas y monoquinas, además de otros tipos como los interferones, factores de necrosis tumoral, factores estimulantes de colonias y diversos tipos de factores de crecimiento. Cualquier sustancia específica que debe estar presente en un medio para que la multiplicación de las células cultivadas tenga lugar, reci-

be el nombre de factor de crecimiento. En realidad sus acciones son muy complejas y abarcan funciones como la quimiotaxis, el reclutamiento y la proliferación de células precursoras, su diferenciación y maduración y la regulación de su capacidad de síntesis de proteínas. Todas ellas son esenciales en procesos fisiológicos como el desarrollo embrionario, fetal y postnatal y en otros patológicos como la reparación y regeneración de los tejidos. En definitiva, se trata de polipéptidos locales con especificidad tisular, reguladores de la actividad celular. Sus funciones biológicas se realizan por unión en la superficie de la célula diana a la porción extracelular de grandes receptores transmembrana. La porción intracelular del receptor es estimulada activando una proteína-quinasa específica. Se inicia una sucesión de acciones que termina en la activación de la transcripción de un gen al ARN mensajero. El mensaje portador de la correspondiente secuencia de bases del gen es traducido para la específica síntesis proteica en la subunidad adecuada del ribosoma¹.

Los factores locales de crecimiento (FLC) actúan habitualmente por un mecanismo paracrino: la célula reguladora segrega la sustancia en el medio intercelular, donde alcanza por difusión la célula diana. Algunos actúan por mecanismo autocrino: el FLC ejerce su acción sobre la misma célula que lo produce. Ocasionalmente el mecanismo es endocrino para alcanzar células distantes a través del sistema vascular o linfático. En cualquier caso, sus funciones se ejecutan dependiendo de factores diversos, ya que se trata de sustancias

Correspondencia:

L. Munuera Martínez.
Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid.
C/ Arzobispo Morcillo s/n. 28029 Madrid.

pleiotrópicas: quimiotaxis, mitogénesis y diferenciación celular varían según la concentración del FLC en cada momento, el tipo de célula diana y su grado de diferenciación, la interacción con otras citoquinas presentes y el contexto tisular en general. Es obvio, por otra parte, que en todos los procesos fisiológicos y patológicos los diversos FLC y citoquinas se hacen presentes y actúan en secuencias y concentraciones de sutil variación según las necesidades. Se han señalado algunas cifras orientativas referentes a las dosis reales necesarias para modelos experimentales, observándose una gradación creciente a medida que se avanza en la escala filogenética: 0,01-0,1 mg/ml para roedores, 0,4 mg/ml para conejos y 0,75 mg/ml para macacos. A pesar de lo aparentemente reducido de las cifras, estas concentraciones son difíciles de obtener de extractos purificados de los depósitos extracelulares donde se encuentran habitualmente (1 mg de proteína ósea morfogénica [BMP]/1 kg de tejido óseo). Por todo ello se ha investigado y desarrollado su obtención a partir de procedimientos de biotecnología recombinante.

El descubrimiento y producción recombinante de uno de los más populares FLC, la BMP, ilustra adecuadamente estos avances. Hace 40 años Urist demostró la formación de un nódulo de tejido óseo tras implantación de matriz ósea desmineralizada (MOD) en el músculo de un modelo animal y dedujo que ésta incluye sustancias que promueven la «formación por autoinducción», acuñando un término definitivamente aceptado como propiedad de proteínas morfogénicas entonces no identificadas². Hacia 1986 se había logrado el aislamiento de un grupo de 7 BMP mediante el estudio de diferentes fracciones proteicas extraídas de MOD. Actualmente se conocen unas 20 de ellas de diferentes acciones. Se procedió después a la caracterización de la secuencia de los péptidos de las proteínas aisladas y se construyeron sondas para identificación de los genes correspondientes consultando genotecas humanas de ADN complementario. Así se identificó la equivalencia de la subunidad de 18 kDa de los extractos osteoconductores de hueso bovino con la BMP-7 humana y la de 16 kDa con la BMP-2. Fue entonces posible insertar los fragmentos de ADN así identificados en un vector e introducir éste en una línea celular (del ovario de hámster chino). Cultivadas en grandes tanques de acero inoxidable, estas células modificadas excretan los FLC a través de la membrana celular en el medio de cultivo del que son recuperados y, finalmente liofilizados para asegurar su estabilidad a temperatura ambiente^{3,4}. Los productos recombinantes obtenidos pueden ser aplicados en el lugar indicado. La inyección directa tiene escasa eficacia, dada la limitada vida media de la mayor parte de ellos y la difusión y dilución a que se ven sometidos en los líquidos circundantes. Por estas razones se los utiliza impregnando matrices o armazones de diversos biomateriales que actúan, entre otras funciones, como dispensadores.

En un intento de aproximación a las condiciones fisiológicas se ha recurrido a la terapia génica para obtener FLC

en el lugar adecuado y con dosis y ritmos de liberación idóneos. Ésta se basa en introducir en el organismo el gen que codifica la proteína deseada, bien de forma sistémica, bien localmente en la zona a tratar. Este último es el caso en cuestión. Primero se transfiere el gen seleccionado a una célula para su transcripción en el ARN mensajero, después los ribosomas traducen el mensaje y sintetizan la proteína. En etapas intermedias se crea un ADNc (complementario) desprovisto de exones e intrones por transcripción inversa del ARNm de la proteína. El ADNc puede introducirse en un fragmento circular de ADN autorreplicativo (plásmido) para su transferencia al interior de las células mediante el vector (vehículo) adecuado. La transferencia por vectores víricos, que se denomina «transducción», es la más habitualmente empleada mediante adenovirus, retrovirus, virus del herpes simple y virus adeno-asociados, debidamente frenada su capacidad reproductiva. Los vectores no-víricos realizan la transferencia por «transfección» y su eficacia es inferior a la obtenida por transducción. Liposomas, ADN cargado en esférulas de oro (pistola génica), ADN conjugado con poliacilaciones y matrices impregnadas de plásmidos pertenecen a este grupo. La introducción en el organismo del vector puede realizarse por inyección o implantación directa *in vivo* o *ex vivo*. En este caso se obtienen mediante biopsia células del paciente que se multiplican en cultivo y se incorporan al vector, y su comportamiento es valorado *in vitro* antes de ser reintroducidas. La primera modalidad es atractiva por su sencillez, pero arriesgada en cuanto a seguridad; la segunda es más costosa y técnicamente más exigente⁵.

Tipos

Son muy numerosos los polipéptidos de interés para el aparato locomotor incluidos bajo la denominación de FLC. La mayor parte sigue sin moverse del terreno de la investigación *in vitro* o, todo lo más, *in vivo* sobre modelos animales. Por otra parte, algunas de estas sustancias reciben sinónimos de siglas diferentes, alusivos a sus diversos matices funcionales, lo que complica su análisis y valoración. A continuación se describen aquellos que parecen actualmente más interesantes para sus aplicaciones terapéuticas en el aparato locomotor. Dado que las indicaciones previstas corresponden a situaciones que requieren reparación o regeneración de los tejidos que lo componen, es interesante conocer su actividad en la consolidación de las fracturas y en las lesiones articulares con daño cartilaginosa.

Factores locales de crecimiento y hueso⁶

En el primer caso, inmediatamente después de la fractura, se presentan en el foco citoquinas proinflamatorias que inician con sus señales el proceso reparador. Las interleucinas 1 y 6, el factor de necrosis tumoral de tipo alfa (TNF α), el factor derivado de las plaquetas (PDGF) y algún miembro de la amplia familia de los factores de transforma-

ción como el TGF β están entre ellas. Otras moléculas de señal identificadas en el foco son los factores similares a la insulina (IGF I y II) y los factores de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). Mientras la mayor parte de éstos y otros parecen tener un papel temporal en sólo algunas de las fases del proceso de consolidación, ciertas BMP están presentes durante prácticamente todo él. Lógicamente considerados agentes terapéuticos potenciales, todos ellos han sido extensamente investigados en estudios preclínicos (Einhorn, AAOS TISS eng 107).

Factor derivado de las plaquetas

Las principales funciones descritas son: proinflamatoria, mitogénica, angiogénica y quimiotáctica (como el TGF β) para las células de estirpe osteoblástica. Es escasamente favorecedor de la síntesis proteica. En osteotomías de tibia de modelos animales aumenta el volumen y la densidad del callo sin mejorar sus propiedades mecánicas. Las combinaciones de PDGF con otros factores como TGF β e IGF no han mejorado los resultados. No existen datos en estudios de nivel alto de comprobación que apoyen su uso clínico.

Factor de crecimiento similar a la insulina

La hormona de crecimiento estimula la síntesis de este factor en el hígado. Pasa desde éste a la sangre y actúa modulando los efectos de la hormona sobre el esqueleto. Mientras la IGF-I estimula el crecimiento y el metabolismo de los condroblastos en la placa de crecimiento, la IGF II acelera el crecimiento óseo en el período embrionario y fetal. Además de este mecanismo endocrino, actúa por vía paracrina como mitógeno para células osteoblásticas indiferenciadas y como anabólico en la síntesis de la matriz extracelular ósea. Implantado en el tejido celular de la rata, este factor estimula la formación de tejido óseo heterotópico en presencia de matriz ósea desmineralizada. Se ha logrado la reparación de defectos críticos en zonas de osificación membranosa, pero no parece tener eficacia en la consolidación de osteotomías y fracturas de huesos largos.

FGF- α

Se le atribuyen funciones de angiogénesis, diferenciación celular de células mesenquimales a condrocitos, mitogénesis en condroblastos y osteoblastos y estímulo de la síntesis proteica en fases iniciales de la condrogénesis. Pero este efecto se invierte en fases tardías. En algunos animales experimentales ha mostrado aumento del callo y del componente condroide, pero retrasa su osificación. En otros modelos de fractura no se han reproducido estos hallazgos.

FGF- β

Estimula la producción de VEGF y colabora *per se* en la angiogénesis por ser quimiotáctica para las células endo-

teliales y los fibroblastos. Tiene extensa actividad mitogénica sobre las células endoteliales y las células mesenquimales indiferenciadas durante el crecimiento de las redes de túbulos capilares y también sobre fibroblastos, condroblastos y osteoblastos. Estimula la diferenciación de células indiferenciadas de estirpe condral. Numerosos estudios con animales pequeños han demostrado su eficacia en cuanto al aumento del volumen del callo, de la mineralización y de su resistencia mecánica. Estos hallazgos se han confirmado en un modelo de fractura de peroné en babuinos a los que se inyectó localmente FGF- β recombinante humana con ácido hialurónico en la pata tratada, dejando la fractura contralateral como control. El incremento estadísticamente significativo de carga y energía para la rotura sugirieron la potencial capacidad de este factor para potenciar la consolidación^{7,8}. En vista de estas observaciones se han iniciado ensayos clínicos en fase III con resultados actualmente no disponibles. El interés por la investigación clínica tanto de éste como de otros factores parece haber decaído por razones de mercado fundamentalmente.

TGF β

Esta proteína es uno de los numerosos componentes (en torno a 40) de la superfamilia de los llamados factores de transformación que incluye las BMP, activinas e inhibinas, la sustancia inhibidora mülleriana y el grupo decapentaplégico BMP, entre otras. Se han descrito tres isoformas del TGF β de las que el tipo I es el más frecuente y el único presente en los gránulos alfa de las plaquetas. Además de su capacidad de inhibición de las células ectodérmicas, se le reconoce actividad mitógena de las células mesenquimales indiferenciadas y quimiotáctica para los osteoblastos en presencia del PDGF. Las observaciones sobre su influencia en la síntesis de los diversos tipos de colágeno y de la fosfatasa alcalina y en el proceso de mineralización son contradictorias. Entre sus localizaciones preferentes están el pericondrio y los condrocitos en vía de diferenciación. Algunos experimentos *in vitro* con extractos purificados de hueso desmineralizado aislaron un factor inductor de cartílago (CIF) que resultó ser TGF β tipo II. El tipo I mostró posteriormente propiedades idénticas. En estudios *in vivo* también ha demostrado su potencial condrogénico en inyecciones subperiósticas en fémur de ratas y en otras localizaciones. El efecto estimulante es solamente eficaz en los estadios iniciales de la diferenciación condrogénica y se invierte en los tardíos, con desdiferenciación a fibroblastos. Aunque se han publicado observaciones contradictorias, parece demostrado su relevante papel en el aumento del componente osteoprogenitor mediante quimiotaxis y potenciación de la proliferación celular. A pesar de frenar más tarde la diferenciación celular, este efecto se compensa por inducción vigorosa de la síntesis y la estructuración de la matriz ósea. El TGF β muestra un comportamiento similar ante las

dos líneas celulares osteoarticulares básicas: estimula su desarrollo en las fases iniciales de diferenciación y lo inhibe en las fases finales⁹. Por el momento no se han publicado aplicaciones clínicas que hayan demostrado su eficacia frente a algunas BMP.

Factores osteoinductores: proteínas óseas morfogénicas

La osteoinducción es el proceso que potencia el reclutamiento y la proliferación de células mesenquimales perivasculares indiferenciadas, conduciéndolas hacia la formación de células osteoprogenitoras con capacidad osteogénica¹⁰. El concepto estaba ya implícitamente expresado en el artículo de Urist ya citado, en el que propuso la presencia en la matriz ósea desmineralizada de una proteína, la BMP, responsable principal de esta propiedad. Desde entonces el conocimiento de este tipo de polipéptidos se ha ampliado considerablemente. Se sabe que constituyen por sí solas dos tercios de los componentes de la superfamilia TGF β y, aunque comparten algunas propiedades con éstas y las activinas como el pleiotropismo, se diferencian de ellas en su actuación morfogénica en el embrión y en su capacidad osteoinductora. Por ello han recibido varias denominaciones: OP (proteína osteogénica), proteína morfogénica derivada del cartílago (CDMP) o factor de crecimiento y diferenciación (GDF). Aunque se han descrito 30 polipéptidos afines en la familia BMP, sólo 15 de ellos reciben este nombre por su similitud estructural. La BMP-1 ha sido excluida del grupo por tratarse de una proteasa perteneciente a otra familia. Basándose en la secuencia de los aminoácidos de una región determinada de su molécula, se les ha reunido en subgrupos: BMP 7-Op 1; BMPs 2-4; GDF 5-6-7; BMP 3 (osteogénica); GDF 9; GDF 8-BMP 11¹¹.

Como se ha descrito más arriba, la obtención de BMP puras en cantidad y pureza adecuadas, ha requerido tiempo, esfuerzos y una rigurosa metodología. Entretanto, se han realizado numerosos intentos de aprovechar en clínica humana las propiedades osteoinductoras de su reservorio principal, la matriz ósea desmineralizada, en sus diversas formas. Es cierto que se han realizado centenares de estudios en diversas localizaciones y en diversos modelos animales, pero los resultados obtenidos en ellos fueron frecuentemente desorientadores al trasladarlos a la práctica clínica. Además, hasta hace poco tiempo, la información disponible sobre su eficacia provenía, en ausencia de ensayos clínicos y publicaciones en revistas con evaluación objetiva, de comunicaciones por los investigadores o la industria. La mayor parte de ellas consistían en series de casos en número variado, sin grupo control ni comparación con el «patrón oro», el autoinjerto de cresta ilíaca. Un argumento frecuentemente esgrimido a favor de las diversas presentaciones de MOD es que el acompañamiento de otros FLC presentes en la matriz (PDGF, FGF e IGF) reforzarían la acción de las BMP. Des-

de 1996 se ha venido realizando un ensayo clínico con una pasta de extracto de hueso bovino rico en varias BMP en pacientes con estenosis raquídea lumbar o espondilolistesis con indicación de artrodesis. Los resultados demostraron que el producto empleado (Ne-Osteo) mezclado con hueso del paciente en dosis de 25 mg fue tan eficaz como el autoinjerto de ilíaco. Cuando la sustancia fue aplicada con una matriz colágena como armazón, el relleno y la maduración del hueso neoformado se alcanzaron más tarde de lo previsto¹².

Como se ha señalado en párrafos anteriores, el PDGF y el TGF β son factores presentes en los gránulos alfa de las plaquetas, de aparición pronta y ubicua en los focos lesionales, por lo que cabe suponer su liberación precoz y abundante en las fases iniciales de los procesos de reparación. Esta observación y algunos estudios *in vitro* han impulsado la utilización de geles de plaquetas concentradas autólogas con propósito terapéutico en heridas y úlceras tórpidas, cirugía dental y maxilofacial y en cirugía ortopédica. Por el momento, la «evidencia» clínica disponible es de bajo nivel en cuanto a eficacia e indicaciones. En lo referente al tejido óseo, este producto parece favorecer la integración de implantes dentales de titanio y la reparación de defectos alveolares o de calota estables y contenidos si se asocia a sucedáneos óseos como fosfato y sulfato cálcico o aloinjertos, pero no en solitario. Los efectos favorables logrados en la cicatrización de las heridas se atribuyen al estímulo proliferativo y migratorio sobre las células presentes en las primeras fases y a sus efectos específicos sobre queratinocitos y células endoteliales. En cuanto a su utilización en huesos de osteogénesis endocondral y en fusión vertebral, los datos disponibles son referencias aisladas por el momento. Algunos usuarios han calificado estos productos como «osteopromotores»¹³ por su capacidad mitogénica específica según el lugar de aplicación, en una aceptación implícita de sus diferencias en cuanto a la osteoinducción característica de las BMP, que son específicas de tejido. Como en los tipos de MOD comercializados, la naturaleza y la dosis de los factores presentes, cuando están descritas, varían ampliamente entre las marcas y no suelen corresponder a las cifras consideradas eficaces en ensayos *in vitro*¹⁴.

La disponibilidad de BMP recombinantes humanas (rhBMP) y la autorización de su uso clínico por las agencias gubernamentales competentes ha exigido la realización de rigurosos estudios preclínicos y ensayos clínicos. En el caso de la rhBMP7 (Op-1) se realizó un ensayo clínico en pacientes con pseudoartrosis de tibia de evolución superior a 9 meses, sin signos de mejoría durante los tres meses anteriores a su inclusión. En un grupo se trató la lesión con enclavado endomedular e injerto autólogo y en otro con la misma síntesis e implantación de Op-1 en una matriz de colágeno I. Los resultados obtenidos en ambos grupos no mostraron diferencias significativas¹⁵. En consecuencia, la *Food and Drug Administration* (FDA) autorizó su uso desde octubre de 2001 para el llamado uso compasivo: «como alternativa al

autoinjerto en pseudoartrosis recalcitrantes de huesos largos en las que no sea posible el uso de autoinjerto y hayan fallado los tratamientos alternativos». En varios países europeos, Australia y Nueva Zelanda las agencias reguladoras han ampliado su uso para otras indicaciones como pseudoartrosis de huesos largos en general. Este polipéptido osteoinductor viene siendo analizado en estudios piloto para la artrodesis vertebral posterolateral (con o sin instrumentación) en cuanto a seguridad y eficacia en espondilolistesis degenerativa y estenosis del canal lumbar¹⁶. Ocasionalmente se ha ensayado su uso en indicaciones aisladas, como el relleno de cavidades osteolíticas periprotésicas o de otro tipo acompañando al aloinjerto o en el tratamiento de la osteonecrosis cefálica.

El primer ensayo prospectivo, aleatorio y multicéntrico (no ciego) de la rhBMP-2 para autorización de uso clínico se realizó en fusión intersomática vertebral de un solo espacio con afectación degenerativa. En todos los pacientes se utilizaron dos implantes («cajas») de fusión. En un grupo de pacientes (136) seleccionados al azar se añadió autoinjerto de cresta ilíaca y en otro (143) la proteína en una esponja absorbible de colágeno. En el grupo tratado con el factor osteoinductor el tiempo operatorio y las pérdidas hemáticas fueron inferiores mientras que la tasa de fusión a los 24 meses fue superior. La valoración clínica mediante el *Oswestry low back pain disability score* fue similar en ambos, pero en el grupo control se registraron 8 efectos adversos relacionados con la toma del injerto. La FDA recomendó su uso para esta indicación en enero de 2001¹⁷. La BMP2rh (0,75 o 1,50 mg/kg en esponja absorbible de colágeno) ha sido también ensayada en el tratamiento de las fracturas abiertas de tibia fijadas con clavo endomedular bloqueado frente a un grupo control con la misma osteosíntesis sin la proteína. El estudio sobre 450 pacientes demostró claramente las ventajas de los tratados con dosis de 1,50 mg/kg en cuanto a rapidez de la consolidación, fallos del implante, infecciones y probabilidad de reintervención¹⁸.

Factores locales de crecimiento y cartílago

El papel de los FLC y otras citoquinas en la reparación y la reconstrucción del tejido cartilaginoso se limita, por ahora, al terreno experimental. Se han identificado desde hace tiempo muchas moléculas potencialmente condrogénicas con actividad principal durante el desarrollo embrionario. Uno de los principios asumidos en los fundamentos estratégicos de la regeneración de tejidos es la recapitulación en el adulto de varias (no todas) etapas de la secuencia embrionaria¹⁹, por lo que cabría suponer que la actuación de algunos de estos factores sobre el número suficiente de células precursoras indiferenciadas podría contribuir a recrear la diferenciación ontogénica, como ocurre en el tejido óseo. Pero los entornos biológicos del cartílago son claramente menos favorables por tratarse de un tejido avascular cuyas células, además de escasas, son muy dependientes para su metabo-

lismo y función de la interacción con la matriz que las rodea. En el cartílago articular maduro normal se ha comprobado la presencia de factores reguladores, tanto en el tejido mismo como en la membrana y el líquido sinovial. El IGF-I es un factor homeostático articular principal por su efecto anabólico y por regular la síntesis de la matriz. Varios miembros de la superfamilia TGF β (los 1, 2 y 3), algunas BMP, el FGF y el PDGF han sido relacionados con la regulación de la respuesta reparadora del cartílago y con el control de la degradación. Se pensó inicialmente que la CDMP podría poseer mayor especificidad, pero estudios posteriores no han confirmado esta hipótesis. Se considera actualmente que el factor insulínico (IGF-1) es de aplicación posible en matrices adecuadas para la reparación condral por ingeniería de tejidos. En un modelo animal de defecto cartilaginoso parcial se ha comprobado la eficacia de TGF-1, especialmente como inductor de condrogénesis, aunque es necesario controlar cuidadosamente la concentración de las dosis para evitar algunos efectos colaterales como sinovitis, aparición de pannus e incluso formación de osteofitos marginales^{20,21}. También se ha comprobado el efecto beneficioso de la BMP-2 en defectos osteocondrales del conejo y de la BMP-7 en modelos animales de artrosis y artritis²². Actualmente numerosas investigaciones van dirigidas a la formación in vitro de neocartílago mediante cultivos celulares²³.

CONCLUSIONES

Cuarenta años después del artículo «princeps» de Urist y tras centenares de estudios experimentales *in vitro* e *in vivo* la traslación a la práctica clínica de tantas investigaciones en el prometedor campo de la biología molecular parece, por el momento, muy limitada. En conjunción con los otros elementos de la «bioingeniería tisular», la terapia celular y los biomateriales para matrices y armazones siguen ofreciendo esperanzas pendientes de materializar para un número limitado de problemas clínicos que no han encontrado respuestas satisfactorias en las tecnologías de la «bioingeniería estructural», actualmente disponibles y que solucionan eficazmente la mayor parte de los retos terapéuticos en el aparato locomotor.

NUESTRA EXPERIENCIA CON LA APLICACIÓN DEL PLASMA RICO EN FACTORES DE CRECIMIENTO PLAQUETARIO EN LA CURACIÓN DE LESIONES ÓSEAS EN MIEMBROS SUPERIORES

Introducción

En los últimos años la cirugía ortopédica ha evolucionado significativamente gracias al desarrollo de nuevas tec-

nologías que han conducido a un refinamiento de los procedimientos quirúrgicos, minimizando la agresión y favoreciendo una reparación más rápida y eficaz. Al mismo tiempo, la aparición de nuevas herramientas biológicas ha revolucionado los tratamientos quirúrgicos, propugnando la aceleración de la cicatrización de los tejidos blandos dañados durante la agresión quirúrgica²⁴. Muchas de las técnicas quirúrgicas «clásicas» que conducen a resultados predecibles se han modificado mediante la asociación de una herramienta biológica destinada a mejorar el proceso, disminuir el riesgo de complicaciones y acelerar la recuperación del paciente²⁵. Por ejemplo, las técnicas de reparación ósea se han visto innovadas por la aparición de una amplia gama de nuevos biomateriales con distintas indicaciones terapéuticas. Estos nuevos biomateriales están destinados en algunos casos a proporcionar soporte o estructura en la zona dañada, y en otras ocasiones a mejorar el proceso biológico asociado a la reparación; en este último caso se utilizan señales celulares de naturaleza proteica, como los factores de crecimiento o las BMP; ambos pueden ser de origen autólogo o recombinante. En el caso concreto del plasma rico en plaquetas (PRP) o geles de plaquetas, se combina un componente estructural como es la matriz de fibrina, ideal para aglutinar sustitutos óseos sintéticos o naturales, que además libera de forma sostenida una secuencia correcta de moléculas que intervienen de forma crítica en la reparación tisular.

Fundamentos biológicos de la aplicación de plasma rico en plaquetas

La reparación de una fractura implica una serie de mecanismos biológicos en los que participan distintos tipos de células junto con un gran número de moléculas; estos procesos siguen un orden temporal y espacial establecido. El fundamento de la aplicación local de los PRP se basa en que liberan moléculas con gran actividad biológica desde el interior de una red de fibrina; algunos de los factores de crecimiento que contiene la red de fibrina son factor de crecimiento transformador beta (TGF- β 1), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF-AB), factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento hepatocítico (HGF), factor de crecimiento insulínico (IGF-I), factor de crecimiento fibroblástico (bFGF) y factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF)²⁶. Los efectos de los distintos factores de crecimiento en el metabolismo de los tejidos del sistema musculoesquelético están ampliamente documentados por la investigación *in vitro* y en animales²⁷⁻³⁰. El concepto de estas proteínas como impulsores de la reparación está basado en el hecho de que están presentes durante el proceso de reparación en tejidos como tendón, ligamento, hueso y cartílago; además las células implicadas en la reparación expresan receptores para estos factores de crecimiento e interactúan con ellos³¹. La acción temporal de todos estos factores de-

pende de mecanismos específicos de activación y/o de una regulación temporal de la expresión de receptores por parte de las células que participan en la reparación tal y como se ha demostrado en experimentos animales³².

Proceso osteoconductor y plasma rico en plaquetas

Las propiedades de los materiales que se utilizan como injertos se describen utilizando los términos osteogénico, osteoinductivo y osteoconductor. El hueso autólogo se considera el injerto ideal porque posee las tres propiedades, pero su utilización está limitada por la propia morbilidad de la zona donante; ello ha impulsado el desarrollo de distintas alternativas. El término osteoconducción se refiere al proceso tridimensional que tiene lugar cuando una estructura porosa se implanta en una región anatómica donde se quiere regenerar hueso rellenando la discontinuidad ósea y actuando como soporte estructural. Hablando en estos términos, los PRP se podrían considerar como un biomaterial autólogo mixto, a la vez conductor e inductor. La red de fibrina es la que proporciona conducción o soporte provisional durante la formación del tejido de reparación, y desde ella se liberan sustancias biológicamente activas con efectos angiogénicos y osteopromotores.

Red de fibrina

La malla o red de fibrina constituye un valor añadido de los PRP; se forma al tiempo que se produce la agregación plaquetaria por acción de la trombina³³. Sus propiedades mecánicas pueden variar dependiendo del tiempo de retracción y de la temperatura. Además de actuar como vehículo de liberación de los factores de crecimiento, cumple funciones conductoras de importancia crucial: proporciona una estructura provisional para el crecimiento celular en las primeras fases de la reparación; y actúa como conductor de la angiogénesis, esencial en el proceso de reparación ósea³⁴. Aunque la fibrina es la proteína mayoritaria en esta red, otras proteínas adhesivas importantes como vitronectina, laminina y fibronectina se entrecruzan con los dímeros de fibrina enriqueciendo la estructura y favoreciendo la adhesión celular.

Caracterización

A pesar de que la aplicación terapéutica de los PRP, solos o combinados con distintos biomateriales, se ha extendido en distintas áreas de la medicina no existe consenso en cuanto al sistema de preparación. Esto hace que los PRP sean diferentes entre sí, desde un punto de vista cualitativo y cuantitativo, dependiendo del protocolo de preparación³⁵⁻³⁸. Esta heterogeneidad impide establecer la estandarización necesaria para analizar e interpretar los resultados clínicos, que en ocasiones son controvertidos. Todos los protocolos comerciales de preparación producen concentrados leuco-

plaquetarios excepto el plasma rico en factores de crecimiento (PRGF)³⁹. El PRGF es un sistema que excluye los leucocitos en su preparación y que contiene un número moderado de plaquetas. La formación de fibrina y la agregación plaquetaria se realiza mediante la adición de cloruro de calcio, evitándose la utilización de trombina. La fibrina que se obtiene es más estable, entre otras razones por la ausencia de leucocitos que interfieren con las plaquetas e inestabilizan la red de fibrina.

Técnica de preparación

El PRGF se prepara a partir de un determinado volumen de sangre, adaptado a cada caso clínico concreto, extraído de una vena periférica empleando citrato sódico como anticoagulante. Tras una breve centrifugación de 8 minutos a 460 g la sangre se separa en sus componentes: hematíes, leucocitos y PRP; se aspira la fracción de plasma superior, se activa con Ca²⁺ provocando la coagulación y permitiendo su retracción durante 30 minutos a 37 °C. La fibrina autóloga obtenida por este procedimiento se utilizará como biomaterial, ya que posee unas excelentes propiedades elásticas y homeostáticas.

Para obtener el PRGF aspiraremos la fracción inferior de plasma de 0,5-1 ml, evitando en todo momento la fracción de células blancas de la sangre, que se disponen encima de los hematíes formando una capa blanquecina. La activación del PRGF se lleva a cabo con cloruro cálcico 5 minutos antes de su uso.

En nuestra práctica clínica exponemos nuestra experiencia en el tratamiento de fracturas complejas de extremidad distal del radio y fracturas de metacarpianos y falanges con PRGF.

Como todos sabemos, las fracturas de extremidad distal del radio son lesiones extremadamente frecuentes en las que la obtención de unos buenos resultados va ligada a una correcta reducción anatómica de la lesión y al mantenimiento de la reducción hasta la curación de misma.

Es precisamente en el mantenimiento de la reducción anatómica donde empleamos material de osteosíntesis, y en casos con pérdida de masa ósea aportamos injerto óseo.

Con la aparición de las sustancias osteoinductoras aparecen tres áreas de potencial mejora: en primer lugar, potenciar la angiogénesis obteniendo una mayor rapidez de curación; en segundo lugar la inexistencia de zona dadora, la posibilidad de realizar la cirugía con anestesia locorregional y el menor ingreso hospitalario se traducirá en una menor morbilidad en nuestros pacientes, y en tercer lugar, derivado de las dos anteriores, la mayor utilización de injertos óseos (biomateriales).

Analizamos las fracturas de extremidad distal de radio tratadas quirúrgicamente en nuestra clínica entre el año 2002 y 2005 dividiendo la serie en dos grandes grupos: los tratados mediante osteosíntesis, y un segundo grupo en el que

además de la osteosíntesis añadimos PRGF asociado o no a matriz ósea desmineralizada o sustancias osteoconductoras.

En total, de 71 fracturas quirúrgicas en 40 se realizó osteosíntesis de la lesión, y en 31 osteosíntesis más aporte de sustancias osteoinductoras. Los resultados fueron valorados según las tablas de Gartland y Werley, obteniendo el primer grupo un 78% de excelentes y buenos resultados y el segundo grupo un 93% de excelentes y buenos resultados. Si de todas las lesiones estudiábamos las fracturas complejas tipo C (AO) valoramos un total de 44 lesiones, y aunque los excelentes y buenos resultados bajaban en ambos grupos, esta pérdida era mayor en el tratado mediante osteosíntesis exclusivamente (68,2%) que en el que además de la osteosíntesis asociamos PRGF (90,9%).

Como conclusión pensamos que en fracturas complejas existe una pérdida de masa ósea por impactación de la lesión, y que actualmente la aplicación de sustancias osteoinductoras (PGRF, matriz ósea desmineralizada) asociadas con sustancias osteoconductoras puede paliar este problema sin incidir en un incremento de la morbilidad en nuestros enfermos.

En el tratamiento de los metacarpianos y falanges han sido múltiples las técnicas empleadas: manipulación, yesos, agujas, cerclajes, tornillos, etc. y es precisamente donde debemos tener en cuenta los distintos tipos de lesiones y sus diferentes localizaciones.

Exponemos nuestra experiencia en el tratamiento de estas lesiones mediante dos sistemas de osteosíntesis (rígida y dinámica), a los que añadimos en todos los casos PRGF. Entre el año 2002 y 2004 tratamos quirúrgicamente 22 metacarpianos y 8 fracturas de falanges mediante osteosíntesis con placas de titanio y PRGF. En el caso de los metacarpianos los resultados fueron excelentes en un 95% de nuestros enfermos, con un período de incorporación laboral de 58 días. En el caso de las fracturas de falanges los resultados excelentes y buenos fueron inferiores (un 84%), con una incorporación laboral de 85 días.

En el año 2005 comenzamos a utilizar la osteosíntesis dinámica más PGRF siendo capaces de evaluar al final del año 24 pacientes (16 metacarpianos y 8 falanges). Los resultados a corto plazo son altamente satisfactorios. En el caso de los metacarpianos obtuvimos excelentes resultados en todos los casos con un promedio de incorporación laboral de 45 días. En el caso de las falanges, en 7 ocasiones obtuvimos excelentes resultados con un promedio de reincorporación laboral de 78 días.

Como conclusiones, diremos que la asociación de diferentes sistemas de osteosíntesis con PGRF ha mejorado nuestras expectativas en el tratamiento de estas lesiones. Existe una evidencia radiológica de mayor rapidez en la consolidación ósea, permitiéndonos la movilidad precoz articular. Todo esto ha hecho que mejoremos nuestras expectativas a la hora de obtener excelentes y buenos resultados con estas lesiones.

BIBLIOGRAFÍA

1. Le Roith D, Blakesley VA. Biology of growth factors. En: Canalis, director. *Skeletal growth factors*. Philadelphia: Lippincott W&W; 2000. p. 31-50.
2. Urist M. Bone formation by autoinduction. *Science*. 1965; 150:893-9.
3. Mac Kay B. Commercial approval of rhBMP-2 in spinal fusions; bringing the product to the market. En Sandell L, Grodzinsky AJ, directores. *Tissue engineering in musculoskeletal practice*. Rosemont, Illinois: American Academy of Orthopedic Surgeons; 2004. p. 61-71.
4. Rueger DC. Biochemistry of Bone Morphogenetic Proteins. En: Vokicevic S, Sampath K, directores. *Bone morphogenetic proteins: from laboratory to clinical practice*. Basel: Birkhäuser Verlag; 2002.
5. Musgrave DS, Fu FH, Huard J. Terapia génica e ingeniería tisular en cirugía ortopédica. *J Am Acad Orthop Surg* (ed esp). 2000;2:72-81.
6. Munuera L, Cordero J. Ingeniería tisular. Cursos de actualización 2001. Madrid: Publicaciones SECOT; 2001.
7. Einhorn TA. Tissue engineering in fracture repair. En: Sandell L, Grodzinsky AJ, directores *Tissue engineering in musculoskeletal clinical practice*. Rosemont Illinois: American Academy of Orthopedic Surgeons; 2004. p.107-13.
8. Radomsky ML, Thompson AY, Spiro RC. Potential role of FGF in enhancement of fracture healing. *Clin Orthop*. 1998; S355:S283-93.
9. Alliston TN, Dorynk R. Transforming growth factor β in skeletal development and maintenance. En: Canalis E, director. *Skeletal growth factors*. Philadelphia: Lippincott W&W; 2000. p. 243-9.
10. Caplan AL. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1991;9: 641-50.
11. Kabawata M, Mizayono K. Bone morphogenetic proteins en Skeletal growth factors. En: Canalis E, director. Philadelphia: Lippincott W&W; 2000. p. 269-90.
12. Boden SC. Clinical trials in bone tissue engineering: spine applications update. En: Sandell LJ, Grodzinsky AJ, directores. *Tissue engineering in musculoskeletal clinical practice*. Rosemont Illinois: American Academy of Orthopedic Surgeons; 2004. p. 141-50.
13. Watson JT. Platelet gels: pro-position. Commonly used enhancers of bone healing: do we really have evidence of efficacy? *Proceedings AAOS meeting*; 2005. p. 348-9.
14. Lane JM. Platelet gels: con-position. Commonly used enhancers of bone healing: do we really have evidence of efficacy? *Proceedings AAOS meeting* 2005. p. 350.
15. Friedlaender GE, Perry CR, Cole JD, Cook SD, Cierny G, Muschler GF, et al. Osteogenic protein 1 (BMP-7) in the treatment of tibial non unions. *J Bone Joint Surg Am*. 2001; S83(A):S151-8.
16. Vaccaro AR, Anderson DG, Toth CA. Recombinant human osteogenic protein (BMP-7) as an osteoinductive agent in spinal fusion. *Spine*. 2002;27:S59-S65.
17. Einhorn TA. Biology of fracture repair and methods to enhance healing. Symposia: Basic research. *Proceedings AAOS Meeting*; 2005. p. 114-22.
18. Govender S, Csimma C, Gennant HK, Valentin-Opran A, Amit Y, Arbel R, et al, BESTT Study Group. Recombinant bone morphogenetic protein-2 for the treatment of open tibial fractures. *J Bone Joint Surg Am*. 2002;84(A):2123-34.
19. Caplan AL, Goldberg VM. Principles of tissue engineered regeneration of skeletal tissues. *Clin Orthop*. 1999;S367:S12-6.
20. van den Berg W, van den Kraan PM, Scharstuhl A, van Beuningen HM. Growth factors in cartilage repair. *Clin Orthop Relat Res*. 2001;S391:S244-50.
21. Hunziker EB, Driesang IMK, Morris EA. Chondrogenesis in cartilage repair is induced by members of the TGF- β superfamily. *Clin Orthop*. 2001;S391:S171-81.
22. Sittinger M. Engineering cartilage structures en Tissue engineering in musculoskeletal clinical practice. En: Sandell L, Grodzinsky AJ, directores. Rosemont, Illinois: AAOS; 2004. p. 175-82.
23. Thonar EJ, Sah RL, Masuda K. Manufacture of cartilage tissue in vitro en Tissue engineering in musculoskeletal clinical practice. En: Sandell L, Grodzinsky AJ, directores. Rosemont Illinois: AAOS; 2005. p. 211-7.
24. Hidaka Ch, Cunningham ME, Rodeo SA, Maher SA, Zhu W. Modern biologics used in orthopedic surgery. *Curr Opin Rheumatol*. 2006;18:74-9.
25. Anitua E, Sánchez M, Nurden AT, Nurden P, Orive G, Andía I. New insights and novel applications for platelet-rich fibrin therapies. *Trends in Biotechnology*. 2006;
26. Anitua E, Andía I, Ardanza B, Nurden P, Nurden AT. Autologous platelets as a source for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost*. 2004;91:4-15.
27. Fréchette JP, Martineau I, Gagnon G. Platelet-rich plasmas: growth factor content and roles in wound healing. *J Den Res*. 2005;84:434-8.
28. Bouletreau PJ. Factors in the fracture microenvironment induce primary osteoblast angiogenic cytokine production. *Plast Reconstr Surg*. 2002;110:139-48.
29. Anitua E, Andía I, Sánchez M, Azofra J, Zalduendo MM, 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.
30. Anitua E, Sánchez M, Nurden AT, Zalduendo MM, de la Fuente M, Azofra J, et al. Reciprocal actions of platelet-secreted TGF- β 1 on the production of VEGF and HGF by human tendon cells. *Plastic Reconstr Surg*. [En prensa]
31. Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev*. 2003;83:835-70.
32. Dahlgren LA, Mohammed HO, Nixon AJ. Temporal expression of growth factors and matrix molecules in healing tendon lesions. *J Orthop Res*. 2005;23:84-92.
33. Anitua E, Sánchez M, Nurden AT, Zalduendo M, de la Fuente M, Azofra J, et al. Autologous fibrin matrices: A potential source of biological mediators that modulate tendon cell activities. *J Biomed Mater Res*. 2006;76:000.
34. Carano RA, Filvaroff EH. Angiogenesis and bone repair DDT. *Drug Discov Today*. 2003;8:980-8.
35. Eppley BL, Woodell JE, Higgins BS. Platelet Quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plast Reconstr Surg*. 2004;114: 1502-8.
36. Weirbrich G, Kleis WKG. Curasan PRP kit vs. PCCS PRP system collection efficiency and platelet counts of two different methods for the preparation of platelet-rich plasma. *Clin Oral Impl Res*. 2002;13:437-43.
37. Appel TR, Pöttsch B, Müller J, Lindern J-J, Bergé SJ, Reich RH. Comparison of three different preparations of platelet concentrates for growth factor enrichment. *Clin Oral Impl Res*. 2002;13:522-8.

38. Weirbrich G, Kleis WKG, Hafner G, Hitzler WE, Wagner W. Comparison of platelet, leukocyte and growth factor levels in point-of-care platelet-enriched plasma, prepared using a modified Curasan Kit, with preparations received from a local blood bank. *Clin Oral Impl Res.* 2003;14: 357-62.
39. Weirbrich G, Kleis WKG, Hitzler WE, Hafner G. Comparison of 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.

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