



Universidad  
Nacional  
de Córdoba



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA**

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**ESCUELA DE POSGRADO**

**“AUMENTO DE LA ANGIOGÉNESIS EN LA ZONA DE  
REPARACIÓN ÓSEA DE LA TIBIA DE LA RATA”**

TESISTA:

**OD. DAVID IGNACIO LESCANO**

DIRECTOR:

**PROF. DR. ROSITA NILDA DEL VALLE LUCERO**

**CÓRDOBA, 2007**



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).



“Trabajo de tesis para optar al título de  
Doctor en Odontología”

Od. David Ignacio Lescano

“Aumento de la angiogénesis en la zona de  
reparación ósea de la tibia de la rata”

- 2007 -

Directora de tesis doctoral

Prof. Dra. Rosita Nilda de Valle Lucero

Comisión de tesis doctoral

Prof. Dr. Héctor Eduardo Lanfranchi Tizeira

Prof. Dra. María Elsa Gómez de Ferraris

Prof. Dra. Susana Cornejo



# Gracias,



A la Prof. Dra. Rosita Lucero por aceptarme como dirigido y poner todo su empeño, capacidad y conocimiento a mi disposición.

Al Prof. Héctor Lanfranchi Tizeira por su disposición para facilitar la tarea.

A la Prof. Dra. María Elsa Gómez de Ferraris por su empeño en obtener mejores resultados.

A la Prof. Dra. Susana Cornejo por sus aportes para hacer más comprensible a las ciencias básicas.

A Adriana y Armando por mostrarme el camino

A mis viejos por su paciencia.

A Germán, Tomás y Carla por el tiempo que les robé.

A Marina.....por todo.



## Índice

Resumen:.....	pág. nº 01
Summary:.....	pág. nº 02
Introducción:.....	pág. nº 04
Objetivos.....	pág. nº 16
Materiales y métodos:.....	pág. nº 17
Resultados:.....	pág. nº 24
Discusión:.....	pág. nº 44
Conclusiones:.....	pág. nº 50
Referencias bibliográficas:.....	pág. nº 51



## Resumen

La pérdida de tejidos como resultado de patologías o traumatismos ha sido una constante preocupación en la rehabilitación oral. El avance en el campo de la regeneración tisular y el estudio de la biología molecular, llevaron al desarrollo del plasma rico en plaquetas (PRP) con el fin de proveer una fuente extra de factores de crecimiento en la zona de reparación tisular. Teniendo en cuenta que, los factores de crecimiento contenidos en los gránulos alfa de las plaquetas tienen actividad angiogénica y que además, hay estudios que comprobaron la transformación de células endoteliales en preosteoblastos, se elaboró la siguiente hipótesis: el PRP aplicado a heridas experimentales en tibias de ratas, provocaría un aumento de la actividad cicatrizal. Ello sería debido, principalmente, al estímulo de los factores de crecimiento sobre las células endoteliales llevando a éstas a aumentar la angiogénesis en el sitio de reparación, requisito fundamental para que las células osteoprogenitoras se transformen en osteoblastos, aumentando la velocidad de reparación del tejido óseo. Se utilizaron un total de 40 ratas Wistar como casos problema y 40 como controles. Se colocó PRP dentro de una herida provocada en la tibia izquierda de los casos problema y no se aplicó el PRP en las tibias de los controles. Se utilizó una técnica de inmunoperoxidasa para marcar las células endoteliales combinada con la técnica de rutina. Las observaciones se realizaron a los 3, 5, 7 y 15 días post tratamiento y se utilizaron 10 animales como control y 10 como casos problema para cada tiempo experimental respectivamente. El estudio cuantitativo se realizó con un analizador digital de imágenes y se determinó la cantidad de células endoteliales inmunomarcadas y tejido osteoide por tiempo.



Se observó que a los 3, 5 y 7 días hubo una diferencia estadísticamente significativa en la cantidad de tejido inmunomarcado en los casos problemas pero no a los 15 días, se observó también que la diferencia en la formación osteoide fue estadísticamente significativa a los 7 días, sólo en los casos problema. En este estudio se demostró que la aplicación de un concentrado de plaquetas autólogas en el sitio de reparación de tibias de ratas Wistar, estimula el aumento de la población de células endoteliales en el mismo sitio y ese efecto causa un aumento en la velocidad de reparación de los tejidos, principalmente el óseo. En este diseño experimental, esta afirmación sobre el PRP, sólo es aplicable al día 7 postratamiento.

### **Summary**

The lack of tissue as a result of pathologies or traumatismos has been a constant concern in the oral rehabilitation. The advance in the field of tissular regeneration and the study of molecular biology led to the development of the platelet rich plasma (PRP) with the purpose of providing an extra source of factors of growth in the area of tissular reparation.

Taking into account that the factors of growth contained in the alfa granules in the blood platelets have an angiogenic activity and, besides, there are studies which proved the transformation of endothelial cells in pre-osteoblasts, a hypothesis was elaborated that the platelets rich plasma applied to injuries caused in tibia of rats, causes a rise of the wound healing activity. This happens, mainly, due to the stimulus of the factors of growth on the endothelial cells leading them to increase the angiogenesis in the site of reparation, a fundamental requirement so that the osteoprogenitor cells are transformed into osteoblasts increasing the speed of reparation of the bony tissue. 40 Wistar

rats were utilized as the problem group and 40 as the control group. PRP was applied to an injury caused in the left tibia in the case group and PRP was not applied to the control group. A technique of immunoperoxidase was used to indicate the endothelial cells combined with a routine technique. The observations were carried out at the third, fifth, seventh and fifteenth day after the treatment and 10 animals were utilized as the control group and 10 as the problem group for each time respectively. The quantitative study was carried out with a digital analyser of images and it was determined that the amount of endothelial cells immunoistained and osteoid tissue by time. It was observed that at third, fifth and seventh day there was a difference statistically significant in the amount of immunoistained tissue in the problem group but not at the fifteenth day. It was also observed that the difference in the osteoid formation was statistically significant at the seventh day only in the problem group. In this study, it was demonstrated that the application of a concentrated of autologous platelets in the place of reparation of tibia of Wistar rats stimulates the increase of the population of endothelial cells in the same place and that effect causes a rise in the speed of reparation of the tissues mainly the bony one. In the experimental design, this statements about PRP is only applicable in the seventh day after the treatment.





## Introducción

La cirugía reconstructiva en general y la maxilofacial en particular se encuentran a menudo con un serio impedimento, y es la falta de volumen de determinados tejidos que son necesarios para la reconstrucción del área dañada. La extirpación de procesos tumorales o quísticos con sus extensiones preventivas <sup>Fig.1</sup>, los traumatismos faciales y las patologías periodontales <sup>Fig. 2</sup>, dejan, en la mayoría de los casos, un déficit tisular que complica la resolución del caso y la recuperación del paciente. La odontología moderna también se ve afectada por esta consecuencia ya que las rehabilitaciones orales por medio de implantes, prótesis o resolución de problemas periodontales se ven limitadas por la falta de terrenos aptos para la óptima definición del tratamiento.



Fig.nº 1  
Quiste dentígero (\*)

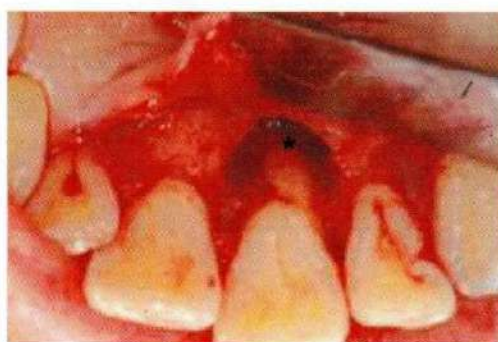


Fig. nº 2  
Pérdida ósea periodontopática (\*)

Con el desarrollo de nuevas técnicas y de la ingeniería tisular que exploran los mecanismos en biología celular y molecular, se conocen los eventos básicos que regulan la regeneración y/o reparación de los tejidos del cuerpo humano. Al aplicar estos nuevos conocimientos al desarrollo de métodos biológicos que estimulen los procesos regenerativos y reparativos del tejido óseo se debe determinar la especificidad de ese estímulo en particular sobre su receptor.

Los estímulos locales en la regeneración del hueso que involucran el desarrollo de moléculas específicas para incitar el proceso de regeneración parecen ser la respuesta a esa búsqueda. Estos estímulos pueden ser categorizados como osteogénicos, osteoconductivos u osteoinductivos. <sup>Tabla 1</sup>

Abordajes locales
Métodos osteogénicos
Injerto de hueso autólogo
Injerto de hueso alogénico
Injerto de médula ósea
Métodos osteoconductivos
Injertos cerámicos
Injertos compuestos de colágeno y calcio
Vidrios bioactivos
Polímeros sintéticos
Métodos osteoinductivos y sustancias promotoras del crecimiento
Superfamilia de factores de crecimiento beta
Proteínas morfogenéticas
Factores de crecimiento derivados de las plaquetas
Factores de crecimiento derivados de los fibroblastos

Tabla 1

Métodos clínicos y experimentales para estimular la regeneración ósea por medios biológicos.

Los métodos osteogénicos incluyen el uso de materiales tales como injertos de médula ósea <sup>12-24</sup>, injertos alogénicos o autógenos <sup>8-9</sup> o matrices de hueso alogénico desmineralizados <sup>6-14</sup>.

La osteoconducción es un proceso que guía el crecimiento de brotes capilares, tejidos perivasculares y células osteoprogenitoras del lecho del huésped hacia la estructura tridimensional del injerto o implante <sup>55</sup>. Las sustancias osteoconductivas no tienen la capacidad de actuar en sitios extraesqueletales. El principio de estas técnicas es, que las células osteoprogenitoras tienen la capacidad de formar hueso sólo en superficies apropiadas y éstas deben tener la composición física y química que soporte la adhesión, división y diferenciación de las células. Muchas investigaciones en el uso de materiales osteoconductivos se han centrado en las cerámicas, incluyendo la hidroxiapatita, compuestos de sulfato de calcio, cerámicas alúminas, fosfato tricálcico y vidrios bioactivos <sup>16-17</sup>.

La osteoinducción es un proceso que apoya la mitogénesis de células mesenquimáticas perivasculares indiferenciadas, llevando a la formación de células osteoprogenitoras con la capacidad de formación de hueso nuevo <sup>55-56</sup>.



A diferencia de los materiales osteoconductivos, las sustancias osteoinductivas, conducen a la formación de hueso en sitios extraesqueletales y la capacidad osteoinductiva de una sustancia (p.ej. proteínas morfogenéticas), puede ser potenciada por otros factores que influyen en la respuesta celular tales como aquellos que mejoran la proliferación, migración y adhesión celular<sup>8</sup>.

A diferencia de los tejidos blandos, los cuales cicatrizan por medio del reemplazo del tejido dañado por un tejido conectivo fibroso, el hueso cicatriza por medio de la regeneración del tejido normal. Por lo tanto, para comprender los mecanismos que median la reparación ósea por regeneración se requiere una apreciación de los factores que estimulan el crecimiento celular y de los mecanismos que participan de la cascada de eventos regenerativos incluyendo la inflamación, quimiotaxis, división y diferenciación celular.

### **Modelado y remodelado óseo**

El modelado óseo es cualquier cambio en la forma y tamaño del hueso. Esto puede ser un proceso anabólico con aposición de hueso en la superficie, o puede ser un proceso catabólico con reabsorción de la superficie. Como estos dos procesos pueden ocurrir separadamente en diferentes superficies, podemos considerar al modelado óseo como un fenómeno superficial que ocurre durante el crecimiento o como parte de la reparación o en respuesta a una carga mecánica<sup>37</sup>.

El modelado es un proceso en el cual la formación no está precedida de reabsorción. La activación de células que reabsorben o forman hueso puede ocurrir en diferentes superficies del mismo hueso por factores mecánicos como los movimientos ortodóncicos o por factores de crecimiento como en el caso de la cicatrización ósea<sup>28</sup>.

La colocación de un injerto óseo autólogo que posee osteoblastos y eventualmente células madre, está rodeado por un lecho vascular en un ambiente bioquímico que es hipóxico ( $O_2$  3 a 10 mm de Hg), acidótico (pH 4.0 a 6.0) y rico en lactato<sup>31,36,37,38,39</sup>. El injerto autólogo posee células osteocompetentes, islas de hueso medular mineralizado, fibrina y plaquetas provenientes del coágulo sanguíneo.

Los osteoblastos y células madre sobreviven los primeros 3 a 5 días debido a su capacidad de absorber nutrientes de la superficie del lecho



receptor. Los osteocitos mueren como resultado de su encerramiento en tejido calcificado ya que el mineral actúa como barrera nutricional.

A causa de que el injerto es hipóxico y el lecho receptor es normóxico ( $O_2$  50 a 55 mm de Hg), se crea un gradiente de oxígeno que es mayor a 20mm de Hg de  $O_2$  (usualmente 35 a 55 mm de Hg de  $O_2$ ) y este fenómeno estimula la quimiotaxis de macrófagos que secretan Factor angiogénico derivado de los macrófagos (MDAF) y Factor de crecimiento derivado de los macrófagos (MDGF)<sup>38. fig.Nº 3</sup>. Dentro del injerto las plaquetas atrapadas en el coágulo se degranulan a las pocas horas de la colocación del injerto liberando Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF). De esta manera, las propiedades inherentes de la herida, particularmente el fenómeno de gradiente de oxígeno y el PDGF, inician un proceso angiogénico temprano en los capilares, mitogénesis y transferencia de células osteocompetentes<sup>50-51</sup>.

Al tercer día del inicio del proceso reparativo, los capilares brotan desde el lecho receptor hacia el injerto, en un proceso denominado angiogénesis, proliferando entre las células medulares hasta formar una completa red a los 14 días. Como esos capilares responden a un gradiente de oxígeno, el MDAF reduce el gradiente paulatinamente para prevenir una sobreangiogénesis.

Durante los primeros 3 a 7 días, la población de células madre y osteoblastos producen una pequeña cantidad de tejido osteoide. Luego de que la red de capilares ha sido establecida, se acelera la producción de tejido osteoide como resultado de la disponibilidad de oxígeno y nutrientes. El tejido osteoide se forma inicialmente en la superficie de las trabéculas por la acción de los osteoblastos endostales y posteriormente se van formando islas osteoides en crecimiento continuo hasta completar el volumen de tejido en reparación.<sup>57-58</sup>

Esta fase de regeneración celular se denomina Fase 1 de la regeneración ósea y se completa aproximadamente a las 3 o 4 semanas de haber comenzado, cuando existe suficiente producción de tejido osteoide y mineralización como para que el injerto sea funcional<sup>36</sup>.

Como la cantidad de hueso formado durante la fase 1 depende de la densidad celular osteocompetente del injerto, se prefieren los sitios donantes con alta cantidad de células medulares como la cresta ilíaca posterior, sínfisis mandibular y calota craneana.



Las propiedades bioquímicas del lecho receptor y las del injerto son fundamentales en el éxito de la rehabilitación del tejido dañado, y es así como Marx y col. <sup>39</sup> adicionaron plasma rico en plaquetas (PRP) al injerto y obtuvieron una consolidación y mineralización del injerto en un tiempo 15 a 30% mas rápido . El concepto que siguieron los investigadores fue que los factores de crecimiento contenidos en las plaquetas se liberan a los 10 minutos del desarrollo del coágulo por un período aproximado de una hora y se unen inmediatamente a los receptores de membrana de las células osteoprogenitoras, células endoteliales y células madre. El gradiente de oxígeno negativo es la clave del estímulo para la proliferación de capilares desde el lecho hacia el injerto <sup>Fig.Nº 3</sup>. A los tres días se pueden observar significantes divisiones celulares y penetración de capilares dentro del injerto <sup>Fig. Nº4</sup>. Entre los 17 a 21 días de la colocación del injerto tiene lugar una completa penetración y profusión capilar y se ha iniciado la producción de osteoide <sup>Fig.Nº5</sup>.

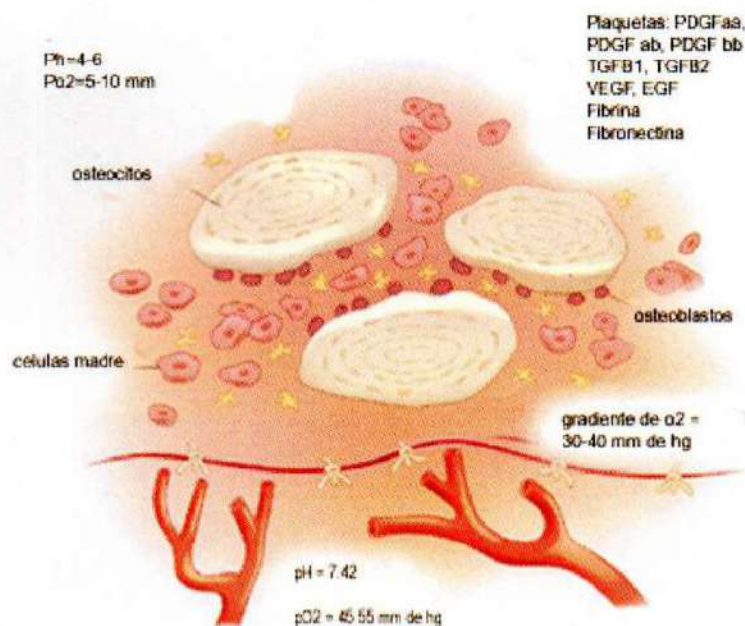


Figura Nº 3

Medioambiente bioquímico de un injerto óseo autólogo

Tomado y modificado de *Dental and craniofacial applications of PRP* By Robert Marx and Arun Garg.



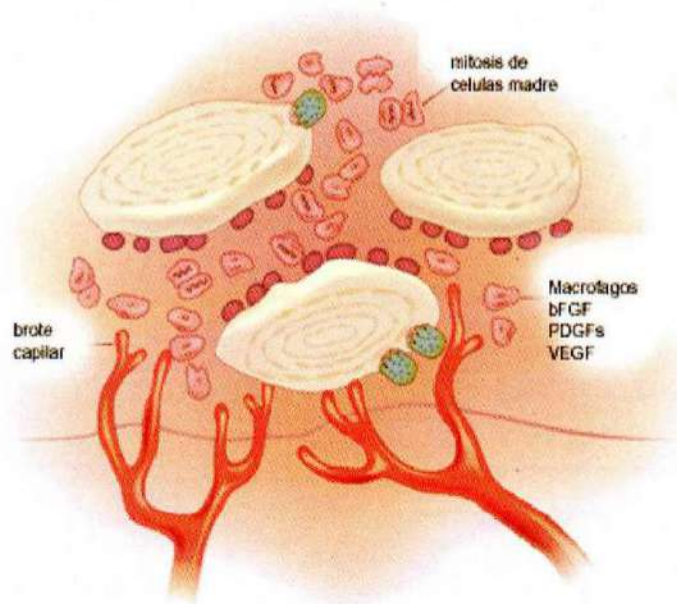


Figura N° 4

Tomado y modificado de *Dental and craniofacial applications of PRP* By Robert Marx and Arun Garg.

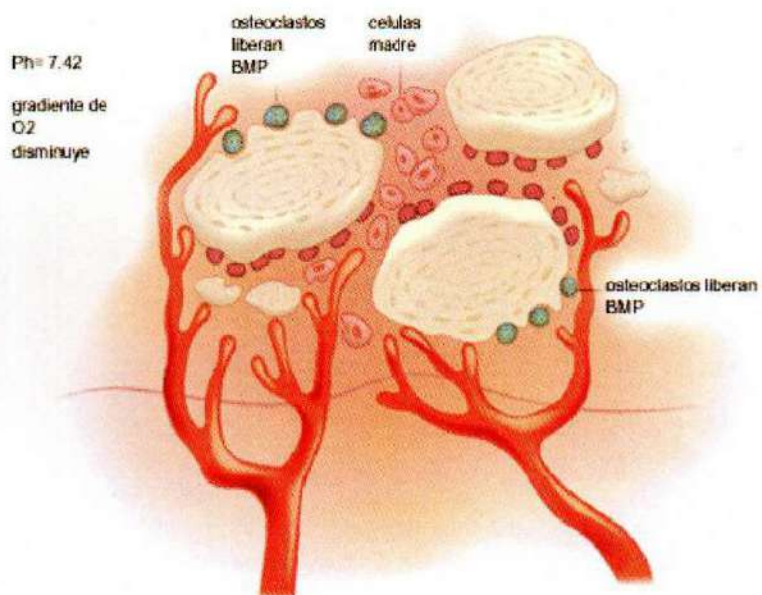


Figura N° 5

Tomado y modificado de *Dental and craniofacial applications of PRP* By Robert Marx and Arun Gar.

## Intervención plaquetaria



Fig. nº 6

Microfotografía electrónica de transmisión donde se observa la densidad de los gránulos alfa en una plaqueta.  
Imagen perteneciente a la UNRC.

Durante la activación plaquetaria los gránulos  $\alpha$  contenidos en las plaquetas se fusionan con la membrana plasmática provocando la degranulación de la misma, y las proteínas secretorias son transformadas a un estado bioactivo por la adición de histonas y cadenas de carbohidratos. Las proteínas activas son secretadas, uniéndose a los receptores de las células blanco (células madre mesenquimáticas, osteoblastos, fibroblastos, células endoteliales y células epidérmicas). Estos receptores agonistas de membrana activan una proteína intracelular que causa la expresión de la secuencia génica que actúa directamente en la proliferación de la matriz, producción de osteoide y síntesis de colágeno, entre otras cosas <sup>36-37</sup>.

La secreción activa de estas proteínas comienza dentro de los 10 minutos de iniciada la coagulación, y son secretados el 95% de los factores de crecimiento detallados en la tabla Nº 2 <sup>4, 32</sup>. Luego de la primera secreción, las plaquetas sintetizan y liberan una cantidad adicional de proteínas para mantener su actividad por 10 días aproximadamente <sup>39</sup>. En este punto los macrófagos, que han arribado vía vascular, aumentan su número estimulados por las plaquetas, y asumen la responsabilidad de la regulación de la cicatrización por la secreción de factores de crecimiento <sup>2</sup>.



PDGF (Factor de Crecimiento derivado de las plaquetas)

Quimiotaxis celular.

Mitogénico para fibroblastos

**Estimula la angiogénesis**

Estimula la contracción de heridas.

VEGF (Factor de crecimiento vascular y endotelial)

Estimula la proliferación y diferenciación de células endoteliales.

**Estimula la angiogénesis**

TGF- $\alpha\beta$  (Factor de crecimiento de transformación alfa beta)

Mitogénico para queratinocitos y fibroblastos

Estimula la migración de queratinocitos.

**Estimula la angiogénesis.**

EGF (Factor de crecimiento epidérmico)

Mitogénico para queratinocitos y fibroblastos.

Estimula la migración de queratinocitos.

Estimula la angiogénesis.

bFGF (Factor de crecimiento fibroblástico básico)

Quimiotáctico y mitogénico para fibroblastos y queratinocitos.

**Estimula la angiogénesis.**

IGF (Factor de crecimiento derivado de la insulina)

Quimiotáctico para fibroblastos

PDAF (Factor angiogénico derivado de las plaquetas)

Recluta pericitos

Estimula la expresión del VEGF

**Estimula la angiogénesis**

IL-8 (Interleucina 8)

Mejora la adherencia de neutrófilos, quimiotaxis

TNF- $\alpha$  (Factor de necrosis tumoral alfa)

Activa los macrófagos

Mitogénico para fibroblastos.

**Estimula la angiogénesis**

Alta concentración de macrófagos

Histamina, Serotonina, Tromboxano A2, y otros agentes quimiotáticos vasoactivos.



Las numerosas proteínas secretadas por las plaquetas activadas, influyen de varias maneras en la cicatrización; el PDGF es quimiotáctico para los macrófagos, mientras que los roles combinados de PDGF, TGF- $\beta$  y IGF producen quimiotaxis y mitogénesis para las células madre y osteoblastos, angiogénesis para el crecimiento de la matriz ósea y síntesis de colágeno<sup>3, 18,26</sup>. El TGF- $\beta$  y el PDGF también asisten a la mineralización ósea<sup>10</sup>. Como un grupo, las proteínas adhesivas Fibronectina, Vitronectina y Endotelina participan en la formación del trombo y algunas también tienen propiedades mitogénicas<sup>2-10-61</sup>. Algunos de los factores de crecimiento liberados por las plaquetas están ausentes en las heridas crónicas<sup>18</sup>. Aunque está aceptado que las plaquetas no contienen proteínas morfogenéticas, Steffensen y col.<sup>49</sup>, identificaron BMP-2 y BMP-4 dentro de un lisado de plaquetas, sugiriendo que éstas pueden contribuir a la formación y reparación ósea.

### **Angiogénesis**

La angiogénesis ocurre como una cascada ordenada de eventos celulares y moleculares. Fig. Nº 7. 20.

1. Los factores angiogénicos se unen a sus receptores en la superficie de las células endoteliales (CE) de capilares pre-existentes.
2. Se activan los mecanismos dentro de las CE
3. Las CE liberan enzimas proteolíticas (gelatinasa A) que disuelven la membrana basal de los vasos circundantes.
4. Las CE proliferan a través de la membrana basal.
5. Las CE migran dentro de la herida usando moléculas de adhesión conocidas como integrinas ( $\alpha_v\beta$ ,  $\alpha_v\beta_5$  y  $\alpha_5\beta_1$ ).
6. Durante el avance de los capilares las enzimas conocidas como metaloproteinasas (MMPs) disuelven la matriz del tejido circundante.
7. Los brotes vasculares forman canales tubulares los cuales se conectan para formar rulos.
8. Las ramas vasculares se diferencian en brazos aferentes (arteriales) y eferentes (venosos).

9. Se forman nuevos vasos sanguíneos por reclutamiento de células murales (células de músculo liso y pericitos) para estabilizar la arquitectura vascular.
10. Comienza el flujo sanguíneo en el vaso maduro.

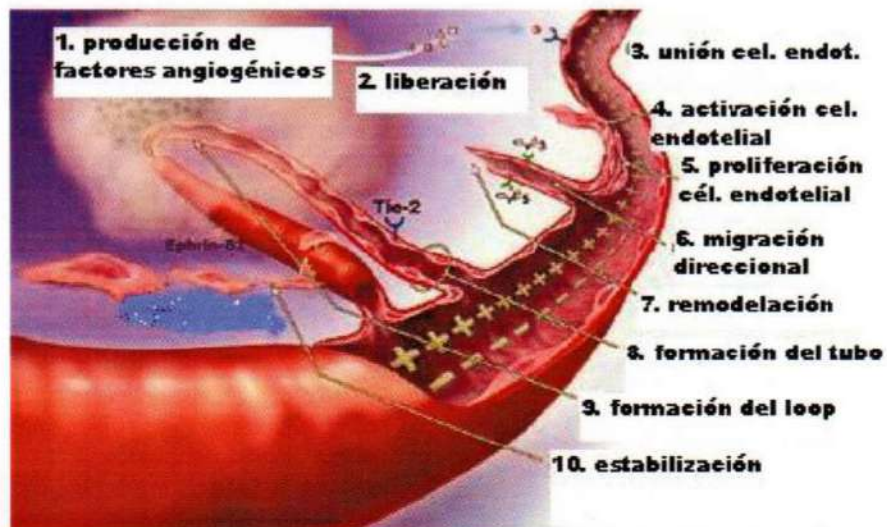


Fig. Nº 7

Cascada de eventos angiogénicos

Tomado y adaptado del gráfico de la Fundación Angiogénesis. 20

La angiogénesis en la cicatrización de una herida ocurre en 5 pasos <sup>20-45-52</sup>:

#### Paso 1: Iniciación de la angiogénesis

El tejido dañado libera bFGF, que está normalmente almacenado dentro de las células sanas y de la matriz extracelular del mismo. La trombina regula los receptores de VEGF y sus efectos. Las células endoteliales expuestas a la trombina liberan gelatinasa A, la que promueve la disolución local de la membrana basal como paso inicial fundamental de la angiogénesis.

Una de las primeras células en activarse en una herida aguda son las plaquetas. Éstas contienen y liberan todos los factores de crecimiento que se detallan en la tabla Nº 2. Estos factores estimulan la proliferación endotelial, migración y formación del tubo.

#### Paso 2: Amplificación de la angiogénesis.

La angiogénesis es amplificada por la inflamación. Los macrófagos y monocitos liberan una gran cantidad de factores angiogénicos dentro de la herida, incluyendo PDGF, VEGF, TGF- $\alpha$ , bFGF, IL-8 y TNF- $\alpha$ .



### Paso 3: Proliferación vascular

Se hace evidente la granulación de la herida. La hipoxia en este paso es un importante mantenedor de la angiogénesis. El gradiente hipóxico que existe en el tejido dañado estimula la producción del VEGF por parte de las células. Una propiedad del VEGF es inducir la formación de edema a través de la hiperpermeabilidad. La hipoxia también promueve la liberación de óxido nítrico (ON) el cual estimula la vasodilatación y angiogénesis mejorando el flujo sanguíneo local.

### Paso 4: Estabilización vascular.

Los vasos recién formados deben ser estabilizados o madurados. La estabilización está gobernada por la angiotensina-1 y su receptor Tie-2. La unión de Ang-1 con Tie-2 en células endoteliales produce un aumento en la liberación de PDGF y el reclutamiento de células musculares lisas y pericitos.

### Paso 5: Supresión de la angiogénesis.

En los estadios finales de la cicatrización, la angiogénesis es suprimida. Los niveles de factores de crecimiento declinan y se restaura la normoxia tisular. Los inhibidores endógenos de la angiogénesis comienzan a dominar la escena. Los pericitos que estabilizan las células endoteliales comienzan a secretar una forma de TGF- $\beta$  activada que impide la proliferación vascular, además producen interferón- $\beta$  que impide la angiogénesis.

## **Plasma rico en plaquetas**

En 1998, Robert Marx y col.<sup>36</sup> investigaron el uso de plasma rico en plaquetas (PRP) y propusieron un modelo de regeneración ósea en el cual, al aumentar la cantidad de plaquetas dentro de la lesión ósea, se produciría un aumento en la concentración de factores de crecimiento tales como el PDGF y el TGF- $\beta$  y esto influiría la regeneración del hueso aumentando la tasa de formación de hueso nuevo.

En 1977, Brighon y col.<sup>7</sup>, estudiaron a nivel de microscopía óptica y electrónica la población celular presente en el sitio de reparación ósea y determinaron que los osteoblastos presentes en el sitio de reparación, provenían del hueso huésped del injerto realizado, de las células madre de la médula ósea y de las células endoteliales de la neovascularización.



A.M. Rabie y col.<sup>46</sup> detallaron a nivel ultraestructural, los eventos celulares asociados a la actividad angiogénica en los sitios de reparación ósea y determinaron por medio de la identificación de proteínas de membrana de las células endoteliales, que éstas son influidas por macrófagos activados y que se transforman en células pluripotenciales para posteriormente convertirse en pre-osteoblastos<sup>46</sup>.

Basados en la bibliografía y teniendo en cuenta que:

- 1- Es necesaria una combinación de estímulos locales, osteogénicos, osteoconductivos y osteoinductivos, en la reparación del tejido óseo dañado.
- 2- Los factores de crecimiento contenidos en las plaquetas tienen como actividad dominante estimular la angiogénesis.
- 3- El gradiente de concentración parcial de oxígeno dentro de una herida en el hueso estimula la liberación de factores angiogénicos por parte de los macrófagos y las células endoteliales.
- 4- La angiogénesis es un paso fundamental en el desarrollo de los eventos cicatrizales y la supervivencia del tejido óseo neoformado.
- 5- Hay evidencias del origen endotelial de los osteoblastos en la regeneración ósea.
- 6- Las observaciones de Marx y col. fueron hechas solo a nivel radiográfico.

se elaboró la siguiente hipótesis: “El aumento en la velocidad de regeneración al utilizar un concentrado de plaquetas en la zona de restitución se debería a que el PRP produciría un aumento en la población de células endoteliales y desencadenaría un proceso angiogénico que provocaría un aumento en la población de células osteogénicas”.

## **Objetivos**

1° Analizar las variaciones cuantitativas de la población de células endoteliales en el sitio de reparación ósea de heridas experimentales realizadas en la tibia de ratas Wistar, posteriores a la colocación de PRP dentro de la herida.

2° Determinar la relación entre la cantidad de tejido osteoide neoformado y el aumento de la población de células endoteliales como precursoras de las células osteoprogenitoras.

## Materiales y métodos

Se utilizaron 80 ratas Wistar machos de  $189 \pm 12$  grs. de peso corporal, provenientes del bioterio de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de Río Cuarto (UNRC) <sup>Figs. Nº 8 y 9</sup>, las que fueron alimentadas con 40 grs. diarios de alimento balanceado elaborado por la misma facultad y agua ad libitum.

Los animales fueron tratados bajo la observación del comité de ética en investigaciones humanas con animales de la UNRC.

El grupo de animales se dividió en un grupo control de 40 animales y otro grupo experimental de 40 animales.

Las observaciones se realizaron a los 3, 5, 7 y 15 días post tratamiento y se utilizaron 10 animales como control y 10 como grupo experimental para cada tiempo respectivamente.

El tratamiento consistió en la colocación de plasma rico en plaquetas (PRP) <sup>Fig. Nº 14</sup> dentro de una lesión provocada en la tibia izquierda de cada animal.



Fig. nº 8  
Bioterio de la FCE de la UNRC



Fig. nº 9  
Ratas Wistar usadas en el experimento

### Obtención Plasma rico en plaquetas Técnica adaptada de la original de R. Marx. 36

Debido a la ausencia de antigenicidad en las plaquetas <sup>29</sup>, el PRP se elaboró a partir de la sangre de una de las ratas la que fue anestesiada siguiendo el mismo protocolo quirúrgico para los problemas y controles. Luego se rasuró la zona del esternón. Se hizo campo con solución de povidona iodada al 10% y con una aguja 40/8 estéril y una jeringa estéril descartable de 5 cc. que contenía 4ml. de citrato de sodio como anticoagulante se punzó por debajo del esternón a una



profundidad de 10 mm. en dirección hacia el corazón. Una vez que se confirmó la punción del mismo, por medio de aspiración se extrajeron 16 ml. de sangre. Luego se agitó la jeringa por inversión para que se mezcle el anticoagulante con la sangre y se realizó el primer conteo de plaquetas por medio de cámara de Nageotte (fig. nº 10 y 11). Posteriormente se sacó la aguja y se transfirió la sangre haciéndola deslizar por las paredes a 2 probetas estériles de 15 ml. cada una y se colocaron en una centrífuga ALC PC 1218® (fig. nº 12) y se centrifugaron a 800 r.p.m. con lo que se obtuvieron 160 G durante 15 minutos. Luego se eliminó el 1er. ml. de plasma y con una pipeta Pasteur se recogió el plasma rico en plaquetas (PRP) resultante, dejando los glóbulos rojos en la probeta original. Luego se transfirió el PRP a otras 2 probetas estériles y se centrifugó a 1.400 r.p.m. consiguiendo 580 G durante 20 minutos para obtener una mayor concentración del plasma rico en plaquetas. En esta etapa se realizó el segundo conteo de plaquetas para determinar la concentración, el incremento promedio fue del 288%. Luego se mezclaron 1 ml. de trombina bovina con 1 ml. de cloruro de calcio 0.025 M (Biopool® Ventura CA USA) en una jeringa estéril de 10 cc. sin aguja y con una pipeta Pasteur estéril se colocó dentro de la jeringa el PRP consiguiendo de esa manera la coagulación del PRP en 1 minuto aproximadamente (fig. nº 15 y 16).

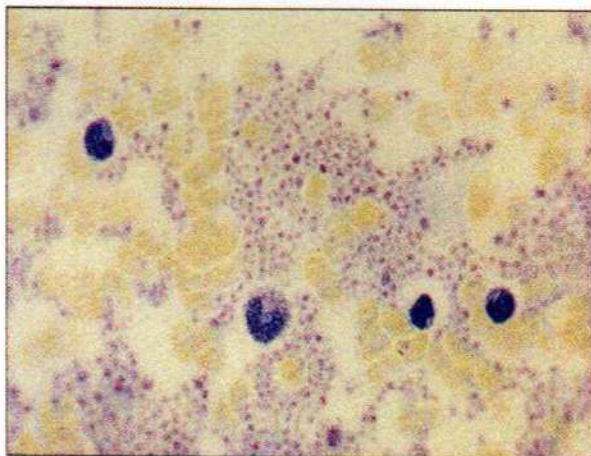


Fig. nº 10

PRP con un aumento del 288 % de cantidad de plaquetas

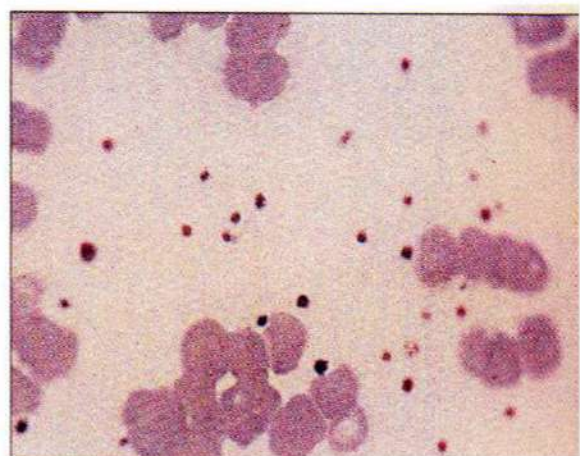


Fig. nº 11

Sangre con cantidad normal de plaquetas



Fig. nº 12  
Centífuga AL PC 1218

**Procedimiento quirúrgico:** Los animales problema y los controles se anestesiaron intramuscularmente con ketamina (vetanarcol® de Köning), a una dosis de 0.25 mg por Kg. de peso y se les administró por la misma vía como relajante muscular 0.15 mg por Kg. de peso de Hidrocloruro de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4H-1,3 tiacina al 2 % (Rhompum® de Bayer). Se rasuraron las tibias



Fig. nº 13 imagen pre quirúrgica



Fig. Nº 14 Decolado de la tibia izquierda

izquierdas de los animales y luego se desinfectaron con una solución de iodo povidona (fig. nº 13). Se aplicó clorhidrato de prilocaína al 3 % como anestésico local y vasoconstrictor. Se realizó una incisión con un bisturí con hoja Nº 15 en la cara anterior de la tibia, de 3 cm. de longitud hacia cada extremo partiendo desde el centro del miembro. Se decoló la musculatura y el periostio con un decolador de Molt (Fig. nº 14). Se realizó una perforación en la cara anterior de la tibia en la mitad de la distancia entre los extremos de la misma. La perforación fue de 2 mm de diámetro hasta el eje medular y se realizó con una fresa cilíndrica de 2 mm de diámetro montada en una pieza de mano a 800 r.p.m con refrigeración. Las



heridas de los problemas y controles fueron lavadas con abundante solución fisiológica para eliminar los restos de hueso.

En los animales problema se colocó el PRP dentro de la herida, con una jeringa de 1 cc de plástico sin aguja. Posteriormente se suturó con poliamida 6&66 monofilamento (Ethilon Nylon ® de ETHICON) 4.0 con puntos tipo colchonero.

En los animales control se efectuaron los mismos pasos quirúrgicos que en los animales problema pero no se les puso plasma rico en plaquetas dentro de la perforación de la tibia.

Los animales operados fueron ubicados en jaulas individuales hasta el final de la experiencia. Para el sacrificio se anestesiaron los animales siguiendo el mismo procedimiento que para la cirugía y se utilizó una inyección intramuscular de 0.1 ml. por Kg. de peso de succinil colina al 5 % como paralizante de la respiración.

Como la succinil colina demora 5 minutos en actuar, en ese tiempo se realizó la extracción de la porción media de la tibia de la rata de aproximadamente 1 cm. de longitud, quedando la cavidad efectuada en la cirugía en el centro de la pieza. El corte del hueso se realizó con un disco sierra de 3cm. de diámetro montado en un mandril y accionado por una pieza de mano quirúrgica a 15.000 r.p.m.



Fig. nº 15

1º centrifugación donde se observa el plasma separado de los glóbulos rojos

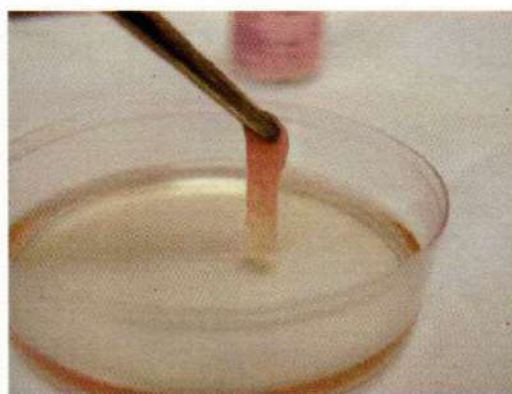


Fig. nº 16

Plasma rico en plaquetas activado por el CaCl

**Fijación:** Los cortes obtenidos se fijaron en formaldehído al 10 % Merck ® en buffer fosfato (100 ml de formol puro, 900 ml de agua tridestilada, 4 grs. de fosfato ácido de sodio monohidratado (PO H NaH O) y 6,5 grs. de fosfato disódico anhidro (PO H Na) durante 48 hs., luego se lavaron los trozos de hueso en agua tridestilada.

**Descalcificación:** Los trozos de hueso se descalcificaron en una solución de EDTA disódico 0.01 molar (Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O) BIOPUR ® por un período de 8 semanas, renovándose en su totalidad cada 3 días. Luego las piezas se lavaron en agua tridestilada.

**Inclusión:** Los trozos de hueso se retaquearon e incluyeron en parafina para posteriormente cortarlos con micrótomo a un espesor de 5 µm. y montarlos en portaobjetos con un adhesivo (VECTABOND SP-1800 ®) que no interfiere con las técnicas de inmunohistoquímica.

**Marcación de células endoteliales:** Se aplicó la técnica de inmunoperoxidasa indirecta método ABC <sup>27</sup> para la marcación de la proteína CD-31 en la superficie de las células endoteliales. Para ello se desparafinaron los cortes, luego se hicieron: dos pases por xilol de 10 minutos cada uno, un pase por una solución 50/50 de xilol alcohol v/v de 10 minutos y posteriormente pases por alcoholes al 100, 96, 80, 75, 50 % de tres minutos cada uno. Por último se hizo un pase por agua tridestilada. Inmediatamente después, las secciones se lavaron en buffer fosfato (fosfato de sodio 0.742 gr., fosfato disódico 0.542, agua tridestilada c.s.p. 100 ml) pH 7,2 por 10 minutos. A continuación, se realizó en cámara húmeda el bloqueo de la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 0.3 % por 30 minutos y se lavó en buffer por 5 minutos. Luego se realizó el bloqueo de adherencias inespecíficas con suero normal de la especie con que fue hecho el secundario (caballo). Posteriormente se incubó con el anticuerpo primario diluido



en buffer (anti-CD-31 de rata # M 823 VECTOR Laboratories, Inc.®) por 30 minutos. Se lavaron los portaobjetos en buffer por 5 minutos. Luego se incubaron con el anticuerpo secundario diluido (ABC anti-mouse PK 6102 VECTOR Laboratories, Inc). Se lavaron los portaobjetos por 5 minutos en buffer. Posteriormente se incubaron los portaobjetos en 0.1 % de 3<sup>l</sup>,3<sup>l</sup>, diaminobencidina tertrahidrocloride y 0.02 % de peróxido de hidrógeno (VECTASTIN ® ABC Reagente SK 4100, VECTOR Laboratories, Inc) controlando el paso con el microscopio para detener el proceso en el momento en que aparecen las primeras señales de tinción y se lavaron los porta objetos por 5 minutos en buffer. Por último se colocó el cubreobjeto.

### Análisis digital de imágenes

Los cortes inmunomarcados con anti CD31 para visualizar las células endoteliales fueron evaluados a través de un analizador digital de imágenes (Kontron Imaging Sistem ®) el que posee una unidad central de procesamiento con el software VIDAS 25 ® con placa de adquisición de imágenes, dos monitores (uno para la manipulación del programa y otro para la visualización de las imágenes) y un mouse indicador de la posición exacta de la imagen. El sistema está conectado a través de una cámara de video Phillips CCD ® a un microscopio Axiophot (Carl Zeiss ®) (fig. nº 17).



Fig. Nº 17

Analizador digital Kontron y microscopio Car Zeiss Axiopot

Se realizó una secuencia de acciones en el programa del analizador denominada macro que contó con cuatro fases principales: 1º) Toma de las



imágenes de la tibia por medio de la cámara CCD instalada en el microscopio y transferencia al monitor por medio de la placa de adquisición.

2º) Procesamiento de la imagen para aportarle mejor definición mediante la manipulación interactiva del rango de grises.

3º) Se grabó la imagen seleccionada y luego se hizo correr el macro generado con anterioridad.

4º) El software reconoció la marcación de la inmunoperoxidasa como señal positiva y transformó el cuadro resultante en una imagen de dos tonos (claros y oscuros) calculando el área clara como positiva.

La elección del área representativa a digitalizar se realizó dividiendo el cuadrante en retículas de 0.1 mm de lado y se registró en cada toma la siguiente comenzando por la primera superior derecha. En cada muestra se tomaron 20 imágenes obteniendo una media de todos los registros.

A los datos obtenidos se les realizó el test T de Student para datos apareados para analizar los datos estadísticamente y graficarlos mediante el gráfico Box Plot. Este trabajo se realizó con el software STATA versión 8.0.

El análisis de la cantidad de tejido osteoide se realizó de la misma manera sólo que el macro que se generó en el software reconoció las áreas que se le delimitaban en forma manual para posteriormente calcular la superficie total del área en cuestión <sup>25-48</sup>.

## Resultados

### Resultados casos problema 3 días

Macroscopía del material quirúrgico: Una vez retirados los tejidos blandos de la pieza se observó la perforación en la mediáfisis de la tibia de aproximadamente 2 mm de diámetro bien definida, en cuyo interior se apreció un coágulo de consistencia firme y oscuro.

Microscopía: Toda la cavidad está ocupada por tejido necrótico y un abundante infiltrado de PMN. Se observó la presencia de adipocitos medulares que conservan su integridad. En todos los casos el tejido medular estaba separado del tejido cortical. Las observaciones mediante el analizador de imágenes revelaron que la media de la cantidad de tejido inmunomarcado con anti CD31 fue de  $6.148 \text{ mm}^2$ . En este tiempo no se observó tejido osteoide neoformado.

Fig N° 18 y 19.

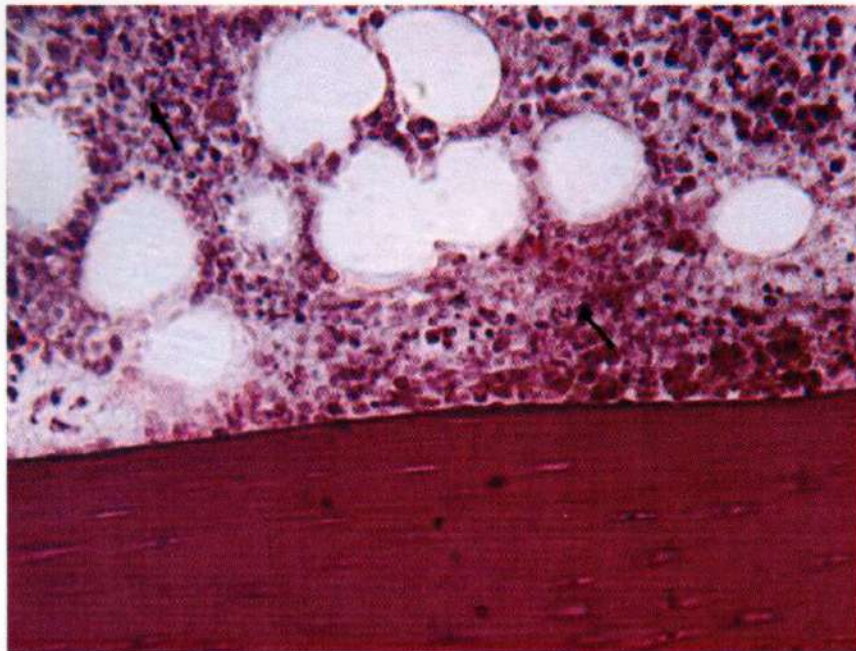


Figura N° 18

Caso de 3 días, HE. 40x. se observa un denso infiltrado de PMN (↑) y una necrosis generalizada. Las áreas claras son adipocitos de la médula ósea.



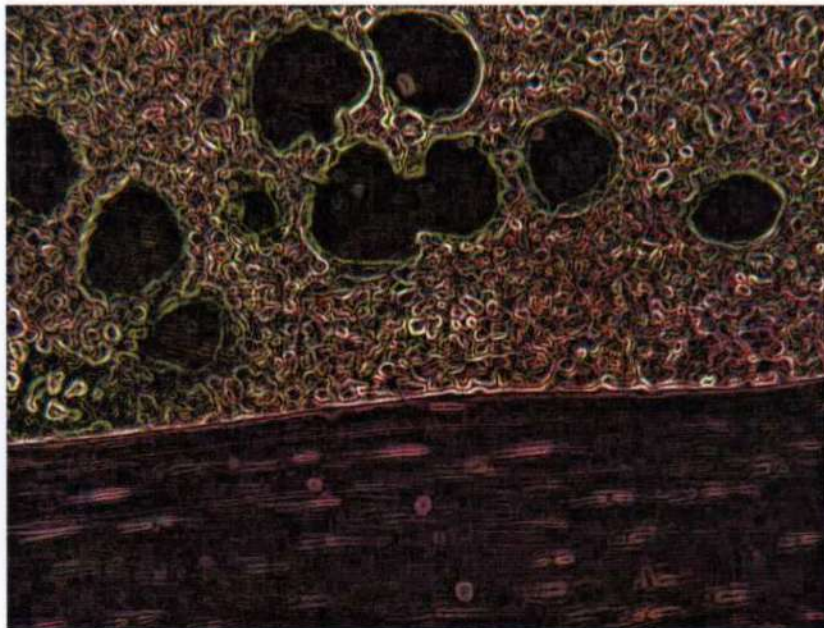


Figura N° 19

Caso de 3 días observado con el analizador de imágenes. 40x  
Se observa las líneas claras por la marcación positiva del anti CD3.

#### Resultados de casos control 3 días

**Macroscopía del material quirúrgico:** Se observó la perforación en la mediáfisis de la tibia de aproximadamente 2 mm de diámetro bien definida, en cuyo interior se apreció un coágulo de consistencia firme y oscuro. No se aprecian diferencias con los casos problema a este nivel de observación.

**Microscopía:** La totalidad de la cavidad está dominada por tejido necrótico y un abundante infiltrado de PMN. Se observa la presencia de adipocitos medulares. En todos los casos el tejido medular estaba separado del tejido cortical. Las observaciones mediante el analizador de imágenes revelaron que la media de la cantidad de tejido inmunomarcado con anti CD31 fue de 4.278 mm<sup>2</sup>. Fig. N° 20 y 21. En este tiempo experimental no se determinó la cantidad de tejido osteoide neoformado en problemas ni controles por ausencia total del mismo.

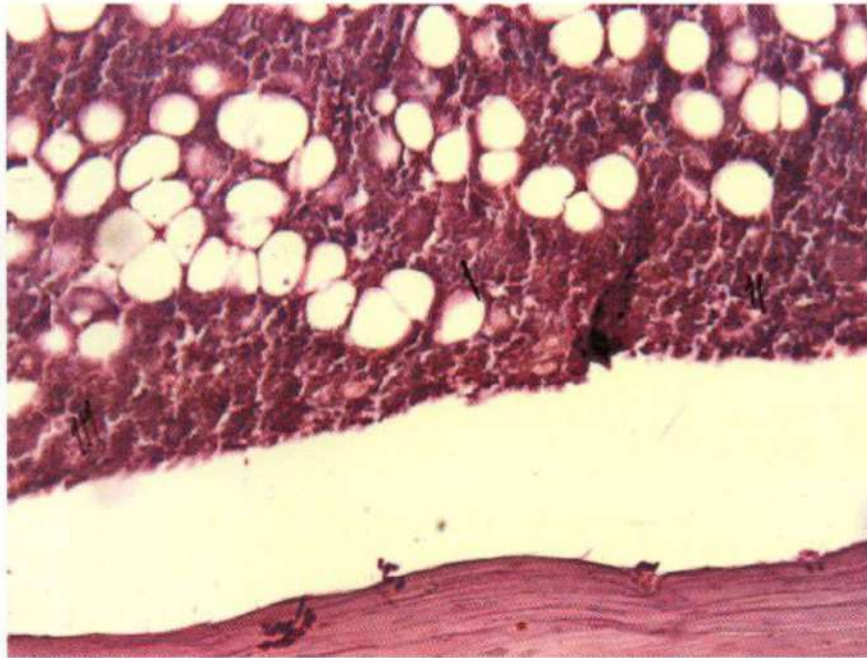


Figura N° 20

Control 3 días HE. 40x. Se observa un denso infiltrado de PMN (↑) y áreas de tejido de granulación (↑↑) y áreas necróticas (↑↑↑) y la presencia de adipocitos.

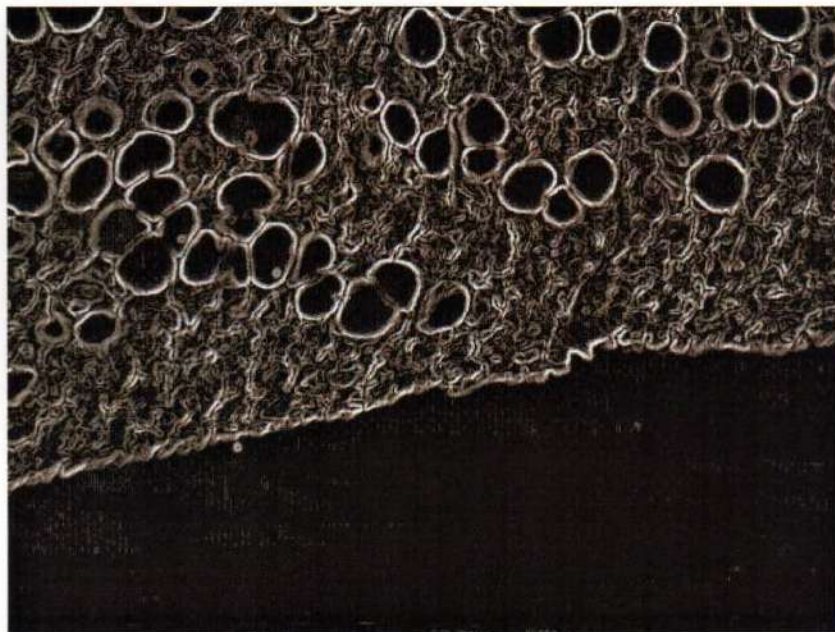


Figura N° 21

Control observado con el analizador de imágenes. 40x

Se identifica una marcación positiva para el anti CD-31 en toda el área medular.



Análisis estadístico de la superficie inmunomarcada de casos y controles a los 3 días  
Test T Student

x	y
5.91	3.75
6.17	3.21
5.15	4.13
7.12	4.16
4.87	4.33
6.89	4.98
6.99	5.19
7.45	4.96
6.24	4.32
4.69	3.75



Variable	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[95% Conf. Interval]
x	10	6.148	.3112726	.9843305	5.443852 6.852148
y	10	4.278	.1979944	.6261132	3.830106 4.725894
diff	10	1.87	.2626785	.8306624	1.27578 2.46422

**P > t = 0.0000**

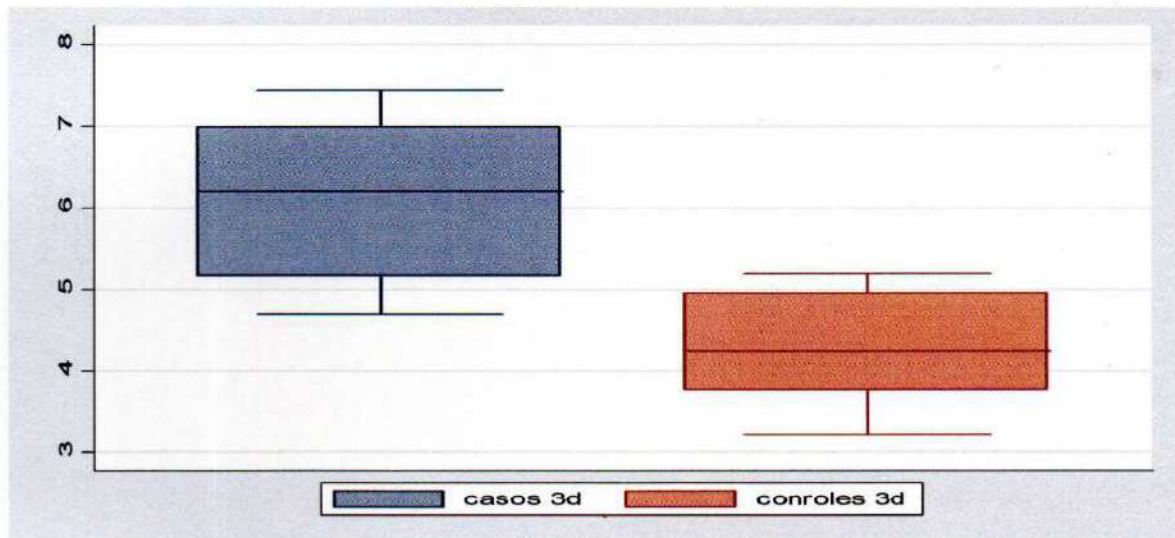


Fig. Nº 22

Gráfico que representa los valores obtenidos en los casos problema y control de 3 días. En el eje vertical están representados los valores obtenidos por el analizador de imágenes de las superficies marcadas por el anti CD 31. El valor P se situó por debajo de 0.005 por lo que podemos afirmar que la diferencia entre casos problema y control es estadísticamente significativa.

### Resultados de casos problema 5 días

Macroscopía de la muestra quirúrgica: Se observó la perforación en la mediáfisis de la tibia de aproximadamente 2 mm. de diámetro con los bordes poco definidos, en cuyo interior se apreció un tejido fibroso, firme y oscuro.

Microscopía: Se observó la presencia de tejido necrótico conjuntamente con un infiltrado de PMN, macrófagos y áreas con tejido de granulación. Se definen algunas áreas fibrosas reactivas y la presencia de osteoclastos activados en áreas de reabsorción. La superficie celular inmunomarcada con anti CD31 fue de  $7.442 \text{ mm}^2$ . La superficie osteoide registrada fue de  $19.892 \text{ mm}^2$ . Fig. N° 23 y 24.



Figura N° 23

Caso 5 días HE 40x. Se observa actividad osteoclástica (↑) y formación ósea reactiva desordenada (↑↑).



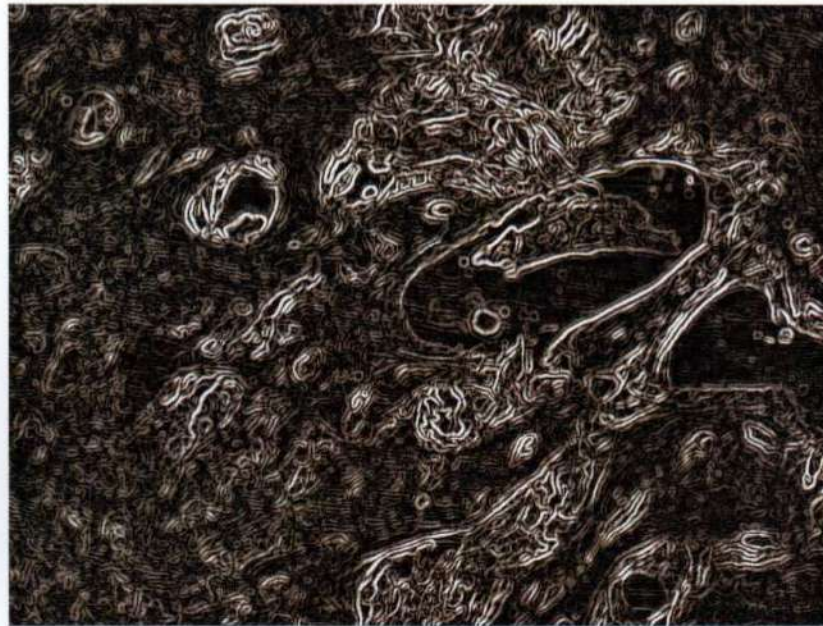


Figura N° 24

Caso 5 días observado con el analizador de imágenes. 40x

Se observa una marcación positiva en toda el área medular.

#### Resultados de casos control 5 días

**Macroscopía del material quirúrgico:** Se observó la marca de la perforación en la mediáfisis de la tibia de aproximadamente 2 mm de diámetro. El tejido que rellena la cavidad es de aspecto firme, claro, con poca solución de continuidad con el tejido circundante a la lesión.

**Microscopía:** Podemos observar la presencia de tejido necrótico conjuntamente con un infiltrado de PMN, macrófagos y áreas con tejido de granulación. Se definen algunas áreas fibrosas reactivas y la presencia de osteoclastos activados en áreas de reabsorción. La superficie celular inmunomarcada con anti CD31 fue de  $5.643 \text{ mm}^2$ . La superficie osteoide registrada fue de  $19.373 \text{ mm}^2$ . Fig. N° 25 y 26.

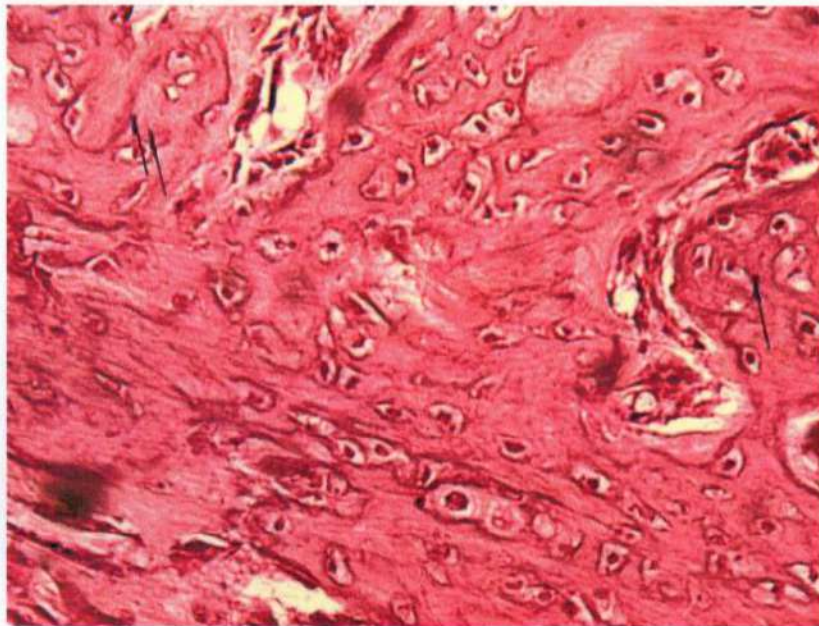


Figura N° 25

Control 5 días HE 40x. Se observan áreas de tejido osteoide desorganizado (↑) y áreas de reabsorción ósea de reemplazo (↑↑).

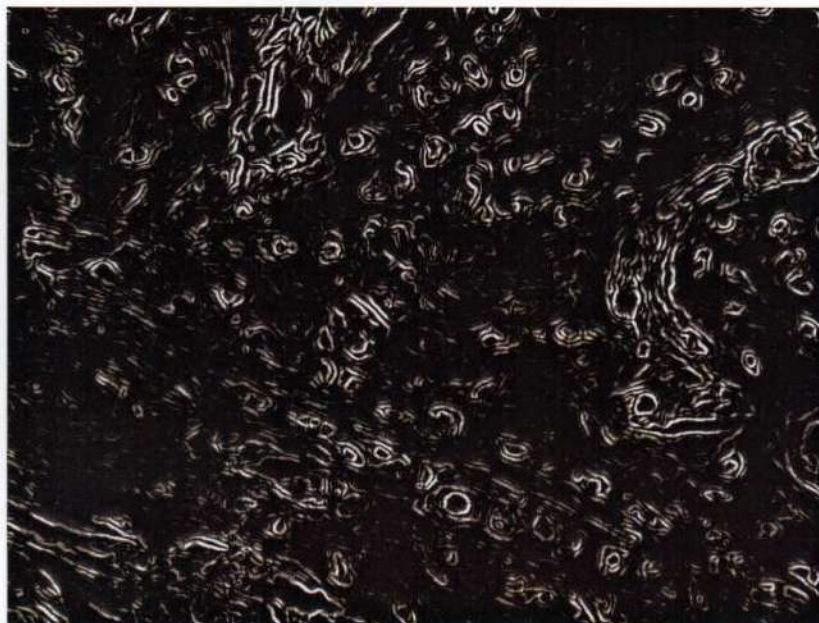


Figura N° 26

Control 5 días observado con el analizador de imágenes. 40x

Se continúa con la marcación positiva para el anti cd31 en las áreas correspondientes a las membranas celulares



Análisis estadístico de la superficie inmunomarcada de casos y controles a los 5 días  
Test T Student

x	y
7.23	5.81
8.21	6.71
8.12	5.98
6.76	5.95
7.59	5.12
9.11	6.86
6.83	5.39
7.3	5.29
5.98	4.11
7.29	5.21

Variable	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[95% Conf. Interval]	
x	10	7.442	.2772676	.8767971	6.814777	8.069223
y	10	5.643	.2550601	.8065709	5.066014	6.219986
diff	10	1.799	.1577089	.4987194	1.442238	2.155762

**P > t = 0.0000**

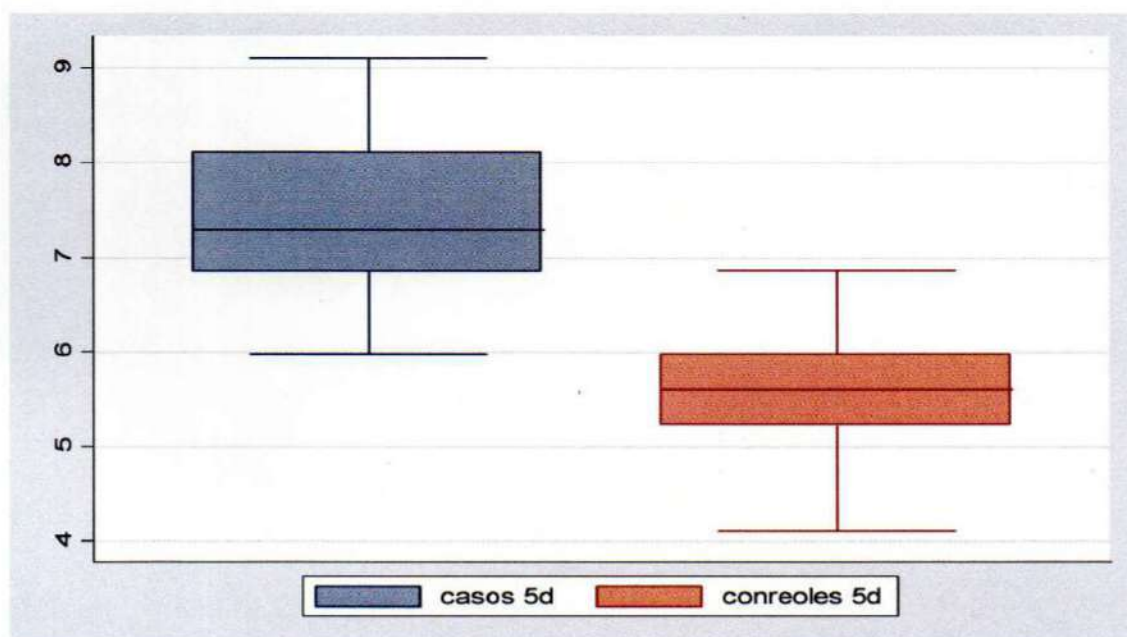


Fig. Nº 27

Gráfico que representa los valores obtenidos en los casos problema y control de 5 días. En el eje vertical están representados los valores obtenidos por el analizador de imágenes de las superficies marcadas por el anti CD 31. El valor P se situó por debajo de 0.005 por lo que podemos afirmar que la diferencia entre casos problema y control es estadísticamente significativa.

Análisis estadísticos de las superficies osteoides de casos y controles 5 días.  
Test T student

x	y
21.97	20.14
19.35	19.87
20.45	19.23
18.72	18.61
19.45	17.01
20.61	19.25
18.88	18.21
19.99	20.21
20.01	19.21
19.19	21.99

Variable	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[95% Conf. Interval]	
x	10	19.862	.3080253	.9740614	19.1652	20.5588
y	10	19.373	.4211783	1.331883	18.42023	20.32577
diff	10	.4890003	.4655832	1.472303	-.564222	1.542223

**P > t = 0.1605**

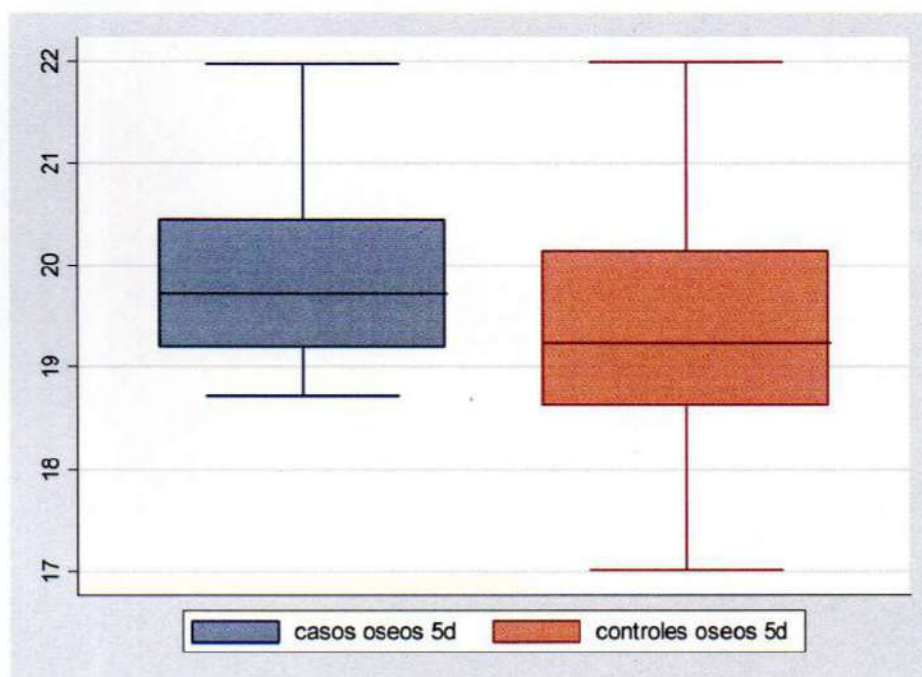


Figura N° 28

Gráfico que representa los valores obtenidos en el análisis digital de la superficie osteoide en casos problema y control de 5 días. En el eje vertical se representan los valores de superficie del área osteoide. Se observa que el valor P se sitúa por encima de 0.005 por lo que podemos afirmar que en este tiempo las diferencias son estadísticamente no significativas.



### Resultados casos problema 7 días

Macroscopía del material quirúrgico: En el sitio de perforación se observa una marca oscura, con bordes poco definidos, sin solución de continuidad, de aproximadamente 2 mm. de diámetro, de textura rugosa.

Microscopía: Se observan extensas áreas de tejido osteoide reactivo entremezcladas con tejido fibroso irregular. Los osteoclastos activados están organizados en los frentes de reabsorción y se aprecian áreas de calcificación laminar y trabéculas en organización. Las áreas neoformadas se encuentran en continuidad con el tejido óseo existente. Los cordones son abundantes e irregulares y se encuentran cubiertos por una capa de osteoblastos cúbicos. El tejido osteoide está invadido por numerosos vasos sanguíneos. La superficie inmunomarcada con anti CD31 fue de 10.75 mm<sup>2</sup> mientras que la superficie osteoide registrada fue de 29.593 mm<sup>2</sup>. Fig. N° 29 y 30.

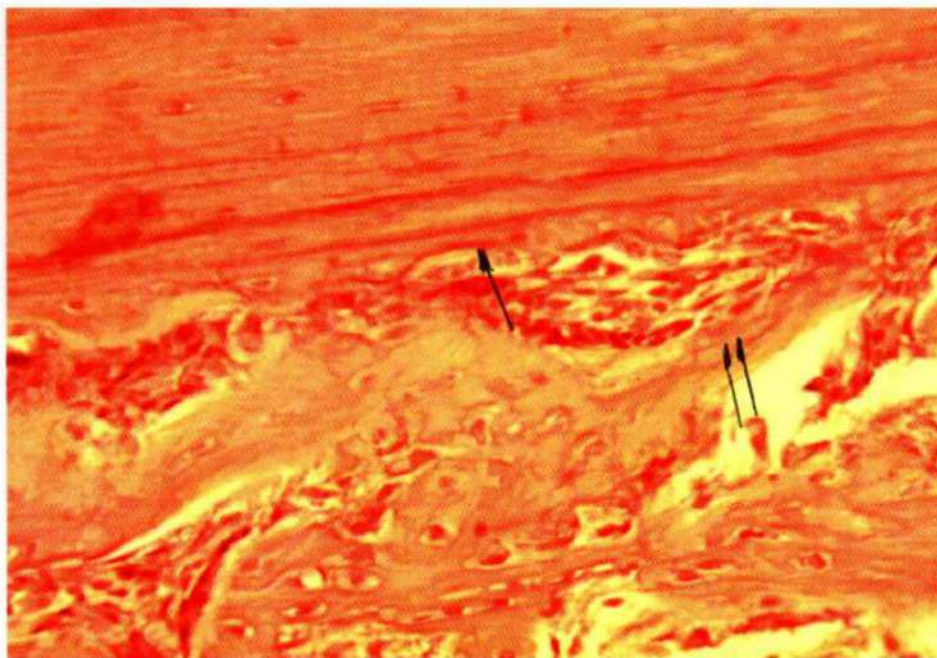


Figura N° 29

Caso 7 días HE 40x. Se observan áreas de reabsorción (↑) junto con áreas de tejido osteoide organizándose en forma laminar (↑↑)



Figura N° 30

Caso 7 días observado con el analizador de imágenes. 40x

En este tiempo también hay marcación positiva para el anti CD31 en el área celular osteoide.

### Resultados casos control 7 días

**Macroscopía del material quirúrgico:** En el sitio de perforación se observa una marca oscura, con bordes poco definidos, sin solución de continuidad, de aproximadamente 2 mm. de diámetro,

**Microscopía:** Se observan extensas áreas de tejido osteoide reactivo entremezcladas con tejido fibroso irregular. Los osteoclastos activados están organizados en los frentes de reabsorción y se aprecian áreas de calcificación laminar y trabéculas en organización. Las áreas neoformadas se encuentran en continuidad con el tejido óseo existente. Los cordones son abundantes e irregulares y se encuentran cubiertos por una capa de osteoblastos. La superficie inmunomarcada con anti CD31 fue de 6.709 mm<sup>2</sup> y la superficie osteoide registrada fue de 26.729 mm<sup>2</sup>. Fig. N° 31 y 32.



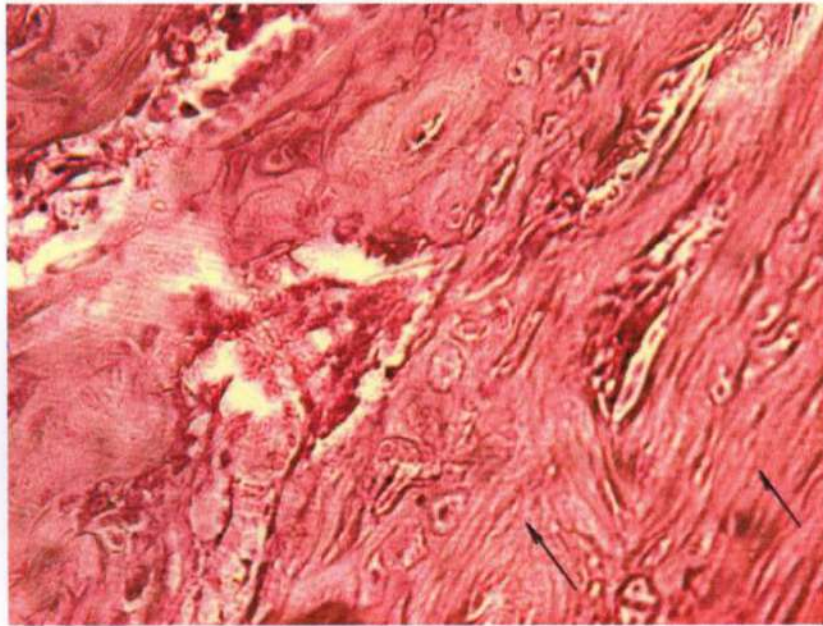


Figura N° 31

Control 7 días HE 40x Tejido osteoide neoformado con una organización laminar (†).



Figura N° 32

Control 7 días observado con el analizador de imágenes.40x

Se observan áreas marcadas con anti CD31

Análisis estadístico de la superficie inmunomarcada de casos y controles a los 7 días  
Test T Student

x	y
9.46	7.21
11.91	6.12
11.01	7.21
9.89	5.98
10.38	6.98
9.91	6.91
11.92	7.12
12.21	7.02
9.87	6.62
10.94	5.92

Variable	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[95% Conf. Interval]	
x	10	10.75	.3157073	.9983542	10.03582	11.46418
y	10	6.709	.1629686	.5153521	6.340339	7.077661
diff	10	4.041	.3546029	1.121353	3.238833	4.843168

**P > t = 0.0000**

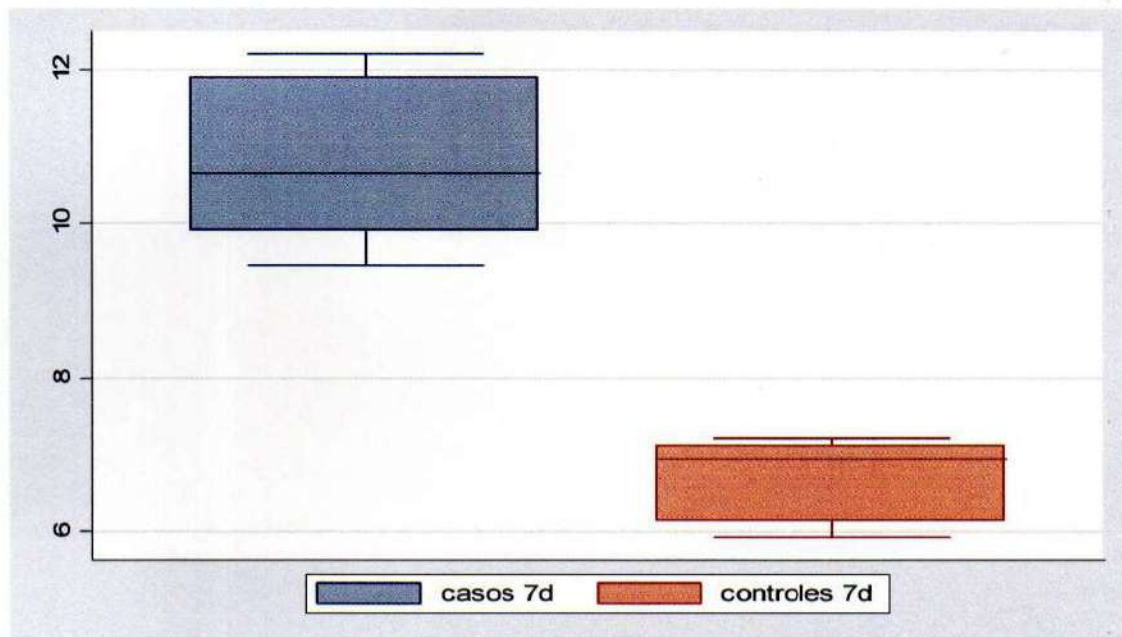


Fig. Nº 33.

Gráfico que representa los valores obtenidos en los casos problema y control de 7 días. En el eje vertical están representados los valores obtenidos por el analizador de imágenes de las superficies marcadas por el anti CD 31. El valor P se situó por debajo de 0.005 por lo que podemos afirmar que la diferencia entre casos problema y control es estadísticamente significativa.



Análisis estadísticos de la superficie osteoide de casos y controles de 7 días  
Test T Student



x	y
28.98	25.18
26.91	24.12
29.77	26.98
31.02	24.98
28.98	26.99
27.19	26.99
29.99	28.77
32.18	29.29
31.88	30.12
29.03	23.87

Variable	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[95% Conf. Interval]	
x	10	29.593	.5596587	1.769796	28.32696	30.85904
y	10	26.729	.69010	2.182295	25.16788	28.29012
diff	10	2.864	.5580586	1.764736	1.601583	4.126416

**P > t = 0.0003**

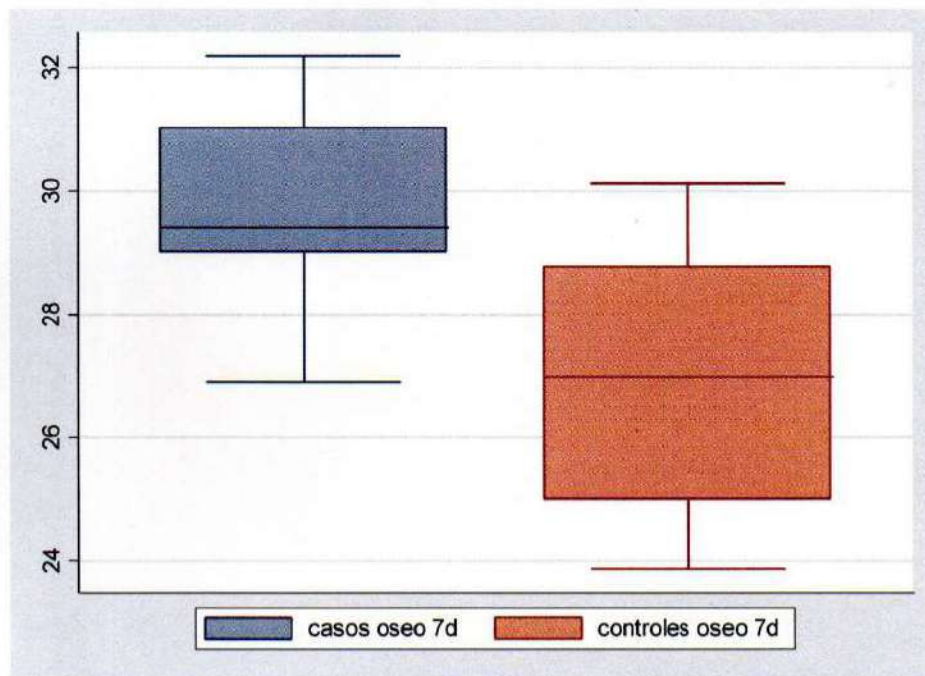


Figura Nº 34

Gráfico que representa los valores obtenidos en el análisis digital de la superficie osteoide en casos problema y control de 7 días. En el eje vertical se representan los valores de superficie del área osteoide. Se observa que el valor P se sitúa por debajo de 0.005 por lo que podemos afirmar que en este tiempo las diferencias son estadísticamente significativas.

### Resultados casos problema 15 días

Macroscopía del material quirúrgico: En el área de perforación solo se puede apreciar una zona más oscura que el tejido circundante sin solución de continuidad y a la presión podemos percibir una consistencia elástica.

Microscopía: es posible observar numerosas áreas de formación ósea reactiva entremezcladas con cordones de formaciones fibrosas. El tejido osteoide neoformado está organizándose en laminillas y se observan osteoblastos dentro de las formaciones laminares. En el frente de formación se ven áreas de reabsorción con sus correspondientes osteoclastos agrupados y un cordón de osteoblastos cuboidales tapiza el frente de osificación. La superficie inmunomarcada con anti CD31 fue de 3.653 mm<sup>2</sup> mientras que la superficie osteoide registrada fue de 47.537 mm<sup>2</sup>. Fig. N° 35 y 36.

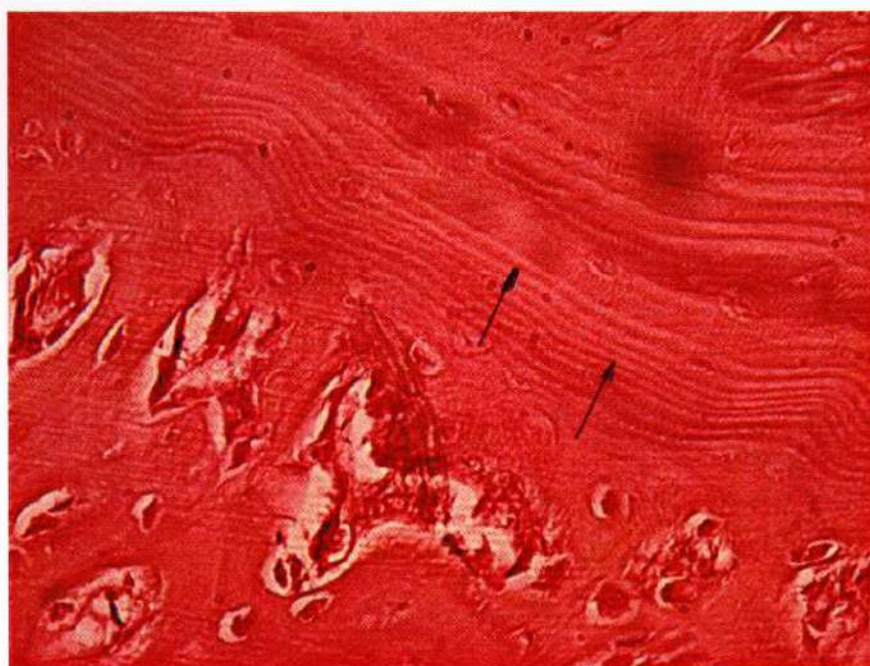


Figura N° 35

Caso 15 días HE 40x. Se observa un organización ósea laminar madura (↑)





Figura N° 36

Caso 15 días observado con el analizador de imágenes.

Anti CD31 40x. Se observa un área positiva.

### Resultados casos control 15 días

Macroscopía de la pieza quirúrgica: En el área de perforación solo se puede apreciar una zona más oscura que el tejido circundante sin solución de continuidad y a la presión podemos ver una consistencia elástica al igual que en los casos problema.

Microscopía: Se observan numerosas áreas de formación ósea entremezcladas con formaciones fibrosas. El tejido osteoide neoformado está organizado en formación laminar y se observan osteoblastos dentro de las laminillas. En el frente de formación hay áreas de reabsorción con osteoclastos agrupados y un cordón de osteoblastos tapiza el frente de osificación. La superficie inmunomarcada con anti CD31 fue de 3.469 mm<sup>2</sup> mientras que la superficie osteoide registrada fue de 48.178 mm<sup>2</sup>. Fig. N° 37 y 38.

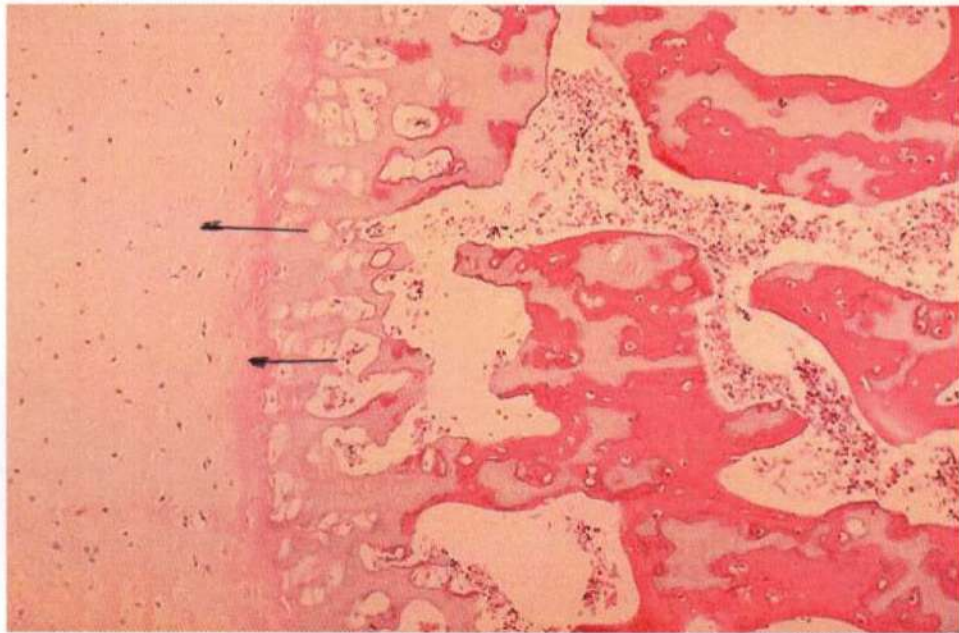


Figura N° 37

Control 15 días HE 40x. Se identifica el área osteoide neoformada organizada en forma laminar (1)

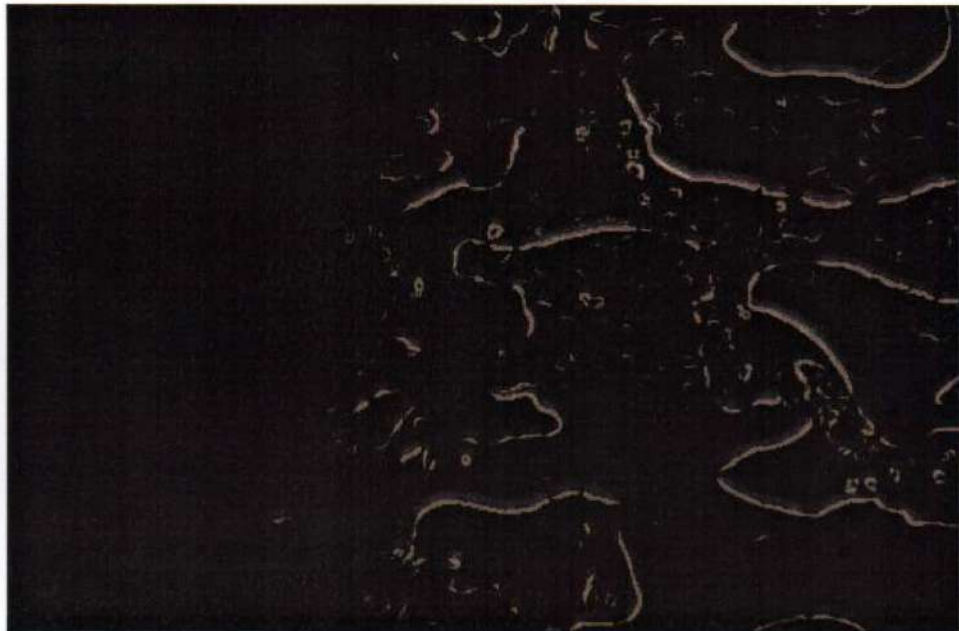


Figura N° 38

Control 15 días observado con el analizador de imágenes.

Anti CD 31 40x. Se observa una disminución del área marcada positivamente.



Análisis estadístico de la superficie inmunomarcada de casos y controles a los 15 días  
Test T Student

x	y
3.21	2.99
3.71	2.96
4.75	4.69
4.12	3.45
2.86	2.89
3.18	3.38
4.31	3.49
2.79	3.01
2.84	3.71

Variable	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[95% Conf. Interval]	
x	10	3.653	.2480235	.7843193	3.091932	4.214068
y	10	3.469	.1830571	.5788772	3.054896	3.883104
diff	10	.184	.1716922	.5429386	-.2043949	.5723948

**P > t = 0.1559**

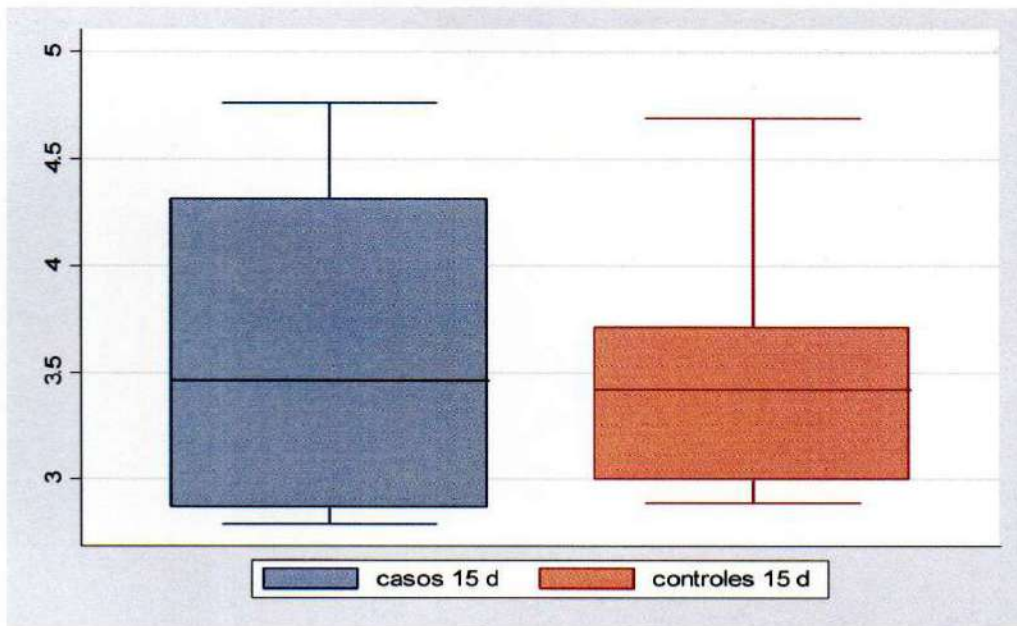


Fig. N° 39.

Gráfico que representa los valores obtenidos en los casos problema y control de 15 días. En el eje vertical están representados los valores obtenidos por el analizador de imágenes de las superficies marcadas por el anti CD 31. El valor P se situó por encima de 0.005 por lo que podemos afirmar que la diferencia entre casos problema y control no es estadísticamente significativa.

Análisis estadísticos de la superficie osteoide de casos y controles de 15 días  
Test T Student

x	y
47.34	46.98
50.12	51.21
45.98	44.3
41.02	51.65
47.94	48.16
53.98	52.99
49.56	46.87
46.88	45.76
51.33	50.98
41.22	42.88

Variable	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[95% Conf. Interval]	
x	10	47.537	1.299985	4.110912	44.59623	50.47777
y	10	48.178	1.076802	3.405146	45.74211	50.61389
diff	10	-.6409996	1.180515	3.733115	-3.311509	2.02951

**P > t = 0.6998**

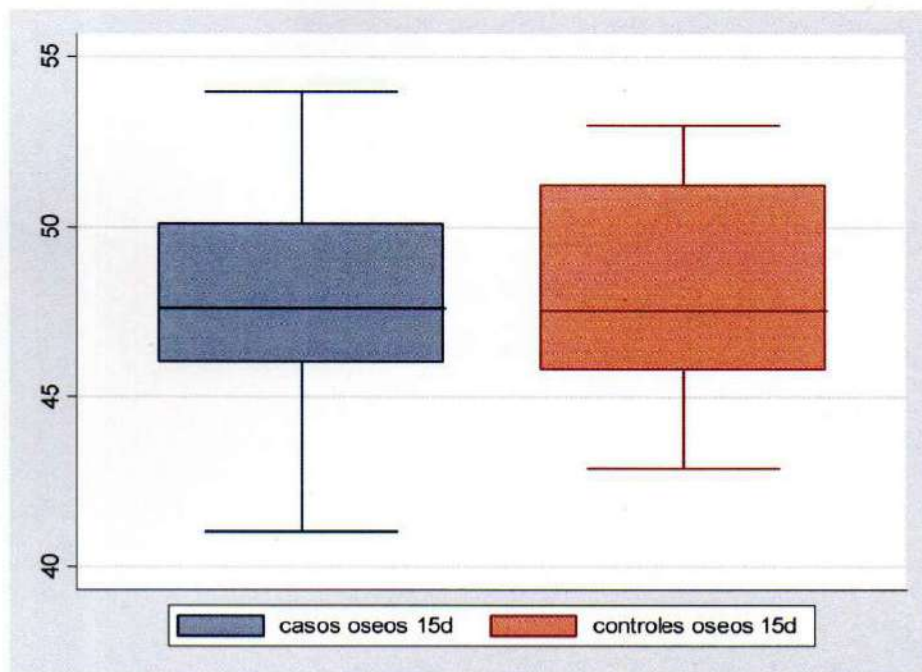


Figura Nº 40

Gráfico que representa los valores obtenidos en el análisis digital de la superficie osteoide en casos problema y control de 15 días. En el eje vertical se representan los valores de superficie del área osteoide. Se observa que el valor P se sitúa por encima de 0.005 por lo que podemos afirmar que en este tiempo las diferencias no son estadísticamente significativas.



Resumen de los Box Plot de superficie celular

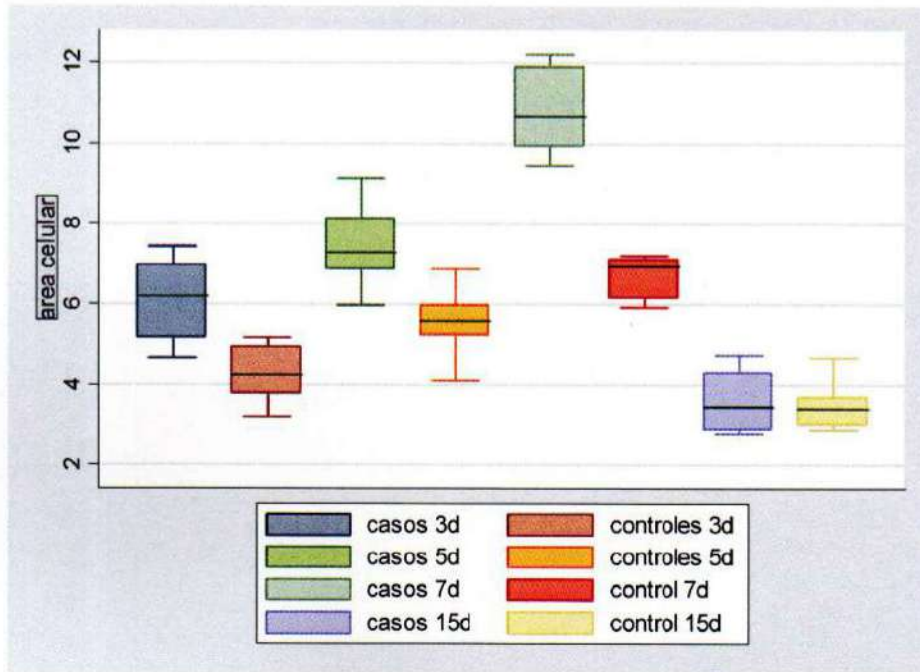


Figura N° 41

En este gráfico podemos observar que la superficie celular marcada con anti CD31 mantiene una diferencia estadísticamente significativa entre casos problema y control hasta el día 7. No existiendo la diferencia significativa a los 15 días.

Resumen de los Box Plot de superficie osteoide

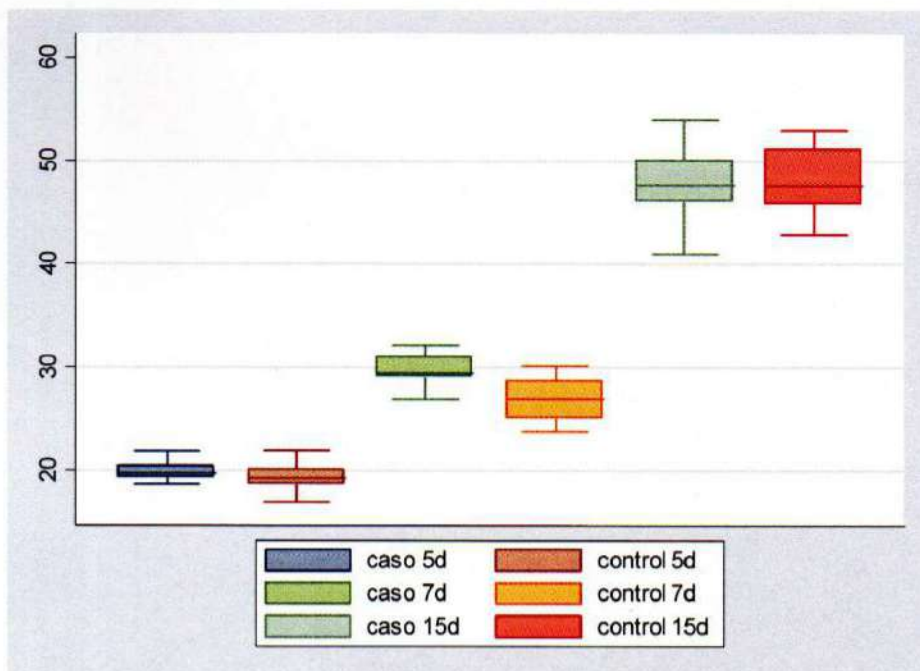


Figura N° 42

En este gráfico se resumen los datos obtenidos de las superficies osteoides neoformadas. Podemos observar que solo en el tiempo de 7 días hubo una diferencia estadísticamente significativa entre casos problema y control.

## Discusión

Una revisión de la literatura relativa a la cicatrización tisular, revela que el cierre primario de una herida fue y es un tópico de gran interés desde los años '50. Ciertamente la cobertura de tejido blando sobre tejido óseo expuesto, heridas traumáticas y defectos quirúrgicos seguidos de un apropiado debridamiento de tejido necrótico y cuerpos extraños, representó un importante avance en la cicatrización tisular y permanece como un standard básico hasta nuestros días.

En la década del '60, el interés se focalizó en los antibióticos. Con la emergencia de las cefalosporinas y la lincomicina/clindamicina se complementó a la penicilina y las sulfas, drogas aún en uso en nuestros días y los cirujanos pudieron vencer al principal enemigo de la cicatrización, la infección bacteriana.

En los años '70, se observaron los beneficios de la inmovilización de los cabos de las heridas. Los micro-movimientos entre los bordes de una fractura impedían el desarrollo de nuevos capilares e inhibían el crecimiento celular requeridos en una cicatrización. Los tornillos, placas rígidas y dispositivos de fijación, mejoraron el crecimiento vascular y proliferación celular mediante la limitación de los micro-movimientos <sup>55</sup>.

En la década del '80, Knighthon <sup>31</sup>, Hunt <sup>28</sup> y Marx y col <sup>40</sup> identificaron el rol fundamental que juega el oxígeno en la cicatrización de las heridas. Reconocieron que factores de crecimiento promueven la regeneración ósea, siendo esos estudios los primeros en identificar que la respuesta del macrófago a los gradientes de oxígeno es uno de los secretos de la regulación de la neoformación tisular por los factores de crecimiento.

En los comienzos de los años '90, los factores de crecimiento emergieron como el paradigma en la regeneración tisular.

Las plaquetas se reconocieron como las células que inician la reparación de heridas, primero observadas por medio del Factor de cicatrización de heridas plaquetario (PDWHF) de Knighton <sup>32</sup>, luego a través del Platelet Derived Growth Factor recombinante (PDFββ) (Regranex, Ortho Mc Neal ©) y posteriormente el Plasma Rico en Plaquetas (PRP).



Los factores de crecimiento secretados por las plaquetas tienen dos sitios activos por lo que son denominados dímeros. Estos se unen solo a las células que tienen los receptores específicos. Estos receptores se encuentran en la superficie de la membrana de las células blanco y los factores de crecimiento nunca penetran la misma, sólo activan a los receptores de membrana, los cuales poseen una porción intracitoplasmática por lo que se los suele denominar receptores transmembranosos <sup>6</sup>. Cuando un factor de crecimiento se une al receptor específico se activan las proteínas de señal, éstas se desprenden de los receptores transmembranosos y migran hacia el núcleo. Posteriormente las proteínas transductoras disparan una secuencia génica específica para una determinada función celular tal como la mitosis. La proliferación celular específica conlleva a la síntesis de colágeno o producción de osteoide. La significancia de este proceso es la que explica por qué la aplicación exógena de un factor de crecimiento, aún en altas concentraciones, no puede producir sobre-reacciones tales como la hiperplasia, tumores benignos o malignos. Los factores de crecimiento no son mutagénicos, son una proteína natural que actúa por una normal regulación génica y son controlados por mecanismos de auto-protección en la cicatrización de heridas.

Los tres PDGF (PDGFaa, PDGFbb y PDGFab) son isómeros de una proteína de aproximadamente 25.000 d. Cada isómero tiene funciones diferentes y muchas de ellas están superpuestas. Los PDGFs son los factores de crecimiento más activos involucrados en la cicatrización. Estimulan la replicación de células mesenquimáticas, osteoblastos y producción de osteoide, también estimulan a las células endoteliales a replicarse y secretar lámina basal para los nuevos vasos sanguíneos y a los fibroblastos a producir colágeno <sup>2</sup>.

El TGFβ1 y 2 son 2 de los 47 factores pertenecientes a la superfamilia de TGFβs (las proteínas morfogenéticas, conocidas también como BMPs, también pertenecen a esta superfamilia). Los TGFβ son proteínas que, al igual que los PDGFs, estimulan la replicación celular, pero también estimulan la producción de matriz y guían la diferenciación de cartílago o hueso, por lo tanto los TGFs son morfogenéticos <sup>50</sup>.



El VEGF es una proteína cuya acción está limitada a las células endoteliales, estimulando la producción de lámina basal y reclutamiento de pericitos para soportar el desarrollo de nuevos vasos <sup>51-58-63</sup>.

El PRP es un coágulo sanguíneo autólogo que contiene una alta concentración de plaquetas. Como es autólogo, está libre de transmitir enfermedades y no produce reacciones de hipersensibilidad. El número mínimo de plaquetas para considerarlo PRP puede ser discutible, pero una concentración de 1 millón de plaquetas por microlitro ha demostrado proveer efectos clínicos benéficos. <sup>36-37-39</sup>. Un coágulo sanguíneo normal en una herida resultante de la perforación para la colocación de un implante o del alvéolo post extracción, contiene un 94 % de células rojas, un 6 % de plaquetas y menos del 1 % de células blancas. Por el contrario, un coágulo de PRP contiene un 94% de plaquetas, solo un 5 % de células rojas y un 1 % de células blancas.

Sumner D. y col. <sup>50</sup> estudiaron el mejoramiento del crecimiento óseo en fracturas creadas en modelos caninos y observaron que al adicionar TGF- $\beta$  (obtenido del suero de hamsters chinos) a implantes colocados en la tibia de los animales, se obtuvieron tres milímetros más de hueso en los casos problema que en los controles (P=.009) a los 10 días post implantación. Según el autor, comparando sus resultados con estudios previos en los cuales se usó el mismo modelo canino, los resultados indicaron que el mejoramiento en el crecimiento óseo, se debió a que los implantes utilizados se trataron con una combinación de hidroxiapatita, fosfato tricálcico y TGF- $\beta$ .

Yihai C. y col. <sup>63</sup> estudiaron la incidencia de la adición de VEGF en el incremento de la tasa de formación de nuevos capilares en una herida provocada en la calota de hamsters y observaron que cuando la herida no superaba el tamaño crítico de 10 mm. de diámetro, el crecimiento de los capilares era significativamente mayor en los casos problema que en los controles donde no se adicionaba VEGF a la misma.

Las uniones interendoteliales juegan un rol muy importante en la regulación de las funciones endoteliales, tales como la vasculogénesis y la permeabilidad vascular. Sybille E. y col. <sup>51</sup> demostraron que la intervención del VEGF estimula la migración de células endoteliales en un modelo artificial de cicatrización de monocapas.



Frenz D. y col.<sup>21</sup> demostraron la sinergia que ocurre entre FGF y el TGF- $\beta$  en la iniciación de la osificación en cultivos celulares de alta densidad.

A los osteoblastos, cuya función especializada incluye la síntesis y secreción de componentes óseos (proteínas de la matriz extracelular, proteoglicanos, y componentes minerales), se los consideraba sólo derivados de células madre, pero los trabajos de Chen L.<sup>11</sup> fueron clave para demostrar el origen de los mismos de células de la médula ósea con marcación positiva para CD34, una molécula de superficie de células endoteliales.

El trabajo de Rabie A. y col.<sup>46</sup>, pionero en la identificación ultraestructural de las células involucradas en la cicatrización ósea, fue realizado a los 7 y 14 días de la creación del defecto óseo, y aunque fue ejecutado en tibia de conejos, los tiempos de aparición de tejido osteoide coinciden con los controles nuestros. En esta investigación se describen detalladamente los eventos celulares iniciales y la actividad angiogénica tras la implantación de una matriz ósea descalcificada como estímulo para la regeneración. En este estudio, los autores identificaron a macrófagos mononucleares a los 7 días post implantación y establecieron que estas células pueden inducir angiogénesis *in vivo* y que éstas juegan un papel importante en la neovascularización durante los procesos de regeneración. Los macrófagos activados producen mediadores angiogénicos que influyen directamente a las células endoteliales haciéndolas migrar y rediferenciarse en preosteoblastos.

Los estudios de Brighton C. y col.<sup>7</sup> describieron por primera vez los cambios que ocurren en los microvasos del callo perióstico que implican a células endoteliales, pericitos, y células progenitoras de cartílago y hueso. Los autores describen los cambios morfológicos tempranos en el callo de una fractura a nivel medular y detallan cómo las células endoteliales se alargan, transforman y extravasan de los micro-vasos. En la matriz adyacente a estos micro-vasos, aparecen células polimórficas mesenquimáticas que poseen las mismas características ultraestructurales que las células endoteliales. La cercana relación espacial entre las células endoteliales extravasadas, las células polimórficas, los osteoblastos y el hueso recién formado, hicieron concluir a los autores que las células endoteliales de los micro-vasos son precursoras de los osteoblastos.



La angiogénesis es un proceso fisiológico vital para la cicatrización de heridas. Fueron fundamentales los estudios de Folkman y col.<sup>20</sup> para el entendimiento de la influencia de la hipoxia en el estímulo y desarrollo de la angiogénesis. Otros estímulos provienen de los factores de crecimiento contenidos en las plaquetas y, si observamos la tabla N° 3 de la introducción, veremos que el efecto denominador común de los mismos es el estímulo de la angiogénesis.

La gran mayoría de las publicaciones reportan un beneficio al usar PRP en la cicatrización de heridas. Algunas de las publicaciones que reportaron beneficios en tejidos blandos y duros son las de Marx Y col.<sup>36-37-38-39</sup> con injertos de hueso autólogo; Garg<sup>24</sup> con compuestos de hueso autólogo y sustitutos de hueso en levantamientos de seno; Man y col.<sup>35</sup> con cirugías estéticas; Adler y Kent<sup>1</sup> con liftings; Tolga Fikret y col.<sup>54</sup> con defectos periodontales; Kim y col.<sup>30</sup> con defectos periimplantes; Froum y col.<sup>30</sup> con injertos de hueso liofilizados en levantamiento de seno y Monteleone y col.<sup>41</sup> con injertos de piel en humanos.

Aunque son muchos los trabajos en relación al uso de PRP, es escasa la información relacionada con los mecanismos moleculares involucrados en la cicatrización tisular utilizando los factores de crecimiento como estímulo.

Podemos asegurar que, según nuestros resultados, el proceso de cicatrización de las heridas en la tibia de rata es más veloz en aquellas en donde se utilizó el plasma rico en plaquetas como estímulo local que en las heridas experimentales en donde no se utilizó PRP.

Nuestras observaciones sobre la evolución de la marcación celular (CD31) y su correlación con la neoformación de tejido osteoide entre los 3 a 15 días (tanto en los problemas como en los controles) puede resumirse en la aparición de la necrosis e infiltrado de PMN, adipocitos, áreas de reabsorción y osificación reactiva, con sus islas de tejido fibroso y la consecuente osificación paulatina<sup>Figs. N° 18 a 38</sup>. Estos hallazgos son coincidentes con las observaciones de Rabbie y col.<sup>46</sup> que, aunque su diseño experimental fue realizado en conejos, la secuencia de eventos a nivel de microscopía óptica fue similar.

El aporte de PRP favoreció que la secuencia de eventos fuera más rápida en los casos problema que en los controles hasta los 7 días



observándose una diferencia estadísticamente significativa en la población de células endoteliales y tejido osteoide para luego anularse la diferencia significativa en los 15 días <sup>Figs. Nº 41 y 42</sup>. Este hallazgo se debe, probablemente, a que tal cual lo referido por Brighton y col <sup>7</sup>, de los 7 a 10 días de comenzada la cicatrización la población de células endoteliales comienza a decrecer porque, conjuntamente con los pericitos, se transforman en células mesenquimáticas y posteriormente en osteoblastos. Estas últimas células, al no poseer la proteína de membrana CD31, no se marcan con la técnica utilizada en este diseño experimental.

Si bien las observaciones realizadas por R. Marx y col.<sup>39</sup> fueron realizadas en tejido óseo humano y de una lesión muy amplia, los tiempos referidos en su trabajo coinciden con los registrados en el nuestro en cuanto al momento de aparición de tejido osteoide.

Por otra parte la proteína de membrana CD 31, también denominada PECAM-1 (platelet/endothelial cell adhesion molecule) <sup>3</sup>, es específica de la superficie de las células endoteliales y si tenemos en cuenta la especificidad de las técnicas de inmunoperoxidasa indirecta ABC <sup>27</sup>, podemos aseverar que las marcaciones obtenidas en nuestro experimento son de alta confiabilidad.

Así mismo, el hecho de que el PRP sea una preparación autóloga, realizada en el momento de la cirugía, elimina las preocupaciones referentes a la transmisión de enfermedades y reacciones inmunológicas relacionadas con fuentes alogénicas o xenogénicas.

## Conclusiones

La comprensión de los mecanismos que utilizan los factores de crecimiento en la biología en general y la reparativa en particular, es fundamental para desarrollar nuevos métodos que estimulen a los tejidos involucrados a producir, en un menor tiempo, el proceso reparativo o regenerativo.

En el presente estudio, mediante la marcación de células endoteliales, se comprobó que la angiogénesis, ligada "per se", a los factores de crecimiento (PDGF y TGF $\beta$ ) es necesaria en la regeneración ósea.

El aumento cuantitativo de los factores de crecimiento por medio de la técnica de secuestro y concentración de plaquetas en un plasma rico en plaquetas junto con la disponibilidad de la fuente de plaquetas autólogas, demostró ser un método práctico para el mejoramiento de la velocidad de cicatrización ósea y de la calidad final del tejido reparado.

Se observó que el PRP contiene una concentración de plaquetas en el orden del 288 % y por lo tanto hay una alta concentración de factores de crecimiento.

Al aplicar un concentrado de plaquetas autólogas en el sitio de reparación de tibias de ratas Wistar, demostramos que el mismo estimula "in situ" el aumento de la población de células endoteliales con resultados estadísticamente significativos entre el 3<sup>ro</sup> y 7<sup>mo</sup> día de la experiencia. El efecto de la angiogénesis causa también, un aumento en la velocidad de reparación del tejido óseo con resultados estadísticamente significativos en el 7<sup>mo</sup> día experimental.







## **Bibliografía**

- 1- Adler S.G. and Kent K.J. Enhancing healing with growth factors. *Facial Plast. Surg.* 2002,10;129-132.
- 2- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M: *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing, Inc. Third edition. 1994. 507-553.
- 3- Anderson JM. The cellular cascades of wound healing. Chapter I. *Bone Engineering. Toronto. University of Toronto*. Davies JE, ed .2000:81-93.
- 4- Anitua E, Andia J, Ardanza B et al.: Autologous platelet as resource of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost* 2004;91:27-33.
- 5- Bhanot S, Alex JC. Current applications of platelet gel in facial plastic surgery. *Facial Plast Surg.* 2002;18:27-33.
- 6- Bolander M. R. Regulation of fracture repair by growth factors. *Proc. Soc. Exper. Biol and Med.* 1992,200;165-170.
- 7- Brighton CT, Hunt R. Early histologic and ultrastructural changes in microvessel of periosteal callus. *Journal of orthopaedic trauma.* 1997;4;244-253.
- 8- Burchardt H. The biology of bone repair. *Clin Orthop.* 1983,174;28-42.
- 9- Burwell R.G. Studies in the transplantation of bone. *J Bone and Joint Surg.* 1991.9; 64-72.
- 10- Carter CA, Jolly DG, Worden CE, et al.: Platelet Rich Plasma promotes differentiation and regeneration during equine wound healing. *Exp Mol Pathol* 2003;74:244-255
- 11- Chen J. et al. Osteoblast precursors cell are found in CD34+ cells from human bone marrow. *Stem Cells.* 1997.15;368-377.
- 12- Connolly J, Development of an osteogenic bone marrow preparation. *J. Bone and Joint Surg.* 1989.71;684-689.

- 13- DeLacure Mark D: Physiology of bone healing and bone grafts. *Otolaryngol Clin of Nor Am.* 1994; 5:859-873.
- 14- Einhorn T.A. The healing of segmental bone defects induced by demineralised bone matrix. *J Bone and Joint surg.* 1990,66;274-279.
- 15- Einhorn T.A. The expression of cytokine activity by fracture callus. *Science.* 1987, 237;1333-1336.
- 16- Elgendry H. Osteoblast like cell. *Biomaterials.* 1993,14,263-269.
- 17- Farso Nielsen. Biodegradable guide for bone regeneration. *Acta Orthop Scand* 1992,63;66-69.
- 18- Fennis JMP, Stoelinga PJW, Jansen JA.: Mandibular reconstruction: a clinical and radiographic animal study on the use of autogenous scaffolds and platelet rich plasma. *J Oral Maxillofac Surg.* 2002;31:281-286.
- 19- Ferrara N: Vascular endothelial growth factor. *Eur J Cancer* 1996;32 A:2413-2422
- 20- Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol. Chem.*1992;5:10931-10934.
- 21- Frenz D. et.al. Induction of chondrogenesis: requirement for synergistic interaction of FGF and TGF. *Development.*1994,120;415-424.
- 22- Frost HM. A 2003 update of bone physiology and Wolf's Law for clinicians. *Angle Orthod.* 2004;43:10-15.
- 23- Froum SJ, Wallace SS, Tarnow DP, et al.: Effects of platelet-rich plasma on bone growth and osseointegration in human maxillary sinus grafts: three bilateral cases reports. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2002;22:45-53.
- 24- Garg A.K. The use of platelet rich plasma to enhance the success of bone grafts around dental implants. *Dental Implantol. Update.*2000,11:17.
- 25- Gonzales, R.C. Woods, R.E. Digital Image processing. *Addison-Wesley.* 1992



- 26- Graves, D.T. Chemokines, A family of chemotactic cytokines. *Crit Rev Oral Biol Med*.1995;62:109-118.
- 27- Hsu SM.. et al.: Avidin and Biotin. *Am J Clin Pathol* 1981;75:734-738
- 28- Hunt TK.: The physiology of wound healing. *Ann Emerg Med* 1988.17:1265-1273.
- 29- Izaguirre Avila, R.: El descubrimiento de las plaquetas. *Rev. Biomed* 1997;8:308-312
- 30- Kim S.G. Use of particulate dentinplaster of Paris combination with/without platelet rich plasma in the treatment of bone defects around implants. *Int. J. Oral Maxillofac. Implant.* 2002,17;86-95
- 31- Knighton, D.R. Silver I, Hunt T: Regulation of wound healing angiogenesis- Effect of oxygen gradients and inspired oxygen concentration. *Surgery* ; 1982;2:262-270.
- 32- Knighton, D.R. Role of platelets and fibrin in the healing sequence: An study in vivo of angiogenesis and collagen synthesis. *Ann Surg* 1982.196:379-388.
- 33- Landesberg, R.: Activation of PRP using thrombin receptor agonist peptide. *J Oral Maxillofac Surg* 2005.63:529.535.
- 34- Liu Y, Kalen A, Risto O, et al.: Fibroblast proliferation due to exposure to a platelet concentrate in Vitro is pH dependent. *Wound Repair Reg.* 2002;10:336-340.
- 35- Man D.et al.The use of autologous platelet rich plasma(platelet gel) and autologous platelet poor plasma(fibrin glue) in cosmetic surgery. *Plast Recons. Surg.* 2001, 107;229-235.
- 36- Marx R.E. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pat,* 1998;85: 638-646.

- 37-Marx R.E. Platelet Rich Plasma: Evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg* 2004;62:489-496.
- 38- Marx R.E., :Platelet concentrate: a strategy for accelerating and improving bone regeneration. Chapter III. *Bone Engineering*. Toronto. University of Toronto. Davies JE, ed. 2002:447-453.
- 39- Marx R.E., Arun Garg. Dental and Craniofacial Applications of Platelet-Rich Plasma. *Quintessence Books*.2005.103-107.
- 40- Marx, R.E. Johnson, R.P. Studies in radiobiology of osteoradionecrosis and their clinical significance. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1982;64:379-390
- 41- Monteleone K. Healing enhancement of skin graft donor site with platelet rich plasma. *J Maxillofac. Surg.* 2002,4;268-272.
- 42- Noiri E, Lee E, Testa J, Quigley J, Colflñesh D, Keese C, Giaver I, Goligorvsky M: Podokinesis in endothelial cell migration: role of nitric oxide. *The American Physiological Society. Annual Report* 1998.236-244.
- 43- Ornitz D. Fibroblast Growth factors. *Genome Biology* 2001;2:302-306
- 44- Petrungaro D. The use of PRP with growth factors to enhance hard and soft tissue. *Contemporary periodontics & implantology*. 2001.9.1-8.
- 45- Polverini, P.J. The Pathophysiology of angiogenesis. *Crit Rev Oral Med* 1995 6;3:230-245.
- 46- Rabie A: Vascular endothelial growth pattern during demineralized bone matrix induced osteogenesis. *Conn tis res* 1997; 4:337-345.
- 47- Rosemberg, L. La Torre J.: Wound Healing, Growth factors. *eMedicine*. At [www.emedicine.com/plastic/topic457.htm](http://www.emedicine.com/plastic/topic457.htm).
- 48- Rosenfeld, A. A-Kak, A.C. *Digital Picture Processing*. Academic Press, 1992.



49- Steffensen B.: Proteolytic Events of Wound Healing. Coordinated interactions among matrix metalloproteinases(MMPs), integrins, and extracellular matrix molecules. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2001.12(5):373-398

50- Sumner D. Enhancement of bone ingrowth by TGF- $\beta$ . *The Journal Clin Invest.* 1995.77,1135-1147.

51- Sybille E. VEGF induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *J of Cell science.*1998.111;1853-1865.

52- Tae-Kwon Sohn, Eun-Joung Moon.: Angio DB: database of angiogenesis and angiogenesis related molecules. *Nucleic Acids Research*, 2002; 30:117-119.

53- Tayapongsak P. Autologous fibrin adhesive in mandibular reconstruction with particulate cancellous bone and marrow. 1994.*J Oral Maxillofac Surg*;52:161-6.

54- Tolga Fikret Tozum. Platelet Rich Plasma: A promising innovation in dentistry. *JADA* 2003;6:9-10.

55- Urist M.R. Bone transplantation and implants. *Acta Orthop Scand.* 1979.50,621-627.

56- Urist.M.R. Bone formation by autoinduction.*Science.*1995.150;893-899.

57- Wang S.J. Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc Nat Acad Sci.* 1990.87;2220-2224.

58- Wartiovaara U, Salvrn P, Mikkola H, Lassila H, Kaukonen J, Joukov V: Peripheral blood platelets express VEGF-C and VEGF which are released during platelet activation. *Thromb Haemost.*1998; 1:171-175.

59- Welsh WJ, : Autologous Platelet gel: clinical function and usage in plastic surgery. *Cosmetic Derm.* 2000;13:13-18.

60- Whitman DH, Berry RL, Green DM, Platelet gel: an alternative to fibrin glue with application in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg* 1977;55: 1294-1299.

61- Williams W, Li.: Angiogenesis in wound healing. *Contemporary Surgery*. 2003;5:197-199.

62- William W, Dimitris Tsakayannis.: Angiogenesis: A control point for normal and delayed wound healing. *Contemporary surgery*.2003;5:208-212.

63- Yihai C. VEGF induces angiogenesis in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.1998.95;14389-14394.

