



Efecto del plasma rico en plaquetas en la incorporación biológica de una plastia tendinosa en un túnel óseo

Leonardo Ruiz Macarrilla

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

ESTUDIO EXPERIMENTAL

***EFFECTO DEL PLASMA RICO EN PLAQUETAS EN
LA INCORPORACIÓN BIOLÓGICA DE UNA
PLASTIA TENDINOSA EN UN TÚNEL ÓSEO***

Tesis Doctoral

Leonardo Ruiz Macarrilla

Barcelona, Enero de 2011

FACULTAT DE MEDICINA
DEPARTAMENT DE CIRURGIA I ESPECIALITATS QUIRÚRGIQUES

ESTUDIO EXPERIMENTAL:

“EFECTO DEL PLASMA RICO EN PLAQUETAS EN LA INCORPORACIÓN BIOLÓGICA DE UNA PLASTIA TENDINOSA EN UN TÚNEL ÓSEO”

Tesis realizada por Leonardo Ruiz Macarrilla en el Departamento de Cirugía y Especialidades Quirúrgicas de la Facultad de Medicina, bajo la dirección de los profesores Dr. José Antonio Hernández Hermoso y Dr. Francisco Maculé Beneyto, para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía por la *Universitat de Barcelona*.

Barcelona, Enero de 2011

Doctorando:



Leonardo Ruiz Macarrilla

Directores de Tesis:

Dr. J.A. Hernández Hermoso
Jefe de Servicio de COT y Director de Ámbito Quirúrgico
Consorti Sanitari de Terrassa
Profesor Universitat Ramon Llull

Dr. Francisco Maculé Beneyto
Jefe de Sección y Consultor de Servicio de COT
Hospital Clínic de Barcelona
Profesor Asociado Universitat de Barcelona

Abreviaturas

EGF	Factor de Crecimiento Epidérmico
FC	Factores de crecimiento
FG	Factor de Crecimiento Fibroblástico
GP	Glicoproteínas
HTH	Hueso-tendón-hueso rotuliano
IGF	Factor de Crecimiento similar a la Insulina
JNK	Kinasa c-jun N-terminal
LCA	Ligamento Cruzado Anterior
MAPK	Proteína activada mitogénica
mg/kg	Miligramos/kilogramos
ml	Mililitros
ml/Kg/h	Mililitros / kilogramos / hora
mm	Milímetro
MMP	Metaloproteinasas
NGF	Factor de crecimiento neurotrófico
PDGF	Factor de Crecimiento Derivado de las Plaquetas
PMO	Proteínas Morfogenéticas Óseas
PRP	Plasma rico en plaquetas
RI	Recto interno
SNC	Sistema Nervioso Central
ST	Semitendinoso
TGF- β	Factor de Crecimiento Transformador beta
TI	Tendones isquiotibiales
TIMP	Inhibidores tisulares de las metaloproteinasas

Índice:

I	AGRADECIMIENTOS	9
II	RESUMEN / ABSTRAT	12
III	JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	15
III. 1	PLASTIA DE TENDONES ISQUIOTIBIALES	18
III. 2	FIJACIÓN DE LA PLASTIA	19
III. 3	PROCESO DE INTEGRACIÓN DEL INJERTO	21
III. 4	ESTUDIOS COMPARATIVOS DE LOS INJERTOS HTH ROTULIANO Y TI	23
III. 5	NUESTRA EXPERIENCIA CLÍNICA	24
III.6	MODIFICACIÓN DEL PROCESO DE FIJACIÓN INICIAL	30
IV	OBJETIVO E HIPOTESIS	32
V	INTRODUCCIÓN	35
V. 1	PROCESO DE REPARACIÓN o CICATRIZACIÓN	36
V. 2	BIOLOGÍA DE LA REPARACIÓN	37
V. 2. 1	Fase Inflamatoria	38
V. 2. 2	Morfología y Función Plaquetaria	39
V. 2. 3	Fase proliferativa	53
V. 2. 4	Fase de Diferenciación y Remodelación	59
V. 3	TENDONES Y LIGAMENTOS	62
V. 3. 1	Tendones	62
V. 3. 2	Ligamentos	65
V. 4	ZONA DE UNIÓN TENDÓN - HUESO	66

V. 5	FACTORES DE CRECIMIENTO	70
V. 5. 1	Tipos de Factores de Crecimiento	73
V. 5. 2	Mecanismo de Acción de los Factores de Crecimiento	77
V. 6	PROTEÍNAS MORFOGENÉTICAS ÓSEAS	82
V. 7	PLASMA RICO EN PLAQUETAS	85
V. 7. 1	Sistemas de Obtención del Plasma Rico en Plaquetas	86
V. 7. 2	Mecanismo de Acción del Plasma Rico en Plaquetas	88
V. 7. 3	Problemas y Limitaciones en los Sistemas de Obtención del Plasma Rico en Plaquetas	88
V. 7. 4	Efectos Conocidos de los Factores de Crecimiento Obtenidos del Plasma Rico en Plaquetas	89
V. 7. 5	Relación entre Plasma Rico en Plaquetas y Carcinogénesis	95
VI	MATERIAL Y MÉTODO	97
VI. 1	PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO	102
VI. 1. 1	Obtención del PRP	103
VI. 1. 2	Anestesia y Técnica Quirúrgica	106
VI. 1. 3	Control Clínico Postoperatorio	111
VI. 1. 4	Sacrificio de los Animales	112
VI. 1. 5	Complicaciones	113
VI. 2	MÉTODOS DE VALORACIÓN	114
VI. 2. 1	Método Radiográfico	114
VI. 2. 2	Estudio Histológico e Inmunohistoquímico	114
VII	RESULTADOS	124
VII. 1	ESTUDIO MACROSCÓPICO	125
VII. 2	ESTUDIO MICROSCÓPICO	130
VII. 2.1	Grupo de Conejos Sacrificados a las 2 Semanas	131

VII. 2.2	Grupo de Conejos Sacrificados a las 4 Semanas	133
VII. 3	ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO	140
VII. 4	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS	144
VII. 4. 1	Análisis Estadístico de los Valores Radiológicos	146
VII. 2. 2	Análisis Estadístico de los Valores Microscópicos	156
VIII	DISCUSIÓN	164
IX	CONCLUSIONES	174
X	BIBLIOGRAFÍA	177
X. I	ANEXO BIBLIOGRÁFICO	204

Indice Figuras:

Figura 1:	Fases del Proceso de cicatrización o reparación tisular	36
Figura 2:	Esquema fase inflamatoria.	38
Figura 3:	Contenido de los Gránulos “ α ”	44
Figura 4:	Secuencia de formación del trombo plaquetar	45
Figura 5:	Elementos participantes en la Adhesión plaquetar	46
Figura 6:	Elementos participantes en la Agregación plaquetar	47
Figura 7:	Inicio proceso reparativo	49
Figura 8:	Esquema de la composición molecular de los Factores de Crecimiento	71
Figura 9:	Acción del los FC	72
Figura 10:	Conejo de raza albina de Nueva Zelanda	98
Figura 11:	Jaulas del estabulario	100
Figura 12:	Extracción sanguínea de la vena auricular del conejo	103
Figura 13:	Centrifugadora GPS TM	104
Figura 14:	Tubo sanguíneo tras su centrifugado	106

Figura 15:	Sala de quirófano	106
Figura 16:	Animal de experimentación en la mesa de quirófano	107
Figura 17:	Instrumental quirúrgico utilizado	108
Figura 18:	Proceso quirúrgico en el animal de experimentación	109
Figura 19:	Conejo enjaulado	111
Figura 20:	Tinciones hematoxilina-eosina y tricrómico de Masson	115
Figura 21:	Preparación de hematoxilina-eosina	118
Figura 22:	Sala de estudio de las preparaciones histológicas	120
Figura 23:	Ejemplo macroscópico y radiográfico de pieza experimental y control del mismo animal	125
Figura 24:	Fotografías y radiografía de la pieza experimental y control de los animales sacrificados a la 2ª semana	126
Figura 25:	Fotografías y radiografía de la pieza experimental y control de los animales sacrificados a la 4ª semana	127
Figura 26:	Grupo Control sacrificado a la 2ª semana	131
Figura 27:	Grupo Experimental sacrificado a la 2ª semana:	132, 133
Figura 28:	Grupo Control sacrificado a la 4ª semana	133, 134
Figura 29:	Grupo Experimental sacrificado a la 4ª semana	135
Figura 30:	Grupo Experimental sacrificado a la 4ª semana	136-138
Figura 31:	Células gigantes multinucleadas	139
Figura 32:	Técnica inmunohistoquímica para colágeno tipo II	140
Figura 33:	Técnica inmunohistoquímica para colágeno tipo II	141
Figura 34:	Técnica inmunohistoquímica para colágeno tipo II	141
Figura 35:	Técnica inmunohistoquímica para colágeno tipo II. Grupo sacrificado a la 2ª semana	142, 143
Figura 36:	Técnica inmunohistoquímica para colágeno tipo II. Grupo sacrificado a la 4ª semana	143, 144
Figura 37:	Digitalización de las imágenes radiológicas	146

Indice Tablas:

Tabla I:	Protocolo de supervisión	112
Tabla II:	Cambios histológicos en el grupo de conejos sacrificados a la 2ª semana postintervención	122
Tabla III:	Cambios histológicos en el grupo de conejos sacrificados a la 4ª semana postintervención	123
Tabla IV:	Resultados de la medición del área de reacción ósea	147

Indice Gráficas:

Gráfica 1:	Área de reacción ósea del grupo de conejos sacrificado a la 2ª semana	128
Gráfica 2:	Área de reacción ósea del grupo de conejos sacrificado a la 4ª semana	129
Gráfica 3:	Área de la reacción ósea todos los grupos	130, 155
Gráfica 4:	Proceso de Cicatrización en los dos grupos Control	157
Gráfica 5:	Proceso de Cicatrización en los dos grupos Experimentales	158
Gráfica 6:	Proceso de Cicatrización a las 2 semanas	159
Gráfica 7:	Proceso de Cicatrización a las 4 semanas	161
Gráfica 8:	Proceso de Cicatrización en los grupos Experimental de la 2ª semana y Control de la 4ª semana	162
Gráfica 9:	Proceso de Cicatrización en todos los grupos	163

Agradecimientos

La realización de este trabajo ha comprendido un espacio importante de mi vida, por lo este capítulo ha sido uno de los más delicados y difíciles de confeccionar. Así, aunque la faceta académica y profesional siempre ha ocupado un lugar preponderante, no debo descuidar el contexto humano que me ha rodeado durante todo este tiempo. El transcurrir de los años me ha proporcionado multitud de estímulos, unos positivos y otros negativos, pero todos ellos me han ido modelando y cambiando poco a poco, muchas veces a un ritmo menor del deseado, hasta convertirme en la persona que soy.

Por ello, quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas y cada una de las personas que han contribuido de algún modo a que pudiera llevarse a término este proyecto. La verdad es que cuando empiezo pensar en todos aquellos que han aportado un granito de arena, me doy cuenta de que han sido muchos, y que sin todos ellos, hubiera sido imposible. A todos, muchas gracias.

No obstante, y sin desear hacer agravios comparativos, quiero agradecer especialmente:

- En primer lugar debo colocar al Dr. D. José Antonio Hernández Hermoso, por sus ideas, aportaciones, correcciones, paciencia, y en definitiva, haber posibilitado la realización de esta tesis.
- Al Dr. D. José Luis Agulló Ferrer, no solo por su apoyo incondicional y colaboración en momentos decisivos del estudio, si no también por su amistad.
- Al Dr. D. Omar Enrique Clavero por sus explicaciones y consejos. Su noble comportamiento y su sentido de la honorabilidad, salvaron la conclusión del estudio de un desastre seguro.
- A D. Mario Galcerán Llorens y a los Dres. D. J. M. Usandizaga Camats y D. Juan Domingo Joly, por la confianza ciega que depositaron en mi proyecto y sin la cual hubiera sido imposible realizarlo.
- Al Dr. D. Francisco Maculé Beneyto, la última pieza pero no por ello menos importante, que ha contribuido a que pudiera concluir esta obra.
- A mi "compañera", Amparo, por las largas horas pasadas soportando mi malhumor y cansancio; por las no disfrutadas en aras de la elaboración de este proyecto; y por su apoyo sin medida en todo momento, sobretodo en los peores.
- A Sergio y Nerea, por no haber venido antes, pues sino hubiera sido imposible sentarme junto al ordenador tantas horas.
- Y sobretodo a mis padres, Josefa y Miguel, que siempre creyeron en mí; y desde siempre han estado a mi lado para ayudarme y darme su respaldo.

*Después de escalar una montaña muy alta,
descubrimos que hay muchas otras montañas
por escalar.*

Nelson Mándela

Resumen / Abstrat

II. RESUMEN /ABSTRAT

EFFECTO DEL PLASMA RICO EN PLAQUETAS EN LA INCORPORACIÓN BIOLÓGICA DE UNA PLASTIA TENDINOSA EN UN TÚNEL ÓSEO

Objetivo: Estudiar el efecto del plasma rico en plaquetas (PRP) en el proceso biológico de cicatrización de un tendón en el interior de un túnel óseo.

Material y Método: Diseñamos un estudio experimental, interviniendo quirúrgicamente a diez conejos en sus dos extremidades posteriores (Experimental y Control). En la extremidad Experimental el tendón del músculo gemelo interno era seccionado, infiltrado con PRP, introducido en un túnel óseo tibial relleno de PRP, y finalmente, fijado con un tornillo biorreabsorbible. En la extremidad Control se realiza el mismo procedimiento sin utilizar PRP. Cinco conejos fueron sacrificados a la 2ª semana y cinco a la 4ª semana de la intervención. Se evaluó la zona intervenida macroscópica, radiográfica, histológica e inmunohistoquímicamente.

Resultados: Macroscópica y radiográficamente se observa un área de reacción óseo más voluminosa en las tibias del grupo Experimental sacrificado a la 4ª semana respecto al resto de grupos. Microscópicamente no se aprecia la “marca de agua” entre el fibrocartilago mineralizado y no mineralizado en ningún grupo. El grupo Experimental presenta mayor cantidad de tejido condroide, osteoide y trabéculas óseas, tanto a la 2ª como a la 4ª semana, de forma estadísticamente significativa. A la 4ª semana observamos zonas de continuidad entre fibras tendinosas y hueso en algunos casos del grupo Experimental. Inmunohistoquímicamente no observamos diferencias en la distribución del colágeno tipo II entre los dos grupos, aunque el grupo Experimental presenta mayor área marcada.

Conclusión: La administración de PRP como fuente de FC afecta al proceso de reparación del autoinjerto tendinoso dentro de un túnel óseo en nuestro modelo experimental, macroscópica, radiográfica y microscópicamente. El PRP aceleró la curación, anticipando en el tiempo la aparición de elementos celulares y tisulares propios de fases posteriores del proceso de cicatrización, y además incrementó de la cantidad éstos.

EFFECT OF PLATELET RICH PLASMA IN THE BIOLOGIC INCORPORATION OF A TENDON GRAFT IN A BONE TUNNEL

Objective: To study the effect of the platelet rich plasma in the biological process of tendon healing inside a bone tunnel

Material y Methods: We designed an experimental study, ten rabbits underwent surgery in their two back legs (Experimental and Control). In the Experimental group the tendon of the internal gastrocnemius muscle was cut, infiltrated with PRP, placed in a tibial bone tunnel filled with PRP, and finally, fixed by a bioabsorbable screw. The same procedure was practiced in the Control group without the use of PRP. Five rabbits were sacrificed on the second week and five on the fourth week after surgery. The legs were evaluated macroscopic, radiographic, histologic and immunohistochemically.

Results: The macroscopic and radiographic study of the pieces shows the presence of a larger bone reaction area in the entrance of the tendon within the bone tunnel in the Experimental group sacrificed on the fourth week compared to other groups. Microscopically, we don't appreciate the "tidemark" between mineralized and unmineralized fibrocartilage in any of the groups. The Experimental group presents an statistically significant greater amount of chondroid tissue, osteoid tissue and trabecular bone, both the second and fourth week. In some cases of the Experimental group on the fourth week we observe continuity zones between tendinous fibers and bone. Immunohistochemically we don't observe differences in the collagen type II distribution between both groups, although the Experimental group presents a greater marked area.

Conclusion: macroscopic, radiographic and microscopically, this study demonstrates that administration of PRP affects the repair process of tendon autograft in a bone tunnel in our experimental model. The PRP accelerated the healing time anticipating the emergence of cellular and tissue elements characteristic of later stages of the healing process, and also increased the amount of them.

Justificación del Estudio

III. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

La ruptura del Ligamento Cruzado Anterior (LCA) es la lesión grave de la rodilla más frecuente (3/1000 habitantes/año)¹. Suele afectar a determinados grupos de población como los deportistas, y por ello es más frecuente en adultos jóvenes. Es significativamente más prevalente en mujeres que en hombres que practiquen el mismo deporte, sin que estén claras las causas de esta diferencia². Los deportes que tienen un mayor riesgo de este tipo de lesión son los que implican cambios de dirección y de ritmo (aceleraciones), como son el esquí, baloncesto o tenis. El mecanismo de producción más frecuente es el pivote sobre una pierna dejando el pie fijo en el suelo. Otros factores de riesgo son la debilidad muscular, la descoordinación o la falta de flexibilidad articular^{3,4}.

El tratamiento de la inestabilidad de rodilla por insuficiencia del LCA es un tema controvertido entre los cirujanos ortopédicos, habiéndose descrito numerosas técnicas quirúrgicas para repararlo o reconstruirlo que comprenden desde su reparación mediante sutura directa⁵, a su reconstrucción utilizando autoinjertos, ligamentos sintéticos y aloinjertos, bien con técnicas extra-articulares⁶⁻¹⁴, intra-articulares¹⁵⁻¹⁹ o una combinación de ellas²⁰⁻²³. El principal objetivo de todas ellas es conseguir una rodilla estable y con plena función, que permita un retorno al nivel de actividad física previo a la lesión, evitando la aparición de ulteriores episodios de inestabilidad y el desarrollo de otras lesiones articulares^{15,24-28}. Pero a la hora de sentar la indicación quirúrgica también hemos

de tener en cuenta otros parámetros como son la edad y la presencia de lesiones intra-articulares²⁹.

El tejido ideal para la plastia sustitutiva debería ser fácilmente accesible³⁰, reproducir la anatomía y biomecánica del LCA original, poseer una rápida y completa incorporación biológica³⁰⁻³³, presentar una fuerte fijación inicial^{30,31,33-37} y reducir al mínimo la morbilidad^{30,31,33,35,38}.

La plastia sustitutiva más utilizada, considerada la plastia de referencia por sus buenos resultados, es el hueso-tendón-hueso rotuliano (HTH) ^{23,39-47}, caracterizado por su gran resistencia intrínseca y su rápida osteointegración mediante la unión hueso-hueso. A pesar de ello presenta de un 5 a un 10% de resultados regulares o malos y no está exenta de complicaciones^{42,44,48,49} como son el dolor femoropatelar, la fractura de rótula, la crepitación patelar, la tendinitis o ruptura del tendón patelar, la pérdida de extensión y la disminución de la fuerza del cuádriceps^{42,50-56}. Esto llevó a la búsqueda de otras fuentes de injertos que proporcionaran resultados similares o superiores y una menor morbilidad. En esta dirección encontramos la plastia reconstructiva multifascicular de tendones isquiotibiales (TI).

III. 1. PLASTIA DE TENDONES ISQUIOTIBIALES

Las propiedades mecánicas de los tejidos conjuntivos dependen de características estructurales como la longitud y el área de sección, y de características materiales como el tipo de colágeno y la organización estructural del mismo, es decir, número de fibras, enlaces entre ellas y orientación de las mismas en la dirección de las fuerzas de tracción. Las cualidades biomecánicas de los injertos tendinosos no parecen alterarse al someterlos a crioconservación^{15,57-64}, aunque si se han encontrado diferencias^{43,65-69} al ser tratados con óxido de etileno, rayos gamma, liofilización y radiación. De todas formas, los injertos heterólogos, que son los que suelen someterse a estos procedimientos, son de indicación excepcional y se reservan generalmente, para el rescate de plastias fallidas⁷⁰.

El autoinjerto de TI semitendinoso (ST) y recto interno (RI) ha ido ganando popularidad por sus potenciales ventajas sobre el autoinjerto HTH rotuliano. Los tendones ST y RI se trenzan en dos a cuatro fascículos para ser utilizados. Biomecánicamente, dos fascículos (2T) y cuatro fascículos (4T) tienen una fuerza superior (2T: 2600 N, 4T: 4090 N) y rigidez (2T: 534 N/mm, 4T: 776 N/mm) que la plastia de HTH rotuliano y el LCA original^{15,23,33,61,62,71-74}. Además, no existe el riesgo de ruptura del tendón rotuliano o fractura de la rótula, disminuye la morbilidad de la zona dadora, que se limita a infrecuentes lesiones del nervio safeno y debilidad de isquiotibiales, y requerir incisiones más pequeñas^{15,23,61,62,71-74}. Entre las teóricas desventajas de este tipo de injerto, encontramos su más lenta incorporación biológica en el interior de un túnel óseo⁷⁵ y la menor resistencia mecánica a la tracción de alguno de los sistemas de fijación del tendón

al hueso⁷⁶⁻⁸⁶, factores que condicionan la aplicación de los protocolos de rehabilitación precoz.

Histológicamente la unión hueso-hueso requiere un menor período de tiempo hasta su incorporación biológica^{31,44,49,72,78,79,87,88} y está constituida por un tejido más fisiológico, tejido cartilaginoso regular⁸⁹, que la interfase tendón-hueso observada en los tendones anserinos^{78,90}. Intra-articularmente ambos injertos se sinovializan y vascularizan de forma similar.

Los primeros trabajos publicados que utilizaban autoinjertos de TI para la reconstrucción del LCA, presentaban una menor incidencia de morbilidad de la zona dadora^{39,51,91}, pero obtenían unos resultados clínicos y de estabilidad inferiores^{23,61,92} a la plastia HTH rotuliano. Hoy sabemos que los factores que determinan la resistencia a la tracción y rigidez del complejo tendón-dispositivo-hueso durante los dos primeros meses tras la cirugía, hasta que se produce la incorporación biológica del injerto en el interior del túnel óseo, son principalmente la interfase injerto-túnel óseo y el dispositivo de fijación elegido^{93,94}, sobre todo a nivel del túnel tibial⁹⁵; y posteriormente tras su integración al hueso, el único factor restrictivo pasa a ser la propia plastia^{79,96-98}.

III. 2. FIJACIÓN DE LA PLASTIA

Steiner et al.³⁷ fueron los primeros en afirmar que la clave del éxito clínico de toda ligamentoplastia de LCA era la obtención de una fijación directa y fuerte del injerto; desde

entonces se han realizado numerosos estudios cuyo objetivo principal ha sido perfeccionar los sistemas de fijación inicial del injerto al hueso, para permitir la realización de un proceso de rehabilitación precoz^{61,78,81,99}, sin restricciones de movilidad y carga, y mejorar los resultados clínicos¹⁰⁰.

La fijación del injerto puede ser directa o indirecta. En la fijación directa, el injerto es fijado directamente al hueso (por ejemplo: grapas, tornillos interferenciales, *cross-pins*...), mientras que en la fijación indirecta se realiza en un punto seguro del injerto a una distancia (por ejemplo: *button*, sutura, poste...). Teóricamente, la ventaja de la fijación directa es disminuir la movilidad longitudinal: efecto "sube y baja" (*bungy*), y disminuir el movimiento sagital: efecto "limpiaparabrisas" (*wiper*), dentro del túnel del injerto. El movimiento del injerto dentro del túnel puede perjudicar su incorporación biológica y ha sido una de las posibles causas del ensanchamiento radiográfico del túnel óseo. La existencia de movimiento mecánico del injerto favorece la reabsorción y osteolisis ósea, pero no es el único factor desencadenante del ensanchamiento del túnel óseo, ya que también intervienen factores biológicos¹⁰¹⁻¹⁰⁴.

Uno de los dispositivos de fijación más comúnmente utilizados en el injerto HTH rotuliano es el tornillo interferencial. El tornillo realiza una interferencia al injerto respecto al túnel y comprime la pastilla ósea. En 1987 M. Kurosaka et al¹⁰⁵ (Kobe, Japón) estudiaron varios tipos de fijación en diferentes tipos de injertos para reconstruir el LCA en cadáveres humanos jóvenes. El dispositivo que aportó mejores resultados (máxima carga, rigidez, movimiento del injerto en el túnel, y máxima elongación del injerto) para la plastia de HTH rotuliano fue el tornillo interferencial metálico de 9 mm de diámetro. En

los últimos años se ha popularizado el uso de tornillos interferenciales biodegradables, fabricados con materiales reabsorbibles tales como el ácido poliláctico, ácido poliglicólico, o recientemente de ácido poliláctico y fosfato tricálcico. Las mejoras en su diseño y las propiedades de los materiales utilizados, hacen que el anclaje con estos tornillos reabsorbibles sea comparable al de los tornillos interferenciales metálicos^{106,107}.

El auge de los TI como plastia reconstructiva del LCA ha hecho evolucionar sus dispositivos de fijación¹⁰⁸, obteniendo unos resultados en la estabilidad articular a largo plazo en aproximadamente el 90% de los pacientes, considerando como tal una diferencia menor de 3 mm de desplazamiento anteroposterior respecto a la rodilla contralateral sana, y devolviendo al 75% de los pacientes a niveles de actividad I y II según el protocolo del IKDC¹⁰⁹.

III. 3. PROCESO DE INTEGRACIÓN DEL INJERTO

En la integración de un injerto hay que considerar dos zonas bien diferenciadas, el injerto intra-articular, donde se produce la ligamentización, y otra extra-articular que se corresponde a la integración en los túneles, diferente para los injertos HTH y de TI¹¹⁰.

El injerto implantado sufre inicialmente un proceso de necrosis avascular, y sucesivamente pasa por una fase de revascularización, proliferación celular y ulterior remodelación¹¹¹.

En la fase inicial del proceso de integración del tendón, dos primeros meses, existe una repoblación celular, aumentando el número y actividad nuclear de los fibroblastos. En los

siguientes diez meses, el injerto pasa por un estado de remodelación rápida con aumento del número y actividad nuclear de los fibroblastos, revascularización y aparición de zonas de degeneración con disminución del porcentaje de fibras de colágeno maduras. La tercera fase es la de maduración y tiene lugar durante los siguientes dos años, caracterizándose por una disminución leve del número de núcleos y la maduración de la matriz de colágeno. A los tres años el injerto es un ligamento según criterios histológicos, aunque con una mayor proporción de colágeno tipo III y acumulación anormal de glicosaminoglicanos, lo que ocasiona una disminución de las características mecánicas del injerto en comparación con el ligamento control (60% de resistencia y 70% del módulo elástico)¹¹². Los aloinjertos poseen un proceso de incorporación biológica mucho más lento que las plastias autólogas¹¹³.

Histológicamente la unión tendón-hueso requiere un mayor período de tiempo hasta su incorporación biológica^{31,44,49,72,78,79,87,88}, generalmente de 8 a 12 semanas, comparado con la unión hueso-hueso, que oscila entre 4 a 6 semanas. Además, la interfase hueso-hueso del injerto HTH rotuliano es más fisiológica, al establecerse una transición de tejido cartilaginoso regular⁸⁹, mientras que en la interfase tendón-hueso de los tendones anserinos encontramos una inserción fibrosa^{78,90}. Posteriormente, el injerto de TI sigue el mismo proceso de ligamentización descrito para otros tipos de injertos¹¹⁴.

III. 4. ESTUDIOS COMPARATIVOS DE LOS INJERTOS HTH ROTULIANO Y TI

En la literatura encontramos numerosos estudios que comparan los resultados tras la reconstrucción del LCA utilizando autoinjertos HTH rotuliano y TI. La mayoría no evidencian diferencias significativas en los resultados clínicos entre los dos tipos de injertos, aunque algunos observan menor morbilidad de la zona dadora o molestias en la cara anterior de la rodilla al utilizar el injerto de TI^{18,30,34,38,92,115-119}, o una menor laxitud ligamentosa con el injerto HTH rotuliano^{1,120}. Pero no existen estudios a largo plazo, y pocos^{18,30,34,38,92,115-119,121} poseen un diseño prospectivo y aleatorio, y tan solo nueve^{109,115,116,121-129} utilizan únicamente tornillos interferenciales para fijar ambos tipos de injerto, tanto a nivel del túnel óseo tibial como femoral. Estos nueve estudios utilizan la técnica dentro-fuera (*in-out*) para realizar el túnel óseo femoral. La mayoría utilizan tornillos interferenciales metálicos^{109,115,116,121-123,126-128} para fijar la plastia a nivel femoral y tibial; uno¹²⁵ usa un tornillo metálico en la fijación femoral y otro reabsorbible en la fijación tibial, y tan solo dos estudios^{124,129} eligen únicamente tornillos interferenciales reabsorbibles tanto en la fijación tibial como femoral, aunque uno de éstos¹²⁹ emplea dos tornillos interferenciales reabsorbibles en la fijación tibial de la plastia de TI. Los resultados de estos nueve estudios ponen de manifiesto que los tornillos interferenciales proporcionan unos resultados clínicos y de estabilidad similares para los dos tipos de autoinjerto, incluyendo el test del IKDC, puntuación de Lysholm, atrofia muscular, nivel de actividad de Tegner, laxitud objetiva articular y porcentaje de rupturas de la plastia;

persistiendo una mayor incidencia de molestias en la cara anterior de la rodilla, pérdida de balance articular y presencia de signos degenerativos articulares al utilizar el autoinjerto de HTH rotuliano al final del periodo de seguimiento. Solo un estudio¹²⁴ obtuvo mejores resultados funcionales al reconstruir el LCA utilizando tornillos interferenciales como dispositivo de fijación con el autoinjerto de TI, comparado con el autoinjerto de HTH rotuliano.

III. 5. NUESTRA EXPERIENCIA CLÍNICA*

Realizamos un estudio prospectivo, controlado y no aleatorio, con el objetivo de comparar los resultados de la reconstrucción del LCA con autoinjerto de tendones ST y RI trenzados en cuatro fascículos igualmente tensionados, y autoinjerto hueso-tendón-hueso de tercio medio de tendón rotuliano. Así, un total de 296 pacientes fueron intervenidos entre enero de 1998 y diciembre de 2001 y divididos en dos grupos. En el primer grupo, constituido por 202 pacientes, se reconstruyó el LCA con autoinjerto HTH rotuliano (grupo HTH); y en el segundo grupo, formado por 94 pacientes, mediante autoinjerto de tendones ST y RI (grupo TI). En ambos grupos se aplicaron los mismos criterios para sentar la indicación quirúrgica, misma técnica quirúrgica (doble incisión, fuera-dentro), mismo dispositivo de fijación (tornillos interferenciales reabsorbibles) tanto a nivel del túnel

* ver anexo bibliográfico

femoral como tibial (Sheathed y Full Thread Bio-interference screw, Arthrex Corp.[®], Naples, FL), e idéntico protocolo de rehabilitación. Todas las intervenciones fueron realizadas por el mismo cirujano, y observadores imparciales, no implicados en la cirugía o proceso de rehabilitación, realizaron las evaluaciones postoperatorias. La valoración de los resultados fue realizada mediante la elaboración de la Historia Clínica, Exploración Física, estudio radiológico simple con proyecciones anteroposterior y lateral en carga, aplicación del protocolo del *International Knee Documentation Committee* (IKDC) y la valoración objetiva de la estabilidad anteroposterior mediante la aplicación de la prueba de Lachman Activo Radiológico utilizando el artrómetro tipo Telos[®], con la rodilla flexionada 30°, ejerciendo una fuerza de desplazamiento anterior sobre la tibia de 150 N, y comparando los resultados obtenidos con los de la rodilla contralateral no lesionada. La valoración global de resultados y el test de satisfacción se realizó a los 12 meses tras la cirugía.

El análisis estadístico fue realizado con el programa SPSS 11.0, y el estudio comparativo entre los grupos fue realizado mediante la aplicación de la prueba de T de Student para las variables cuantitativas continuas y con la prueba del Chi-cuadrado y la prueba exacta de Fisher para las variables categóricas. En todas las pruebas, se estableció un nivel alfa de 0,05 para ser considerado como significativo.

Los dos grupos a estudio eran homogéneos, no encontrando diferencias significativas entre ellos en la distribución de las variables Edad, Sexo, Tiempo de Seguimiento, Grado de Actividad Previa, existencia de Patología Previa en la Rodilla Afecta, y Mecanismo de Accidente.

A la finalización del periodo de seguimiento (12 meses), no encontramos diferencias significativas entre los dos grupos de tratamiento, HTH y TI, en el resultado de la Evaluación Final del protocolo del IKDC, con un 86,5% y 89,2% respectivamente de resultados satisfactorios. Nuestros resultados eran similares a los obtenidos por series precedentes^{55,81,109,115,116,125,130,131}. De los nueve estudios que poseen un diseño similar al nuestro, ocho tampoco observan diferencias significativas entre los dos tipos de injerto al utilizar solo tornillos interferenciales para su fijación, y el restante obtiene mejores resultados de la Evaluación Final del protocolo del IKDC en el grupo de TI¹²⁴.

Tampoco encontramos diferencias significativas en la variable Evaluación Final del protocolo del IKDC entre ambas técnicas se realizara o no meniscectomía asociada durante la intervención, existiese ó no lesión condral asociada evidenciada en la radiología previa o durante el acto quirúrgico, o existiese o no antecedente quirúrgico de la rodilla afecta a la finalización del periodo de seguimiento.

No encontramos diferencias estadísticamente significativas en el resultado de las distintas variables evaluadas en el protocolo del IKDC entre los dos grupos a estudio, a excepción de la variable “molestias en la rodilla”, que incluye además del dolor, alteraciones de la sensibilidad en el sitio de extracción del injerto, como disestesias o hipoestesia, y aparición de crujidos articulares, aunque estos últimos tienen un significado clínico dudoso ya que pueden aparecer después de cualquier tipo de cirugía intra-articular, siendo más frecuentes cuando existe un proceso degenerativo articular. Las molestias en la zona dadora se presentaron en un 22,3% de los pacientes del grupo HTH y en un 2,2% del grupo TI, diferencia estadísticamente significativa ($p=0,031$). Estos resultados coinciden con los de otros estudios previos^{92,109,115,116,119,123,132}, que también evidencian una mayor

incidencia de molestias en la zona dadora tras la cirugía reconstructiva del LCA al utilizar el autoinjerto HTH rotuliano comparado con el de TI. Aunque en el 92% de los pacientes estas molestias eran leves, no incapacitantes, y suponían solo un problema menor, se sabe que su presencia se relaciona con pérdidas de un balance articular completo, existencia de debilidad del cuádriceps, o alteraciones de la sensibilidad^{18,32,132-135}. Otros autores^{117,125} no han encontrado diferencias en la presencia de molestias en la cara anterior de la rodilla al utilizar autoinjerto HTH o TI. Si comparamos nuestro resultado de la variable “molestias en la rodilla” con los obtenidos en los nueve estudios de diseño similar, vemos que cinco también encuentran mayor incidencia en el grupo HTH^{109,116,124,127,129}, y el resto no observan diferencias.

No existían diferencias estadísticamente significativas en la incidencia de complicaciones, incluidas infecciones y ruptura de plastias, entre ambas técnicas quirúrgicas. Igual que en los estudios de Corry et al¹⁰⁹, Pinczewski et al, Ejerhed et al¹¹⁵, Sajovic et al.¹²⁵, Laxdal et al¹²⁶ y Maletis et al¹²⁹ tampoco encontramos un aumento del riesgo de fallo de la plastia al utilizar tornillos interferenciales como dispositivo de fijación de los TI por lo que podemos afirmar que los tornillos interferenciales utilizados para la fijación de los injertos de tejidos blandos proporcionan una fijación estable y suficiente, que permite obtener resultados clínicos similares a los que obtenemos con los injertos que poseen bloques o pastillas óseas, como es el HTH rotuliano.

El grupo HTH tenía un mayor porcentaje de pacientes que abandonaron la práctica deportiva, 12'4%, comparado con el grupo TI, 3'4%, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,017$). Este resultado contrasta con los obtenidos por Corry et al¹⁰⁹, y de otras series publicadas^{92,120}, donde la recuperación del nivel de

actividad previa fue significativamente mayor en el grupo HTH. De los estudios con diseño similar, solo el estudio de Wagner et al¹²⁴, que evalúa el nivel de actividad física por la puntuación obtenida en el test de Lysholm, obtiene mejores resultados en esta variable en el grupo de TI. El resultado de la variable nivel de actividad física es corroborado por el obtenido en la variable número de horas de actividad deportiva por año, donde aparece un 20,8% de pacientes que tenían una frecuencia inferior a 50 horas/año en el grupo HTH, frente a un 10,1% en el grupo TI ($p = 0,038$). En resumen, el porcentaje de abandono de la práctica deportiva en el grupo HTH es similar el del resto de estudios^{109,115,116,121-123,125,127-129}, mientras que nosotros al igual que Wagner et al¹²⁴ obtenemos mejores resultados en el grupo de TI, razón por la que posiblemente se aprecien diferencias significativas en el nivel de actividad postquirúrgica entre los dos grupos de tratamiento.

Los pacientes del grupo HTH tenían mayor estabilidad objetiva medida con artrómetro tipo Telos®, con una media LAR diferencial postquirúrgico de 2,85 mm, respecto a los 4,13 mm del grupo TI. Estudios previos también muestran mejores resultados en la estabilidad estática cuando se utiliza autoinjerto HTH rotuliano comparado con el de TI^{18,38,92,119}, incluyendo la serie de Corry et al.¹⁰⁹, aunque el resto de estudios^{115,116,121-129} que solo utilizan tornillos interferenciales para la fijación de los dos tipos de injerto, no evidencian diferencias estadísticamente significativas. Algunos autores¹³⁶ creen que la estabilidad anteroposterior objetiva podría ser mejorada en la plastia de TI si se asocia al tornillo interferencial otro dispositivo de fijación que actúe como poste a nivel tibial.

Al analizar las variables sexo y grupos LAR diferencial postquirúrgico ≤ 8 mm y >8 mm, observamos que dentro del grupo de TI si existía un LAR diferencial postquirúrgico > 8

mm (indicativo de existencia de inestabilidad) existía un predominio del sexo femenino ($p=0,014$). Algunas series también han presentado peores resultados con el uso de tendones anserinos en mujeres sobre todo en los primeros años tras la cirugía, como en las de Pinczewski et al.¹²², Maletis et al.¹²⁹, Sajovic et al.¹²⁵, Corry et al.¹⁰⁹, y otras que utilizan dispositivos de fijación con propiedades biomecánicas diferentes^{137,138}. Señalar que la mayoría de pacientes del grupo TI, independientemente del sexo, con una inestabilidad objetiva presentaban un resultado satisfactorio en la Evaluación Final del IKDC, aunque el porcentaje de pacientes con resultado no satisfactorio en este subgrupo es mayor que en su homónimo del grupo HTH ($p = 0,017$).

En conclusión, creemos que la reconstrucción del LCA con autoinjerto HTH rotuliano o con plastia cuádruple de TI mediante técnica de doble túnel y fijación con tornillos interferenciales tanto a nivel femoral como tibial, proporciona unos resultados clínicos similares, aunque hemos obtenido una menor presencia de molestias en la rodilla y menor abandono de la práctica deportiva en los pacientes con autoinjerto de TI, y una menor laxitud ligamentosa con el autoinjerto HTH rotuliano. En el sexo femenino probablemente es mejor, si no hay algún factor que lo contraindique, realizar la reconstrucción del LCA con una plastia autóloga de tendón rotuliano.

III. 6. MODIFICACIÓN DEL PROCESO DE FIJACIÓN INICIAL

Uno de los factores determinantes del éxito de la ligamentoplastia reconstructiva del LCA es la obtención una fuerte y directa fijación inicial del injerto^{37,61,78,81,99,100}. Para mejorar este aspecto podríamos incidir en dos puntos. El primero, sería la mejora de los dispositivos y técnicas mecánicas de fijación de la plastia, y el segundo, sería estimular o acelerar el proceso de incorporación biológica del injerto en el interior del túnel óseo.

Con la utilización de los actuales dispositivos y técnicas de fijación de los injertos de HTH rotuliano y de TI obtenemos unos resultados clínicos similares para los dos tipos de plastia, aunque algunos cirujanos prefieren utilizar una u otra dependiendo de factores como la edad, sexo, actividad deportiva o laboral paciente^{50,117}. Además, los nuevos tornillos interferenciales se han convertido en uno de los dispositivos de fijación más utilizados, no solo por su sencillez técnica y coste económico, sino por proporcionar la solidez suficiente para contrarrestar las sollicitaciones biomecánicas de los programas de rehabilitación precoz, tanto en la fijación primaria de la interfase hueso-hueso como tendón-hueso^{78,83,106,139-141}.

Así pues, la principal desventaja de la plastia de TI respecto a la de HTH rotuliano es poseer una incorporación biológica más prolongada y menos fisiológica, al establecerse una unión tendón-hueso en lugar de la unión hueso-hueso.

La aplicación de alternativas terapéuticas que favorezcan una rápida cicatrización e incorporación definitiva de la plastia, podrían acelerar la rehabilitación y reincorporación a la actividad deportiva o laboral del paciente. En este sentido se han utilizado diferentes técnicas que incluyen desde la adición de factores de crecimiento exógenos¹⁴²⁻¹⁴⁴, a células de la médula ósea¹⁴⁵, al recubrimiento del injerto con periostio¹⁴⁶⁻¹⁴⁸, o la terapia génica¹⁴².

La inclusión en la zona de unión hueso-tendón de factores de crecimiento (FC) de forma aislada y en concentraciones suprafisiológicas, potencia el proceso de reparación tisular de un tendón en el interior de un túnel óseo¹⁴²⁻¹⁴⁴. Sin embargo, se desconoce el efecto que tiene la aplicación de plasma rico en plaquetas (PRP), que aporta varios FC en proporciones fisiológicas, en la misma interfase. Para intentar conocer el efecto del PRP en el proceso de cicatrización de un tendón en el interior de un túnel óseo se diseñó un estudio experimental, motivo de esta tesis doctoral.

Objetivo e Hipótesis

IV. OBJETIVO E HIPÓTESIS

El objetivo marcado para nuestro proyecto de investigación es demostrar si la presencia de PRP como aporte de FC en la interfase injerto tendinoso-hueso modifica el proceso de reparación de los tejidos locales en nuestro modelo experimental.

Es decir, la **hipótesis alternativa o de trabajo** del presente estudio es:

“La presencia de PRP autólogo como aporte de FC en la interfase injerto tendinoso-hueso estimula y acelera la reparación de los tejidos locales mediante un mecanismo que reproduce las etapas fisiológicas de la cicatrización tisular”.

Para demostrar esta hipótesis nos proponemos responder a las siguientes preguntas:

a).- En la valoración microscópica:

1º.- ¿Existen diferencias en la presencia de fibroblastos, vasos de neoformación, matriz extracelular, tejido condroide, tejido cartilaginoso organizado, sustancia osteoide, trabéculas óseas y fibras de anclaje del tendón al hueso en la interfase hueso-tendón que nos indiquen una estimulación en tiempo o cantidad del proceso de cicatrización al aplicar PRP?

2º.- ¿Existen diferencias en el momento de aparición, área de tinción y patrón de distribución del colágeno tipo II en la interfase hueso-tendón que nos indiquen una estimulación en tiempo o cantidad del proceso de cicatrización al aplicar PRP?

b).- En la valoración macroscópica y radiográfica:

3°.- ¿Existen diferencias en el volumen o área de reacción ósea existente alrededor de la zona de entrada del túnel óseo que nos indiquen una estimulación en tiempo o cantidad del proceso de cicatrización?

Introducción

V. INTRODUCCIÓN

V. 1. PROCESO DE REPARACIÓN o CICATRIZACIÓN

Todos los seres vivos pluricelulares pueden sufrir lesiones de sus tejidos. La reparación tisular constituye un complejo proceso biológico que comprende la integración de diversas fases, como la inflamación, la quimiotaxis y división celular, la angiogénesis, la síntesis de las proteínas de la matriz extracelular y la remodelación del tejido neoformado. (Figura 1). La aparición de un tejido nuevo donde previamente había una solución de continuidad, la formación de un tejido que reproduce las propiedades morfológicas y biomecánicas del tejido previo, la activación de una proliferación masiva de varias estirpes celulares en la región dañada, que el organismo activa y controla localmente una vez restituida la población celular necesaria, son, en definitiva, datos que explican el interés científico creciente de diversos cambios biomédicos en la reparación tisular.

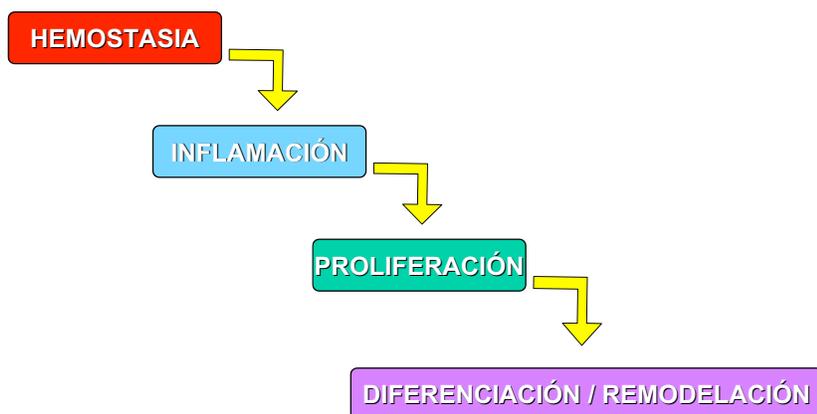


Figura 1: Fases del Proceso de cicatrización o reparación tisular

El proceso lesivo que acontece tras un traumatismo o agresión tisular como puede ser una intervención quirúrgica, pone en marcha los mecanismos necesarios para su curación. Esta curación se puede llevar a efecto mediante un proceso de reparación o de regeneración. En la **reparación tisular** la curación de la herida da lugar a un tejido que no restaura totalmente la arquitectura o función del tejido afectado, mientras que en la **regeneración** si se produce una restauración completa de la parte perdida o lesionada.

Encontrar alternativas terapéuticas que estimulen los procesos de reparación es importante para superar múltiples patologías, pero para conseguirlo debemos conocer los fundamentos biológicos y celulares de la reparación, así como las propiedades y formas de actuar de los distintos mediadores moleculares que regulan estos procesos^{149,150}. Los avances científicos de las últimas décadas han permitido constatar que los FC regulan los procesos clave de la reparación tisular.

V. 2. BIOLOGÍA DE LA REPARACIÓN

Si bien la diversidad de tejidos condiciona peculiaridades distintas en el proceso de reparación, existen fenómenos celulares y tisulares comunes. La cicatrización es un complejo fenómeno biológico que comprende varias fases perfectamente ensambladas y ordenadas en el tiempo, que se inicia en el momento de la agresión tisular mediante la activación de una cascada de señales moleculares, y pudiendo requerir varios meses¹⁵⁰

hasta completarse todo el proceso. Se compone de las siguientes fases: inflamatoria, proliferativa, diferenciación y remodelación.

V. 2. 1. Fase Inflamatoria

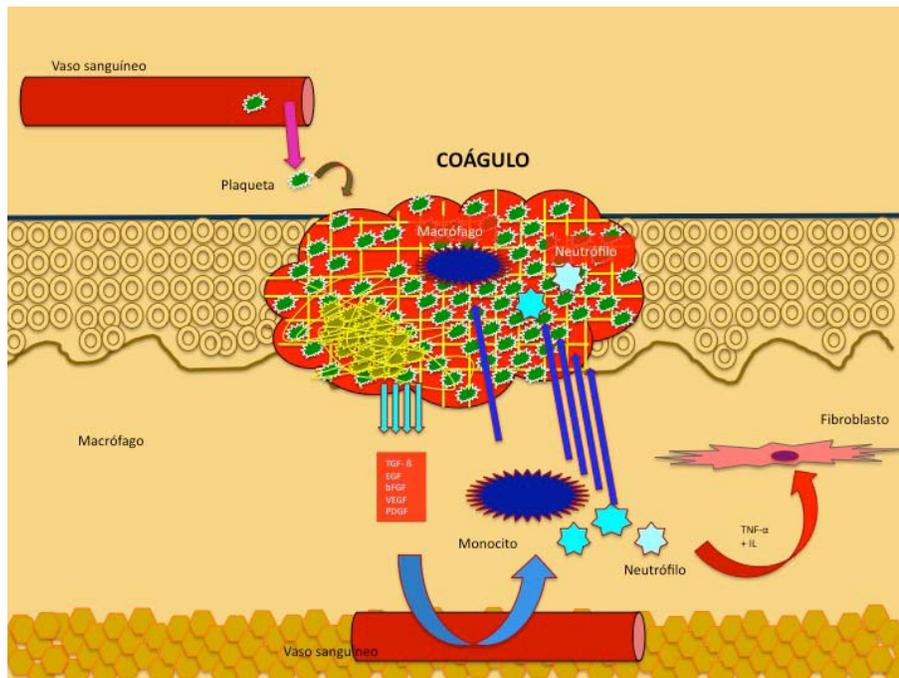


Figura 2: Esquema fase inflamatoria. El coágulo constituye el andamiaje básico para la formación del nuevo tejido cicatricial, pero también es el reservorio de citoquinas y factores de crecimiento liberados en la degranulación plaquetaria

La inflamación representa la compleja reacción de defensa del organismo ante la acción de diferentes agentes nocivos de procedencia mecánica, física, química o bacteriana.

(Figura 2).

El objetivo de esta fase es eliminar los agentes nocivos, o en su defecto inactivarlos, además de limpiar el tejido y establecer las condiciones óptimas para el desarrollo de posteriores procesos proliferativos. Se inicia en el momento de la lesión y su duración alcanza en condiciones fisiológicas los primeros días del proceso.

La mayoría de lesiones que aparecen en nuestra especialidad causan una hemorragia procedente de los vasos sanguíneos adyacentes dañados. Por tanto, el primer objetivo de los procesos reparativos será el detener la hemorragia. Al producirse una lesión, las células dañadas liberan sustancias vasoactivas que provocan una constricción de los vasos, evitando una mayor pérdida de sangre, hasta que la aglomeración de plaquetas (trombo o coágulo plaquetar) consiga una primera obliteración vascular.

V. 2. 2. Morfología y Función Plaquetaria

Las plaquetas son pequeñas células discoides anucleadas, procedentes de la fragmentación del citoplasma de los megacariocitos medulares, que circulan en la sangre y cuya misión es taponar rápidamente cualquier solución de continuidad producida en el endotelio vascular. Además de intervenir en la hemostasia primaria, coagulación y fibrinólisis, intervienen en otro tipo de procesos como la inflamación, cicatrización de las heridas, fibrosis, arteriosclerosis o diseminación de las neoplasias.

Su estructura se adapta a la gran variedad de funciones que deben desempeñar, con zonas anatómicas preferentemente dedicadas a cada una de ellas. En la membrana plaquetaria se producen las interacciones con el exterior, el citoesqueleto es el responsable de la

contracción celular, los gránulos específicos almacenan sustancias prohemostáticas, procitotóxicas y activadoras de las propias plaquetas, y los sistemas membranosos amplifican la superficie plaquetaria y alojan componentes químicos involucrados en la activación. Además, poseen estructuras anatómicas destinadas a algunas funciones celulares inespecíficas, como el metabolismo energético, una escasa capacidad de síntesis y mecanismos de endocitosis y exocitosis¹⁵¹.

Las plaquetas no activadas son elementos discoides biconvexos de 2,9 a 4,2 μm de diámetro y 0,6 a 1,2 μm de grosor, que siguen el modelo geométrico de un elipsoide de revolución oblato. En la sangre periférica de sujetos sanos, su número oscila entre 1,5 y 4 $\times 10^8$ células/ml, con una tasa de producción diaria de $5,5 \times 10^7$ células/ml/día. La vida media de las plaquetas en circulación, en sujetos normales, oscila entre 7 y 10 días, desapareciendo de la misma por envejecimiento o por consumo en procesos fisiopatológicos¹⁵².

La membrana plaquetaria está dividida en tres capas: una cubierta exterior o glicocálix, de 15 – 20 nm de grosor, que contiene receptores glicoproteicos, entre ellos el complejo Ib-IX, que interacciona con el factor de von Willebrand en el proceso de adhesión, y el complejo IIb-IIIa, que lo hace con el fibrinógeno durante la agregación. También presenta otros receptores capaces de iniciar la activación plaquetaria. Las glicoproteínas (GP) además, integran en su estructura química los principales antígenos plaquetarios de membrana. La segunda capa es una típica unidad de membrana o bicapa fosfolipídica, asimétrica, especialmente rica en ácido araquidónico. En respuesta a la activación, la membrana expone una superficie cargada negativamente, esencial como soporte de los

factores de la coagulación (actividad procoagulante), y el ácido araquidónico entra en el metabolismo de los eicosanoides, participando en la transmisión del estímulo recibido en la membrana hacia las regiones celulares efectoras. La capa más interna es el área submembranosa, que está unida a las porciones transmembranosa de algunas glicoproteínas, y contiene filamentos que forman parte del citoesqueleto. En esta zona se produce la transformación de las señales recibidas en la superficie exterior en los mensajes químicos y alteraciones físicas que activarán a la plaqueta¹⁵³.

Las GP de la membrana plaquetar actúan como receptores mediando, entre otras, en la adhesión de las plaquetas sobre las superficies vasculares dañadas y la interacción plaqueta-plaqueta o agregación plaquetaria. Tipos de GP de membrana:

- **GP Ia:** es el receptor para el colágeno, y alternativamente, puede estar involucrada en la interacción de las plaquetas con un cofactor de adhesión plaquetario al colágeno, como es el caso de la proteína adhesiva fibronectina¹⁵⁴⁻¹⁶⁰.

- **GP IIb:** posee un alto contenido en hidratos de carbono, contribuyendo a la carga neta negativa de la membrana plaquetaria. Está compuesta por dos subunidades, α y β , unidas por puentes de disulfuro. Esta GP es capaz de formar complejos en la membrana plaquetaria. A nivel de la membrana conecta con la GP IX, mientras que en la porción citoplasmática interacciona con una proteína del citoesqueleto llamada *actin binding protein* (ABP). La unión del complejo GP Ib-IX a proteínas contráctiles puede ser especialmente importante en el proceso de adhesión plaquetaria. La GP Ib desempeña un papel fundamental en la hemostasia primaria, actuando como receptor de contacto de las plaquetas con el subendotelio. Este paso está mediado por el factor de von Willebrand adsorbido al colágeno o a otros componentes del subendotelio. Cuando se une al

subendotelio, el factor de von Willebrand adquiere una conformación que permite su interacción con la superficie plaquetaria. También se ha descrito que la GP Ib participa en la interacción de las plaquetas con la trombina, ya que algunos anticuerpos anti-GP Ib inhiben la agregación y secreción plaquetar inducidas por la trombina¹⁶¹⁻¹⁶³.

- **GP Ic-IIa:** puede actuar como receptor de la laminina, proteína de la estructura subendotelial del vaso.

- **Complejo glicoproteico IIb-IIIa:** es el complejo más abundante en la membrana plaquetaria. Es el lugar de unión de diferentes proteínas adhesivas: fibrinógeno, fibronectina, factor de von Willebrand, vitronectina, trombospondina y colágeno. El complejo GP IIb-IIIa juega un importante papel en los procesos de agregación plaquetaria, actuando como receptor del fibrinógeno, el cual al unirse a este complejo glicoproteico de las plaquetas activadas, forma un puente entre ellas, favoreciendo la agregación de las mismas. El sitio de unión del fibrinógeno al complejo GP IIb-IIIa sólo es accesible cuando la plaqueta ha sido previamente activada. También participa en la transmisión del estímulo activante, el control del cambio de forma de las plaquetas, la formación de puentes plaqueta-plaqueta, y la mediación de las interacciones de las plaquetas con la matriz extracelular.

- **GP IV o IIIb o CD36.**

Las plaquetas poseen otros receptores no glicoproteicos que regulan la activación y agregación plaquetarias. La adrenalina posee receptores adrenérgicos, cuya unión induce la agregación plaquetaria. El ADP se une a receptores específicos, induciendo la exposición de GP IIb-IIIa y favoreciendo la agregación plaquetaria a través de puentes de

fibrinógeno. Además el ADP inhibe la adenilciclase, enzima que interviene en los procesos de inhibición plaquetar por incrementar los niveles de AMPc^{164,165}.

El citoesqueleto plaquetario está formado por proteínas como la actina, miosina, tropomiosina y microtúbulos de tubulina. Estas proteínas son responsables del mantenimiento de la forma, movimiento externo (extensión) o interno (contracción)¹⁵³.

La plaqueta contiene tres tipos de gránulos citoplasmáticos: gránulos α , gránulos **densos** y **lisosomas**, que son liberados al medio extracelular por exocitosis como consecuencia de la estimulación plaquetaria, proceso conocido como reacción de liberación. La cinética de la secreción de los diversos tipos de gránulos es secuencial, dependiendo de la intensidad de activación plaquetaria. La liberación de los gránulos α requiere una estimulación menor de las plaquetas que para la liberación de los gránulos densos, y ésta, a su vez es menor que la necesaria para la liberación de los lisosomas.

Una plaqueta posee aproximadamente unos 50 a 80 **gránulos** α , con un diámetro que oscila entre 200 a 500 nm. El contenido de estos gránulos α consiste en factores mitogénicos (PDGF), proteínas plaquetarias específicas (factor plaquetario 4, β -tromboglobulina, proteína básica), factores de coagulación (fibrinógeno, factor de von Willebrand, Factor V), proteínas adhesivas (trombospondina, fibronectina), factores de permeabilidad vascular, inhibidores proteolíticos y factores fibrinolíticos¹⁶⁶. (Figura 3).

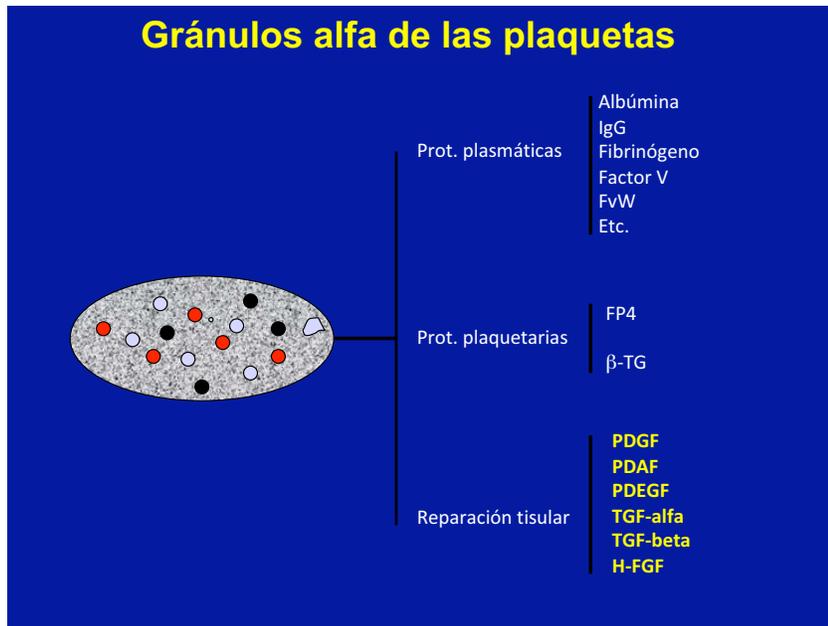


Figura 3: Contenido de los Gránulos “α”.

Los **gránulos densos** “ojo de buey” poseen una mayor densidad que los gránulos α al ser observados al microscopio electrónico, por su alto contenido en calcio y fósforo. Contienen nucleótidos de adenina (ADP, ATP), serotonina o 5-hidroxitriptamina, calcio y fósforo, y son liberados al medio extracelular tras la activación plaquetaria, favoreciendo la agregación y activación plaquetar¹⁵¹.

Los **lisosomas** poseen un contenido enzimático de actividad hidrolítica y proteolítica.

En condiciones normales, una solución de continuidad en el endotelio vascular, expone el colágeno subendotelial, iniciándose los procesos de la hemostasia primaria, con la interacción entre la plaqueta y la superficie vascular dañada. El endotelio produce sustancias favorecedoras del proceso trombótico, como el factor activador plaquetario, el factor de von Willebrand, factor VIII, el factor tisular, la endotelina-1, el inhibidor de la

activación del plasminógeno y diferentes moléculas de adhesión. Pero también produce otras sustancias con una función fundamentalmente antitrombótica, como prostaciclina, activador tisular del plasminógeno, activador de la uroquinasa, proteína S, etc.

Tras la producción de una lesión vascular, el vaso se contrae, y las plaquetas interaccionan con las estructuras subendoteliales, iniciándose las etapas de adhesión, agregación, activación y reclutamiento plaquetario. (Figura 4). El daño vascular, sirve también como señal para el inicio de la cascada de la coagulación, que dará lugar a la formación de trombina, otro importante inductor plaquetario, que contribuirá a la formación del trombo y de fibrina que facilitará la consolidación del mismo¹⁵¹.

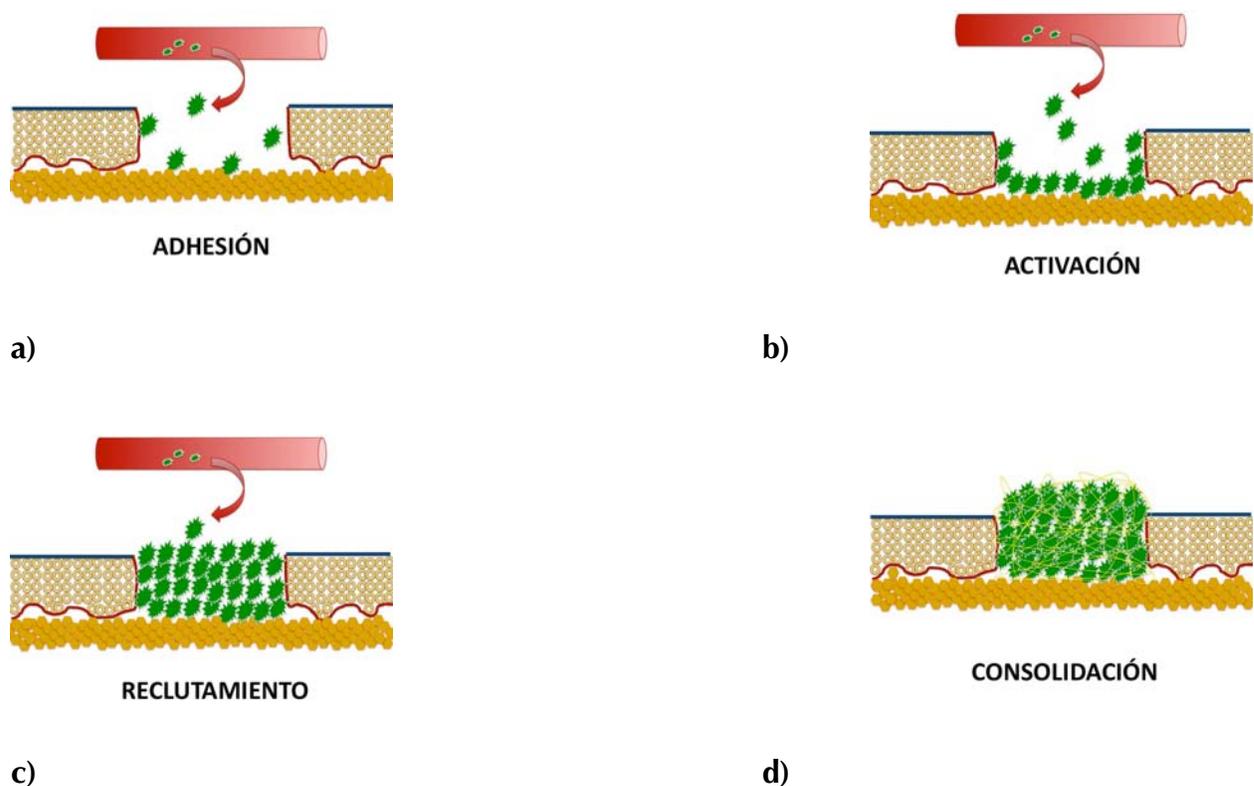


Figura 4: Secuencia de formación del trombo plaquetario

Adhesión Plaquetaria:

Constituye la primera etapa de la hemostasia primaria. Las plaquetas se adhieren a varios componentes subendoteliales, como el factor de von Willebrand, el colágeno, la trombospondina, la fibronectina o la laminina, gracias a la participación de varios receptores de su membrana plasmática. Los dos primeros son los más importantes en los procesos adhesivos, así, el factor de von Willebrand media la adhesión plaqueta-vaso sin necesidad de una activación plaquetar previa, y el colágeno subendotelial favorece el proceso de adhesión plaqueta-vaso y además puede activar a las plaquetas¹⁶⁷.

En el inicio del proceso de adhesión plaquetar, el complejo glicoproteico Ib/IX se une al factor de von Willebrand a su vez unido al subendotelio. También la GP IV y el complejo GP Ia/IIa de la membrana plaquetaria, se unen al colágeno del subendotelio. (Figura 5).

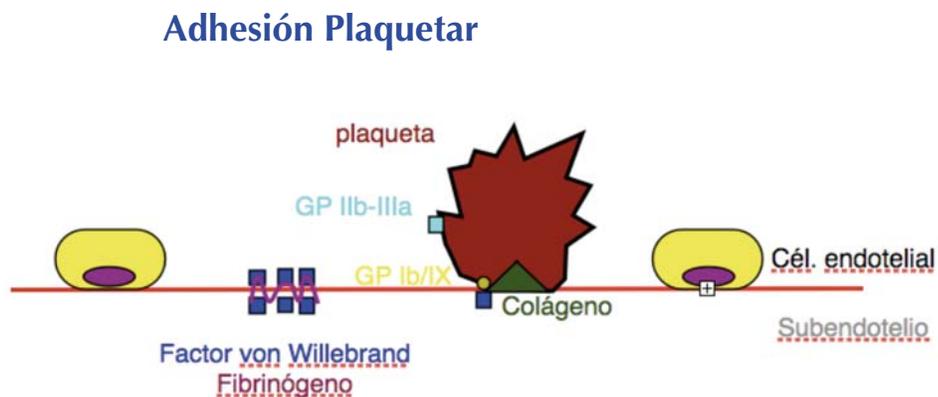


Figura 5: Elementos participantes en la Adhesión plaquetar

Una etapa subsiguiente a la adhesión plaqueta-vaso es la adhesión plaqueta-plaqueta. Este proceso tiene lugar cuando el vaso se ha recubierto por una monocapa de plaquetas.

En él intervienen otras proteínas de la membrana plaquetaria y otras proteínas adhesivas, como la GP Ib que interacciona con el factor de von Willebrand, la GP Ic que interacciona con la fibronectina, y la GP IV que interacciona con la trombospondina^{168,169}.

Agregación Plaquetaria:

La agregación plaquetaria es un fenómeno que se inicia con la interacción entre un inductor (**fibrinógeno**) y un receptor específico de la membrana plaquetaria (complejo glicoproteico IIb/IIIa) en presencia de calcio, formándose puentes de unión plaqueta-plaqueta. Esto conduce a una serie de cambios morfológicos y bioquímicos de la plaqueta, que se caracterizan por la transformación de una forma discoidal a una forma esférica con emisión de pseudópodos y centralización de sus gránulos¹⁵³. (Figura 6)

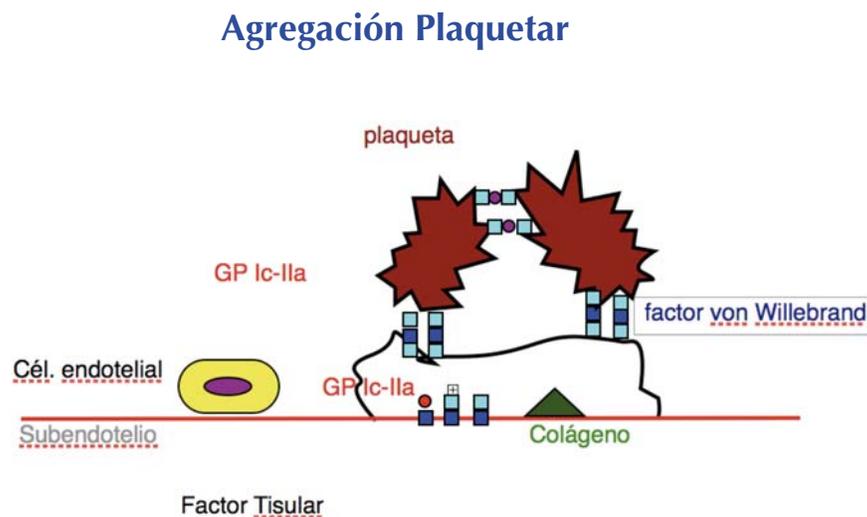


Figura 6: Elementos participantes en la Agregación plaquetar

Reclutamiento:

Las plaquetas activadas liberan al microentorno celular sus productos granulares, que a su vez interactúan con células del entorno y otras plaquetas, favoreciendo el crecimiento del trombo y dando lugar al fenómeno oclusivo. Una vez liberado el contenido granular, la agregación plaquetaria, que hasta este momento era reversible, se convierte en irreversible.

Consolidación del Trombo:

Simultáneamente a estos procesos, tras la producción de la lesión vascular, se inicia la cascada de la coagulación por su vía intrínseca, que culmina con la formación de trombina. La trombina amplifica la formación del trombo plaquetario favoreciendo los fenómenos de agregación y liberación plaquetar, y por otra parte da lugar a la formación y polimerización de la fibrina. La interacción de las plaquetas con la malla de fibrina, junto a pequeñas cantidades de fibronectina plasmática, vitronectina y trombospondina, forma un entramado que consolida el trombo, deteniendo la hemorragia y cerrando de manera permanente el lugar de la lesión, protegiendo a la herida de posibles contaminaciones bacterianas y de la pérdida de humores.

El coágulo constituye el andamiaje básico para la formación del nuevo tejido cicatricial, y proporciona una matriz provisional a través de la cual las células pueden migrar durante los procesos de reparación. Además el coágulo también sirve de reservorio de citoquinas y FC liberados en la degranulación plaquetaria. Este «*cocktail*» precoz de FC constituye el pistoletazo de salida de los procesos de cierre de la lesión, proporciona señales

quimiotácticas para reclutar células inflamatorias circulantes hacia la zona lesionada, y estimula la característica respuesta angiogénica de la herida¹⁷⁰. (Figura 7)

Al mismo tiempo la agregación plaquetar y los procesos de coagulación sanguínea deben permanecer localizados en el lugar de la lesión, para que los procesos trombóticos que ellos mismos originan no pongan en peligro a la totalidad del organismo. Por esta razón, en la sangre circulante se controla continuamente el proceso de coagulación mediante la activación de sustancias del sistema fibrinolítico.

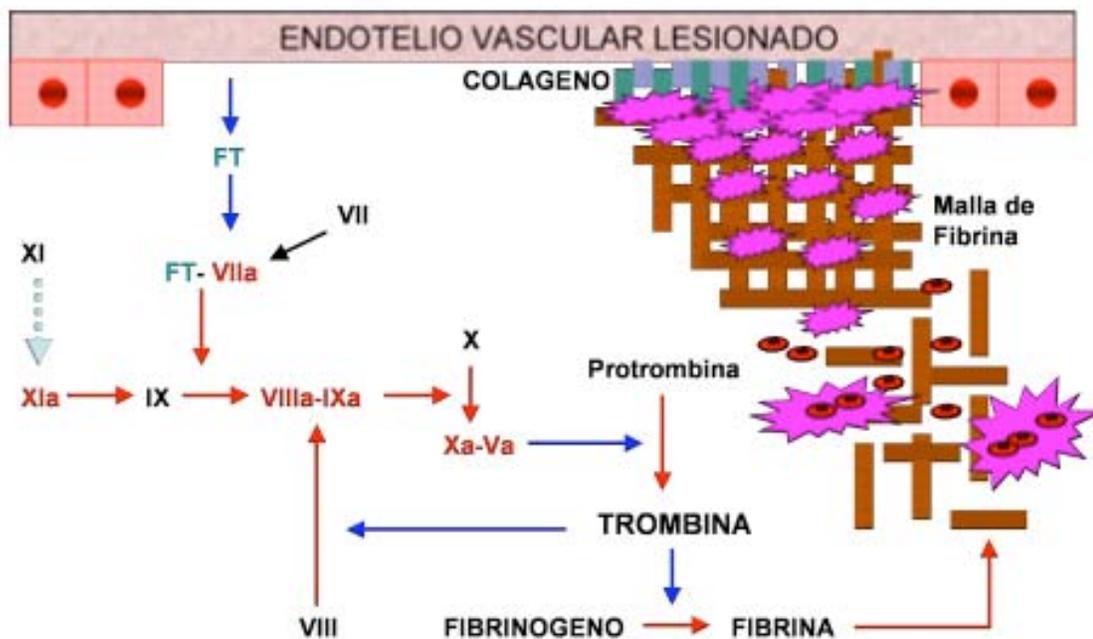


Figura 7: En el momento en que se produce la lesión aparece una hemorragia desde los vasos sanguíneos dañados adyacentes. El primer objetivo de los procesos reparativos es el de detener la hemorragia. Al producirse una lesión, las células dañadas liberan sustancias vasoactivas que provocan una vasoconstricción, evitando una mayor pérdida de sangre. Las plaquetas interactúan con estructuras subendoteliales, iniciándose las etapas de adhesión, agregación, activación y reclutamiento plaquetario. El daño vascular también sirve de señal para el inicio de la cascada de la coagulación (vía intrínseca), dando lugar a la formación de trombina, otro importante inductor plaquetario, que contribuirá a la formación del trombo y de fibrina que facilitará la consolidación del mismo. El Factor Tisular (FT) de origen extravascular se expresa cuando existe un daño vascular, el FT se une rápidamente al factor VII y lo activa para formar el complejo FT/VIIa, éste a su vez activa a sus sustratos, los factores X y IX, el factor Xa se une a su cofactor el Va y genera trombina. La trombina que se genera activa a los factores VIII, V, XI y las plaquetas.

Las arteriolas, que se constriñeron brevemente en el momento de producirse la lesión, se dilatan por medio de la acción de sustancias vasoactivas como la histamina, la serotonina y la quinina. Esto conduce a una intensa irrigación sanguínea en la zona de la lesión y un incremento del metabolismo local. La vasodilatación provoca un aumento de la permeabilidad vascular con un aumento de la exudación de plasma sanguíneo al intersticio. Un primer impulso exudativo tiene lugar aproximadamente 10 minutos después de que se produzca la lesión, y un segundo impulso después de transcurridas entre una y dos horas. Luego se va desarrollando un edema, a cuya formación contribuyen de forma adicional la ralentización de la circulación sanguínea, pero también la acidosis de la zona de la lesión. La acidosis local intensifica los procesos catabólicos, el aumento del humor hístico, y diluye los productos tóxicos de descomposición producidos por los tejidos y las bacterias.

La degranulación plaquetaria durante la formación del coágulo libera distintos FC, como el PDGF, el VEGF, el bFGF, el IGF-1, el EGF y el TGF- β , que son potentes factores quimiotácticos de células inflamatorias, sobre todo el PDGF y el TGF- β . Los FC liberados desde las plaquetas parecen ser los iniciadores de la cascada de acontecimientos que dirigen a la curación, difundándose rápidamente desde el lugar de la lesión y finalmente degradados por proteasas¹⁴⁹. Hay una gran variedad de señales quimiotácticas que atraen neutrófilos y monocitos al lugar de la lesión. Además de los FC hay otras señales quimiotácticas para estas células inflamatorias como péptidos formil metionil escindidos de proteínas bacterianas cuando hay contaminación del lecho lesionado, productos de la reacción proteolítica de la fibrina y otros componentes de la matriz¹⁷⁰.

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

Las citoquinas y los FC promueven la expresión de moléculas de adhesión en poblaciones endoteliales y leucocitarias. Por ejemplo, el TGF- β potencia la expresión de receptores de integrina β 1 en los monocitos que modulan la interacción celular con componentes de la matriz¹⁷¹. Así, los neutrófilos y los monocitos son reclutados de la circulación sanguínea gracias a cambios moleculares que se originan en la superficie de las células endoteliales de los capilares que se ubican en el lugar de la herida. Inicialmente algunas moléculas de la familia de las selectinas son expresadas para permitir una rápida pero ligera unión de los leucocitos a las células endoteliales, enlenteciendo su velocidad y verificando el rodamiento (*“rolling”*) por las paredes de los vasos, siendo de este modo extraídos de la circulación sanguínea rápida. Seguidamente se establecen fuertes uniones moleculares mediadas por integrinas del tipo β 2 que detienen las células, permitiendo la extravasación de los leucocitos activados a través de los espacios entre las células endoteliales, pasando al espacio intersticial¹⁷².

Estudios realizados en ratones transgénicos fueron los primeros en aportar información sobre las cruciales adhesiones celulares que aparecen en este proceso; así se observó que en los ratones carentes de β -selectina, el *“rolling”* leucocitario y su extravasación están severamente dañados¹⁷⁰.

Los neutrófilos llegados al lugar de la lesión, además de liberar enzimas proteolíticas para eliminar regiones dañadas y sin vitalidad, combatir y despejar la contaminación bacteriana inicial, son también una fuente de citoquinas proinflamatorias (TNF- α , e interleuquinas) que probablemente constituyen una de las más tempranas señales para la activación local de fibroblastos y queratinocitos. Su número alcanza un pico a las 24 horas de la lesión, y a partir de entonces cae gradualmente, cesando la infiltración de neutrófilos en la zona lesionada en unos pocos días, y siendo fagocitados por los macrófagos¹⁷⁰. En ausencia de infección, los neutrófilos no son requeridos en ulteriores fases de la reparación tisular normal¹⁷¹. Si se produjese una infección, la migración de leucocitos se mantendría, y se intensificaría la fagocitosis, prolongándose la fase inflamatoria y retrasándose la curación de la herida.

Transcurridas las primeras 24 horas se produce la migración de monocitos a la zona de la lesión, reclutados desde la circulación sanguínea (gracias a factores quimiotácticos como TGF- β , sobre todo¹⁷³, y también PDGF y FGF), alcanzando su pico máximo a las 48 horas después de producirse la herida. El PDGF también induce la síntesis de MCP-1/JE por las células tisulares circundantes, y esto constituye un persistente estímulo para la infiltración por monocitos¹⁷¹. Los monocitos se transforman en macrófagos en el área de la lesión, de modo que al tercer día los neutrófilos han sido sustituidos en gran parte por macrófagos. Los macrófagos ocupan un papel central en la cicatrización, de hecho, ésta no sería posible sin su participación. Atraídos por estímulos quimiotácticos provocados por toxinas bacterianas, migran en densas filas desde la sangre hasta llegar a la herida. Además de su importante función fagocitadora¹⁷⁰, capturan y modifican parcialmente antígenos para

después ponerlos a disposición de los linfocitos de una forma reconocible. Si la infiltración de macrófagos fuese impedida, el proceso de reparación se vería severamente afectado¹⁷⁴.

Los macrófagos liberan una batería de citoquinas y FC en la región lesionada que amplifican las señales precoces liberadas por plaquetas y neutrófilos¹⁷⁰, y a su vez estimulan y controlan la deposición de proteínas de la matriz, la angiogénesis y la reepitelización en el caso de lesiones cutáneas¹⁷¹. Por ello son considerados una fuente esencial de citoquinas que conducirá a la reparación de la herida^{150,171}.

V. 2. 3. Fase proliferativa

Esta fase comienza aproximadamente al cuarto día de la lesión. Existe un predominio de la proliferación celular, con el fin de rellenar la zona defectuosa con tejido neoformado. Los FC liberados por los macrófagos estimulan la migración de fibroblastos (TGF- β y PDGF fundamentalmente), células epiteliales (EGF) y células del endotelio vascular ilesas de los márgenes de la lesión (bFGF y IGF-1)¹⁷⁵; a su vez, estas células proliferan iniciando la fase proliferativa, que a menudo dura varias semanas.

La migración de fibroblastos y su ulterior proliferación es desencadenada por TGF- β , PDGF, EGF, FGF, y las citoquinas fibrogénicas (IL-1 y TNF- α)¹⁷⁵.

A partir del tercer día, los fibroblastos que derivan del tejido circundante van incrementando su número dentro de la herida, se diferencian y comienzan a depositar colágeno y proteoglicanos (macromoléculas de la matriz extracelular)¹⁷¹.

La red de fibrina es aprovechada como matriz por los fibroblastos para la formación del colágeno. Las distintas poblaciones celulares presentes en la herida liberan varios FC (los fibroblastos concretamente bFGF, IGF-1, TGF- β , PDGF y KGF, y las células endoteliales bFGF y PDGF). Muchos de los FC que regulan la proliferación de los fibroblastos, estimulan también la síntesis del colágeno (PDGF, FGF, TGF- β). El factor de crecimiento más importante que participa en la fibrosis inflamatoria es el TGF- β ¹⁷⁶.

La reparación de un tejido no puede progresar sin la formación de nuevos vasos que garanticen un aporte adecuado de sangre, oxígeno y nutrientes. Además los vasos neoformados son esenciales para asegurar una función normal de fibroblastos y leucocitos. El oxígeno y los nutrientes permiten a los fibroblastos dividirse y sintetizar colágeno y otras proteínas de la matriz¹⁷¹.

Gracias a los FC, los vasos intactos del borde de la herida generan brotes vasculares que migran a la zona lesionada y al coágulo sanguíneo colindante; la degradación proteolítica de la membrana basal del vaso progenitor, la migración de las células endoteliales hacia el estímulo angiogénico (VEGF, bFGF, IGF-1), la proliferación de las células endoteliales justo detrás de las células que migran, la maduración de las células endoteliales y el reclutamiento de las células periendotheliales, son pasos sucesivos también regulados por los FC¹⁷⁷.

Los macrófagos activados son parte integrante de la respuesta neovascular y liberan bFGF y VEGF. El bFGF también es liberado tras la degradación enzimática de la membrana basal subendotelial. El VEGF, principal estimulador de la angiogénesis, y el bFGF estimulan la

migración y división de las células endoteliales¹⁷¹. Los queratinocitos de los bordes de la herida al igual que los macrófagos, también liberan VEGF posiblemente en respuesta a FGF y a TGF- α , y simultáneamente, uno de sus receptores, flt-1, es regulado positivamente por las células endoteliales en el lugar de la lesión. La expresión del VEGF también es estimulada por otros FC (como TGF- β , PDGF, TGF- α) y citoquinas¹⁷⁸.

El bFGF es un potente factor angiogénico; cuando este factor es experimentalmente anulado con anticuerpos monoespecíficos contra receptores de bFGF, la angiogénesis es bloqueada de forma casi completa¹⁷⁹. El IGF-1 es, asimismo, un potente agente quimiotáctico para las células del endotelio vascular¹⁵⁰, existiendo además otros factores como el PDGF y el TGF- β , que son importantes en la correcta maduración y remodelación vascular¹⁸⁰.

Las células endoteliales deben aumentar la expresión de integrinas como las $\alpha\beta_3$ si quieren responder a alguna señal angiogénica de la lesión. Las $\alpha\beta_3$ están expresadas transitoriamente en los extremos de los capilares en crecimiento del tejido neoformado, y la presencia de péptidos o anticuerpos que bloqueen estas integrinas causan un fallo de la angiogénesis, y como resultado, un tejido con un importante deterioro de su reparación.

Al igual que ocurre con las demás migraciones celulares en la zona dañada, la morfogénesis capilar también depende de una severa regulación de la proteólisis de la matriz circundante durante la fase de invasión.

A través de sucesivas divisiones de las células endoteliales se origina una figura canaliculada, la cual se vuelve a dividir en su extremo adquiriendo una forma de botón. Pequeños lazos capilares se forman y canalizan, permitiendo el flujo de la sangre¹⁷¹. Estos botones vasculares individuales crecen uno encima de otro y se unen formando asas vasculares, que a su vez se seguirán ramificando, hasta que se topen con un vaso mayor en el que pueden finalmente desembocar. En la sangre también existen células germinales endoteliales circulantes¹⁸¹.

Una lesión bien irrigada se encuentra extremadamente vascularizada, incluso la permeabilidad de los nuevos capilares formados es mayor que la de los capilares normales debido al aumento del metabolismo en el área de la herida. Sin embargo, los nuevos capilares tienen una menor capacidad de resistencia ante sobrecargas mecánicas. Con el transcurso del tiempo el tejido neoformado madura y se transforma en tejido cicatricial, que reduce su densidad vascular¹⁸¹.

La matriz extracelular está formada en parte por carbohidratos glucosaminoglicanos. Muchos de éstos se combinan con moléculas de naturaleza proteica para formar proteoglicanos. Los fibroblastos producen por una parte colágeno, que madura fuera de las células hasta transformarse en una fibra que proporciona resistencia al tejido, y por otra parte proteoglicanos. Muchos FC, incluyendo el bFGF, el VEGF y el PDGF, también se unen a las proteínas de la matriz. Así, las interacciones entre los FC de la matriz y las células son importantes para determinar el comportamiento celular y la acción de diversas citoquinas¹⁷¹.

Los fibroblastos fusiformes no son transportados a la región lesionada mediante la circulación sanguínea, sino que proceden principalmente de los tejidos locales próximos y son atraídos por quimiotaxis. Como una respuesta temprana a la lesión, los fibroblastos dérmicos localizados en las proximidades de la herida comienzan a proliferar, y tres o cuatro días después de producirse la herida comienzan a migrar hacia el interior de la matriz provisional del coágulo de la misma, depositando su propia matriz rica en colágeno. El retraso de la fase premigratoria parece ser debido principalmente al tiempo requerido por los fibroblastos para salir de su estado de quiescencia, y como consecuencia de ello, no acontecería en un segundo tiempo si la herida se reabriera y una nueva matriz provisional fuera depositada debajo. Muchos de los FC presentes en la lesión pueden actuar bien como mitógenos, bien como factores quimiotácticos para los fibroblastos de la herida, y algunos, como ciertas isoformas de PDGF y TGF- β ¹⁷⁰, pueden ejercer ambas acciones. La activación de las isoformas β A y β B relacionadas con el factor de crecimiento TGF- β , son inducidas en los fibroblastos que proliferan en los márgenes de la herida, y en los queratinocitos adyacentes de los bordes de la herida, respectivamente; no está claro todavía qué células responden a estas señales activadoras, pero es muy probable que su significado funcional se solape a las señales del TGF- β ¹⁸².

Los fibroblastos del tejido adyacente, que normalmente subyacen en una matriz rica en colágeno, deben disminuir sus receptores de colágeno (α 2) y aumentar las integrinas capaces de unirse a la fibrina, fibronectina y vitronectina (α 3 y α 5), que utilizarán como una tubería para introducirse en el coágulo¹⁷⁰.

Poco se conoce acerca de la regulación de la activación del citoesqueleto de actomiosina, que debe ser crucial en el proceso de la migración fibroblástica, como se desprende del hecho de que los fibroblastos de ratones transgénicos carentes del efecto de desunión de la proteína gelsolina tienen impedida la respuesta migratoria en cultivos¹⁷⁰.

Alrededor de una semana después de producirse la herida, el coágulo localizado en el tejido lesionado ha sido completamente invadido y reemplazado por fibroblastos activados que son estimulados por TGF- β 1 y otros FC para sintetizar y remodelar una nueva matriz rica en colágeno¹⁷⁰.

La degradación del coágulo sanguíneo dará lugar a la aparición de aminoácidos, que sirven de sustrato nutritivo para los fibroblastos. De forma simultánea, los fibroblastos utilizan la red de fibrina que se formó durante la coagulación sanguínea como matriz para la formación de colágeno. Este proceso, que es controlado por la enzima plasmina, se denomina fibrinolisis.

Si en esta área persistieran hematomas, tejido necrótico, cuerpos extraños y bacterias, se retrasaría tanto la reconstitución vascular como también la migración de fibroblastos. El alcance de la neoformación tisular se corresponde de forma directa con la envergadura de la coagulación sanguínea y la dimensión del incidente inflamatorio, incluido el desbridamiento endógeno realizado con la ayuda de la fagocitosis¹⁷⁰.

Aún cuando los fibroblastos sean definidos usualmente como un tipo celular uniforme, difieren entre ellos en sus funciones y sus reacciones frente a los FC. Así en el área de la lesión se pueden encontrar fibroblastos de diferentes edades, que difieren en sus funciones de secreción como también en el tipo de reacción frente a los FC¹⁷⁰.

V. 2. 4. Fase de Diferenciación y Remodelación

En esta fase comienza la maduración de las fibras de colágeno, la extensión de la lesión se reduce, disminuye la presencia vascular y el contenido de agua del tejido neoformado, que gana en consistencia, y se transforma finalmente en un tejido reparado¹⁷⁰.

Para que el tejido neoformado sea sustituido por una cicatriz son necesarios cambios en la matriz extracelular; el PDGF, el FGF y diversas citoquinas (IL-1, TNF- α) inducen la secreción de metaloproteinasas (MMP) por parte de los fibroblastos, macrófagos, neutrófilos, y algunas células epiteliales, que degradan el colágeno y otras proteínas de la matriz extracelular. El metabolismo del colágeno dentro de la zona lesionada mantiene un equilibrio entre síntesis y degradación¹⁷¹. La digestión del colágeno maduro resulta de la ruptura de una localización específica dentro de la triple hélice por la colagenasa intersticial (metaloproteinasa-1 de la matriz). La colagenasa intersticial es producida por diferentes tipos celulares, incluyendo células endoteliales, monocitos y fibroblastos. Se libera como una forma inactiva y es proteolizada por la plasmina o estromelisinina para generar la enzima activa.

Una vez formadas, las MMP son inhibidas rápidamente por sus inhibidores tisulares (TIMP). Los TIMP son importantes en la regulación de la actividad de la colagenasa. Las MMP y los TIMP son esenciales en la remodelación del tejido conjuntivo. El TGF- β inhibe las MMP, es un potente estimulador de la producción de procolágeno y TIMP-1 y bloquea la inducción de colagenasa por otras citoquinas. Así, el TGF- β tiene un papel fundamental en la inhibición de la colagenolisis, dirigiendo la deposición de colágeno y de otras proteínas de la matriz¹⁷¹. El resultado final de los procesos de síntesis y degradación es la remodelación.

La retracción de las fibras colágenas sólo desempeña un papel secundario en la reducción del espacio lesionado en algunos tejidos (heridas cutáneas). Los fibroblastos tienen una intervención mucho más decisiva en la contracción, ya que en ciertos tejidos una vez concluyen sus actividades de secreción se transforman en parte en fibrocitos (estado de reposo) y en parte en miofibroblastos, que al igual que las células musculares lisas contienen actomiosina, proteína muscular con capacidad para generar fuerzas contráctiles que hacen posible la contracción¹⁸³. Esta conversión es activada por FC tales como TGF- β ¹⁸³ y señales mecánicas relacionadas con las fuerzas que resisten la contracción. Al contraerse los miofibroblastos se tensan al mismo tiempo que las fibras colágenas y el tejido de reparación se retrae¹⁷⁰.

La contracción reduce la superficie de la herida, y hace que la zona de reparación incompleta se mantenga lo más reducida posible¹⁷⁰. *In vitro*, los fibroblastos se alinean a lo largo de las fibras de un gel de colágeno y promueven un proceso similar por un mecanismo energético-dependiente. El TGF- β puede aplicarse para estimular la

contracción de geles de colágeno *in vitro*. La vascularización de la herida decrece hasta que queda un tejido fibrótico acelular. Los factores implicados en esta transformación son menos conocidos¹⁷⁰.

Las diversas fuerzas de tensión que son ejercidas por los fibroblastos antes, durante y después de la contracción de la herida, han sido estudiadas en modelos de sistemas de geles de colágeno. Varios FC son potentes estimulantes de la contracción del gel conducida por los fibroblastos, y presumiblemente son señales para la contracción del tejido *in vivo*. Las señales que frenan potencialmente la contracción están siendo analizadas por liberación de las fuerzas mecánicas de los geles fijados desde su unión al sustrato, para simular la pérdida de resistencia que ocurre cuando el tejido se ha reparado. Unos minutos después de liberarse de las fuerzas de resistencia, los fibroblastos activan cAMP, que es la señal de transducción del camino que involucra la entrada de iones de Ca^{2+} extracelulares y la producción de ácido fosfatídico por la fosfolipasa D¹⁸⁴. Seguidamente, los receptores del PDGF y el EGF pierden sensibilidad, y las células retornan a un estado quiescente similar al que tenían antes de producirse la herida¹⁷⁰.

V. 3. TENDONES Y LIGAMENTOS

V. 3. 1 Tendones^{185,186}

Un tendón es un cordón fibroso cilíndrico o aplanado que une el músculo al hueso. Está compuesto por diferentes fibras tendinosas o fascículos separados por tabiques de tejido conectivo. El conjunto está recubierto por un revestimiento conectivo o peritenon.

Los tendones están formados por fibrillas colágenas embebidas en una matriz de proteoglicanos asociado a una relativa escasez de células de naturaleza fibroblástica.

Los fibroblastos, el tipo celular predominante en el tendón, están distribuidos en filas paralelas largas en los espacios entre los haces de colágeno. Los cuerpos celulares son alargados o fusiformes y están orientados en filas cuando son observados en un corte longitudinal al microscopio. Cuando son observados en una sección transversal, los bordes celulares aparecen oscuros y en forma de estrella entre los haces de colágeno. El citoplasma de los fibroblastos se tiñe de color oscuro con los colorantes básicos y contiene un centrosoma claro adyacente al núcleo redondeado y denso, también contiene un retículo endoplasmático abundante y un aparato de Golgi bien desarrollado. El núcleo contiene un nucleolo voluminoso. La tinción con orceína permite descubrir la existencia de fibras elásticas poco abundantes, dispersas entre las fibras de colágenas y paralelas a éstas.

Los fibroblastos son capaces de elaborar los cuatro principales componentes de la matriz extracelular: proteoglicanos, GP de estructura, elastina y colágeno.

El principal componente del tendón es el colágeno del tipo I (86% del peso seco). El colágeno contiene una elevada concentración de glicina (33%), prolina (15%) e hidroxiprolina (15%). Tres cadenas de colágeno se combinan, formando una molécula de colágeno. En el colágeno de tipo I hay 2 cadenas polipeptídicas idénticas llamadas α y una cadena diferente llamada cadena α_2 . Las tres cadenas están enrolladas en una triple hélice con giro a la derecha mantenida por puentes de hidrógeno y enlaces covalentes. La asociación de moléculas de colágeno en una unidad de baja energía hace que se requiera una gran cantidad de energía, y por lo tanto, de fuerza para separar estas moléculas, hecho que explica en parte la fuerza de la estructura. De esta forma las moléculas de colágeno se combinan para formar unidades de microfibrillas (5 moléculas de colágeno), subfibrillas y fibrillas. Estas unidades están ordenadas en haces estrechamente compactos, estrictamente paralelos, orientados en un patrón longitudinal específico. En este nivel los proteoglicanos y GP se asocian con el agua formando una matriz, uniendo las fibrillas para formar fascículos.

Los fascículos dentro del tendón se mantienen unidos por tejido conectivo laxo, el endotendón, que permite el movimiento longitudinal de los fascículos colágeno y soporta vasos sanguíneos, linfáticos y nervios.

Los tendones tienen típicamente fuerza tensil. En las articulaciones que soportan grandes cargas compresivas adoptan aspecto semejante al cartílago. Los tendones que se doblan demasiado (flexores de la mano) están encerrados en una vaina que actúa como polea y dirige al tendón. Los tendones que no poseen vaina, se mueven en línea recta y están rodeados por tejido conjuntivo areolar laxo llamado paratendón, que se continúa con el tendón.

Reciben su aporte sanguíneo de los vasos del perimisisio, de la inserción perióstica y del tejido circundante a través de vasos en el paratendón o mesotendón. Los tendones que están rodeados por paratendón se han llamado tendones vasculares, y los que están rodeados por bandas fibrosas, avasculares. La red vascular intratendinosa se dispone en forma de escalera con numerosas anastomosis. En la unión osteotendinosa las arterias son filiformes, sin trayecto fijo.

La presencia de terminaciones nerviosas en el tendón le permite intervenir en la contracción muscular.

Las propiedades de los tendones dependen de las propiedades mecánicas y de la arquitectura de las fibras de colágeno, así como de las fibras elásticas y de los proteoglicanos. En la curva carga-esfuerzo, la curva de deformación empieza con la región basal, en la cual el tendón se estira fácilmente, sin mucha fuerza. Esta región basal es pequeña y disminuye con la edad. Al aumentar el esfuerzo entramos en la región lineal o módulo elástico del tendón. Después de la región lineal, con grandes esfuerzos, la curva de deformación puede terminar abruptamente o dirigirse hacia abajo como resultado de cambios irreversibles (fracaso) o de la elongación permanente del tendón. Así para describir una curva de deformación debe definirse la pendiente de la región lineal (módulo elástico), la carga máxima (fuerza tensil final), el esfuerzo (esfuerzo final) y el área bajo la curva (densidad de energía del esfuerzo para llegar hasta la rotura).

Los tendones tienen propiedades viscoelásticas. Cuando se realiza una prueba cíclica en un tendón con carga y descarga repetida, la curva de deformación se desplaza a la

derecha, se vuelve menos rígido. La respuesta viscoelástica regula no sólo la tensión, sino también la elongación y, por lo tanto, las características de la contracción muscular. Se cree que estas características viscoelásticas son el resultado de las propiedades viscosas de la matriz interfibrilar de mucopolisacáridos (sustancia fundamental). Así, el tendón que contiene más colágeno y menos sustancia fundamental muestra menos efectos viscoelásticos y es más puramente elástico.

Los factores que afectan las propiedades biomecánicas de los tendones son la localización anatómica, el ejercicio y la edad.

La mayoría de los tendones pueden resistir fuerzas tensiles más grandes que las que pueden ejercer sus músculos o las que pueden resistir los huesos. Como resultado, las fracturas por avulsión y rotura de los tendones se producen con mucha mayor frecuencia en la unión musculotendinosa que en la parte media del tendón.

V. 3. 2 Ligamentos^{185,186}

Los ligamentos son microscópicamente y microscópicamente similares a los tendones.

Los ligamentos contienen un menor porcentaje de colágeno y un mayor porcentaje de sustancia fundamental que los tendones. El colágeno de los ligamentos también está distribuido más al azar que en los tendones. Los ligamentos son hipovasculares, existiendo una microvascularización uniforme que se origina en las zonas de inserción del ligamento. Tienen diversidad de terminaciones nerviosas especializadas (dolor, propicepción y nocicepción)

V. 4. ZONA DE UNIÓN TENDÓN-HUESO

Las fibras de inserción de un tendón o ligamento al hueso se dividen en superficiales y profundas. Las fibras superficiales se continúan con el periostio y las profundas se dirigen al hueso. El paso de tendón o ligamento a hueso se realiza de manera progresiva. En la zona de unión hueso-tendón encontramos de forma característica fibrocartílago, con un componente macromolecular abundante que es el colágeno tipo II^{187,188}. Microscópicamente está formada por 4 zonas: tendón, fibrocartílago no mineralizado, fibrocartílago mineralizado, y hueso¹⁸⁹. En las zonas no mineralizadas y mineralizadas del fibrocartílago, las células se disponen en hileras constituyendo columnas. La “**marca de agua**” (en inglés “*tidemark*”)¹⁹⁰ es una línea basófila que señala el límite externo de la zona mineralizada, y aparece entre el fibrocartílago mineralizado y no mineralizado. La progresión de las distintas capas histológicas permite una transmisión armónica de las fuerzas entre el músculo, de bajo módulo de elasticidad, y el hueso, de alto módulo de elasticidad, que puede alcanzar valores de hasta 1800 Kg. / cm² ¹¹⁴.

Existe una forma de inserción directa y otra indirecta. En la directa, la más frecuente, las fibras llegan al hueso de forma casi perpendicular, con variaciones, pero nunca con un ángulo agudo, y podemos ver las cuatro zonas anteriormente descritas. En la inserción indirecta las fibras llegan de forma casi paralela al hueso; las fibras superficiales se continúan con el periostio, y las profundas se insertan directamente en el hueso, fibras de Sharpey, con una transición menos definida¹⁸⁷.

La incorporación de un injerto tendinoso dentro de un túnel óseo es crucial para obtener un buen resultado tras la reconstrucción del LCA. Se logra por la formación de tejido fibrovascular, por crecimiento óseo interno y la formación de fibras de colágeno (fibras de Sharpey) entre tendón-hueso⁷⁹.

El proceso de cicatrización de un tendón tras una lesión aguda sigue un patrón similar al de la curación de otros tejidos blandos, aunque no se reproduce la histología normal de su inserción. El momento de aparición y desaparición de cada uno de estos elementos en condiciones normales, ha sido ya observado^{143,191,192}. Tras injertar un tendón en el interior de un túnel óseo, los fibroblastos intrínsecos del tendón sufren un proceso de necrosis isquémica, iniciándose un proceso biológico de reparación en el intervienen diversos elementos tisulares, celulares y moleculares¹⁹⁰⁻¹⁹². La respuesta inflamatoria proporciona la llegada de células extrínsecas al foco de lesión y a continuación tiene lugar una proliferación de células e incremento de la vascularización, con aumento de la síntesis de colágeno a medida que va madurando el tejido. Con la progresión del proceso de cicatrización del tendón en el interior del túnel óseo aparece una interfase fibrovascular y se inicia el crecimiento óseo. Aproximadamente entre las ocho y doce semanas de la lesión la interfase hueso-tendón estará más organizada, y las fibras de colágeno atraviesan la interfase, produciéndose una inserción indirecta de las fibras de colágeno del tendón en el hueso, orientadas en la dirección de tracción del tendón sobre el hueso, sin presentar ninguna ventaja sobre la reparación directa en el hueso cortical¹⁹³.

Sano et al.¹⁹² describieron la histología del proceso reparativo en conejos, tras realizar un injerto de fascia lata en una trinchera ósea en el húmero, determinando en el tiempo las siguientes etapas tras la agresión quirúrgica:

- Del 4º día a la 1ª semana postintervención, el injerto es rodeado de tejido de granulación y aparecen células mesenquimatosas.
- A la 2ª semana, el número de células mesenquimales aumenta y aparecen células de linaje óseo y algunos condrocitos.
- A la 3ª-4ª semanas, el número de condrocitos ha aumentado considerablemente, sin embargo, están desorganizados. Las fibras de colágeno no están ancladas en el hueso.
- A la 6ª semana, los condrocitos se organizan en columnas de forma gradual, perpendicularmente al hueso trabecular. El tejido de granulación con las células mesenquimales no es grande.
- A la 8ª semana, las columnas de fibrocartílago son parecidas a las existentes en la inserción tendinosa normal en el hueso. Además, ya se pueden observar fibras en continuidad entre injerto tendinoso y trabéculas óseas.

Existen evidencias que sugieren que la curación de un tendón en un hueso depende de factores como son el hueso donde se produce ó las fuerzas mecánicas en la interfase hueso-tendón. En este sentido, Grassman et al¹⁹⁴ demostraron que la incorporación y remodelado son más extensos y rápidos en un túnel óseo femoral que en un túnel óseo tibial; Yamakado et al¹⁹⁵ observaron que las fuerzas de tracción aumentan y promueven el proceso de cicatrización de un tendón en un túnel óseo, mientras que las fuerzas de compresión favorecen la formación de tejido condroide.

Aunque el colágeno tipo I constituye más del 95% del total de colágeno de un tendón en los individuos adultos normales, el estudio inmunohistoquímico de la zona de unión del tendón al hueso ha demostrado que es el colágeno tipo II el más abundante en el fibrocartílago de este área^{197,188,196}, tanto en el fibrocartílago mineralizado como en el no mineralizado. El colágeno tipo III puede visualizarse intensamente en el fibrocartílago no mineralizado, y el colágeno tipo I es escaso en cualquier zona de este fibrocartílago. Estos hallazgos, nos hacen suponer que el tendón injertado solo actúa como soporte o andamiaje en el proceso de cicatrización de esta zona, siendo el túnel óseo, el principal contribuyente como fuente de células.

Tras la inserción de un tendón en el interior de un túnel óseo, inmunohistoquímicamente, el colágeno tipo II no es observado en la unión hueso-tendón hasta después de la 2ª semana tras la cirugía concomitantemente con la aparición de los condrocitos. Posteriormente, entre la 3ª y la 4ª semana, el área positiva para el colágeno tipo II aumenta rápidamente, de forma proporcional al aumento del número de condrocitos. A partir de la 8ª semana la distribución del colágeno tipo II es similar a la del tendón normal^{190,191}.

V. 5. FACTORES DE CRECIMIENTO

Se denominan **Factores de Crecimiento (FC)** a aquel subgrupo de citoquinas que estimulan específicamente la proliferación celular controlando la evolución de los procesos de regeneración y reparación de los tejidos.

Los FC tienen capacidad para regular funciones celulares importantes como la proliferación, migración y diferenciación celular, y síntesis de la matriz extracelular, todos ellos esenciales en la reparación y regeneración tisular. Pero, como cualquier molécula con actividad biológica, no todo consiste en administrar un principio activo, ya que estos pueden ejercer una función moduladora positiva, no tener eficacia alguna o incluso desarrollar acciones negativas dependiendo del modo en que se verifique su uso; incluso un mismo FC puede desarrollar acciones contrapuestas modificando su concentración en el medio extracelular. Así se ha ido descubriendo su baja biodisponibilidad vía oral y transdérmica, su inestabilidad física y química, y su corta vida media biológica *in vivo*¹⁹⁷, que hace que sus efectos queden en su mayoría limitados al sitio de su liberación, aunque sabemos que su administración por vía sistémica puede no estar exenta de efectos indeseables¹⁸⁰.

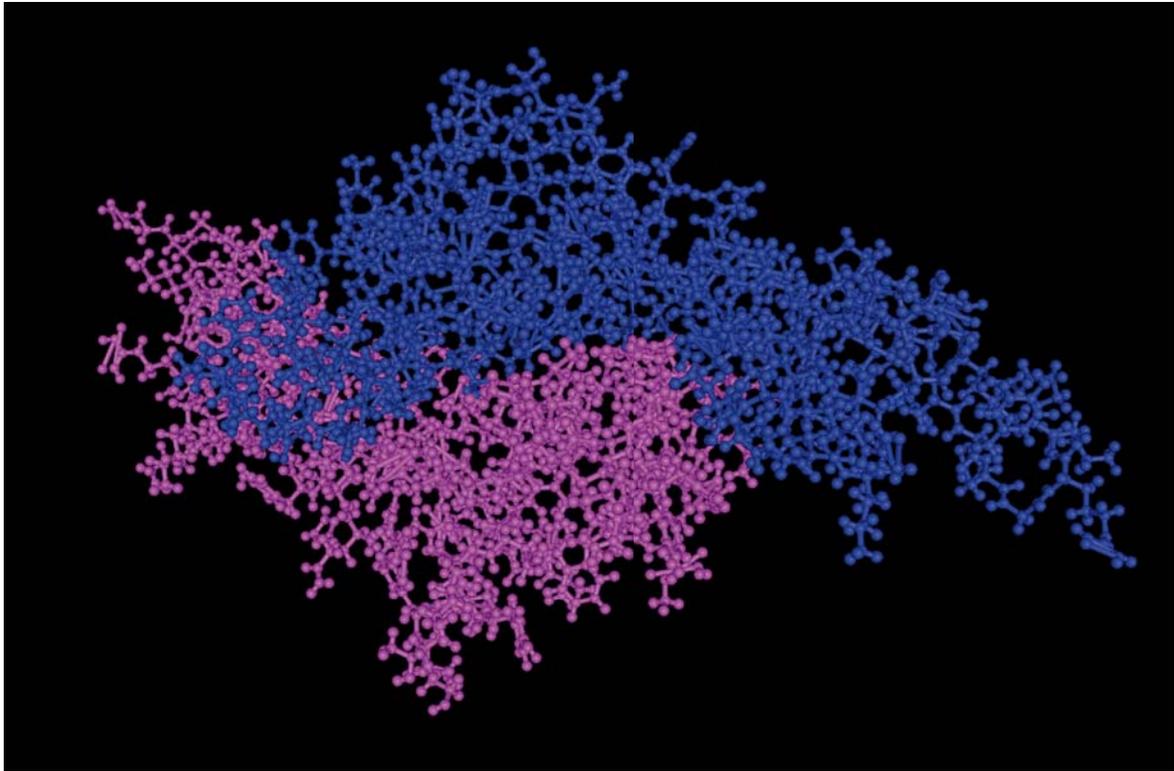


Figura 8: Esquema de la composición molecular de los Factores de Crecimiento (reproducido de Hinck AP et al. Transforming growth factor beta 1: three-dimensional structure in solution and comparison with the X-ray structure of transforming growth factor beta 2. Biochemistry 1996;35(26):8517-34; y modificado con el programa Cn3D)

Los FC son péptidos grandes o glicoproteínas (Figura 8) que estimulan la proliferación celular, solos o en asociación, actuando como mitógenos y afectando todos los aspectos del fenotipo celular. La interacción de estas proteínas con receptores celulares¹⁹⁸, da lugar a complejos mecanismos bioquímicos que introducen cambios en la expresión génica y producen una nueva síntesis proteica, provocando cambios en la actividad, metabolismo, crecimiento, proliferación y diferenciación celular¹⁸¹. (Figura 9).

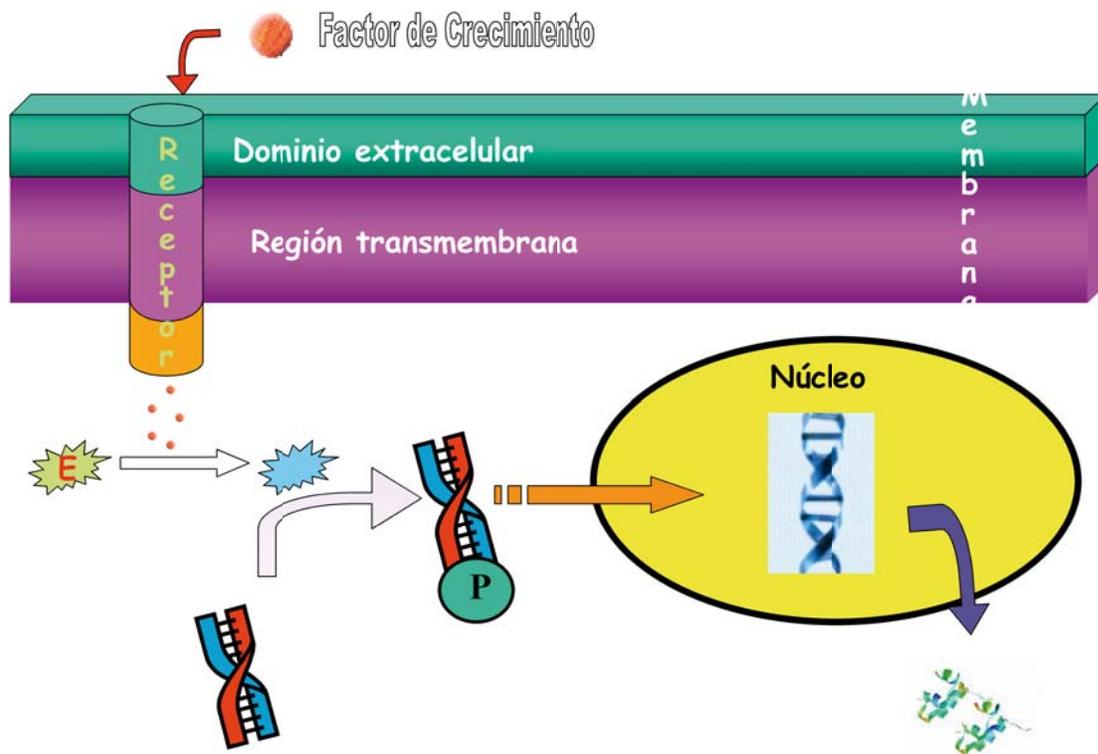


Figura 9: Los FC ejercen su acción a través de la interacción con receptores celulares específicos, activando enzimas intracelulares, que a su vez producen cambios en la expresión genética y síntesis proteica.

Trabajos de investigación demuestran que la expresión de los FC y de sus receptores se encuentra modulada después de una lesión tisular y las células de los tejidos en proceso de regeneración son sensibles a la interacción con los FC. La unión de un FC a su receptor celular conduce a largo plazo a cambios en la expresión genética y síntesis proteica que alteran el fenotipo de células individuales y tejidos, teniendo efectos profundos sobre el crecimiento y desarrollo completo del animal^{150,181}.

Así mismo, influyen en la cicatrización¹⁹⁹ por varios mecanismos, poseen actividades quimiotácticas atrayendo células inflamatorias y fibroblastos al foco, son mitógenos estimulando la proliferación celular, pueden estimular la angiogénesis, tienen efecto

importante en la producción y degradación de la matriz celular, e influyen en la producción de FC y citoquinas en las células vecinas.

Los factores más importantes para los objetivos del presente trabajo, son el Factor de Crecimiento Derivado de las Plaquetas (**PDGF**, *platelet derived growth factor*), el Factor de Crecimiento Fibroblástico (**FGF**, *fibroblastic growth factor*), el Factor de Crecimiento similar a la Insulina (**IGF-I** y **IGF-II** *insulin-like growth factor*), el Factor de Crecimiento Transformador beta (**TGF- β** , *transforming growth factor β*) y el Factor de Crecimiento Epidérmico (**EGF**, *factor epidermic growth factor*), este último tal vez el menos relevante desde el punto de vista de la reparación ósea, pero uno de los primeros en ser identificado.

V. 5. 1. Tipos de Factores de Crecimiento

☒ Factor de Crecimiento Derivado de las Plaquetas (PDGF).

Es una proteína dimérica compuesta por 2 subunidades A y B, que tienen una similitud del 60% en su estructura, y están codificadas por genes situados en cromosomas diferentes (gen A en el cromosoma 7 y B en el cromosoma 22). La combinación de estas dos cadenas originan tres formas: PDGF-AA, PDGF-BB, y PDGF-AB, cuyos receptores presentan distinta afinidad para cada dímero, y como ocurre con muchas de las citoquinas, varían sus efectos^{200,201}. Se le llamó así porque se encontró por primera vez

dentro de los gránulos α de las plaquetas²⁰², aunque también es sintetizado y secretado por macrófagos, células endoteliales²⁰³ y otros tipos celulares²⁰⁴.

Es el primer FC en actuar en proceso de cicatrización²⁰⁵. Su función principal es estimular la mitogénesis y la angiogénesis²⁰⁶. Es quimiotáctico para los fibroblastos, células del músculo liso, macrófagos, monocitos y neutrófilos²⁰⁷. Induce la proliferación de las células madre de la médula ósea, osteoblastos endóxicos, fibroblastos y células del músculo liso²⁰⁸. Favorece la formación de colágeno tipo I. Incrementa la regeneración ósea en conjunción con otros FC, tales como IGF-1 y TGF- β , ya que no tiene propiedades osteogénicas por sí mismo. Favorece la división de los osteoblastos e inhibe la aposición de matriz ósea, estimulando la reabsorción ósea. Produce la liberación secundaria de nuevos FC, como el IGF-1, al estimular la acción de los macrófagos²⁰⁹.

☒ **Factor de Crecimiento Transformador beta (TGF- β).**

El TGF- β tiene 6 receptores celulares, I a VI²¹⁰, y 3 isoformas: TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3. Su síntesis se debe a un gen localizado en el cromosoma 19.

Los TGF se llaman así porque se aislaron por primera vez en los tejidos transformados (sarcomas). Son una mezcla de dos proteínas TGF- α y TGF- β , y en la práctica constituyen una superfamilia de FC dentro de las cuales encontramos a las Proteínas Morfogenéticas Óseas²⁰³.

El TGF- β 1 es producido principalmente por las plaquetas, linfocitos y neutrófilos, mientras que el TGF- β 2 se encuentra principalmente en hueso, linfocitos, plaquetas y neutrófilos²¹¹.

En la matriz ósea son abundantes en forma latente y al activarse influyen en la cicatrización y eventualmente en la remodelación ósea²¹².

El **TGF-β** tiene dos efectos sobre las células indiferenciadas, a altas dosis suprime la proliferación y diferenciación osteoblástica, mientras que a bajas concentraciones no. Es un potente osteogénico²¹³, parece ser quimiotáctico y mitógeno para los precursores de los osteoblastos y condroblastos, e inhibidor de los osteoclastos, disminuyendo la reabsorción ósea y estimulando la formación ósea. Estimula a los fibroblastos, favorece la deposición de colágeno e inhibe su degradación al destruir a sus proteasas²¹⁴. También tiene una importante función en la regulación y modulación la respuesta inflamatoria²¹⁵, e induce la angiogénesis²¹⁶.

☒ **Factor de crecimiento similar a la insulina (IGF I y II).**

Grupo de potentes FC que presentan unas proteínas de unión que incrementan o disminuyen su acción²¹⁷. Son producidos por las plaquetas, células óseas, así como otros tipos celulares^{210,217}.

El IGF-I actúa sobre el crecimiento, especialmente el secundario, característico de la adolescencia (el efecto anabólico de la hormona de crecimiento se produciría por incremento de los niveles de IGF-I)²¹⁸. Por el contrario, el IGF-II actuaría principalmente en el crecimiento fetal²¹⁹.

Estudios en animales han sugerido que pueden acelerar y mejorar la cicatrización de lesiones tendinosas y musculares^{220,221}. En el tejido óseo estimulan la síntesis proteica²²², así como de colágeno tipo I y matriz ósea por los osteoblastos^{215,217}. Asociada al PDGF o FGF estimulan la proliferación de múltiples tipos celulares, especialmente los

fibroblastos²²⁰; disminuye la degradación del colágeno²²³; activa la mitogénesis de los precursores de los osteoblastos²¹⁷ y posee un gran potencial osteogénico²¹⁰, así como estimulador de la regeneración ósea²¹⁵.

☒ **Factor de crecimiento fibroblástico (FGF).**

Son un grupo de al menos 9 isoformas, de los cuales los mejor conocidos son el FGF ácido (aFGF o FGF-1) y el FGF básico (bFGF o FGF-2)²¹⁴. El gen que codifica al factor básico está localizado en el cromosoma 4 y el ácido en el 5. Solo poseen un único receptor celular. Son producidos por fibroblastos (principalmente), macrófagos, osteoblastos, plaquetas, células endoteliales y matriz ósea.

La forma básica es más potente que la ácida. Son mitógenos generales²¹⁷, con potente potencial osteogénico²¹⁰ y capacidad de estimular la replicación de osteoblastos²¹⁰, fibroblastos y sus células precursoras²¹⁷, así como estimular la angiogénesis^{214,224}.

☒ **Factor de crecimiento epidérmico (EGF)**

Posee una gran similitud con el TGF- α , incluso se unen al mismo receptor. Es producido principalmente en las glándulas salivales, aunque también por las plaquetas, fibroblastos y células endoteliales. Tiene acción mitogénica, y favorece la migración y diferenciación de células epiteliales, fibroblastos, células renales, células gliales y también de osteoblastos, aunque inhibe la síntesis de la matriz osteoide.

V. 5. 2. Mecanismo de Acción de los Factores de Crecimiento

Inicialmente, se descubrió que los FC peptídicos eran capaces de estimular la mitosis continua de células quiescentes, en un medio nutricionalmente completo que carecía de suero¹⁵⁰.

Los FC son los mediadores del crecimiento y reparación celular, fisiológico y patológico, que incluye los procesos de embriogénesis, reparación tisular y carcinogénesis. Una interrelación compleja de lazos de retroalimentación ó *feedback* surge en el medioambiente tisular, donde los FC se regulan a sí mismos durante el crecimiento tisular¹⁹⁹.

Los FC son producidos localmente a nivel del tejido lesionado, y sistemáticamente desde diferentes fuentes, siendo sintetizados por muchos tipos celulares que intervienen en la reparación de los tejidos.

Actúan sobre la célula productora de diversas formas¹⁵⁰: endocrina, paracrina, yuxtacrina, autocrina e intracrina. Un modo de acción **endocrino** acontece cuando ejerce su acción sobre células distantes a través del torrente sanguíneo. El modo de acción **paracrina** ocurre cuando un FC que es secretado por una célula, tiene su efecto sobre las células adyacentes. El modo de acción **yuxtacrino** es similar, aunque el FC cuando ejerce su efecto sobre las células adyacentes permanece unido a la membrana celular de la célula que lo secretó o en la matriz extracelular. Las acciones **autocrinas** están mediadas por FC que actúan sobre la propia célula de origen, tras su secreción al medio extracelular¹⁸¹. Una variación de la acción autocrina ha sido denominada **intracrina** y fue descrita por primera vez en una variante oncogénica del factor de crecimiento derivado

de las plaquetas (PDGF) denominada α -TGF β . La acción intracrina ocurre dentro de la célula de origen, y es así independiente de la secreción del TGF β ¹⁸¹.

Un único TGF β puede dar lugar a importantes y diferentes respuestas, inhibitorias y/o estimuladoras, dependiendo de sus interacciones con otros factores y con el medio ambiente celular donde son liberados. Los TGF β liberados desde macrófagos, neutrófilos, linfocitos, plaquetas y fibroblastos se unen a células diana por una vía específica a través de los receptores de superficie celulares, induciendo a las células a migrar, dividirse o producir otras proteínas o factores requeridos para la reparación tisular.

Los TGF β tienen también efectos sobre la migración, contractibilidad y diferenciación celular, que son tan esenciales para la reparación de los tejidos como para el crecimiento. Además, los TGF β también tienen efectos sobre la síntesis de la matriz extracelular. Estas propiedades demostradas *in vitro* llevaron a la conclusión de que los TGF β desempeñan un importante papel en la reparación tisular¹⁵⁰.

Algunas hormonas peptídicas cumplen funciones específicas en el proceso de reparación. Las hormonas regulan el crecimiento y desarrollo de células y tejidos, pudiendo ser clasificadas en este sentido como TGF β . Las hormonas son producidas en glándulas endocrinas, secretadas en la corriente sanguínea y actúan en localizaciones distantes a su lugar de síntesis. Aunque este modo de actuación endocrino es compartido por algunos TGF β , como por ejemplo el IGF, existen diferencias específicas entre estos dos tipos de moléculas. Los TGF β son sintetizados por muchos tejidos del cuerpo, y por lo tanto, no son exclusivamente sintetizados por unas glándulas específicas. Los TGF β son proteínas, mientras

que las hormonas pueden ser proteínas, péptidos pequeños o derivados lipídicos. Los FC también emplean modos de acción que los distinguen de las hormonas, denominados paracrino, yuxtacrino y autocrino.

Las citoquinas son proteínas producidas por linfocitos, macrófagos y precursores de las células sanguíneas, y regulan la función del sistema inmune y hematopoyético, con un modo de acción similar al de los FC tradicionales.

Los FC también pueden interactuar con otras células asociadas o proteínas transportadoras secretadas, que modulan la disponibilidad o estabilidad de los FC¹⁵⁰.

Los **efectos de los FC** están mediados por la activación de receptores celulares específicos¹⁵⁰. Los receptores son módulos de proteínas transmembrana que pueden unir FC a sus dominios extracelulares de alta afinidad y especificidad, transmitiendo la información generada por la unión para producir cambios intracelulares. Los receptores de los FC constan de por lo menos, tres dominios: una región extracelular que se une al FC con alta afinidad y especificidad, un segmento intramembrana y uno o más dominios intracelulares que interactúan con señales moleculares dentro de la célula.

Los receptores ejercen su acción uniéndose a enzimas intracelulares y activándolas. A excepción del TGF- β , todos los receptores de los FC estudiados tienen actividad sobre la tirosina kinasa¹⁷², que fosforila proteínas citoplasmáticas, algunas de las cuales permanecen en el citoplasma y otras pasan al núcleo donde causan una activación genética¹⁹⁹. Los receptores de la TGF- β y moléculas relacionadas fosforilan sustratos de serina y treonina en lugar de tirosina¹⁷⁶.

Varios principios generales gobiernan los pasos a través de los cuales los FC activan sus receptores, aunque hay detalles específicos que difieren para cada combinación FC-receptor. La unión de un FC al dominio extracelular de su receptor, primero conduce a una dimerización u oligomerización del receptor¹⁸¹. La dimerización de los receptores sucede bien porque el FC existe como un dímero y se une a dos receptores (TGF- β , PDGF, factor de crecimiento neurotrófico [NGF]), o porque un FC monomérico tenga dos sitios de unión para su receptor (EGF), o bien porque el receptor sea un dímero preformado (IGF-1). Los cambios conformacionales inducidos por la unión al ligando activan el dominio intracelular kinasa del receptor, lo cual conduce secuencialmente a una fosforilación del receptor, por un mecanismo de transfosforilación, y entonces a la fosforilación de otros sustratos. La autofosforilación, particularmente sobre residuos de tirosina, crea una serie de sitios cercenados para otras proteínas intracelulares que contienen módulos denominados dominios SH2, por su similitud con una región de aproximadamente 100 aminoácidos que fue primero identificada en el oncogén celular *c-src*²²⁶. Posteriormente se ha identificado otra clase de lugar de unión a la fosfotirosina, denominado dominio PTB. Aunque estructuralmente es distinto del dominio SH2, funcionalmente es equivalente para mediar interacciones entre una tirosina fosforilada y una proteína de señalización. Así, los receptores de FC activados con múltiples tirosinas fosforiladas en diferentes contextos de aminoácidos, vuelven al punto focal para la agregación intracelular transitoria de muchas proteínas que contienen SH2- o PTB-. Estas proteínas incluyen una variedad de intermediarios en sendas de transducción de señal, con los últimos efectos amplificados y diversificados respecto a la señal inicial inducida por la unión del FC a su receptor²²⁷.

En el contexto de las acciones sobre el núcleo de los FC, los cambios a largo plazo que se dan en las células inducidas por FC son secundarios a alteraciones en la expresión de genes. Estos cambios no son sino un resultado de las múltiples rutas de señales inducidas después de la unión de proteínas sobre el receptor activado. Así, hay sendas que reflejan una respuesta primaria a los FC, de la que dependen una serie de interacciones proteína-proteína y pasos enzimáticos, en los que intervienen miembros de la familia MAPK (proteína activada mitogénica), que no requieren una nueva síntesis de proteínas celulares. La proteína c-fos se combina con c-jun como componentes de la proteína-1 activadora del factor de transcripción, el cual a su vez, regula la actividad de una variedad de genes²²⁸. Así, la expresión de genes y la biosíntesis de proteínas están alteradas después de ser estimuladas las señales del FC.

Una senda relacionada mediada por la activación de receptores de FC, conduce a la estimulación de otros miembros de la familia MAPK denominados kinasa c-jun N-terminal (JNK). Las JNK fosforilan c-jun sobre dos residuos de serina, que son críticos para su activación como un factor de transcripción²²⁹. Así, c-jun y c-fos pueden ser inducidos a través de la ruta de señales estimuladas por el FC. Hay también otras cascadas de MAPK con diferentes efectos sobre el núcleo que son activadas por los receptores de los FC²²⁸.

En resumen, la acción de los FC a través de diversas rutas tiene una gran repercusión en la biología de la célula, y por ende, en la del tejido donde se localiza.

V. 6. **PROTEÍNAS MORFOGENÉTICAS ÓSEAS**

Se denominan **Proteínas Morfogenéticas Óseas (PMO)** (*Bone Morphogenetic Protein–BMP* en inglés) aquella subfamilia del TGF celular, también denominadas morfógenos, capaces de iniciar el desarrollo de tejidos y sistemas orgánicos estimulando a células indiferenciadas para convertirlas fenotípicamente en células de las líneas osteoblástica y condroblástica.

La secuencia histórica que llevó al descubrimiento de las PMO se inició con el estudio de la osteogénesis y calcificación heterotópica. Levander²³⁰, en 1938, planteó la existencia de un factor extraíble del hueso. Lacroix²³¹ (1945) describió la existencia de un factor obtenible del cartílago que llamó osteogenina. Urist²³² (1960) indujo hueso heterotópico implantando extractos proteicos que denominó proteínas morfogenéticas óseas. Wang y Wozney²³³ (1988) aislaron las formas monoméricas; a través de clones recombinantes para cada una, obtuvieron PMO 1, 2A y 3 humanas y revelaron sus características bioquímicas y biológicas, incluyendo sus secuencias de aminoácidos. Wozney²³⁴ (1992) produjo PMO-2 recombinante por clonación, lo cual permitió acceder a cantidades significativas más fácilmente accesibles, permitiendo en consecuencia ampliar significativamente las posibilidades de investigación. Posteriormente, se aislaron y caracterizaron cinco PMO más (PMO 4 a 8), la 2B se red denominó 4 y la 2A, 2. Song²³⁵ (1995) identificó la PMO-9 y posteriormente las PMO 10 a 15; con todo, sólo las siete primeras tienen capacidad osteoinductiva.

Las PMO (PMO-1, PMO-2, PMO-3 u osteogenina, PMO-4, PMO-5, PMO-6, PMO-7, PMO-8 y PMO-9) tienen capacidad para actuar sobre células indiferenciadas o pluripotenciales e inducir su diferenciación hacia condroblastos y osteoblastos. Si se aplican sobre condrocitos y osteocitos adultos refuerzan su expresión fenotípica, y además, en los osteocitos activan la mitogénesis.

Las PMO-2 a 9 forman por sí mismas una subfamilia claramente identificable dentro de la superfamilia TGF, basándose en sus secuencias de aminoácidos, y por sus actividades biológicas bien diferenciadas. La PMO-1, por su estructura, no sólo puede ser clasificada dentro de la superfamilia TGF, sino que recientemente ha sido identificada como una procolágeno-C-proteinasa^{200,217}.

Debe considerarse, además, que las PMO son activas en forma dimérica, por lo que la posibilidad de existencia de homo y heterodímeros amplía el espectro de posibles acciones biológicas diferentes para esta familia de proteínas²¹⁷. A diferencia de los FC, que no son capaces de inducir formación ósea ectópica y necesitan la preexistencia del tipo celular que se pretende estimular o sus precursores, modulando o estimulando células osteoprogenitoras preexistentes, las PMO no sólo tienen mayor efecto sobre la dirección de diferenciación celular (excepto la PMO-1, que no induce formación ósea, pero podría tener una actividad sinérgica con otras PMO), sino que también actúan como signos de posición y proveen de la información necesaria para la formación del patrón. Por ello se deben denominar, apropiadamente, antes que inductores, **morfógenos**, ya que si bien ambos proveen de señal de posición, sólo éstos especifican el patrón; tal vez las PMO actúen como verdaderos morfógenos durante el período embrionario y sólo como inductores en el adulto.

La incorporación del injerto óseo es un proceso secuencial. Las células madre indiferenciadas y FC están, en mayor o menor medida, en todos los injertos aunque son más fáciles de encontrar en el injerto autólogo fresco. Los FC y las proteínas contenidas en los injertos estimulan la migración y fijación de las células en el lugar de la reparación, la proliferación y la síntesis celular, y la diferenciación condro y osteoblástica. Hay tres tipos de factores que afectan la formación ósea, los factores mitogénicos, los que inducen la diferenciación de células hacia la línea osteoblástica y los que aumentan la función diferenciadora de los osteoblastos. Las PMO son los únicos factores conocidos que estimulan la diferenciación de las células madres mesenquimales en las líneas osteoblástica y condroblástica.

Tres o cinco días después de colocar un injerto aparece el blastema de reparación, en la unión entre el hueso receptor y el injerto, con los vasos y células, fibroblastos y macrófagos, además de las fibras de colágeno que constituyen el substrato clave para las células indiferenciadas sobre las que actúan los factores de crecimiento (TGF β ; FGFb; PDGF y PMO). Por su parte, los FC liberados de los gránulos α de las plaquetas estimulan a los leucocitos polimorfonucleares, linfocitos, monocitos y macrófagos. Simultáneamente la sangre extravasada del hueso receptor se coagula y forma el hematoma que por la acción de las plaquetas efectúa la hemostasia liberando PDGF; TGF β y FGF-b.

V. 7. PLASMA RICO EN PLAQUETAS

Los pegamentos de fibrina se vienen utilizando desde hace dos décadas en la Cirugía Oral y Máxilofacial con el fin de promover una función osteoconductor. Posteriormente se observó que además del efecto osteoconductor que aportaba la fibrina, existía un efecto beneficioso para la curación ósea derivado de los FC existentes²¹⁶. Su aplicación en Cirugía Ortopédica y Traumatología comenzó a principios de esta década junto a injertos óseos con el fin de favorecer la fusión espinal y la consolidación de fracturas. Aunque su utilización es todavía discutida, su potencial mejoría del proceso de cicatrización^{236,237} y el aumento del número de estudios que confirman sus beneficios^{238,239}, ha hecho que su aplicación siga creciendo.

El PRP se define como una fracción de plasma de sangre autóloga con una concentración de plaquetas superior a la existente en la sangre normal. Aunque se ha sugerido que el PRP debe contener una concentración de plaquetas de al menos 4 veces la concentración plasmática normal (es decir más de 1 millón de plaquetas por ml)²⁴⁰, su eficacia clínica ha sido demostrada con menores concentraciones^{241,242}.

En condiciones normales, tras una lesión tisular, las plaquetas forman un coágulo estable y posteriormente liberan su contenido de FC, acumulados en sus gránulos α . Este coágulo natural está formado en un 95% por hematíes, un 4% de plaquetas, y un 1% de leucocitos; sin embargo, el análisis de un coágulo de PRP muestra una composición diferente, existiendo un 95% de plaquetas, un 4% de hematíes y un 1% de leucocitos. El

efecto de los leucocitos presentes en el PRP también es causa de polémica, pues a pesar de ser un elemento habitual del área de la lesión, *in vitro* se ha demostrado que las metaloproteinasas y los radicales de oxígeno liberados por los neutrófilos pueden exacerbar las lesiones de los tejidos existentes²⁴³. Otros autores también desaconsejan su presencia porque pueden interferir la agregación plaquetaria²⁴⁴.

El uso tópico de los geles formados tras la agregación plaquetaria promueve el aporte exógeno e *in situ* de FC. Una vez depositadas las plaquetas comienza la secreción activa de los FC presintetizados en los primeros 10 minutos desde su activación, liberando el 95% de su contenido dentro de la 1ª hora, y posteriormente seguirá la liberación mientras las plaquetas sean viables (aproximadamente 7 días)²⁴⁰.

Una ventaja teórica de la utilización del PRP respecto a la de FC purificados individuales es la aplicación de distintos FC y en proporciones fisiológicas, consiguiendo un equilibrio natural de los procesos biológicos²⁴⁰. Esto distingue al PRP de los FC recombinantes, los cuales se aplican en solitario y en dosis habitualmente suprafisiológicas. Esta combinación fisiológica de FC ha demostrado ser más efectiva que la acción independiente de cada uno ellos por separado en el proceso de curación²⁴⁵⁻²⁴⁷.

V. 7. 1. Sistemas de Obtención del Plasma Rico en Plaquetas

Existen diversos sistemas comercializados para la obtención de FC a partir de plasma rico en plaquetas. Estos, obtienen los concentrados plaquetarios (PRP) mediante dos

procedimientos físicos: separación gravitacional (centrifugación) y filtración. Uno de los problemas de estos procesos de separación es la aparición de fragmentación y lisis plaquetar, que conlleva una liberación precoz de FC y citoquinas, comprometiendo la bioactividad del PRP^{248,249}.

La concentración de plaquetas está aumentada hasta 8 veces en la fracción plasmática rica en plaquetas (PRP) respecto del recuento en sangre total, incrementándose consecuentemente la concentración de FC con el aumento del número de plaquetas²⁴².

López-Oliva et al²⁵⁰ revisaron 4 sistemas frecuentemente utilizados para la obtención de PRP y concluyen que las diferencias entre ellos estriban en pequeños matices, pero que todos ellos comparten la eficacia a la hora de obtener estos concentrados plaquetarios. De todas formas, sabemos que el contenido de estos FC en las plaquetas, recuento plaquetar, recuento de leucocitos... puede variar de un individuo a otro²⁴², por lo que se necesitan nuevas investigaciones que precisen el número óptimo de plaquetas necesarias para obtener un efecto biológico determinado^{251,252}.

La recogida del PRP debe realizarse antes de la cirugía, algunos consideran que incluso antes de inhalar agentes anestésicos, para evitar la activación plaquetar. Antes de su aplicación, el concentrado debe ser activado por la adición de trombina o cloruro cálcico al 10%. La liberación del PRP sin activador exógeno también puede ser realizada, produciéndose una lenta activación plaquetar al ser expuestas a derivados del colágeno del tendón^{253,254}.

V. 7. 2. Mecanismo de Acción del Plasma Rico en Plaquetas

Los FC contenidos en diferentes tipos celulares y en la matriz extracelular (MEC), regulan diversos procesos celulares, como son la mitogénesis, quimiotaxis, diferenciación y el metabolismo celular²¹⁶. Numerosos estudios han mostrado que el PDGF, VEGF, TGF- β , bFGF e IGF-1 se hallan en el PRP y su aplicación local es usada para promover la curación de los tejidos²⁵⁵. Los FC liberados de las plaquetas activadas inician y modulan la curación de lesiones tanto óseas como de partes blandas²⁴², induciendo una diferenciación celular acelerada y produciendo un tejido bien organizado, incluso en lesiones que previamente eran consideradas como intratables²⁵⁶.

V. 7. 3. Problemas y Limitaciones en los Sistemas de Obtención del Plasma Rico en Plaquetas

No se han descrito problemas de salud tras la utilización de esta técnica, aunque si existen algunos factores limitantes, tales como discrasias sanguíneas (anemias, hematocrito elevado, trombocitopenia, hipofibrinogenemia), tratamientos con anticoagulantes, infecciones activas, tumores, embarazo y motivos religiosos.

Una potencial complicación local de la administración de factores de crecimiento es la inducción de una fibrosis excesiva en el tejido de cicatrización. Con el fin de abordar este

posible problema se están estudiando distintas sustancias que podrían limitar este efecto²⁵⁷.

El riesgo de aparición de alergias o de la introducción de una infección se considera insignificante si la técnica se realiza en condiciones estériles al tratarse de una muestra autóloga²⁵⁷⁻²⁵⁹. Incluso se ha sugerido que el PRP puede tener un efecto antimicrobiano²⁶⁰.

Las técnicas de producción de PRP iniciales utilizaron trombina bovina para la activación plaquetar²⁴⁰, que contiene contaminantes como el factor Va de la especie bovina, lo que dió lugar a la aparición de coagulopatías²⁵⁸, y por esta razón dejó de utilizarse.

V. 7. 4. Efectos Conocidos de los Factores de Crecimiento Obtenidos del Plasma Rico en Plaquetas

a) En el hueso

Los FC pueden estimular la formación y curación ósea, y por ello son buenos candidatos para su uso en cirugía ortopédica. En la regeneración ósea, PDGF y TGF- β son los factores más importantes²¹⁶.

Marx et al²⁶¹ observaron la aceleración de la reparación ósea tras la administración de PRP como fuente de altas concentraciones de PDGF, TGF- β y otros FC. Slater et al²⁴⁷, usaron PRP para estimular la actividad proliferativa y funcional de células similares a osteoblastos fetales humanos. Zhang et al²⁶² usando compuestos de biocerámicas porosos

con PRP para reparar defectos óseos en conejos, demuestran que la adición de los mismos acelera la formación de hueso nuevo y la curación ósea a las 12 semanas.

En la práctica diaria se han descrito diversos efectos beneficiosos tras la administración de FC plaquetarios. Así, se ha visto un descenso en la necesidad de drenajes e incidencia de complicaciones (reducción en la tasa de infecciones) y en el número de días de hospitalización en pacientes de cirugía plástica. Se han descrito también ciertas propiedades antiinflamatorias con reducción del edema y equimosis, y hemostáticas, siendo efectivo para detener el sangrado difuso capilar en las heridas. En heridas de extremidades inferiores se demostró una correlación directa entre la cicatrización de las mismas y el inicio de la terapia con estos FC²⁶²⁻²⁶⁴.

Esta técnica está siendo usada en pacientes que son sometidos a una fusión espinal lumbar. Tras observar regeneración ósea alrededor de los implantes de titanio, se hipotetiza que las plaquetas liberan múltiples FC, los cuales poseen efectos quimiotácticos y mitogénicos sobre las células madre mesenquimales y sobre los osteoblastos, acelerando con ello la curación ósea²⁶⁵.

En cirugía de rodilla la inyección de PRP autólogo puede facilitar la reconstrucción del LCA²⁶⁶. Varios investigadores han evaluado los resultados de la utilización de PRP en la cicatrización del injerto tendinoso dentro de los túneles óseos tras la reconstrucción del LCA. Orrego et al²¹⁸ evaluaron mediante la intensidad de la señal de RNM el proceso de cicatrización del injerto en 108 pacientes aplicando PRP y pastillas óseas autólogas. El uso de PRP produjo un efecto potenciador del proceso de cicatrización del injerto en comparación con el grupo control, sin embargo, a los 6 meses, el grupo con PRP no

demostró un efecto significativo en la interfase osteo-ligamentosa o en el ensanchamiento del túnel. Silva y Sampaio²⁶⁷ tampoco encontraron diferencias en la intensidad de la señal de la RNM en la interfase hueso-tendón a los 3 meses de la cirugía en comparación con el grupo control.

Sánchez et al²⁶⁸ utilizaron el PRP en la fijación de un fragmento de cartílago articular grande (>2 cm) con una aguja de Kirschner en un joven jugador de fútbol, obteniendo un excelente resultado a pesar del pobre pronóstico inicial, volviendo al ritmo de competición previo y evidenciando en la RNM una consolidación completa de la lesión a las 18 semanas.

Señalar que el uso del PRP puede ayudar a favorecer las fusiones, pero no elimina la necesidad de la realización de una técnica quirúrgica meticulosa o el uso de un injerto estructural cuando sea necesario^{269,270}. Además se ha observado que la eficacia del PRP puede verse modificada e incluso inhibida dependiendo del vehículo de administración utilizado^{237,271}.

b) En **tendones y músculos**

La investigación clínica en lesiones musculares y tendinosas es limitada pero los estudios existentes sugieren que el PRP puede ser útil para mejorar el proceso de cicatrización de tendones y ligamentos *in vivo*^{257,259,272,273}.

Anitua et al, estudiando el efecto del PRP sobre células de tendón cultivado, encuentran un incremento en la proliferación de estas células, las cuales, además, sintetizan VEGF, y éste, en un sistema *in vivo*, presumiblemente promoverá la neoangiogénesis²⁷⁴. Además,

Kajikawa et al²⁷⁵ al inyectar PRP han observado una la movilización de derivados celulares circulantes hacia la zona de la inyección y la estimulación de la producción de colágeno tipo I.

Virchenko y Aspenberg²⁷⁶ observaron una mayor regeneración inicial de lesiones del tendón de Aquiles en ratas al ser tratadas con PRP y un aumento del 30% de su resistencia a la tracción tras la 1ª semana. Los autores concluyeron que el PRP puede acelerar la fase de inflamación inicial de la reparación del tendón, haciendo a las células más receptivas a una carga mecánica precoz.

En el músculo esquelético, se ha demostrado que los factores de crecimiento del PRP regulan la fase de inflamación y mejoran la curación. Lefaucheur et²⁷⁷ examinaron lesiones musculares en ratón con anticuerpos para neutralizar al bFGF, IGF-1 y TGF- β 1, observando una atenuación de la respuesta de curación, lo que demuestra que la eliminación de estos factores conduce a pobres procesos de reparación.

Sánchez et al²⁷⁸ aplicaron el PRP tras la cirugía de reparación de una lesión del tendón de Aquiles de un jugador de baloncesto y otro de fútbol profesional, retornando a una actividad deportiva completa a las 14 semanas de la cirugía.

Mishra et al²⁵³ investigaron el uso del PRP para el tratamiento de epicondilitis. Realizaron un estudio prospectivo, no ciego, sobre dos grupos de pacientes; el primer grupo se componía de 15 pacientes con epicondilitis crónica (15 meses como media) donde había fracasado el tratamiento conservador y el segundo grupo de 5 pacientes de características similares. En el primer grupo se realizó una única inyección de PRP (GPS [Gravitational plaquetar separation] III Sistema, Biomet, Warsaw, IN), y el segundo grupo recibió una sola inyección de bupivacaína. A las 4 semanas después de la inyección, los pacientes tratados

con PRP presentaban una mejoría media de un 46% en la puntuación de la escala visual analógica del dolor (EVA), frente a la mejoría del 17% en el grupo control. A las 8 semanas, existía un 60% de mejoría en el EVA y del 54% en el Mayo Elbow Performance en el grupo tratado con PRP, frente al 16% de mejoría del EVA y del 14% en el Mayo Elbow Performance del grupo control, diferencias estadísticamente significativas. A partir de este momento, tres de los cinco casos del grupo control abandonaron el estudio para realizar un tratamiento alternativo. A los 6 meses la puntuación del dolor se redujo un 81% en el grupo de tratamiento, y al concluir el seguimiento (2 años) existía una mejoría del 93% del dolor, y el 94% de los pacientes regresaron al deporte o trabajo en el grupo con PRP.

Estos autores²⁷⁹ también han informado sobre los resultados preliminares de un estudio aleatorio, doble ciego, de 100 pacientes divididos en 2 grupos de tratamiento, uno recibió una inyección de PRP y el otro de cortisona. El grupo tratado con PRP obtuvo mayores mejorías del EVA y del Disabilities of the Arm, Shoulder, and Hand questionnaire score a los 6 meses de seguimiento.

Kon et al²⁸⁰ han publicado recientemente los resultados de 20 atletas afectados de tendinosis patelar crónica tratados con tres inyecciones de PRP intratendinosas realizadas en intervalos de 15 días. Todos los participantes presentaron una mejoría en los resultados de la EVA, Medical Outcomes Study SF-36 y Tegner activity scores a los 6 meses de seguimiento. El 80% de los participantes estaban satisfechos, y el 70% mostró una completa o marcada recuperación funcional.

En la serie presentada por Barrett y Erredge²⁸¹, los autores demuestran que el PRP puede ser inyectado de forma segura bajo control por ultrasonidos en el tratamiento de la fascitis

plantar. Siete de nueve pacientes presentaron una resolución completa del dolor al 1º año de seguimiento.

Solo existe un informe clínico en la actualidad que evalúa los resultados del PRP en las lesiones musculares. Sánchez et al evaluaron de forma prospectiva el resultado de la aplicación de PRP mediante inyección guiada por ultrasonidos en 22 lesiones musculares de 20 atletas profesionales con pequeñas lesiones musculares, observando una recuperación funcional en la mitad del tiempo previsto, sin evidenciar una fibrosis excesiva²⁸².

En un estudio retrospectivo (nivel IV), Sánchez et al²⁸³ administraron de forma intra-articular inyecciones de PRP a 30 de pacientes de forma semanal durante 3 semanas y compararon los resultados con los de 30 pacientes que se les había administrado inyecciones de ácido hialurónico. Los autores observaron la mejora de los Index Western Ontario y McMaster Universities Osteoarthritis y puntuaciones del dolor al utilizar PRP a las 5 semanas de seguimiento.

Varios estudios describen la utilización intraoperatoria del PRP.

- a) Un estudio caso-control realizado por Sánchez et al²⁴¹ evalúa a 12 atletas sometidos a una reparación quirúrgica de una lesión aguda de tendón de Aquiles. A 6 pacientes se les aplicó PRP (SCLP [Plasma Rico en Factores de Crecimiento] System II, BTI [Instituto de Biotecnología], Victoria, España) en el sitio de la reparación. Este grupo presentó una restauración del balance articular (7 frente a 11 semanas, $P = 0,025$), un retorno a la carrera (11 frente a 18 semanas, $p = 0,042$) y al entrenamiento (14 frente a 21 semanas, $p = 0,004$) más precoz, sin observar la

aparición de complicaciones de la herida. En este grupo también se observó una menor área de sección transversal del tendón de Aquiles tras un periodo de tiempo de 18 meses, en comparación con los sujetos control ($P = 0,009$), lo que posiblemente indica una menor formación de tejido cicatrizal.

- b) Randelli et al²⁸⁴ aplicaron PRP activado con trombina (GPS II Sistema de concentrado de plaquetas, Biomet) en 14 pacientes tras cirugía artroscopia reparadora del manguito rotador. No hubo complicaciones, y a los 2 años de seguimiento todos los pacientes tenían mejoras estadísticamente significativas en la EVA, Constant, y University of California Los Angeles shoulder scores en comparación con los valores preoperatorios.
- c) Everts et al²⁸⁵ observaron una recuperación más rápida, menor uso de analgésicos, mayor balance articular, y mayor capacidad para realizar las actividades de la vida diaria al aplicar PRP tras descompresión subacromial abierta en comparación con el grupo control sin PRP.

V. 7. 5. Relación entre Plasma Rico en Plaquetas y Carcinogénesis

Se sabe que los FC se hallan sobreexpresados en los tumores, pero la revisión de la literatura no ha permitido aportar evidencias científicas que relacionen la aplicación terapéutica de PRP o de FC recombinantes con la transformación carcinomatosa de tejidos normales o displásicos donde son aplicados²⁵⁷.

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

Shih et al²⁸⁶ realizaron un estudio experimental en el que observaron la repercusión de la aplicación terapéutica de PDGF-BB e IGF-1 sobre la mucosa de mejilla donde previamente se había inducido una displasia. Observaron que la aplicación de los FC no producía un efecto exacerbado sobre el tejido displásico para su transformación en carcinomas, en comparación con las muestras donde no se aplicaron FC.

Material y Método

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

El presente estudio experimental fue presentado y aprobado por el CEEA (Comité de Ética en Experimentación Animal) de la Universidad de Barcelona (ley 5/1995 con posterior modificación en el Decreto 214/1997 del departamento de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Generalitat de Catalunya) que está relacionado con la FELASA (*Federation European of Laboratory Animal Sciences Associations*).

Diseñamos un estudio de investigación de tipo experimental, longitudinal y prospectivo.

Animal de Experimentación

Utilizamos como animal de experimentación el conejo de raza albina de Nueva Zelanda (*Oryctolagus cuniculus*), esqueléticamente maduros, machos, con un peso entre 4.000 y 4.500 gr. (Figura 10).



Figura 10: Conejo de raza albina de Nueva Zelanda (*Oryctolagus cuniculus*)

La utilización del conejo (lagomorfo) como animal de experimentación en estudios del aparato locomotor es muy frecuente, dado que el tamaño del animal es adecuado para la realización de intervenciones quirúrgicas y administración sistémica de fármacos, buena tolerancia a la cirugía, el coste de estabulación es moderado y el proceso de cicatrización (aceptando las diferencias entre las diferentes especies) sigue los principios básicos del ser humano^{287,288}.

Macroambiente

Los animales están ubicados en el estabulario de la Ciutat Sanitària i Universitària de Bellvitge de la Universidad de Barcelona y en las siguientes condiciones:

- Jaulas individuales de suelo perforado con espacio sólido donde apoyarse (específicas para el conejo). (Figura 11).
- Temperatura: entre 15° y 21°C.
- Humedad Relativa: 50-60.
- Ciclo Luz / Oscuridad: 12/12 (blanca artificial).
- Comida racionada para evitar la obesidad, con un contenido en fibra entre el 10-20%, 1.25% de calcio y 0.65% de fósforo, con un complemento de heno para prevenir trastornos intestinales por ingesta de bolas de pelo.
- Acceso AD LIBITUM a agua potable no contaminada.



Figura 11: Jaulas del estabulario

Manipulación de los Animales

En todo momento se siguieron las recomendaciones del Comité Ético de Experimentación Animal (CEEA).

El tipo de intervención a realizar no priva al animal de su anatomía normal, pudiendo deambular correctamente en el postoperatorio inmediato, y a parte del problema álgico, que se trata médicamente, solo preveíamos la aparición de problemas derivados de la herida quirúrgica (infección, déficit de cicatrización...)

Nuestro estudio experimental pretende confirmar la existencia de un efecto de interés biológico en una muestra homogénea, con el objetivo de establecer una base científica sólida. Como no existían estudios previos similares al nuestro, se realizó un estudio piloto

(2 animales) que puso de manifiesto la existencia de grandes diferencias histológicas entre las extremidades experimentales y controles. Posteriormente se calculó el tamaño muestral utilizando el programa estadístico PC-SIZE, determinando la desviación típica (2.6), nivel de significación (5%) y potencia de la prueba (90%).

Los 10 conejos son intervenidos en sus 2 extremidades traseras, en una tibia se realiza la técnica quirúrgica experimental aplicando PRP y la otra tibia sirve de control, realizando la misma técnica quirúrgica pero sin aplicar PRP. La asignación de una u otra extremidad a la técnica experimental o control se realiza de forma aleatoria. Los animales son divididos en 2 grupos de 5 animales de forma aleatoria, según el tiempo de estabulación antes del sacrificio. Un grupo de conejos es sacrificado a la 2ª semana postintervención y el otro a la 4ª semana postintervención.

Las extremidades traseras de cada animal son identificadas de acuerdo al número de semanas estabulado (2 ó 4) y al tipo de intervención realizada (C: tibia control, PRP: tibia donde se aplica FC). Dado que la muestra no es excesivamente grande, para nombrar a los conejos individualmente hemos preferido asignar un número a cada animal del 1 al 10, teniendo en cuenta que los 5 primeros (del 1 al 5) son los sacrificados a las 2 semanas y los otros 5 (del 6 al 10) a las 4 semanas. Cada extremidad es identificada con el número asignado al conejo seguido de:

- "C": si se trata de la tibia control.
- "PRP": si se trata de la tibia donde se aplicó el PRP.

De este modo tenemos identificada cada extremidad trasera de cada animal:

-	2ª semanas de estabulación:	1 (C)	y	1 (PRP)
		2 (C)	y	2 (PRP)
		3 (C)	y	3 (PRP)
		4 (C)	y	4 (PRP)
		5 (C)	y	5 (PRP)
-	4ª semanas de estabulación:	6 (C)	y	6 (PRP)
		7 (C)	y	7 (PRP)
		8 (C)	y	8 (PRP)
		9 (C)	y	9 (PRP)
		10 (C)	y	10 (PRP)

VI. 1. PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO

Siguiendo la normativa vigente, los animales llegan al estabulario como mínimo una semana antes de la intervención quirúrgica. Durante este periodo de tiempo permanecen en cuarentena.

Todos los animales admitidos para cirugía experimental se evalúan rigurosamente, para corroborar que se encuentren en buenas condiciones generales antes de la cirugía.

Tras extraer al animal de su jaula, y transportarlo a la sala de operaciones, se deja unos 30 ó 40 minutos libre para minimizar todo factor estresante.

Los animales son premedicados mediante la administración por vía intramuscular, repartida entre los dos glúteos, de una combinación de los siguientes fármacos: Xilacina (Rompun® 25 ml, 2%) en dosis de 5 mg/kg; Ketamina (Ketolar® 10 ml, 50 mg) en dosis de 35 mg/kg y 1 ml de suero salino fisiológico. Con estas dosis se consigue una buena relajación del animal al cabo de unos 15 minutos y el efecto dura aproximadamente 60 minutos²⁸⁹.

VI. 1. 1. Obtención del PRP

El plasma autólogo rico en FC se obtiene de la sangre del propio animal mediante un procedimiento descrito por Anitua et al²⁹⁰, antes de la realización de la intervención quirúrgica.

Se rasura el área quirúrgica y la oreja del conejo con una maquina eléctrica. En condiciones asépticas se extraen 3 ml de sangre venosa de la vena auricular, y introducen en un tubo sanguíneo estéril con citrato sódico al 3.8% (1:10) como anticoagulante. (Figura 12).



Figura 12: Extracción sanguínea de la vena auricular del conejo

A continuación el tubo sanguíneo se introduce en la centrifugadora “**GPSTTM**” (Biomet, Warsaw, IN). (Figura 13). Es una centrifugadora compacta de gama alta diseñada para multiuso en laboratorios médicos, industriales y científicos. La centrifugadora consiste en una Centra-CL2 diseñada y manufacturada por *International Equipment Company* (IEC) Needham Heights, MA (nº de registro FDA 1250014). La centrifugadora GPSTM es una Centra-CL” que ha sido modificada por IEC removiendo la función de frenado del rotor. Esta disponible a 120 voltios con número de serie 7426 y a 220/240 voltios con número de serie 7427. La centrifugadora se utiliza con un cubo rotor deslizante de cuatro plazas (cat. N°.2361) adaptadores número de catalogo 2083SF y 50776F. Al igual que todos los productos producidos por IEC, ha sido desarrollado y manufacturado según la ISO 9001.



Figura 13: Centrifugadora GPST[™]

Se centrifuga la sangre venosa obtenida a 3.200 p.m. durante 12 minutos y se observa la calidad del centrifugado, apreciándose tres niveles en el tubo de ensayo. (Figura 14). Un sedimento profundo de hematíes, por encima un halo blanco que corresponde a la capa de leucocitos y por encima de ésta, el plasma con las plaquetas, que corresponde aproximadamente a unos 1,5 ml. El plasma es separado en fracciones mediante una extracción muy meticulosa para no crear turbulencias en las fracciones obtenidas. El centrifugado divide la fracción plasmática en capas con diferente concentración de plaquetas, así, la primera toma corresponde al plasma menos concentrado y la última, al plasma más concentrado, situado inmediatamente encima de la capa de leucocitos. Se preparan 5 jeringas de 0.5 ml, y 2 tubos de ensayo estériles numerados. Con las jeringas se extraen 0.3 ml del plasma, y se depositan en los diferentes tubos de ensayo estériles por orden de concentrado: los más diluidos (primera, segunda y tercera capa) en el tubo 1º y los más concentrados (cuarta y quinta capa) en el número 2º. Diez minutos antes de la aplicación del PRP, se vertía cloruro cálcico al 10% en la proporción de 0.05 ml por cada

ml de plasma. El Cl_2Ca rompe las plaquetas, liberándose los FC. La mezcla de más concentración (tubo 2º) se utilizaba para infiltrar el tendón y el túnel perforado en el hueso. El resto se aplicaba en los tejidos perincisionales.

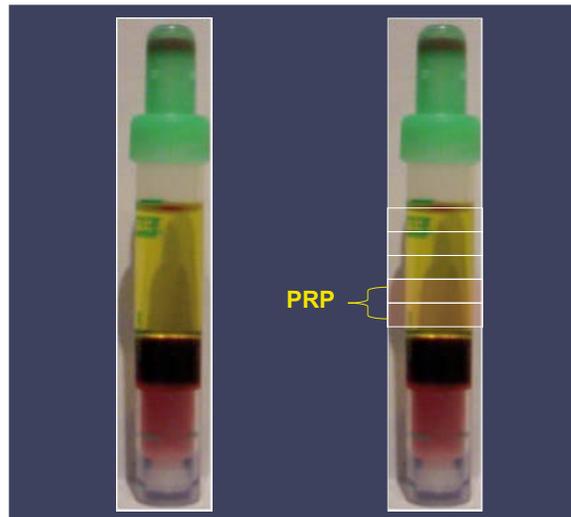


Figura 14: Tubo sanguíneo tras su centrifugado. Se aprecia el sedimento profundo de hematíes, y por encima, el plasma.

VI. 1. 2. Anestesia y Técnica Quirúrgica

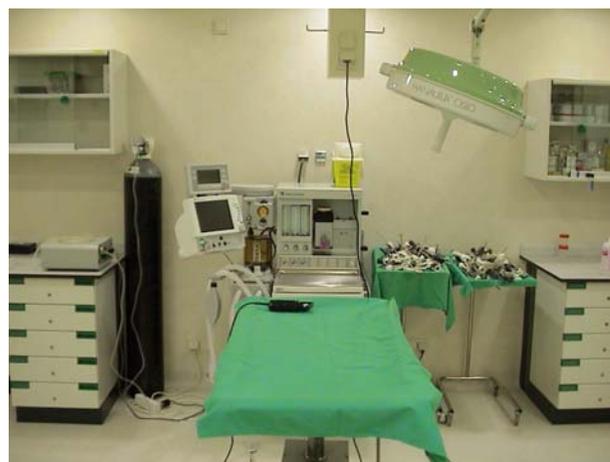


Figura 15: Sala de quirófano

Se realiza en condiciones de máxima esterilidad, en el quirófano del estabulario (Figura 15 y 16). Las intervenciones son bilaterales (1/3 distal de tibias) para cada animal, y se realizan de forma aleatoria.



Figura 16: Animal de experimentación en la mesa de quirófano

El material quirúrgico utilizado es el básico, y consta de: bisturí frío, pinzas, tijeras de disección, porta, separadores manuales y autoestáticos, gubia, broca, cuchara, periostotomo y tornillos biorreabsorbibles, todos ellos acordes con el tamaño de la articulación que abordamos y esterilizados en autoclave. (Figura 17).



Figura 17: Instrumental quirúrgico utilizado

Durante el acto quirúrgico los animales son anestesiados mediante inhalación de halotano, oxígeno y óxido nítrico a través de mascarilla (para prolongar el efecto sedante), a la vez que se mantiene una vía venosa permeable localizada en la oreja. La vía venosa permeable permite el mantenimiento de un aporte de fluidos durante la anestesia de aproximadamente 10 ml/Kg/h de una solución de suero salino al 0,9%. Este aporte de líquido también permite contrarrestar parcialmente la depresión cardiovascular provocada por los anestésicos. Además permite la posibilidad de administrar fármacos por esta vía si fuese necesario.

El área quirúrgica se prepara mediante desinfección de la piel con una solución de alcohol yodado y entallamiento estéril del campo quirúrgico. Se realiza un abordaje posterointerno longitudinal de la extremidad trasera de unos 2-3 cm de longitud. Se disecciona por planos, aislando el paquete vasculonervioso interno, y el tendón distal del

músculo gemelo interno de unos 3 mm de diámetro que se inserta en calcáneo, procediendo a seccionarlo a nivel de su inserción. En el conjunto óseo de tibia-peroné se realiza un túnel óseo de unos 3 mm de diámetro, en zona metafisaria posterointerna y perpendicular al eje longitudinal del hueso. (Figura 18).

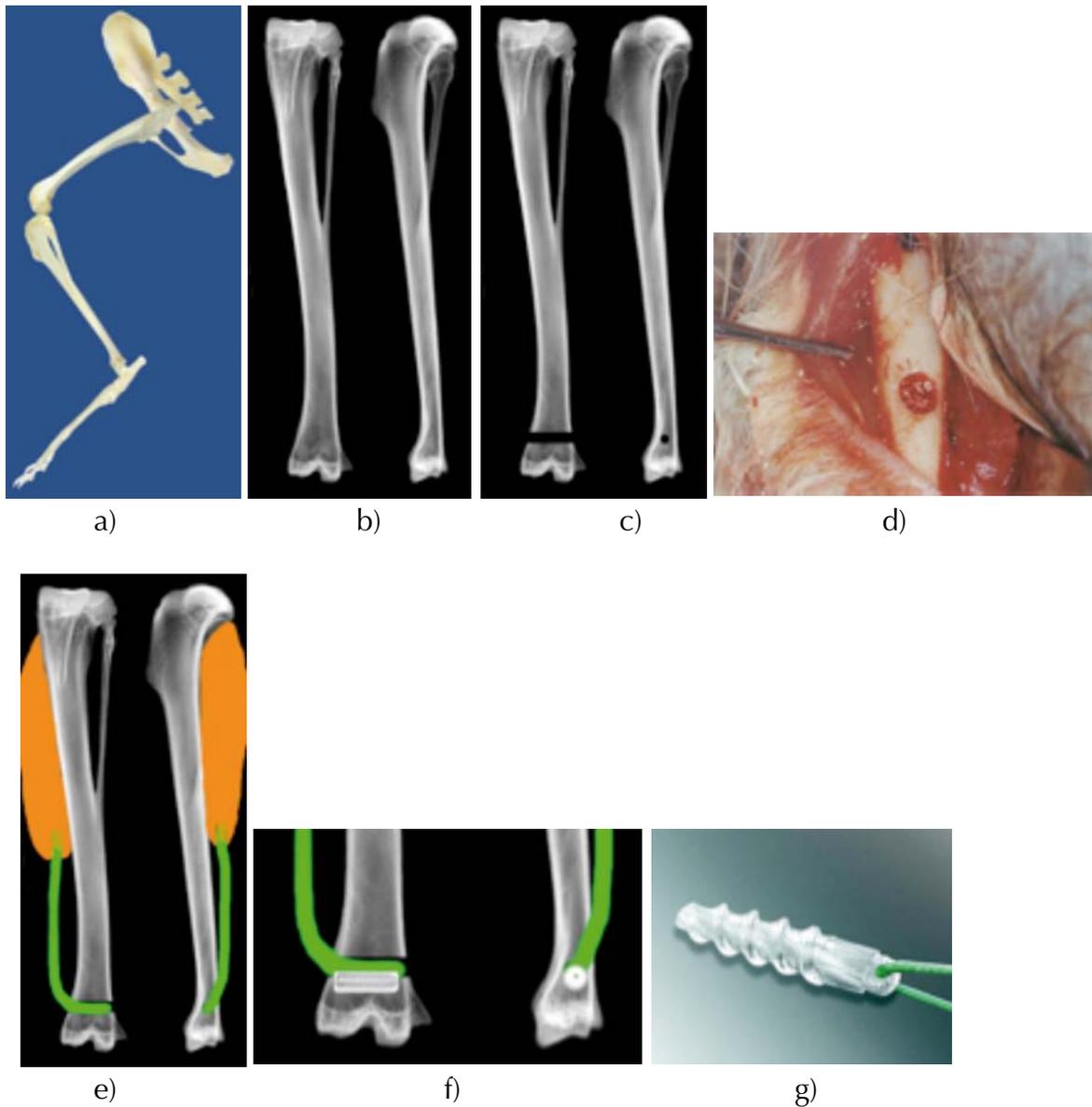


Figura 18: (a) Esqueleto de El de conejo. (b) Radiografía de la tibia-peroné de un conejo. (c) Esquema de la localización del túnel óseo realizado en la tibia del conejo, a nivel de zona metafisaria distal. (d) Imagen intraoperatoria del túnel óseo tibial. (e y f) Esquema de la introducción del injerto tendinoso en el túnel óseo tibial y fijación con un tornillo biorreabsorbible (g)

En la tibia perteneciente al grupo Experimental, el tendón se infiltra en su interior con PRP y se introduce en el túnel óseo relleno con gel de PRP. Posteriormente el tendón es fijado con un tornillo biorreabsorbible de 3 mm de diámetro (Bio-FASTak® Suture Anchor de Arthrex) (Figura 18). En la tibia perteneciente al grupo Control se realiza el mismo procedimiento, pero el tendón se introduce en el túnel óseo y se fija con un tornillo biorreabsorbible sin utilizar PRP.

Este modelo experimental reproduce el ambiente habitualmente encontrado en la interfase hueso-tendón de una ligamentoplastia reconstructiva de LCA utilizando tendones isquiotibiales y tornillos interferenciales reabsorbibles como dispositivo de fijación, con la salvedad de la inclusión en el grupo Experimental de PRP como fuente de aporte de FC, única condición variable entre los dos grupos del estudio.

Para terminar la intervención, se cierra la piel con sutura intradérmica Dexon® 2(0), y se coloca un apósito y vendaje compresivo. A continuación administramos Doxiciclina en dosis de 4 mg./Kg. vía intramuscular como profilaxis antibiótica postoperatoria.

No se utiliza ningún medio de inmovilización postoperatoria de la extremidad. La herida se cubre con un apósito y el animal se coloca en la jaula inmediatamente después de la intervención, con libertad para moverse sin restricción ó inmovilización de sus extremidades.

Se identifica la jaula con el número de conejo pertinente (también identificamos la fecha de la intervención y el día previsto de sacrificio).

En el postoperatorio se realiza la siguiente pauta de analgesia: Buprenorfina, en dosis 0,05 mg/Kg/12 h. durante las primeras 48 h., primera dosis intraoperatoria, y Meloxicam 3 ml/24 h. vía sc. durante 1 semana.

VI. 1. 3. Control Clínico Postoperatorio

Los animales permanecen enjaulados individualmente después de la cirugía, teniendo libre acceso a comida y agua. (Figura 19).



Figura 19: Conejo enjaulado

Todos los animales son revisados físicamente cada día y pesados cada tres. En todos los animales intervenidos quirúrgicamente aplicamos un protocolo de supervisión y se

establece un criterio de punto final, si en algún momento se alcanza la puntuación indicada (> 12 puntos) se procede al sacrificio inmediato del animal. (Tabla I).

	Frecuencia	Puntuación
Peso	72h	Perdidas del 10%=1; 20%=2; 20%=3
Secreciones	24h	0-1-2-3
Pelaje	24h	0-1-2-3
Automutilación	24h	6 puntos
Herida quirúrgica	24h	Bien 0 ; inflamada 1 ; supuración 2
Chillidos	24h	0-1-2
Postura de ocultación	24h	0-1-2

Tabla I: Protocolo de supervisión. Criterio de punto final > 12 punto

VI. 1. 4. Sacrificio de los Animales

Los animales son sacrificados en dos grupos de cinco, a la 2ª y 4ª semana tras la cirugía con una sobredosis de Tiopental sódico vía intravenosa (100 mg/ Kg peso). Este fármaco se disuelve en concentraciones menores al 5%, pues de lo contrario precipita y requiere alcalinizar más el medio, siendo más irritante y doloroso para el animal. Para reducir las molestias de la venopunción en la vena auricular marginal, se aplica crema de lidocaína al 25% de forma tópica. Los barbitúricos son los eutanásicos más empleados porque producen la muerte sin sufrimiento, siendo además baratos. Producen la muerte en pocos segundos por depresión del SNC y de los sistemas cardiovascular y respiratorio.

Una vez sacrificado al animal, se reinterviene realizando una disección cuidadosa de los tejidos y extrayendo una única pieza que contenga la tibia distal (extracción en bloque de la tibia con integridad de la zona donde se realizó la tunelización).

Las muestras se identifican y se realiza una fotografía y una placa radiográfica de cada pieza. A continuación las muestras son fijadas en una solución de paraformaldehído al 4% y conservadas a 4° C.

VI. 1. 5. Complicaciones

No hemos tenido ningún tipo de complicaciones intraoperatorias, postoperatorias, ni durante el tiempo que los animales han estado en el estabulario hasta su sacrificio.

No hemos tenido infecciones de la herida, tampoco lesiones vasculonerviosas, ni muertes.

En ningún caso se ha llegado a una puntuación superior de 12 en el protocolo de supervisión realizado, por lo que nunca hemos tenido que aplicar el criterio de punto final.

VI. 2. MÉTODOS DE VALORACIÓN

Para el estudio del proceso de cicatrización del tendón en el interior de un túnel óseo valoramos las piezas obtenidas desde el punto de vista radiográfico, macroscópico e histológico.

VI. 2. 1. Método Radiográfico

Practicamos una radiografía en proyección AP de la tibia distal, donde se localiza el túnel óseo con el tendón en su interior, valorando la reacción ósea existente.

Para mejorar la calidad de la imagen, las radiografías se realizan con placas de grano fino. Hemos utilizado unas características de 45KV, 5 mAs y 1 metro de distancia foco-placa. La imagen radiográfica es digitalizada y tratada con el programa ImageJ 1.39I para el cálculo del área de la reacción ósea.

VI. 2. 2. Estudio Histológico e Inmunohistoquímico

El estudio histológico se ha realizado en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Bellvitge.

Las muestras son sometidas a un proceso de descalcificación mediante inmersión en solución de ácido nítrico al 7% durante 72 a 82 horas. Una vez finalizada la descalcificación se efectúa la sección de las muestras perpendicularmente al eje mayor del hueso, se realiza una osteotomía proximal y distal al tornillo colocado durante la cirugía y luego es retirado. La pieza se incluye en parafina y posteriormente los bloques obtenidos son seccionados en cortes de 7 micras de espesor. Se realizan 4 cortes histológicos de cada una de las piezas, siendo coloreados 3 de ellos con hematoxilina-eosina y el restante con tricrómico de Masson. (Figura 20).



Figura 20: tinciones histológicas

También se obtienen cortes de 4 micras de grosor de cada bloque, para efectuar técnicas de tinción inmunohistoquímica para colágeno tipo II utilizando anticuerpo policlonal anti-colágeno tipo II (NCL-Coll-IIp; Novocastra).

Tinciones:

- ***Hematoxilina Eosina***

La hematoxilina es una sustancia natural capaz de colorear, extraída de la madera de un árbol conocido como árbol de Campeche, originario de Centroamérica. Fue utilizada por primera vez en 1983. La hematoxilina se expende en polvo, el cual es cristalino, casi incoloro o algo amarillento a veces más oscuro.

La hematoxilina, como tal, aunque esté disuelta en agua o en alcohol de 96° o de 100°, es incapaz de colorear, para poder hacerlo, debe sufrir una oxidación. La hematoxilina oxidada es hemateína y bajo este cambio físico-químico y la unión con una base es capaz de colorear. La base es conocida como mordiente, hay muchas bases que actúan como tal, la más conocida es el alumbre que puede ser de potasio, hierro o cromo. El mordiente es un intermediario entre el colorante y el tejido y en general entre dos cuerpos que químicamente carecen de afinidad. De alguna manera activa las moléculas del tejido y forma con ellas una unión firme y estable. Con el colorante forma un precipitado que presenta una fuerte coloración y es, además insoluble en agua y otros líquidos. Este tipo de precipitado coloreado se llama "laca". Los mordientes deben ser ácidos nunca básicos. Utilizamos el método de Harris. Este método tiñe todas las estructuras tisulares, núcleos, citoplasma, tejidos conectivos... y continúa con una decolorización controlada y "azulamiento" hasta llegar a una tinción nuclear óptima.

Fijación: Formalina neutra al 10% estabilizada, fijadores de Bouin o de Zenker.

Secciones: en parafina de 7 micras.

Soluciones: Alcohol ácido al 1%, agua amoniacal, solución saturada de carbonato de litio, solución de Eosina-Floxina, Hematoxilina de Harris (5 g de hematoxilina, 50 ml de etanol al 100%, 100 g de alumbre de potasio o de amonio, 1000 ml de agua destilada y 2,5 g de óxido rojo de mercurio).

Procedimiento:

1. Desparafinización e hidratación de las láminas hasta llegar al agua destilada.
2. Tinción en hematoxilina de Harris durante 5 minutos.
3. Lavado en agua corriente.
4. Diferenciación en alcohol ácido al 1%.
5. Lavado en agua corriente.
6. Colocación de las láminas en una solución de agua amoniacal.
7. Lavado en agua corriente (10-20 minutos).
8. Colocación en etanol al 80%.
9. Contraste en la solución de eosina-floxina.
10. Deshidratación y aclaramiento con etanol y xileno.
11. Montaje en medio resinoso. ([Figura 21](#)).

Resultados: se observan los núcleos en color azul, citoplasma y la mayoría de otros tejidos de rosado a rojo. La tinción hematoxilina-eosina permite observar el osteoide de color rosado pálido y el hueso mineralizado de color rosado oscuro.



Figura 21: Preparación de hematoxilina-eosina

- ***Tricrómico de Masson***

Las fibras de colágeno constituyen el elemento predominante del tejido conectivo aunque son visibles con la tinción de hematoxilina eosina, la tinción de tricrómico de Masson las resalta con suma facilidad.

Fijación: Formalina neutra al 10% estabilizada, fijador de Bouin

Secciones: en parafina 7 micras.

Soluciones: fijadora de Bouin, hematoxilina de hierro de Weigert, fucsina ácida y escarlata de Biebrich, ácido fosfomolibdico-fosfotungstico, azul de anilina, ácido acético al 1%.

Procedimiento:

1. Desparafinización e hidratación de las láminas hasta llegar al agua destilada.
2. Dejar enfriar durante 10 minutos.
3. Lavado en agua corriente y enjuague con agua destilada.
4. Coloración con la solución de hematoxilina de hierro de Weigert durante 10 minutos.
5. Lavado en agua corriente y enjuague con agua destilada.
6. Coloración con la solución fucsina ácida-escarlata de Biebrich.

7. Diferenciación con la solución de ácido fosfomolibdico-fosfotungstico.
8. Contrastar con la succión azul de anilina.
9. Deshidratación y aclaramiento con etanol y xileno.
10. Montaje en medio resinoso.

Resultados: Núcleos en color negro, músculo, citoplasma y queratina en rojo y colágeno en azul (o verde).

- ***Anticuerpo Policlonal Anti-Colágeno Tipo II (Ncl-Coll-IIp; Novocastra)***

Anticuerpo no organoespecífico, específico de tejido, dirigido contra antígenos localizados en tejidos concretos que poseen fibras de colágeno tipo II, pudiendo formar parte, sin embargo, de diversos órganos.

Secciones: en parafina de 4 micras

Procedimiento:

- 1- Desenmascaramiento antigénico introduciendo la pieza en una olla a presión durante 2 minutos, con tampón citrato pH 4.
- 2- Bloqueo de la peroxidasa con agua oxigenada durante 5 minutos.
- 3- Anticuerpo primario (Novocastra) a dilución 1:40 durante 20 minutos
- 4- Sistema de visualización "En Vision" (DAKO) durante 20 minutos.
- 5- Sistema de revelado con DAB durante 5 minutos
- 6- Lavado con agua destilada
- 7- Tinción de contraste con hematoxicilina durante 7 minutos.

8- Lavado con agua destilada.

9- Deshidratación y aclaramiento con etanol y xileno.

10- Montaje en medio resinoso

Todos los lavados intermedios fueron realizados con tampón fosfato pH 7

Como control de la positividad de estas técnicas inmunohistoquímicas se utilizaron tejidos cartilagosos de conejo y humanos.

Observación histológica



Figura 22: Sala de estudio de las preparaciones histológicas.

Se ha realizado un estudio descriptivo de la celularidad, características de la matriz extracelular, orientación de las fibras de colágeno, vascularización y hallazgos no esperados. Por otro lado, se ha realizado un estudio inmunohistoquímico para determinar la cantidad y distribución del colágeno tipo II.

El área de estudio para observar los cambios histológicos es la comprendida entre el hueso y el tendón injertado. Se registra la presencia de los siguientes cambios tisulares ó variables:

- (1) fibroblastos,
- (2) vasos de neoformación,
- (3) matriz extracelular
- (4) tejido de tipo condroide poco organizado,
- (5) tejido cartilaginoso con células organizadas,
- (6) sustancia osteoide,
- (7) trabéculas óseas,
- (8) fibras de anclaje del tendón al hueso.

Cada uno de estos cambios histológicos es valorado por un Anatómo Patólogo, que desconoce a que grupo pertenece cada una de las muestras, con la siguiente gradación:

- (-) no presente,
- (+/-) presente en escasa cantidad,
- (+) moderada cantidad,
- (++) abundante cantidad y
- (+++) muy abundante cantidad.

(Tablas II y III)

Cambios histológicos

GRUPO	Sacrificio 2ª Semana	Fb	Vn	MExt	TCo	TC	SO	TO	a T-H
	1 (C)	++	+	+	+	+	+/-	+/-	--
	1 (PRP)	++	++	+++	+++	++	++	+	--
	2(C)	++	+	+	+	+/-	+/-	+	--
	2 (PRP)	++	+	+	++	++	++	++	--
	3 (C)	++	+	++	++	+	+/-	--	--
	3 (PRP)	++	+	++	++	++	++	+	--
	4 (C)	++	+	+	+	+	+	+/-	--
	4 (PRP)	++	+	++	++	++	++	+	--
	5 (C)	++	+	+	+	+	+/-	+/-	--
5 (PRP)	++	+	++	++	++	++	++	--	

Tabla II: Cambios histológicos en el grupo de conejos sacrificados a la 2ª semana postintervención: grupo control (C), grupo experimental (PRP). En el eje de abscisas situamos los distintos elementos histológicos observados en la interfase injerto tendinoso-hueso: Fibroblastos (tejido de granulación)=Fb, vasos de neoformación = Vn, matriz extracelular = Mes, tejido condroide = TCo, tejido fibrocartilaginoso organizado = TC, sustancia osteoide = SO, trabéculas óseas = TO y anclajes tendón-hueso = aT-H. Cada uno de estos elementos histológicos eran cuantificados en cada preparación mediante la siguiente gradación: (-) no presente, (+/-) presente en escasa cantidad, (+) moderada cantidad, (++) abundante cantidad, (+++) muy abundante cantidad. Las piezas pertenecientes al grupo experimental (PRP), poseen un nivel superior de tejido condroide, tejido fibrocartilaginoso organizado, sustancia osteoide y trabéculas óseas, que las piezas del grupo control

Cambios histológicos

GRUPO	Sacrificio 4 ^a Semana	Fb	Vn	MExt	TCo	TC	SO	TO	a T-H
	6 (C)	+	+	++	+++	+	+	+	--
	6 (PRP).	+	+	++	++	++	++	++	+
	7 (C)	+	+	+	+	+	+	+	--
	7 (PRP).	+	+	+	+	++	+++	+++	+
	8 (C)	++	+	+	++	+	+	+	--
	8 (PRP)	+	+	++	+++	++	++	++	--
	9 (C)	+	+	+	+	+	+	+	--
	9 (PRP)	++	++	+	++	++	+++	+++	--
	10 (C)	+	+	+	+	+	+	+	--
	10 (PRP)	++	+	++	++	++	+++	++	--

Tabla III: Cambios histológicos en el grupo de conejos sacrificados a la 4ª semana postintervención: grupo control (C), grupo experimental (PRP). En el eje de abscisas situamos los distintos elementos histológicos observados en la interfase injerto tendinoso-hueso: Fibroblastos (tejido de granulación)=Fb, vasos de neoformación = Vn, matriz extracelular = MExt, tejido condroide = TCo, tejido fibrocartilaginoso organizado = TC, sustancia osteoide = SO, trabéculas óseas = TO y anclajes tendón-hueso = aT-H. Cada uno de estos elementos histológicos están cuantificados en cada preparación mediante la siguiente gradación: (-) no presente, (+/-) presente en escasa cantidad, (+) moderada cantidad, (++) abundante cantidad, (+++) muy abundante cantidad. Las piezas pertenecientes al grupo experimental (PRP), poseen un nivel superior tejido fibrocartilaginoso organizado, sustancia osteoide y trabéculas óseas.

Resultados

VII. RESULTADOS

VII. 1. ESTUDIO MACROSCÓPICO

El estudio macroscópico y radiográfico de las piezas muestra la presencia de una reacción ósea de mayor tamaño de la zona de entrada del tendón en el interior del túnel óseo tibial en el grupo Experimental, que recibió PRP, de los animales sacrificados a la 4ª semana, respecto al resto de grupos. (Figuras 23, 24 y 25)

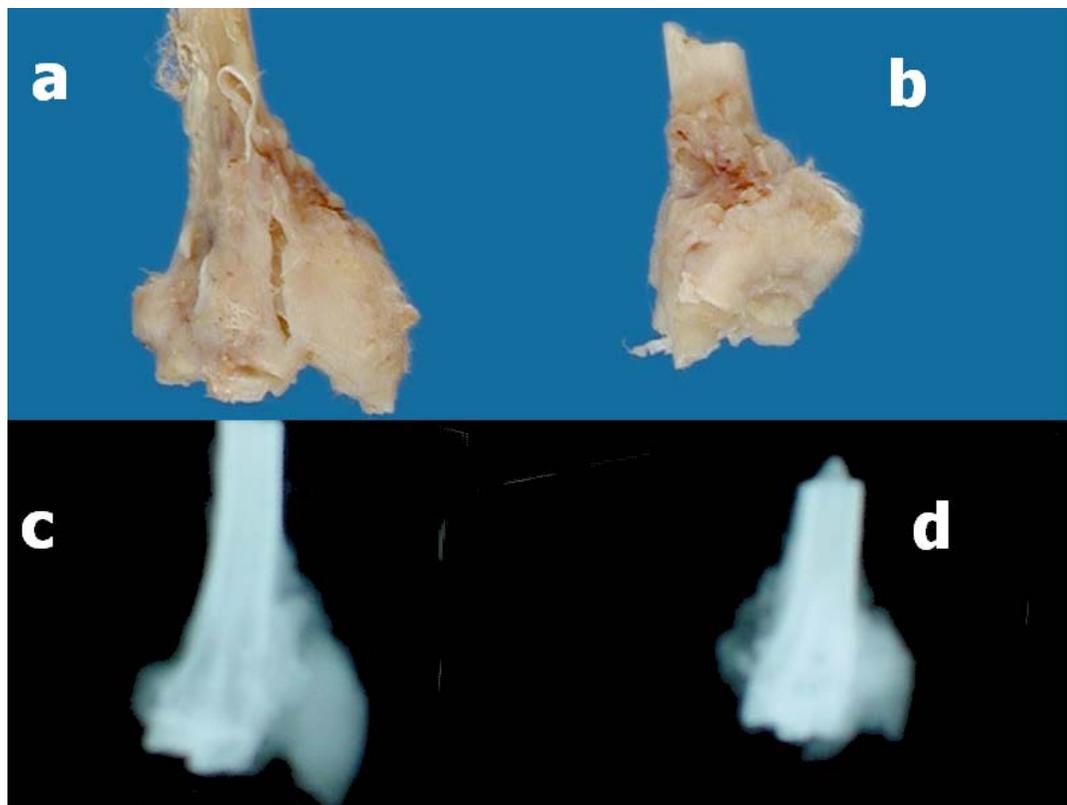


Figura 23: Aspecto macroscópico del extremo distal de la tibia Experimental (con PRP) (a) y la pieza Control (b) de un mismo conejo sacrificado a la 4ª semana. Estudio radiográfico correspondiente a ambas tibias, experimental (c) y control (d). Se evidencia la existencia de un callo óseo mucho más manifiesto en la tibia que recibió PRP.

2 SEMANAS

Control

FC

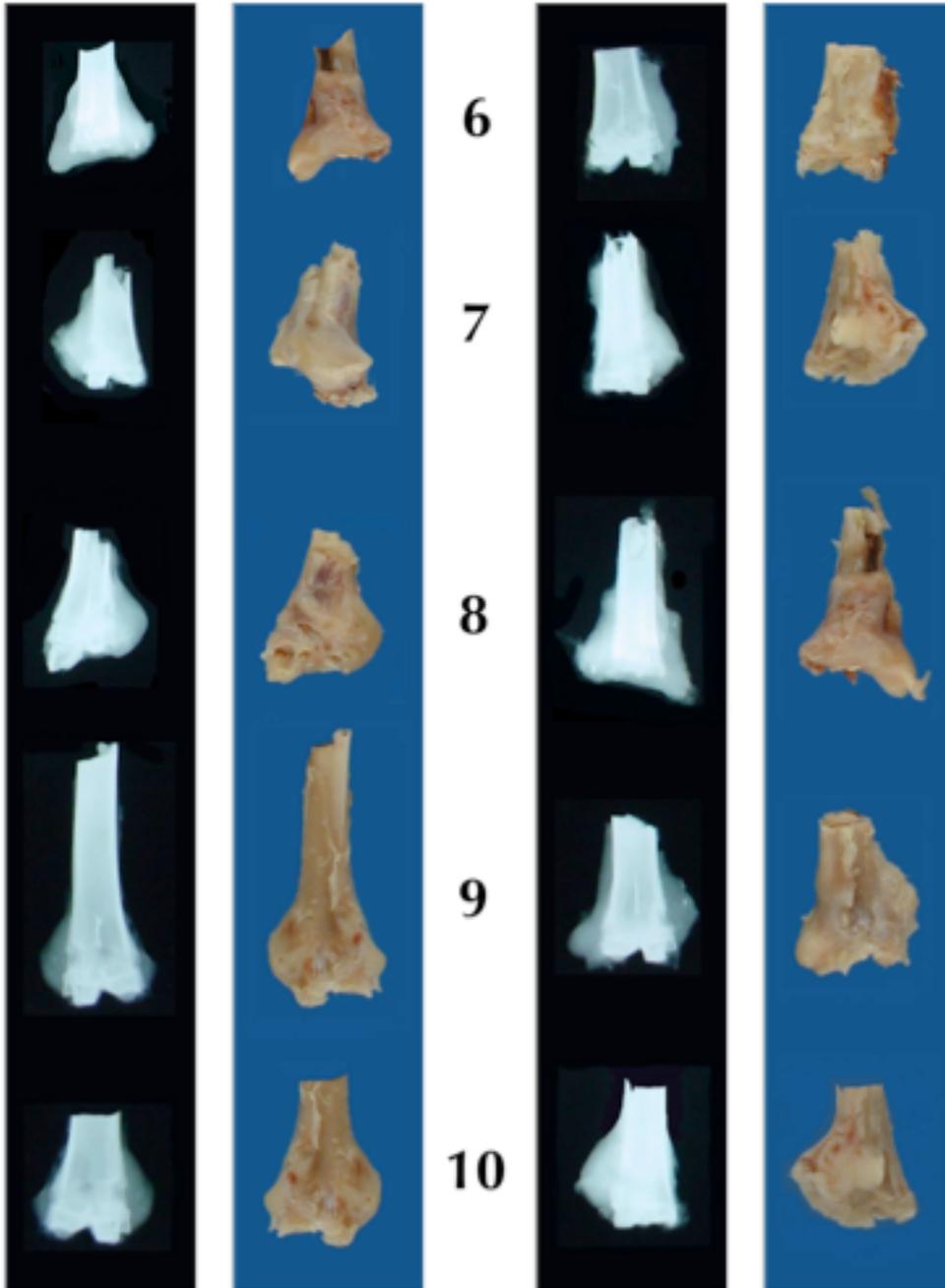


Figura 24: Aspecto macroscópico y radiografía del extremo distal de la tibia Experimental, con PRP (a la izquierda), y Control (a la derecha) de un mismo conejo sacrificado a la 2ª semana.

4 SEMANAS

Control

FC

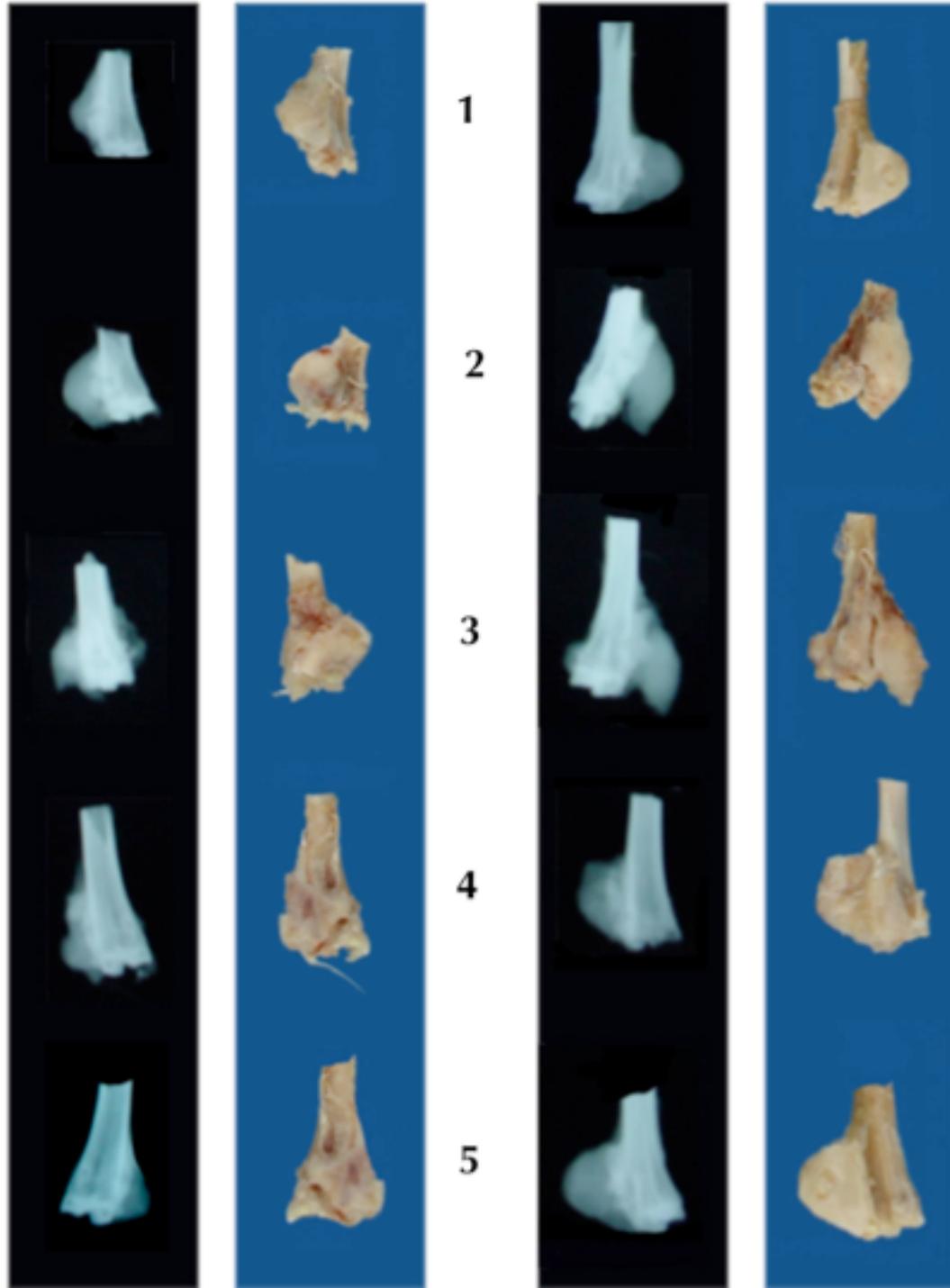
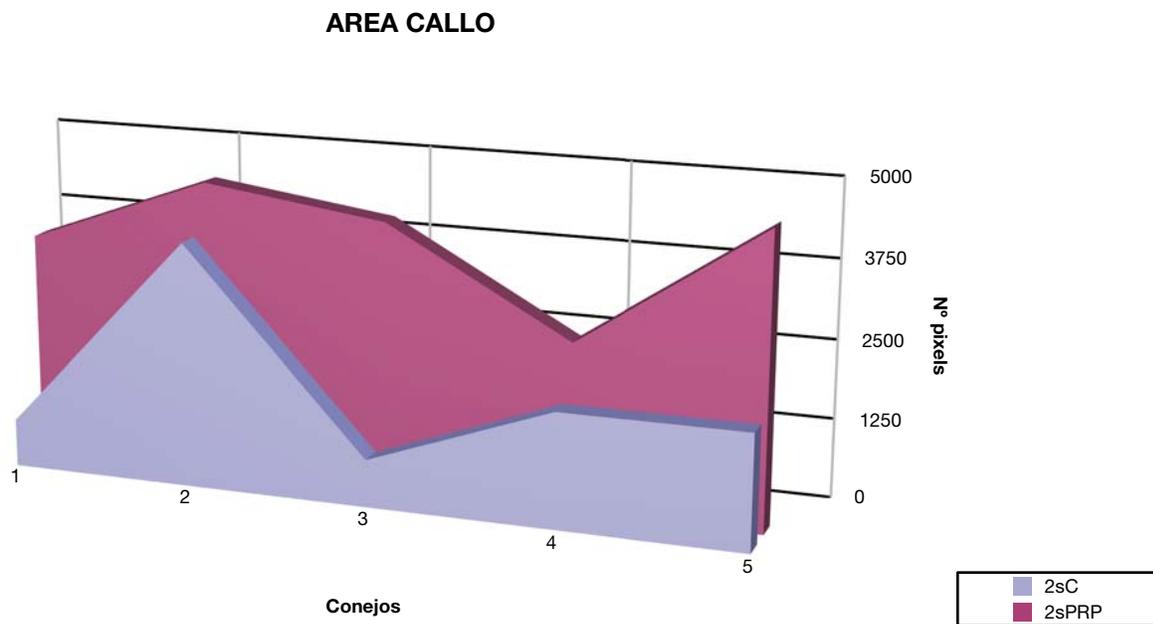
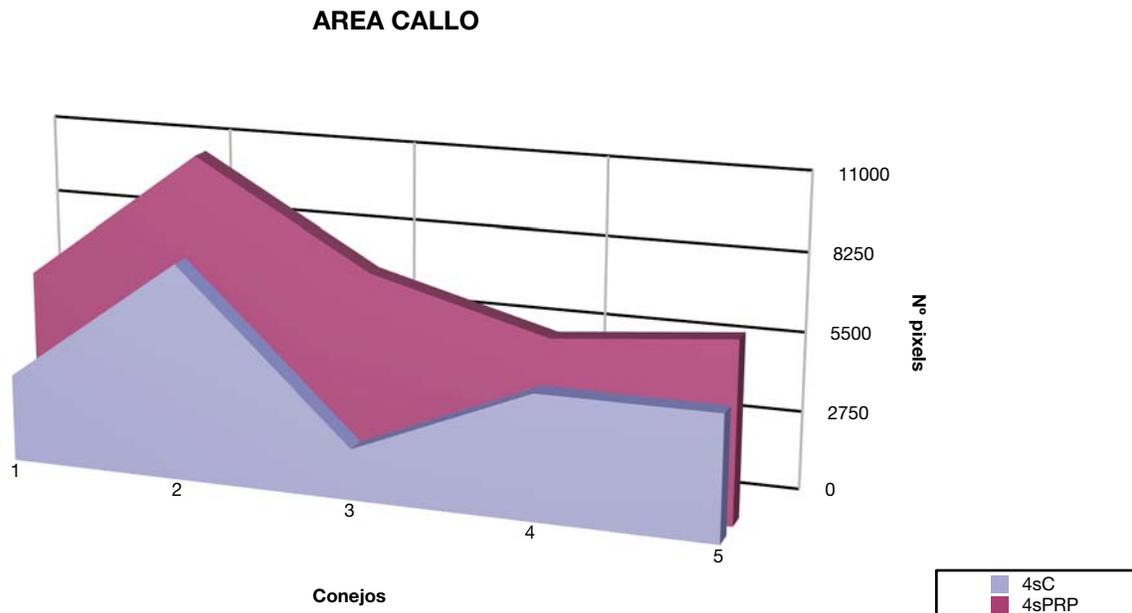


Figura 25: Aspecto macroscópico y radiografía del extremo distal de la tibia Experimental, con PRP, (a la izquierda) y Control (a la derecha) de un mismo conejo sacrificado a la 4ª semana.

Este hallazgo subjetivo es corroborado por los datos obtenidos en el tratamiento informático de las imágenes radiológicas, donde se evidencia que el área media de la reacción ósea a la entrada del túnel tibial en las extremidades de los conejos sacrificados a la 2ª semana del grupo Control es de 1798,8 píxeles (0,48 cm²), mientras que en el grupo Experimental es de 3924 píxeles (1,05 cm²). (Gráfica 1); y las extremidades de los conejos sacrificados a la 4ª semana del grupo Control presentan un área media de reacción ósea de 4324,6 píxeles (1,12 cm²) mientras que en las del grupo Experimental es de 7336 píxeles (1,94 cm²). (Gráfica 2).

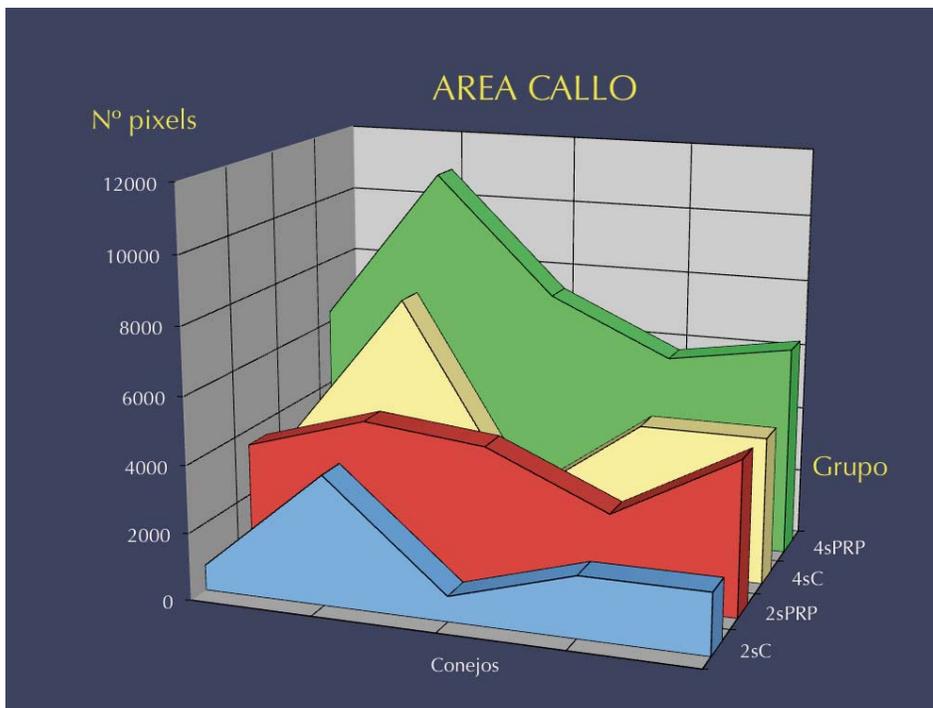


Gráfica 1: Representación del área de la reacción ósea en el grupo de conejos sacrificado a la 2ª semana. Rojo: grupo experimental (2sPRP). Azul: grupo control (2sC)



Gráfica 2: Representación del área de la reacción ósea en el grupo de conejos sacrificado a la 4ª semana. Rojo: grupo experimental (4sPRP). Azul: grupo control (4sC)

Observando las medias muestrales podemos concluir que la aplicación de PRP obtiene un callo óseo de mayor área en los grupos Experimentales si se comparan con sus respectivos grupos Control, existiendo una mayor reacción perióstica en las piezas de los conejos sacrificados a la 4ª semana donde se aplicó PRP respecto al resto de grupos. (Gráfica 3).



Gráfica 3: Representación del área de la reacción ósea en el grupo de conejos sacrificado a la 2ª semana y 4ª semana. 2sC: piezas del grupo Control sacrificado a la 2ª semana. 2sPRP: piezas del grupo experimental sacrificado a la 2ª semana. 4sC: piezas del grupo control sacrificado a la 2ª semana. 4sPRP: piezas del grupo experimental sacrificado a la 2ª semana.

VII. 2. ESTUDIO MICROSCÓPICO

En ningún corte histológico de hematoxilina y eosina, tanto de los grupos Control como Experimental, se observa la línea de separación basófila, denominada **marca de agua**¹⁹⁰ entre el fibrocartílago mineralizado y el no mineralizado.

VII. 2. 1. Grupo de Conejos Sacrificados a las 2 Semanas

En el grupo Control se visualiza en la interfase hueso-tendón abundante tejido de granulación con fibroblastos jóvenes, una rica sustancia extracelular y numerosos vasos de neoformación. Se observa tejido de tipo mesenquimático, escasos focos de tejido condroide con células desordenadas, tejido cartilaginoso y una proporción similar de sustancia osteoide y trabéculas óseas neoformadas. (Figura 26).

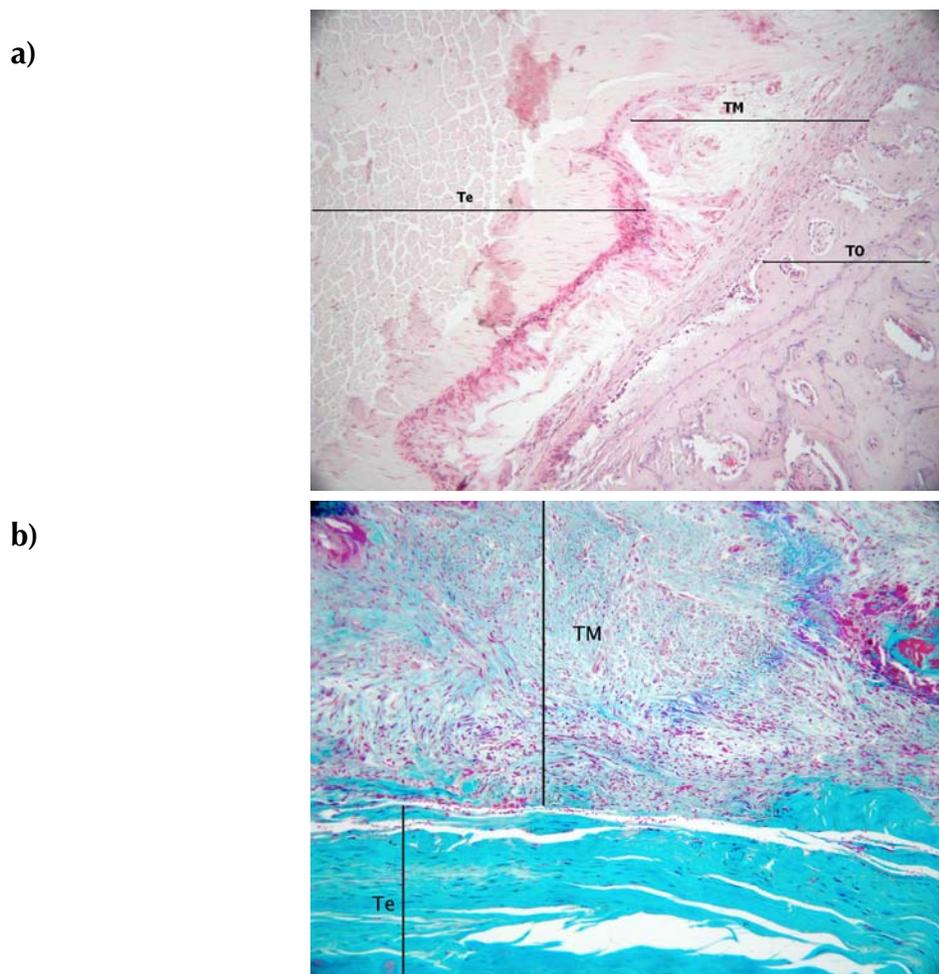
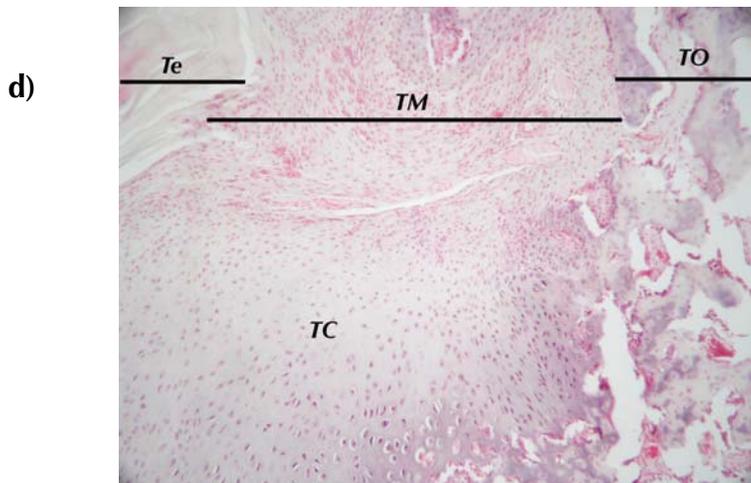
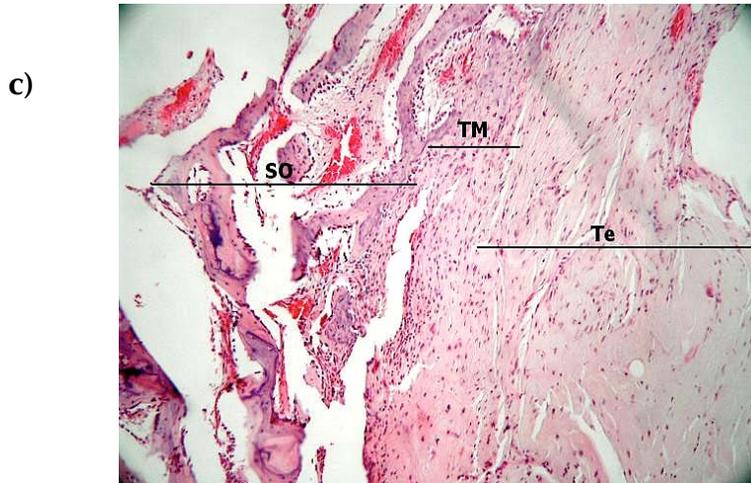


Figura 26: Grupo Control sacrificado a la 2ª semana: (a) Tinción hematoxilina-eosina. (x10). (b) Tinción tricrómico de Masson (x10). Se visualiza una interfaz entre hueso (TO) - tendón (Te) con abundante tejido mesenquimático (TM), rico en fibroblastos jóvenes, vasos de neoformación y sustancia extracelular. **Figura 28: Grupo Control sacrificado a la 2ª semana:** (a) Tinción hematoxilina-eosina. (x10). (b) Tinción tricrómico de Masson (x10). Se visualiza una interfaz entre hueso (TO) - tendón (Te) con abundante tejido mesenquimático (TM), rico en fibroblastos jóvenes, vasos de neoformación y sustancia extracelular.

En la interfase hueso-tendón del grupo Experimental, con PRP, se observan los mismos elementos tisulares que en el grupo Control. No obstante, se aprecia una mayor cantidad de focos de tejido cartilaginoso con células más ordenadas, mayor presencia de sustancia osteoide y de trabéculas óseas neoformadas. Por otra parte, el tejido mesenquimático en este grupo está marcadamente disminuido. (Figura 27).



e)

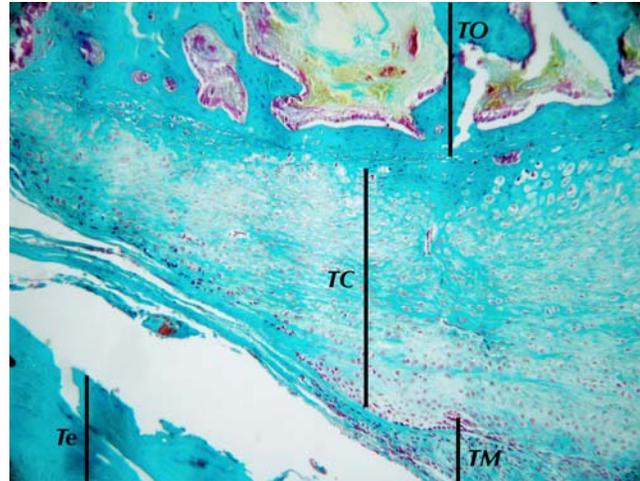
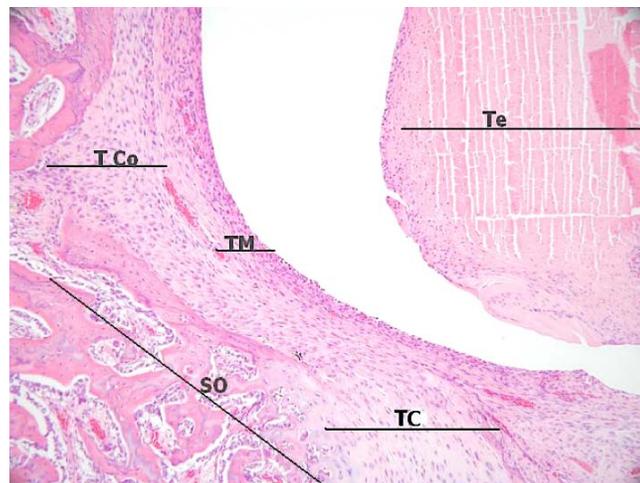


Figura 27: Grupo Experimental (con PRP) sacrificado a la 2ª semana: (c y d) Tinción hematoxilina-eosina. (x10). (e) Tinción tricrómico de Masson (x10). Se observa una interfaz entre hueso (TO) - tendón (Te) con menor componente mesenquimático (TM), mayor número de focos de tejido cartilaginoso constituido por tejido condroide y condrocitos ordenados (TC), junto a sustancia osteoide, si se compara con las preparaciones del grupo Control.

VII. 2. 2. Grupo de Conejos Sacrificados a las 4 Semanas

En el grupo Control, se observa un predominio de los componentes mesenquimático, condroide y cartilaginoso en la interfaz hueso-tendón. (Figura 28)

a)



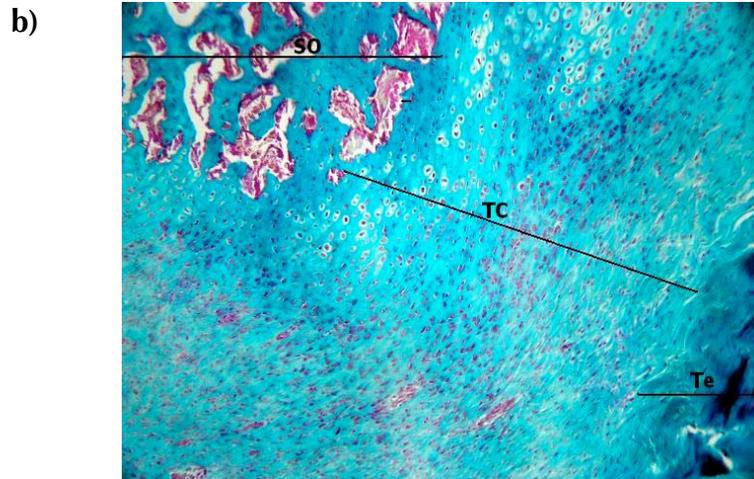
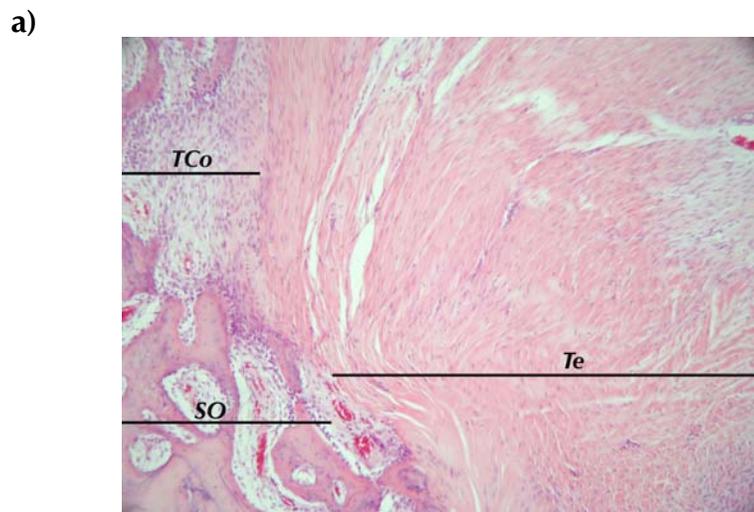
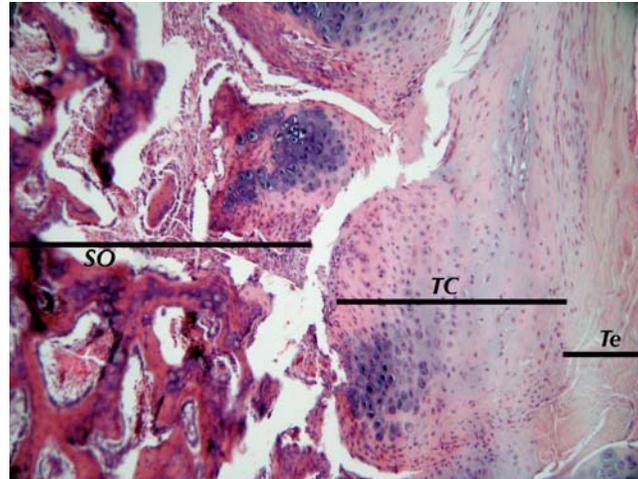


Figura 28: Grupo Control sacrificado a la 4ª semana: (a)Tinción hematoxilina-eosina. (x10). **(b)**Tinción tricrómico de Masson (x10). Se observa una interfaz entre hueso (SO) - tendón (Te) con predominio de los componentes mesenquimático, condroide y cartilaginoso (TC)

En el grupo Experimental, predomina el tejido cartilaginoso organizado, la sustancia osteoide y las trabéculas de hueso neoformado. (Figura 29)



b)



c)

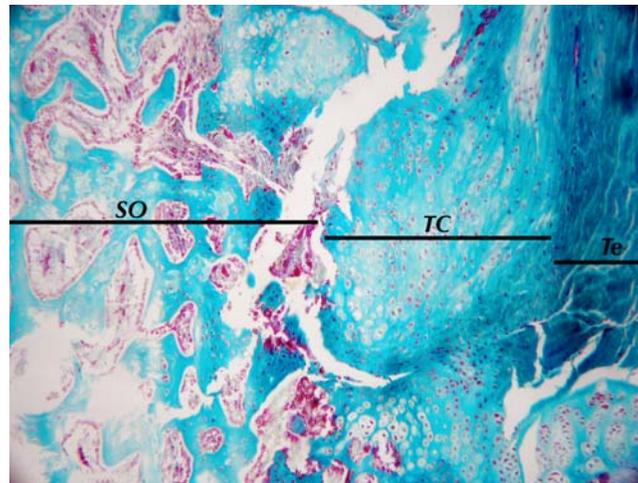
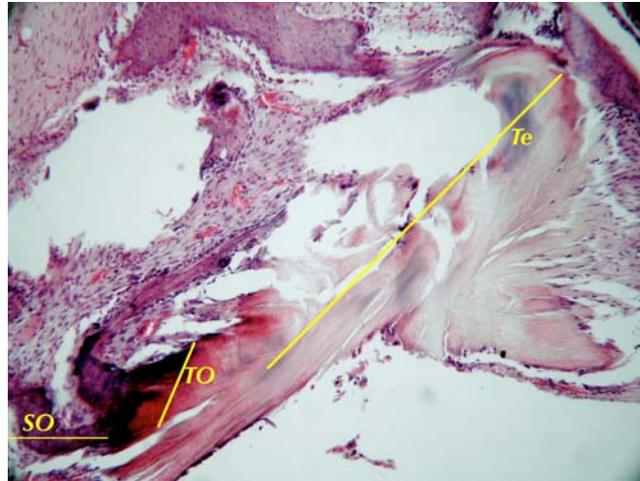


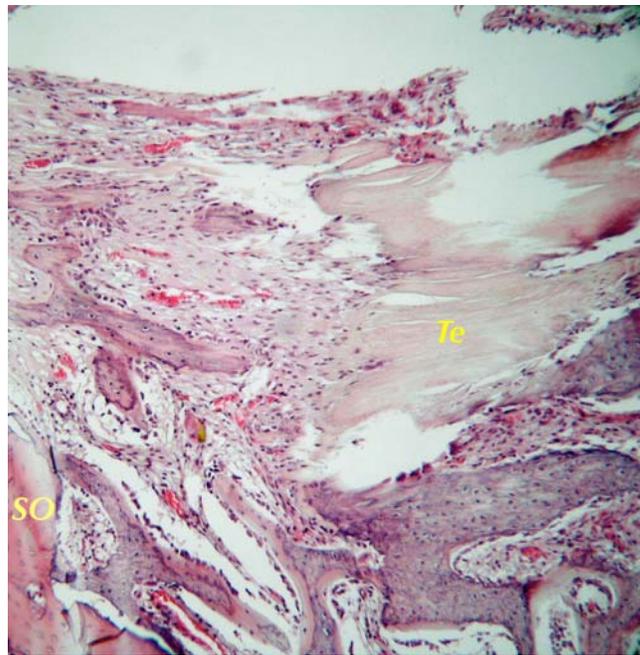
Figura 29: Grupo Experimental (con PRP) sacrificado a la 4ª semana: (a y b) Tinción hematoxilina-eosina (x10). **(c)** Tinción tricrómico de Masson (x10). En la interfaz entre hueso-tendón (**Te**) predomina el tejido cartilaginoso (**TC**), la sustancia osteoide (**SO**) y las trabéculas de hueso neoformado. Se evidencian áreas de anclaje de las fibras tendinosas al hueso y restos de tejido condroide (**TCo**).

Destacar, que en dos casos del grupo Experimental se observan áreas donde las fibras del tendón muestran continuidad con las trabéculas óseas como expresión de una incipiente zona de anclaje de las fibras tendinosas al hueso. (Figura 30)

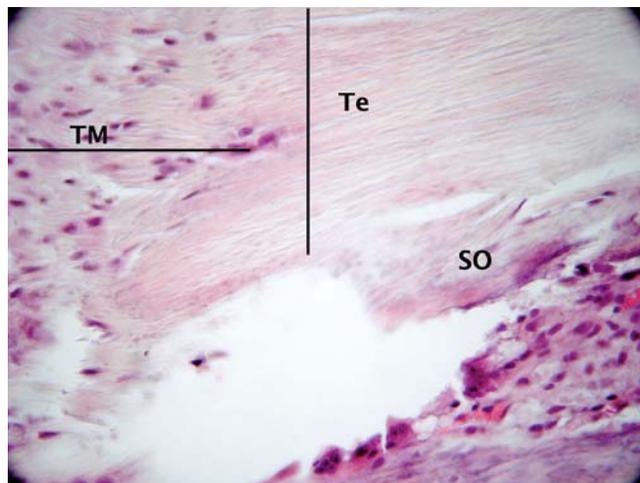
a)



b)



c)



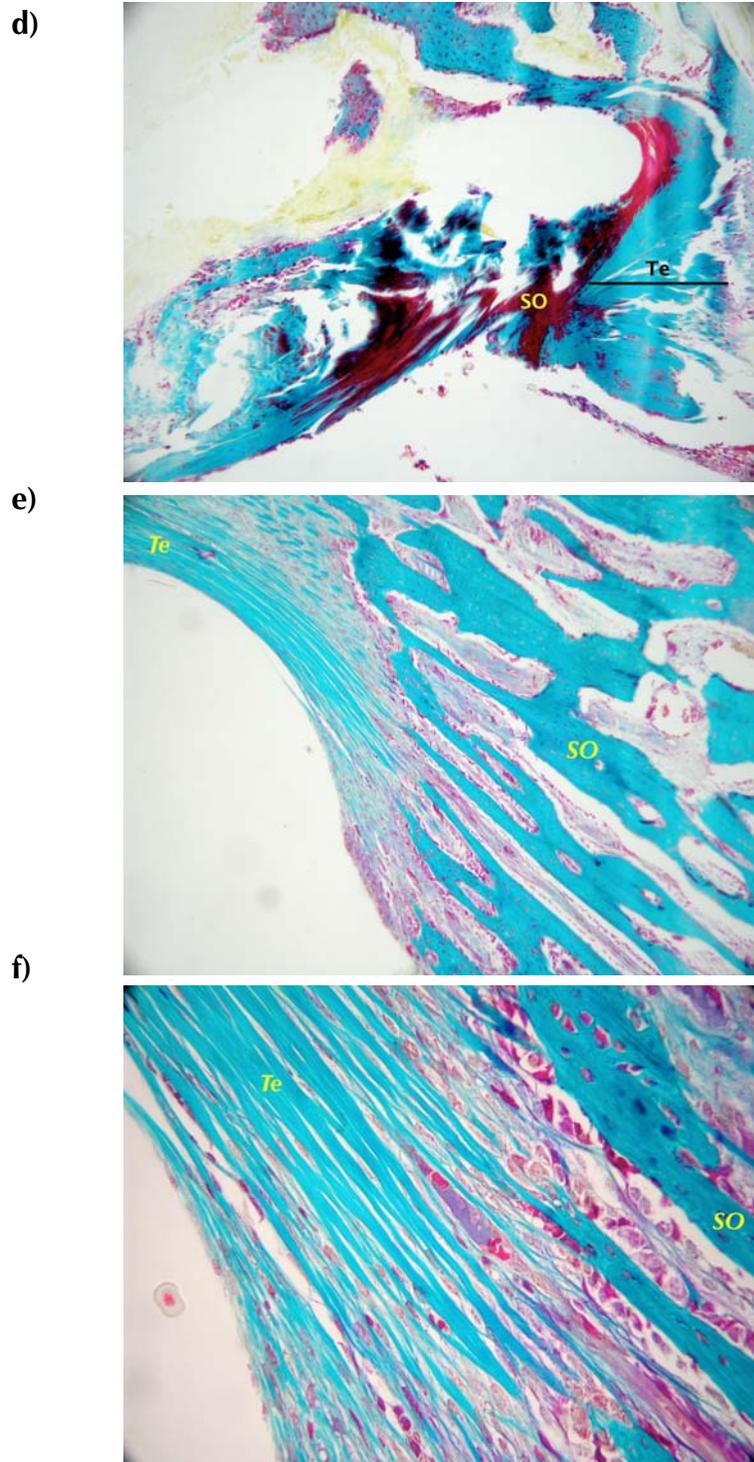
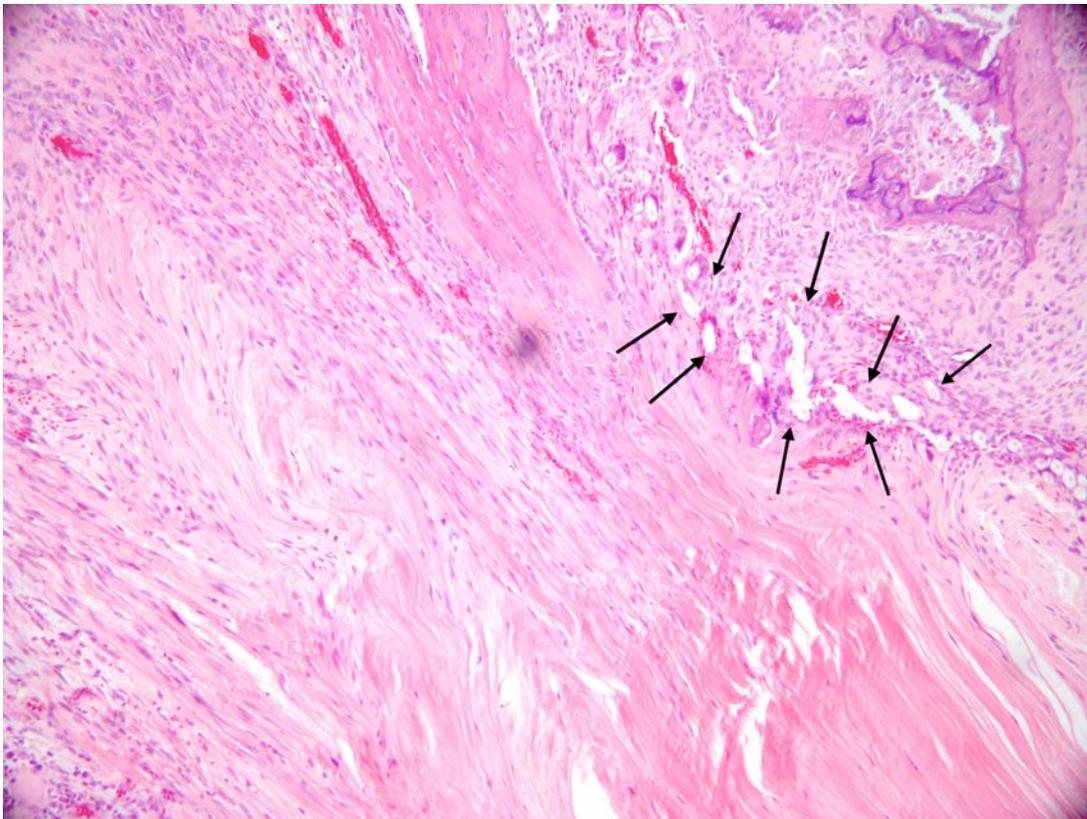


Figura 30: Grupo Experimental (con PRP) **sacrificado a la 4ª semana:** *(a,b,c)* Tinción hematoxilina-eosina (x10). *(d,e,f)* Tinción tricrómico de Masson (x10). *(c)* Detalle a mayor aumento (x200) de *(b)*. *(f)* Detalle a mayor aumento (x200) de *(e)*. Se observa una zona de anclaje tendón (**Te**) – hueso recientemente formado (**TO**), junto a sustancia osteoide (**SO**) y zona de anclaje directo del tendón al hueso.

Tanto en el grupo Control como el grupo Experimental tratado con PRP se evidencia la presencia de escasa cantidad de células gigantes multinucleadas de tipo cuerpo extraño en relación con restos óseos y a partículas del tornillo insertado. En dos de las extremidades del grupo con PRP se observa una intensa proliferación del tejido cartilaginoso, que involucraba restos de los tornillos implantados. (Figura 31).

a)



b)

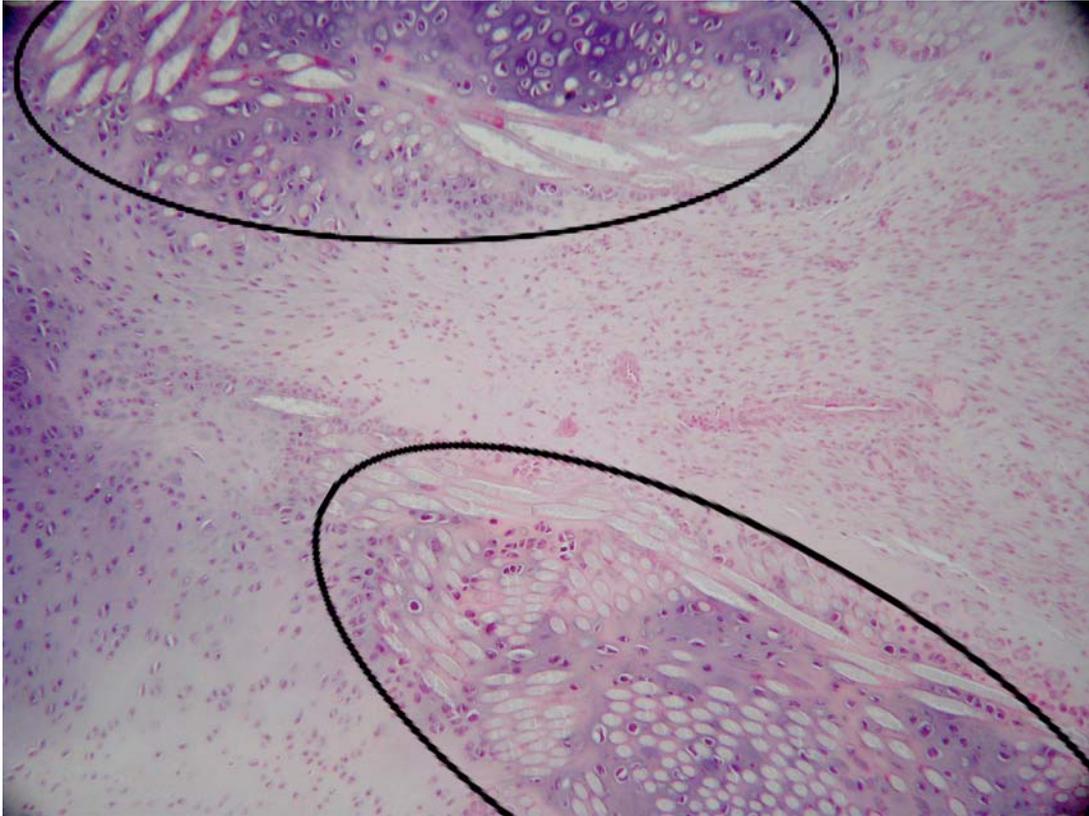


Figura 31: Células gigantes multinucleadas de tipo cuerpo extraño alrededor de restos óseos y partículas del tornillo insertado. (a y b) Tinción hematoxilina-eosina (x10).

VII. 3. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

Se realizó un estudio control previo del patrón de distribución de la técnica de tinción inmunohistoquímica con Ac anti-Colágeno tipo II, utilizando tejido cartilaginoso procedente de conejo y humano, apreciando positividad para la tinción en la membrana celular de condrocitos y una tenue tinción de trasfondo en la sustancia extracelular.

El patrón de tinción encontrado en las preparaciones procedentes de las piezas de los animales del estudio, es de membrana citoplasmática, existiendo una mayor intensidad de tinción en los condrocitos del fibrocartílago mineralizado y en la sustancia osteoide.

(Figura 32, 33 y 34).

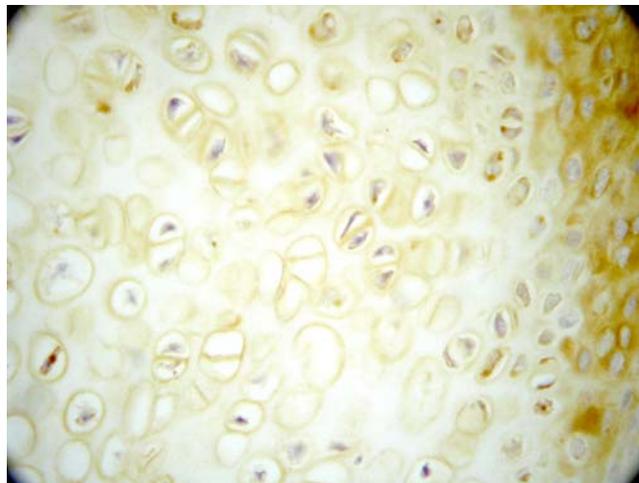


Figura 32: Técnica inmunohistoquímica para colágeno tipo II. (Anticuerpo policlonal anti-colágeno tipo II) (x200). Patrón de tinción de membrana citoplasmática

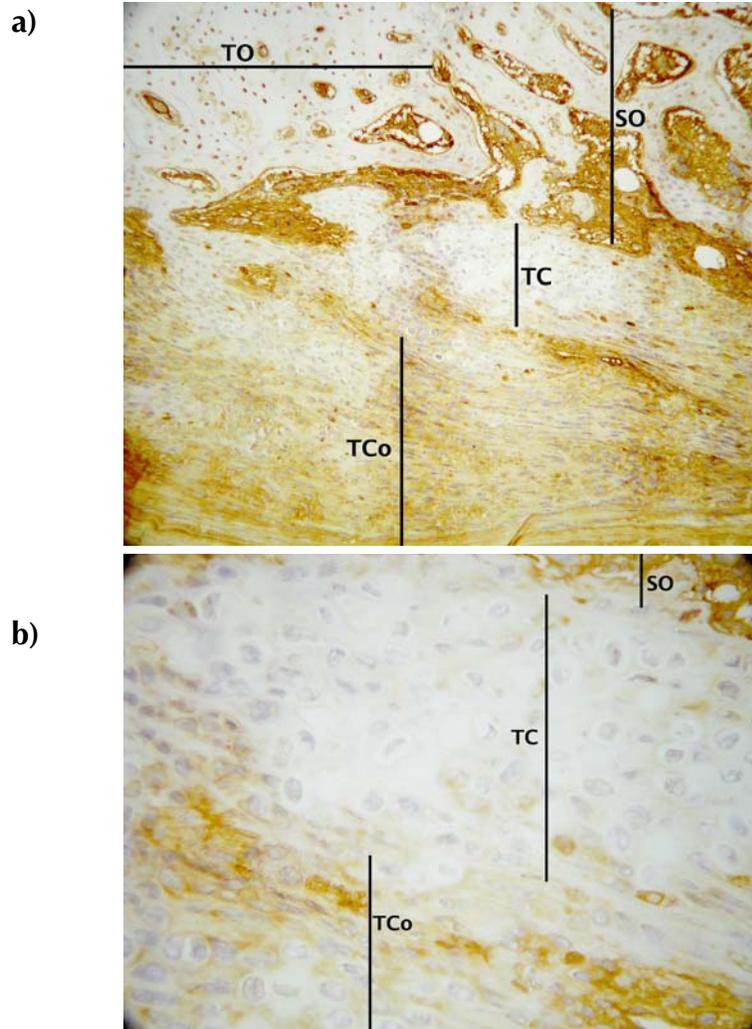


Figura 33: Técnica inmunohistoquímica para colágeno tipo II. (Anticuerpo policlonal anti-colágeno tipo II) (x10). (a, b). (b) Detalle a mayor aumento (x200) de (a). Mayor tinción de la sustancia osteoide que del tejido cartilaginoso.

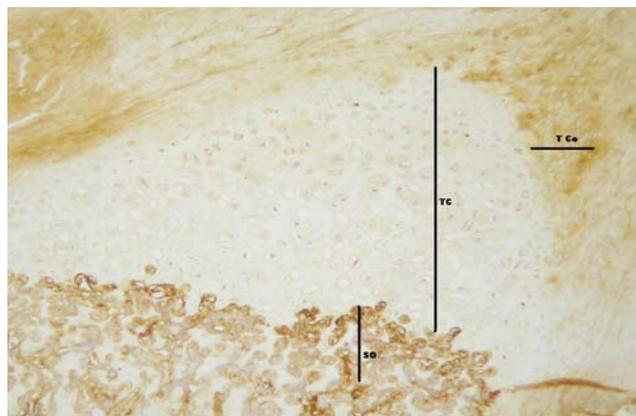
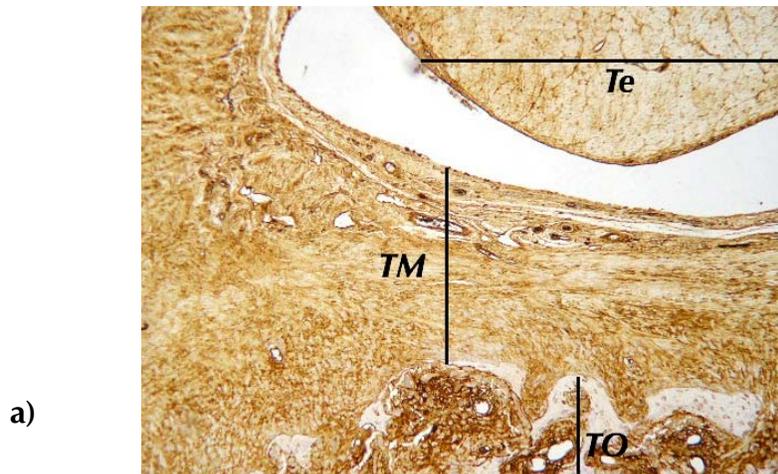


Figura 34: Técnica inmunohistoquímica para colágeno tipo II. (Anticuerpo policlonal anti-colágeno tipo II) (x10). Patrón de tinción de membrana citoplasmática. La intensidad tintorial es mayor en los condrocitos del fibrocartílago mineralizado y sustancia osteoide (SO) y menor en los condrocitos del tejido cartilaginoso (TC) y tejido condroide (TCo).

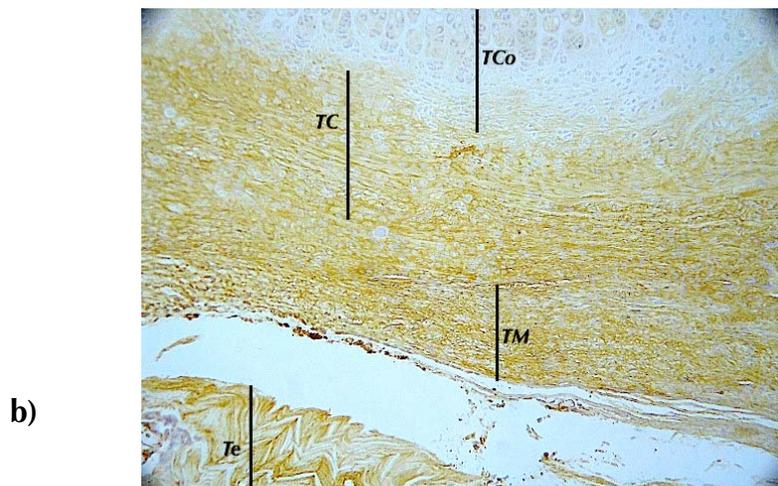
Las preparaciones del grupo Control y Experimental, tanto de la 2ª como de la 4ª semana, presentan positividad para el colágeno tipo II en el tejido fibrocartilaginoso no mineralizado y mineralizado.

Aunque no se aprecian diferencias en el patrón de distribución del colágeno tipo II entre los dos grupos de animales, si existe una mayor área de tinción de colágeno tipo II en el grupo Experimental, tratado con PRP, de la 2ª y 4ª semana, respecto sus grupos Control, ya que la cantidad de tejido fibrocartilaginoso, en sus variadas formas de presentación, también es mayor en los grupos que recibieron PRP. (Figura 35 y 36).

2 semanas Control



2 semanas PRP



c)

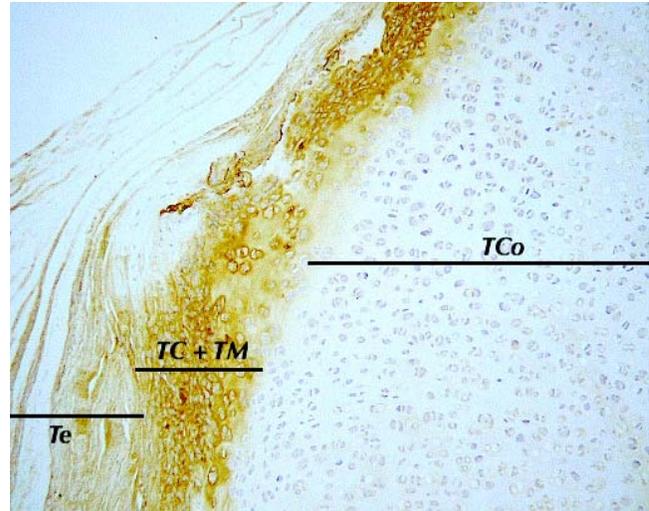
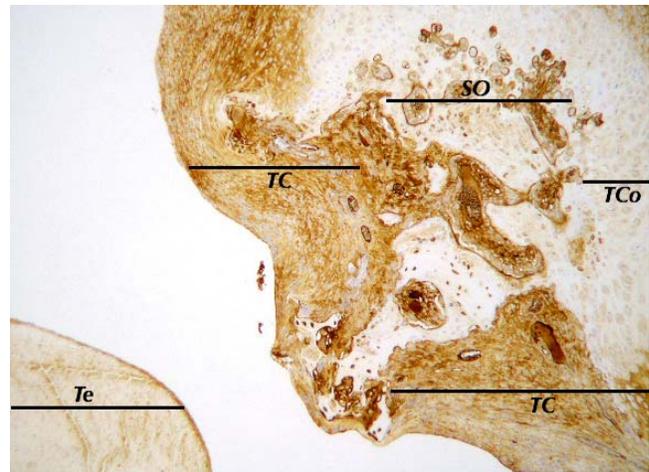


Figura 35: Técnica inmunohistoquímica para colágeno tipo II. (Anticuerpo policlonal anti-colágeno tipo II) (x10).

Grupo Control sacrificado a la 2ª semana: (a) Se visualiza una interfaz entre hueso (TO) - tendón (Te) con abundante tejido mesenquimático (TM), rico en fibroblastos jóvenes, vasos de neoformación y sustancia extracelular. La intensidad tintorial es mayor en la sustancia osteoide del hueso (TO) y menor en los fibroblastos del tejido mesenquimático (TM). **Grupo Experimental (con PRP) sacrificado a la 2ª semana:** (b y c). Se observa una interfaz entre hueso - tendón (Te) con menor componente mesenquimático (TM), mayor número de focos de tejido cartilaginoso constituido por tejido condroide (TCo) y condrocitos ordenados (TC), junto a sustancia osteoide (SO), si se compara con las preparaciones del grupo Control. La intensidad tintorial es mayor en la zona con condrocitos ordenados (TC) y sustancia osteoide (SO) y menor en los condrocitos del tejido condroide (TCo).

4 semanas Control

a)



4 semanas PRP

b)

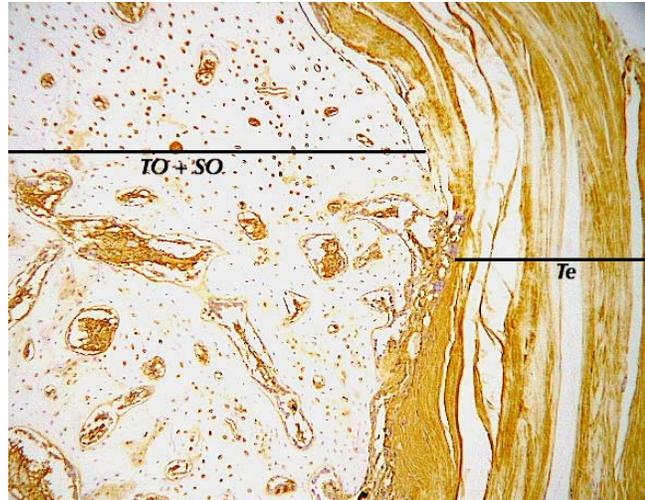


Figura 36: Técnica inmunohistoquímica para colágeno tipo II. (Anticuerpo policlonal anti-colágeno tipo II) (x10).

Grupo Control sacrificado a la 4ª semana: (a). Se observa una interfaz entre hueso-tendón (Te) con predominio de los componentes mesenquimático (TM) condroide (TCo) y cartilaginoso (TC).

Grupo Experimental (con PRP) sacrificado a la 4ª semana (b). En la interfaz entre hueso-tendón (Te) predomina el tejido cartilaginoso (TC), la sustancia osteoide (SO) y las trabéculas de hueso neoformado (TO). La intensidad tintorial es mayor en los condrocitos del fibrocartilago mineralizado y sustancia osteoide (SO) y menor en los condrocitos del tejido cartilaginoso (TC) y tejido condroide (TCo).

VII. 4. ANALISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Hemos realizado el estudio estadístico analizando cinco apartados diferenciados.

Analizamos por separado:

- Los resultados obtenidos según el tiempo de estabulación de los animales relacionándolos con el tipo de cirugía a los que han sido sometidos.
- Los resultados obtenidos en cada tipo de cirugía en relación con el tiempo de estabulación.

Es decir:

- a) Estudio del proceso de cicatrización: comparamos las extremidades "C", es decir las tibias intervenidas quirúrgicamente donde no se utilizó PRP de los conejos sacrificados a las 2 semanas, con las tibias intervenidas quirúrgicamente donde no se utilizó PRP de los conejos sacrificados a las 4 semanas.
- b) Estudio del proceso de cicatrización al aplicar PRP: comparamos las extremidades "PRP", es decir las tibias intervenidas quirúrgicamente donde se utilizó PRP de los conejos sacrificados a las 2 semanas, con las tibias intervenidas quirúrgicamente donde se utilizó PRP de los conejos sacrificados a las 4 semanas
- c) Estudio de las 2 semanas: comparamos en el grupo sacrificado a las 2ª semanas las piezas C (tibias intervenidas quirúrgicamente donde no se utilizó PRP de los conejos sacrificados a las 2 semanas) con las piezas PRP (tibias intervenidas quirúrgicamente donde se utilizó PRP de los conejos sacrificados a las 2 semanas).
- d) Estudio de las 4 semanas: comparamos en el grupo sacrificado a las 4ª semanas las piezas "C" (tibias intervenidas quirúrgicamente donde no se utilizó PRP de los conejos sacrificados a las 4 semanas) con las piezas "PRP" (tibias intervenidas quirúrgicamente donde se utilizó PRP de los conejos sacrificados a las 4 semanas).
- e) Por último, comparamos los resultados obtenidos en las piezas "C" de los animales sacrificados a las 4 semanas, con los de las piezas "PRP" de los animales sacrificados a las 2 semanas.

VII. 4. 1. Análisis Estadístico de los Valores Radiológicos

Las imágenes radiológicas tras ser digitalizadas, son tratadas con el programa ImageJ 1.39I para calcular los resultados de la variable: “área de la reacción ósea” aparecida en la zona de entrada de la plastia tendinosa en el túnel óseo tibial. (Figura 37) (Tabla IV).

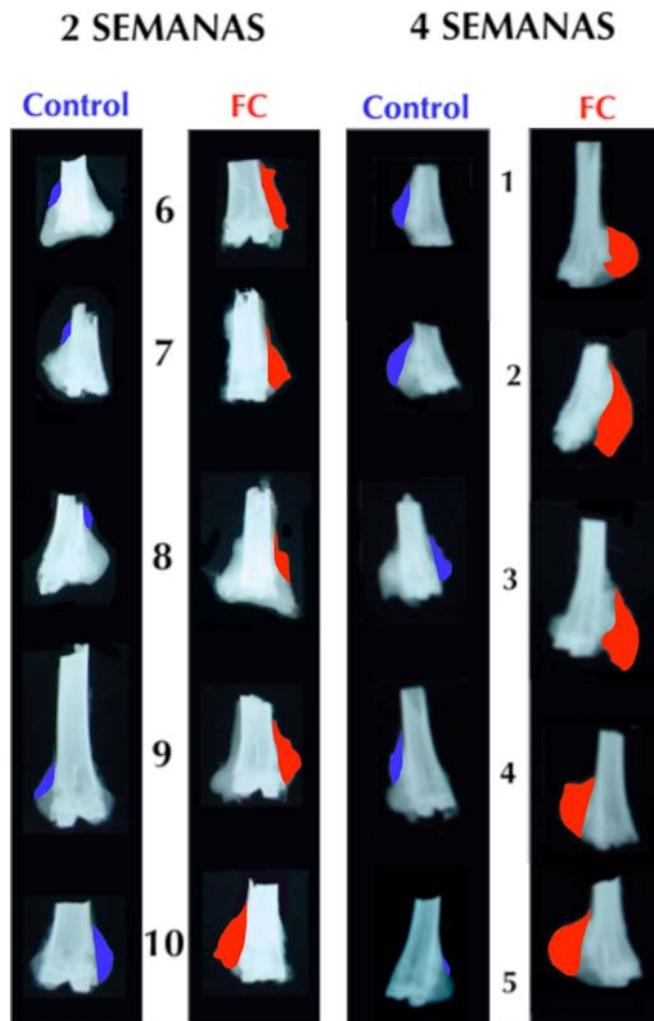


Figura 37: Digitalización de las imágenes radiológicas del área de reacción ósea en cada una de las piezas.

	Area C (pixeles)	Area C (cm2)	Area PRP (pixeles)	Area PRP (cm2)
GRUPO 2ª semana				
6	750	0,20145044	3.532	0,94869729
7	3854	1,03518668	4.599	1,23529412
8	763	0,20494225	4.227	1,1353747
9	1820	0,48885308	2.631	0,70668815
10	1807	0,48536127	4.633	1,24469514
Media	1798,8	0,48315874	3924	1,05409616
Máximo	3854	1,04	4616	1,24
Mínimo	750	0,2	2631	0,7
GRUPO 4ª semana				
1	3067	0,81051797	6.313	1,66834038
2	7593	2,00660677	10.930	2,8884778
3	1812	0,47885835	7.391	1,9532241
4	4394	1,16120507	5.733	1,51506342
5	4382	1,15803383	6.313	1,66834038
Media	4249,6	1,12304440	7336	1,93868922
Máximo	7593	2	10930	2,89
Mínimo	1800	0,48	5733	1,52

Tabla IV: resultados de la medición del área de reacción ósea

El análisis estadístico se realizó con el paquete SPSS 11.0 y Statistics462.

Valores del área media de la reacción ósea en los distintos grupos:

- a) grupo 2ª semana Control: 0,48 cm2 (1798,8 pixeles) +/- 0,3
- b) grupo 2ª semana PRP: 1,05 cm2 (3924 pixeles) +/- 0,2
- c) grupo 4ª semana Control: 1,12 cm2 (4249,6 pixeles) +/- 0,51
- d) grupo 4ª semana PRP: 1,94 cm2 (7336 pixeles) +/- 0,5

Al realizarse el estudio en grupos pequeños ($n < 30$) debemos comprobar si los datos provienen de una variable normal para decidir la prueba a realizar. La prueba que comprueba la normalidad de los datos es la de Kolmogorov-Smirnov, en la que se

considera $\alpha = 0,05$. Si el p-valor es mayor que α se puede considerar que los datos provienen de una distribución normal y utilizaremos pruebas paramétricas. Si por el contrario el p-valor es menor que α consideramos que esos datos no provienen de una distribución normal por lo que utilizaremos pruebas no paramétricas.

Las pruebas estadísticas utilizadas son:

- U de Mann-Whitney (prueba no paramétrica para comparar los valores de los grupos).
- T de Student (prueba paramétrica utilizada cuando los datos provienen de una distribución normal).
- Chi-cuadrado (para comparar frecuencias independientes).

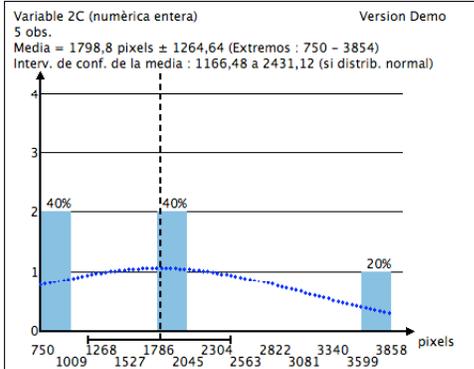
El resultado de la aplicación de la prueba de Kolmogorov-Smirnov en los cuatro grupos de tratamiento (grupo 2ª semana Control, grupo 2ª semana PRP, grupo 4ª semana Control y grupo 4ª semana PRP), admiten la normalidad de los datos. La prueba obtiene los siguientes p-valor:

- grupo 2ª semana Control:	0,783
- grupo 2ª semana PRP:	0,937
- grupo 4ª semana Control:	0,849
- grupo 4ª semana PRP:	0,796

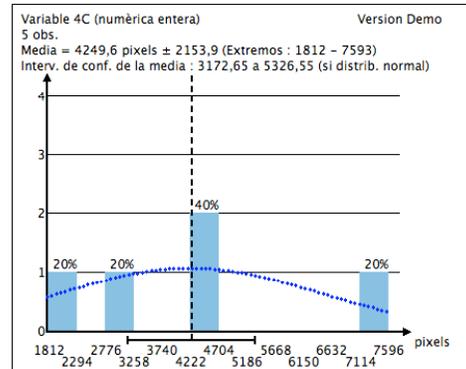
Así pues, podemos suponer que los datos de estos grupos siguen una distribución normal, y además están relacionados, por lo que utilizaremos la prueba paramétrica t de Student, para compararlos. Las hipótesis que nos vamos a plantear son las siguientes:

a) El área de reacción ósea del grupo “4ª semana Control” mayor la del grupo “2ª semana Control”: **4ª semana Control > 2ª semana Control?**

Grupo 2ª sem Control

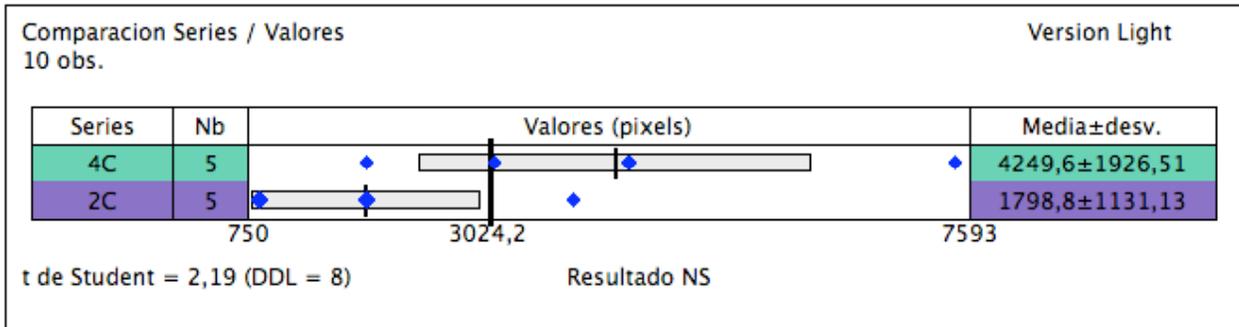


Grupo 4ª sem Control



Media (4 sem C) = 4249,60

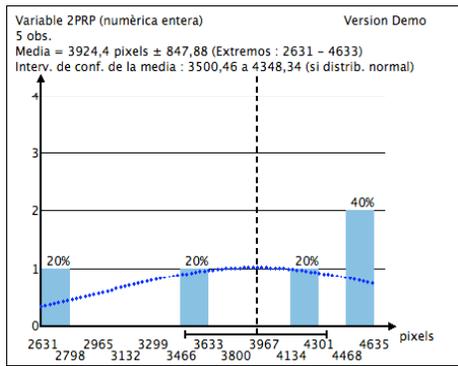
Media (2 sem C) = 1798,80



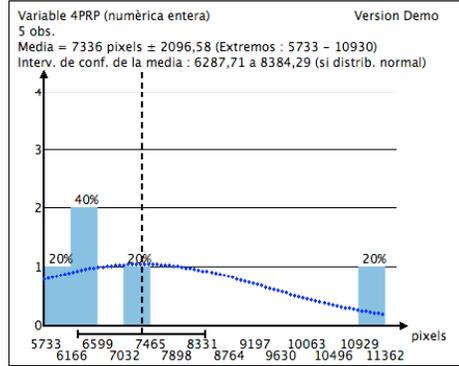
En este caso obtenemos un estadístico t de Student igual a 2,194 con 8 grados de libertad, y un p-valor de 0,0298, por lo que podemos afirmar que existen diferencias estadísticamente significativas entre el área media de los dos grupos. Así, podemos afirmar que existen mayores reacciones óseas a las 4 semanas que a las 2 semanas al comparar los 2 grupos Control.

b) El área de reacción ósea del grupo “4ª semana PRP” es mayor que la del grupo 2ª semana PRP: 4ª sem PRP > 2ª sem PRP?

Grupo 2ª sem PRP

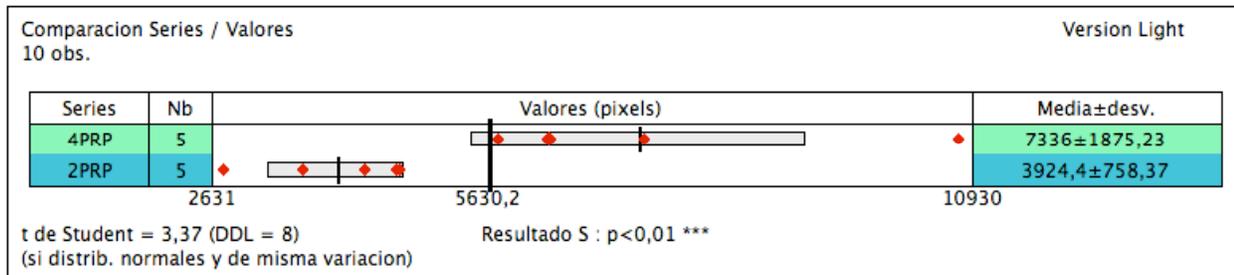


Grupo 4ª sem PRP



Media (4ªsemPRP) = 7336,00

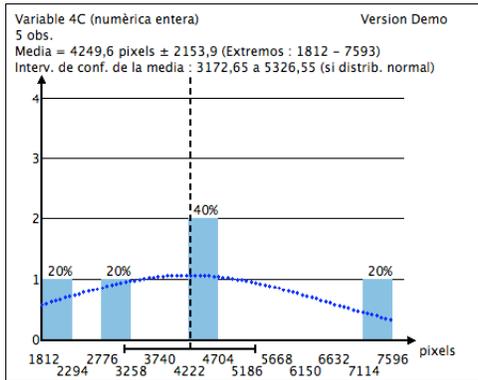
Media (2ªsemPRP) = 3924,40



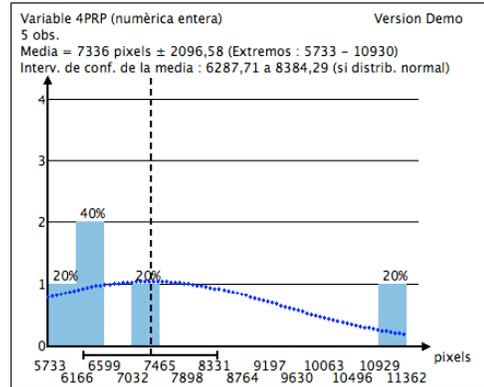
Aplicando la prueba t de Student obtenemos un estadístico de valor 3,373 con 8 grados de libertad, y un p-valor de 0,0049, por lo que podemos afirmar que existen diferencias estadísticamente significativas entre el área de callo a la 4ª semana respecto a la 2ª semana de los 2 grupos donde aplicamos PRP, encontrando valores mayores a las cuatro que a las dos semanas.

d) El área de reacción ósea del grupo “4ª semana PRP” es mayor que la del grupo 4ª semana Control: **4ª sem PRP > 4ª sem Control?**

Grupo 4ª sem Control



Grupo 4ª sem PRP



Media (4ª sem PRP) = 7336,00

Media (4ª sem C) = 4249,60

Comparación 4PRP / 4C

5 pares

Series	Nb	Valores (pixels)	Media±desv.
4PRP	5		7336±1875,23
4C	5		4249,6±1926,51

1812 5792,8 10930

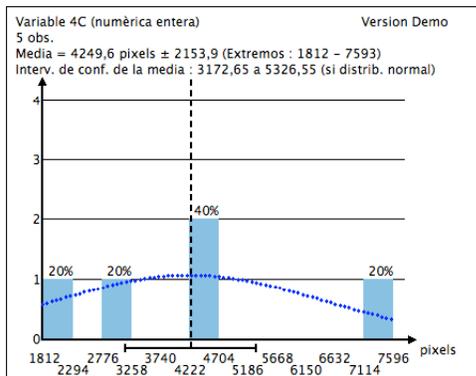
t de Student = 4,22 (DDL = 4)

Resultado S : p<0,02**

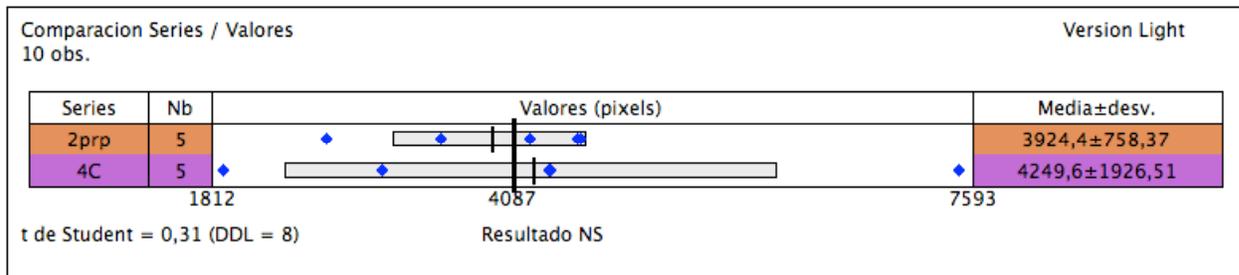
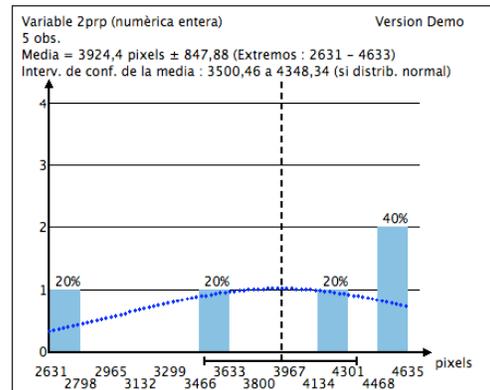
La prueba t de Student obtiene un estadístico de valor 4,222 con 4 grados de libertad, que corresponde a un p-valor de 0,0067, por lo que podemos de nuevo afirmar que existe una diferencia estadísticamente significativa del área entre estos grupos, observando mayores valores en el grupo Experimental que en su respectivo grupo Control a las 4 semanas.

e) Comparación del área de reacción ósea del grupo “4ª semana Control” con el grupo “2ª semana PRP”: **4ª sem Control = 2ª sem PRP?**

Grupo 4ª sem Control



Grupo 2ª sem PRP



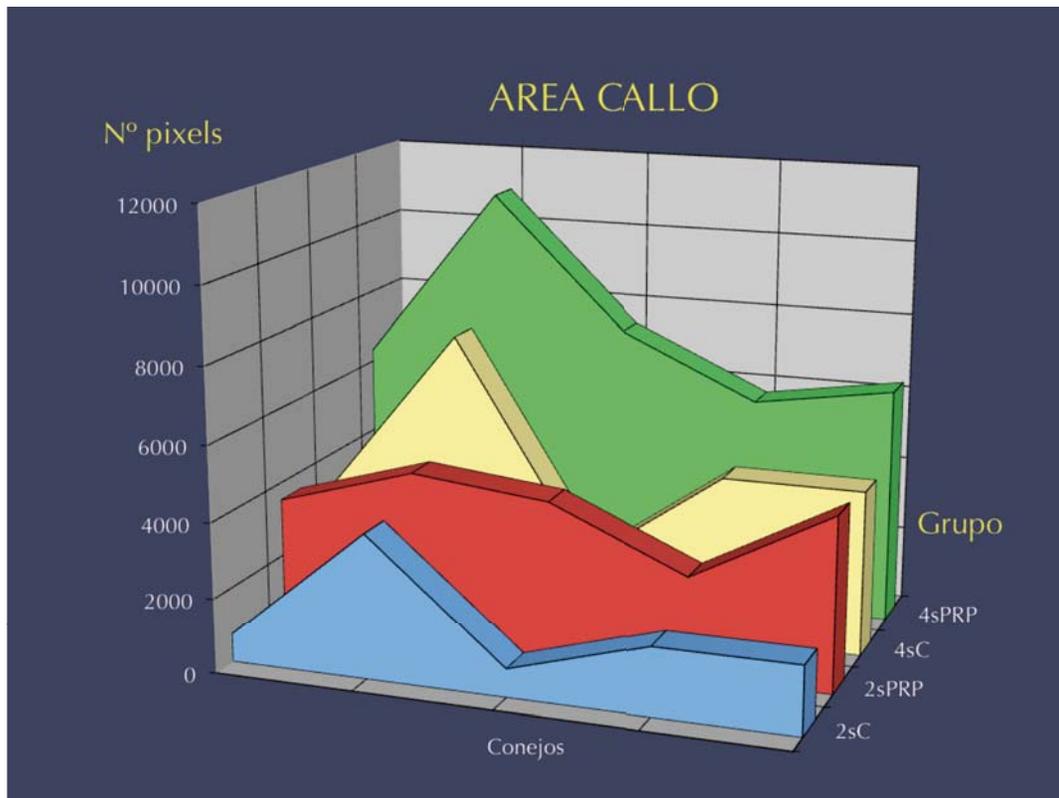
La aplicación de la prueba t de Student obtiene un estadístico de valor 0,314 con 8 grados de libertad, con un p-valor de 0,0761 , por lo que **no** podemos afirmar que existen diferencias estadísticamente significativas entre el área de estos dos grupos: 4ª semana Control y 2ª semana Experimental.

Conclusión los resultados radiológicos

El estudio informático de las imágenes radiográficas de las piezas pone de manifiesto la presencia de una reacción ósea de mayor tamaño:

- a) a las 4 semanas que a las 2 semanas, tanto si se comparan los dos grupos Experimentales como Controles,
- b) en los grupos Experimentales respecto a sus correspondientes grupos Control, y
- c) en el grupo Experimental de los animales sacrificados a la 4ª semana respecto al resto de grupos.

No existen diferencias estadísticamente significativas del área de reacción ósea existente entre las extremidades del grupo Control de los conejos sacrificados a la 4ª semana al ser comparadas con el grupo Experimental de los conejos sacrificados a la 2ª semana, donde se aplicó PRP. ([Gráfica 3](#)).



Gráfica 3: Representación del área de la reacción ósea en el grupo de conejos sacrificados a la 2ª semana y 4ª semana.
2sC: piezas del grupo control sacrificado a la 2ª semana.
2sPRP: piezas del grupo experimental sacrificado a la 2ª semana.
4sC: piezas del grupo control sacrificado a la 4ª semana.
4sPRP: piezas del grupo experimental sacrificado a la 4ª semana.

VII. 4. 2. Análisis Estadístico de los Valores Microscópicos

El análisis estadístico se realizó con el paquete SPSS 11.0. El estudio comparativo de las variables cualitativas estudiadas se realizó mediante la prueba de la U de Mann-Whitney para variables ordinales independientes no paramétricas. Se consideró una diferencia estadísticamente significativa una $p < 0.05$, en este caso se aceptaba la hipótesis alternativa.

Las variables estudiadas son ordinales. Así pues, no es correcto utilizar pruebas para variables continuas sobre la media. Tampoco hemos podido hacer una prueba de Chi-cuadrado, al disponer de pocos elementos. En estos casos se utilizan pruebas no paramétricas, las adecuadas cuando no se tiene una muestra suficientemente grande.

Nuestro estudio compara dos poblaciones (sacrificio a 2 semanas vs. 4 semanas, y grupo Control vs. grupo Experimental (con PRP)) mediante muestras independientes. Así pues, debemos hacer una prueba no paramétrica con 2 muestras independientes. Esta prueba se conoce como la prueba de la U de Mann-Whitney.

Partimos de dos hipótesis:

Hipótesis nula: las dos muestras provienen de la misma población.

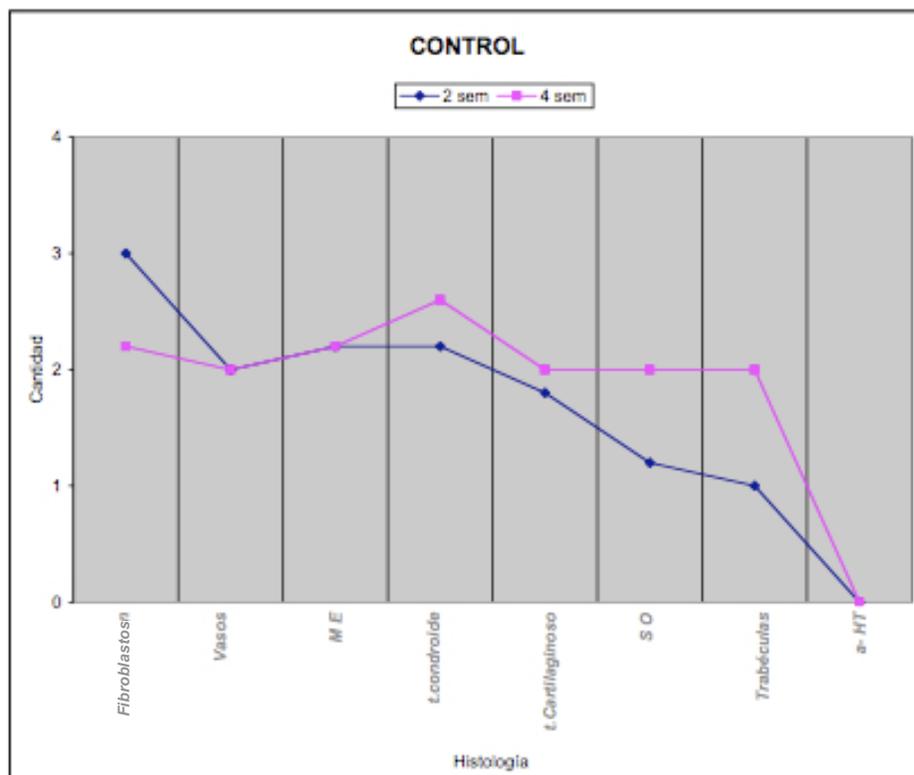
Hipótesis alternativa: las dos muestras provienen de poblaciones diferentes.

Se calcula un estadístico basado en rangos, y se obtiene un p-valor. Si el p-valor es mayor que alfa, entonces nos quedaremos con la hipótesis nula. Si el p-valor es menor que alfa, entonces nos quedaremos con la hipótesis alternativa. El valor estándar de alfa es 0.05.

a) Al comparar los resultados de las piezas del grupo Control en los animales sacrificados a la 2ª y 4ª semana, podemos concluir que:

- Existe un nivel superior de fibroblastos en las extremidades de los conejos sacrificados a la 2ª semana del grupo Control ($p=0,14$)
- Existe un nivel superior de sustancia osteoide ($p=0,014$) y trabéculas óseas ($p=0,017$) en las extremidades de los conejos sacrificados a la 4ª semana del grupo Control

Como vemos existe un predominio de elementos diferente (fibroblastos ó sustancia osteoide y trabéculas óseas) según el intervalo de tiempo de sacrificio de los animales. (Gráfica 4).

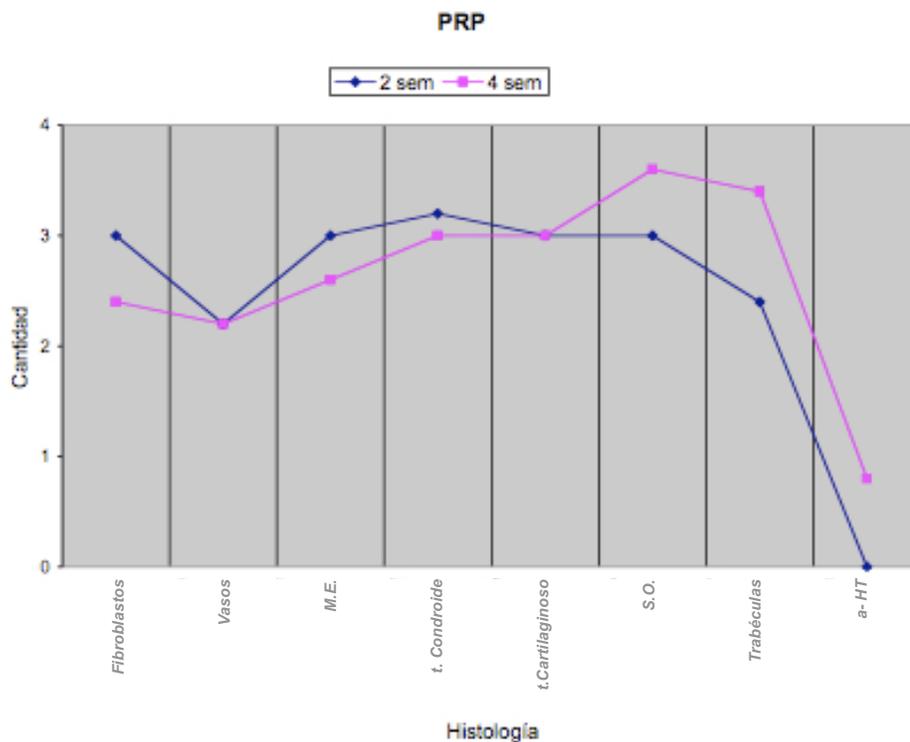


Gráfica 4: representación gráfica de los resultados obtenidos en los dos grupos Control, situando en el eje de abcisas los distintos elementos predominantes según aparecen a lo largo del tiempo en el proceso de cicatrización (fibroblastos, vasos de neoformación, matriz extracelular, tejido condroide, tejido fibrocartilaginoso organizado, sustancia osteoide, trabéculas óseas y anclajes hueso-tendón), y en el eje de ordenadas la cantidad de éstos.

b) Al comparar los resultados de las piezas del grupo Experimental de los animales sacrificados a la 2ª y 4ª semana, podemos concluir que:

- Existe un nivel superior posiblemente de fibroblastos ($p=0,05$) en las extremidades de los conejos sacrificados a la 2ª semana del grupo Experimental.
- Existe un nivel superior de trabéculas óseas ($p=0,031$) y posiblemente de sustancia osteoide ($p=0,05$) y anclaje hueso-tendón en las extremidades de los conejos sacrificados a la 4ª semana del grupo Experimental.

Como vemos existe un predominio de elementos diferente (fibroblastos ó trabéculas óseas) según el intervalo de tiempo de sacrificio de los animales. (Gráfica 5).

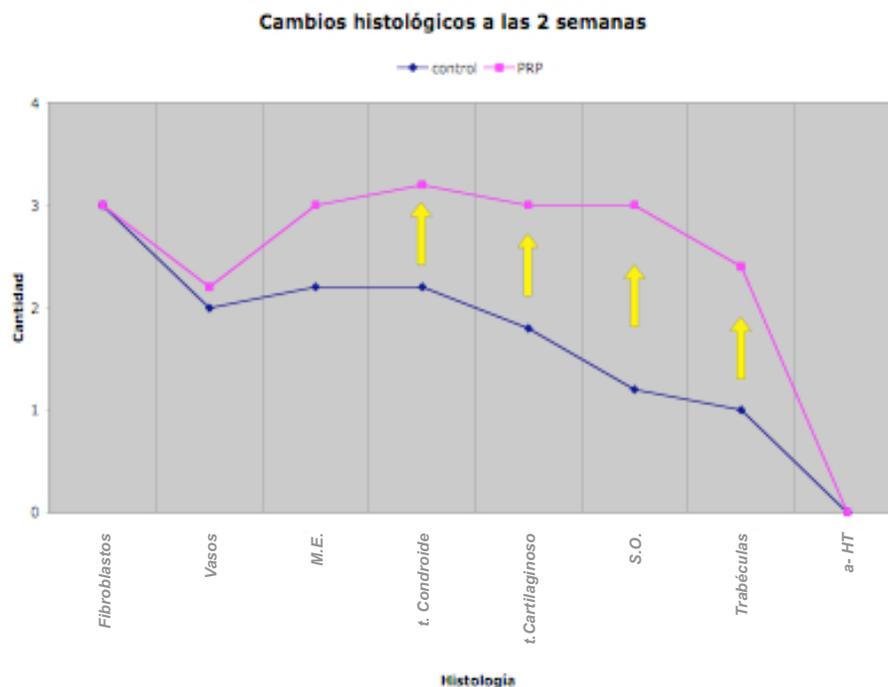


Gráfica 5: representación gráfica de los resultados obtenidos en los dos grupos PRP, situando en el eje de los distintos elementos predominantes según aparecen a lo largo del tiempo en el proceso de cicatrización (fibroblastos, vasos de neoformación, matriz extracelular, tejido condroide, tejido fibrocartilaginoso organizado, sustancia osteoide, trabéculas óseas y anclajes hueso-tendón), y en el eje de ordenadas la cantidad de éstos.

c) Al comparar los resultados de las piezas de los animales sacrificados a la 2ª semana pertenecientes al grupo Control y Experimental, podemos concluir que:

- Las extremidades del grupo Experimental poseen una mayor presencia de tejido condroide ($p=0,015$), tejido fibrocartilaginoso organizado ($p=0,004$), sustancia osteoide ($p=0,004$), trabéculas óseas ($p=0,015$) de forma estadísticamente significativa respecto a las piezas de su correspondiente grupo Control, y posiblemente también de matriz extracelular ($p=0,065$).

Así, a la 2ª semana encontramos mayor cantidad de elementos y además característicos de intervalos de tiempo posteriores, en el grupo Experimental, donde se aplicó PRP, respecto a su correspondiente grupo Control. (Gráfica 6).

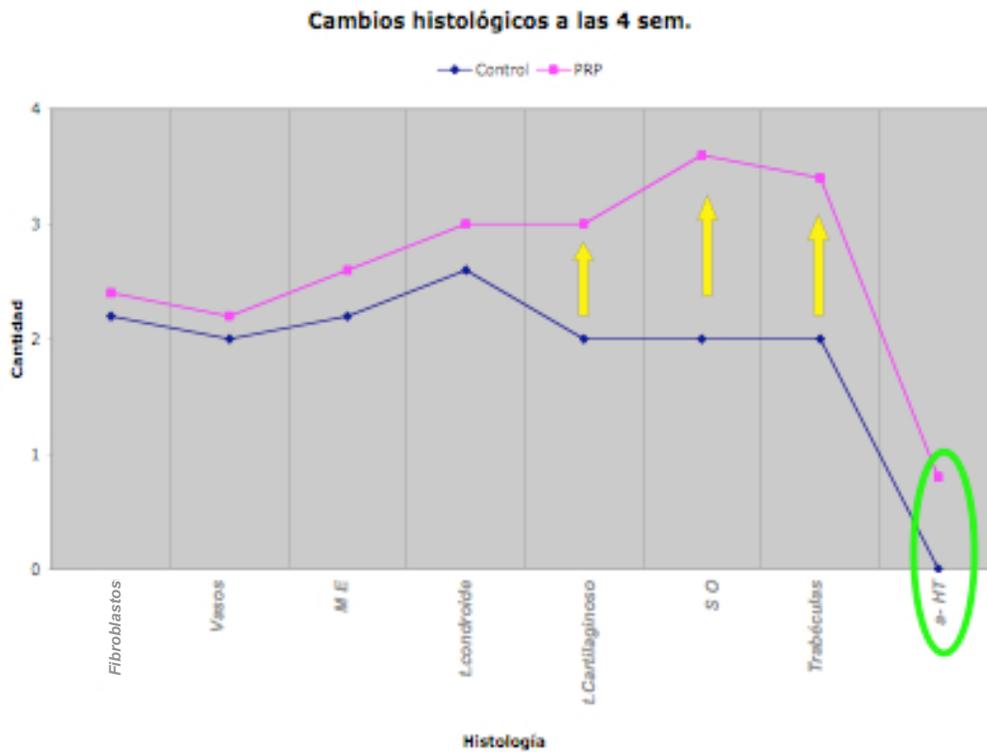


Gráfica 6: representación gráfica de los resultados obtenidos en los animales sacrificados a la 2ª semana, situando en el eje de abcisas los distintos elementos predominantes según aparecen a lo largo del tiempo en el proceso de cicatrización (fibroblastos, vasos de neoformación, matriz extracelular, tejido condroide, tejido fibrocartilaginoso organizado, sustancia osteoide, trabéculas óseas y anclajes hueso-tendón), y en el eje de ordenadas la cantidad de éstos. Las extremidades pertenecientes al grupo Experimental (PRP), poseen un nivel superior de tejido condroide, tejido fibrocartilaginoso organizado, sustancia osteoide, trabéculas óseas, que las extremidades del grupo Control; siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

d) Al comparar los resultados de las extremidades de los animales sacrificados a la 4^a semana pertenecientes al grupo Control y Experimental, podemos concluir que:

- Las extremidades del grupo Experimental poseen de forma estadísticamente significativa un nivel superior de tejido fibrocartilaginoso organizado ($p=0,003$), sustancia osteoide ($p=0,005$), y trabéculas óseas ($p=0,005$).
- La prueba estadística no puede confirmar la existencia de diferencias estadísticamente significativas en la variable anclaje hueso-tendón ($p=0,134$), pero al ser detectada únicamente su presencia en piezas del grupo Experimental, con PRP, seguramente con muestras mayores si sería posible confirmar esta diferencia.

Así, a la 4^a semana encontramos mayor cantidad de elementos y además característicos de intervalos de tiempo posteriores, en el grupo Experimental, donde se aplicó PRP, respecto a su correspondiente grupo Control. ([Gráfica 7](#)).

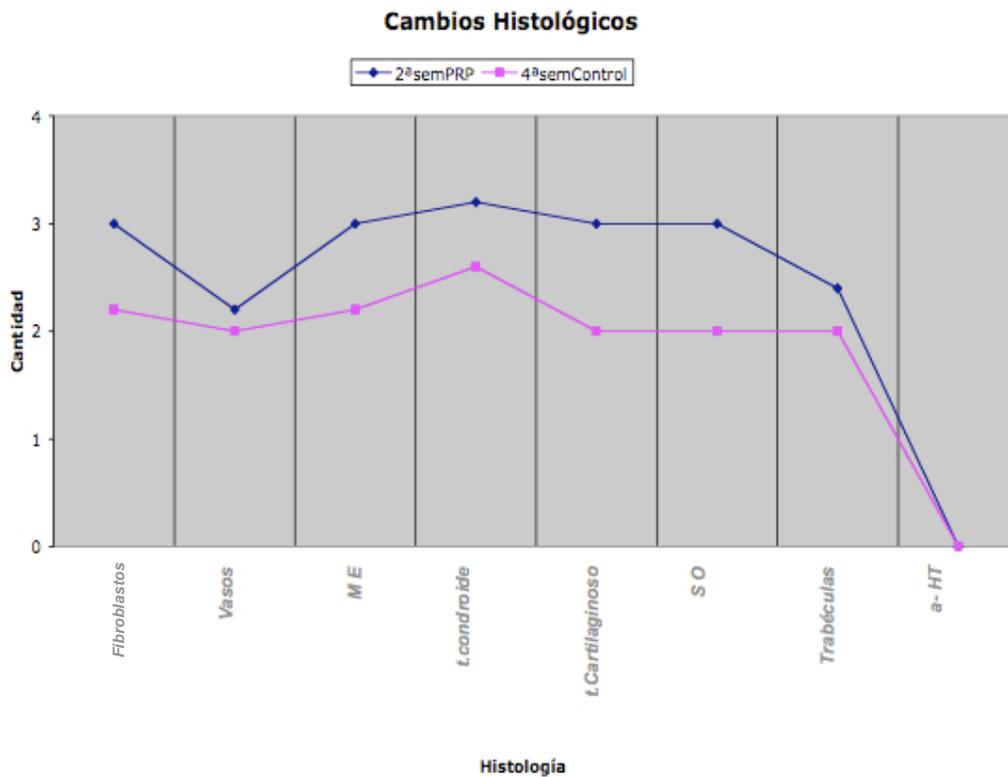


Gráfica 7: representación de los resultados obtenidos en los animales sacrificados a las 4ª semanas, situando en el eje de abscisas los distintos elementos predominantes según aparecen a lo largo del tiempo en el proceso de cicatrización (fibroblastos, vasos de neoformación, matriz extracelular, tejido condroide, tejido fibrocartilaginoso organizado, sustancia osteoide, trabéculas óseas y anclajes hueso-tendón), y en el eje de ordenadas la cantidad de éstos. Las piezas pertenecientes al grupo Experimental (PRP), poseen un nivel superior tejido fibrocartilaginoso organizado, sustancia osteoide y trabéculas óseas; siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Los anclajes hueso-tendón no obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($P=0,134$), pero seguramente con muestras de mayor tamaño, si hubiera sido posible confirmar esta diferencia.

e) Al comparar los resultados de las extremidades de los animales sacrificados a la 2ª semana del grupo Experimental con las de los animales sacrificados a la 4ª semana del grupo Control, podemos concluir que:

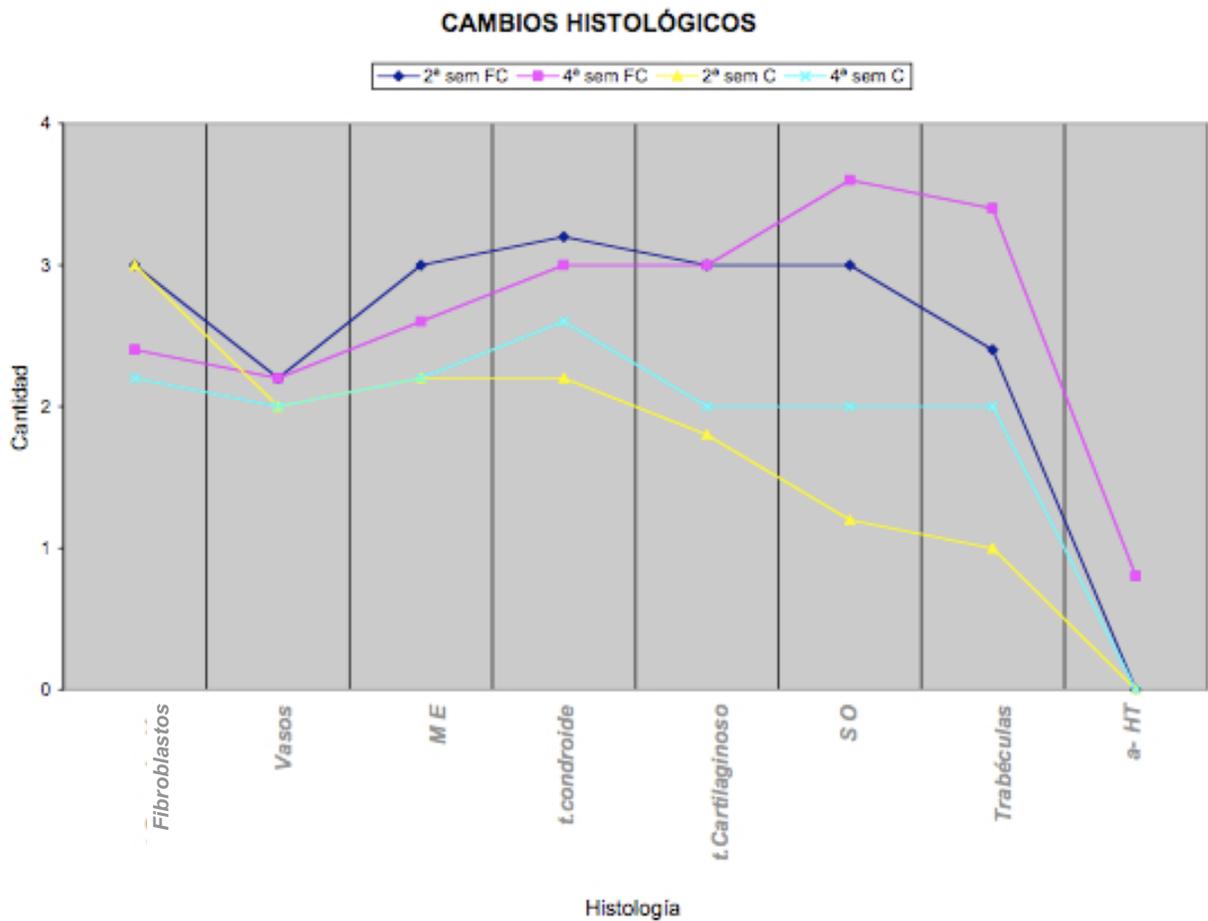
- Las piezas del grupo Experimental de los animales sacrificados a la 2ª semana poseen valores superiores de fibroblastos ($p=0,014$), tejido fibrocartilaginoso organizado ($p= 0,003$), sustancia osteoide ($p = 0,003$), y posiblemente también de matriz extracelular ($p=0,065$), tejido condroide ($p=0,174$) y trabéculas óseas ($p=0,134$).

Así, las extremidades del grupo Experimental (PRP) de los animales sacrificados a la 2ª semana poseen mayor cantidad de elementos propios de su etapa y también de elementos característicos de intervalos de tiempo posteriores, que las del grupo Control de los animales sacrificados a la 4ª semana. (Gráfica 8).



Gráfica 8: representación gráfica de los resultados obtenidos en los grupos 2ª sem PRP y 4ª sem Control, situando en el eje de abcisas los distintos elementos predominantes según aparecen a lo largo del tiempo en el proceso de cicatrización (fibroblastos, vasos de neoformación, matriz extracelular, tejido condroide, tejido fibrocartilaginoso organizado, sustancia osteoide, trabéculas óseas y anclajes hueso-tendón), y en el eje de ordenadas la cantidad de éstos.

En resumen, las extremidades que recibieron PRP, tanto de los animales sacrificados a la 2ª semana como a la 4ª semana, presentan unos niveles superiores y de forma más precoz de los distintos elementos que participan en el proceso de cicatrización, que sus respectivos grupos Control. (Gráfica 9).



Gráfica 9: representación gráfica de los resultados de todos los grupos, situando en el eje de abcisas los distintos elementos predominantes según aparecen a lo largo del tiempo en el proceso de cicatrización (fibroblastos, vasos de neoformación, matriz extracelular, tejido condroide, tejido fibrocartilaginosa organizado, sustancia osteoide, trabéculas óseas y anclajes hueso-tendón), y en el eje de ordenadas la cantidad de éstos.

Discusión

VIII. DISCUSIÓN

En la práctica clínica se han utilizado múltiples tipos de plastias tendinosas para la reconstrucción del LCA. Las más utilizadas actualmente son el autoinjerto HTH rotuliano y la multifascicular de TI, consiguiéndose buenos resultados funcionales en más del 80-90% de los de pacientes²⁹¹ aunque todavía quedan cuestiones sin resolver, como la elección del tipo de injerto, el lugar de inserción, su configuración en uno o dos fascículos, el tipo de fijación o la tensión del mismo.

Los protocolos de rehabilitación actual²⁹² no limitan la extensión ni la flexión de la rodilla en las fases iniciales, permiten al paciente a caminar con carga, y a subir y bajar escaleras desde el postoperatorio inmediato. Para que los injertos que reconstruyen al LCA puedan aguantar las sollicitaciones de tracción a las que son sometidos durante estas actividades, son necesarios dispositivos de fijación que proporcionen una resistencia mecánica inicial suficiente. No obstante, es imprescindible conseguir una fijación biológica precoz del injerto a la zona receptora para permitir que soporte las sollicitaciones que requieren la realización de las actividades de la vida cotidiana, deportiva y/o laboral.

Se ha conseguido acelerar la cicatrización del injerto en el interior del túnel óseo con diferentes métodos biológicos, como es aplicar en la zona de unión del tendón al túnel óseo BMP-2^{142,143}, factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF-BB)¹⁴⁴, células de la medula ósea¹⁴⁵, terapia génica¹⁴², ó colocando periostio recubriendo al injerto tendinoso^{146,147}. No obstante, no conocemos ningún trabajo que estudie el efecto y la histología del proceso reparativo de un tendón en el interior de un túnel óseo cuando se

aplica PRP como fuente de aporte de FC, es decir, aplicar varios FC a la vez y en proporciones fisiológicas.

En el conejo la inserción de un tendón no patológico en el hueso se produce de una forma muy parecida histológicamente a la de otros modelos animales como el perro, o en el mismo ser humano^{143,190,193}. Hemos elegido al conejo como modelo de experimentación animal por su fácil manipulación, requerir una escasa infraestructura para su mantenimiento y bajo coste económico.

La extrapolación a la especie humana de los resultados obtenidos con animales sigue siendo motivo de controversia. Es difícil, realizar comparaciones entre diferentes modelos experimentales, con diferentes animales y más realizar extrapolaciones al ser humano. Además se sabe que la cicatrización en el conejo es un proceso más rápido que en el hombre. No obstante, creemos que los resultados deben acercarse a la realidad porque no hemos sacado ninguna conclusión a partir de cifras absolutas, sino siempre con valores relativos respecto a los otros grupos de estudio. Por otra parte el proceso de cicatrización ya ha sido estudiado por otros autores en el conejo^{190,192,293}, aspecto que permite realizar comparaciones con nuestro modelo animal a pesar de las diferencias con el mismo. Así, la comparación de los resultados observados entre el grupo Experimental y Control permite atribuir las diferencias observadas en la cicatrización a la aplicación del PRP.

En este estudio planteamos un modelo experimental donde el mismo conejo sirve de grupo caso y control, intervención quirúrgica bilateral, lo que permite eliminar variaciones atribuibles a factores individuales de los animales (peso, sexo, dieta,

actividad...). El modelo experimental reproduce el ambiente habitualmente encontrado en la interfase hueso-tendón de una ligamentoplastia reconstructiva de LCA que emplea tendones isquiotibiales y tornillos interferenciales reabsorbibles como dispositivo de fijación. La única diferencia es que en el grupo Experimental, a diferencia del grupo Control, se aplica PRP en el interior del tendón y del túnel óseo donde se introduce.

Realizamos un estudio cronológico para describir los cambios radiográficos, macroscópicos y microscópicos en el tiempo. Sabemos que entre las ocho y doce semanas de la inserción de un tendón en un túnel óseo la interfase hueso-tendón está más organizada, y las fibras de colágeno atraviesan la interfase, produciéndose una inserción indirecta de las fibras de colágeno del tendón en el hueso, orientadas en la dirección de tracción del tendón al hueso, sin presentar ninguna ventaja sobre la reparación directa en el hueso cortical¹⁹³. El periodo de tiempo en el que se completa el proceso de cicatrización puede variar en función de diversos factores, como son las fuerzas mecánicas que actúan en la interfase y el tipo de hueso implicado^{194,195}. Por esta razón centramos el estudio en un periodo de tiempo no superior a las 8 semanas, ya que posteriormente la cicatrización ha finalizado y no es previsible encontrar diferencias entre los dos grupos de tratamiento. También sabemos que en la zona de unión del tendón al hueso el colágeno predominante es el tipo II^{187,188,196}, tanto en el fibrocartílago mineralizado como en el no mineralizado. Tras la inserción de un tendón en el interior de un túnel óseo, el colágeno tipo II no es observado en la unión hueso-tendón hasta después de la 2ª semana tras la cirugía concomitantemente con la aparición de los condrocitos, por lo que era recomendable elegir un intervalo de tiempo inferior. Entre la

3ª y la 4ª semana de la inserción del tendón en el túnel óseo, el área positiva para el colágeno tipo II aumenta rápidamente, de forma proporcional al aumento del número de condrocitos, y a partir de la 8ª semana la distribución del colágeno tipo II es similar a la del tendón normal^{114,190,191}.

Conocidos estos intervalos de tiempo, y los elementos predominantes en cada uno de ellos, decidimos sacrificar a un grupo de conejos a las 2ª semana (tiempo de aparición del colágeno tipo II en la interfase hueso-tendón) y el otro grupo de animales a la 4ª semana postintervención (tiempo de aparición de la mayor cantidad de colágeno tipo II), intentando ver si se presentaba alguna modificación en tiempo de aparición o en la cantidad de los distintos elementos histológicos participantes del proceso de cicatrización normal.

No hemos utilizado atropina durante el acto anestésico para disminuir la mortalidad asociada a este fármaco por su efecto vagolítico, como es la producción de taquicardia o la reducción de las secreciones bronquiales y salivares²⁸⁹, además uno de cada tres conejos posee la enzima atropina esterasa, que explica por qué muchos son refractarios a la administración de atropina^{288,293}.

Hemos realizado una técnica quirúrgica con las máximas condiciones de esterilidad, como se utiliza en humanos, administrando antibióticos profilácticos, y no hemos tenido ninguna infección lo que ha permitido no descartar a ningún conejo del estudio.

El proceso de cicatrización de un tendón en el interior de un túnel óseo se produce tras la sucesión de una fase inflamatoria, proliferativa, reparadora y remodeladora, pudiendo durar varios meses hasta completarse. Parece que la cicatrización se inicia por los FC liberados en la degranulación plaquetar²⁹⁴. El PRP contiene FC como el PDGF, VEGF, TGF- β , β -FGF e IGF-1, que favorecen la curación de los tejidos^{255,261} estimulando la diferenciación y maduración celular²⁹⁵. Se ha visto que los FC actúan de forma combinada y su efecto varía según la concentración y proporción de los mismos^{245,246,295}. Los FC obtenidos de las plaquetas están en proporciones fisiológicas, a diferencia de los FC recombinantes, los cuales se aplican en solitario y a dosis habitualmente suprafisiológicas.

El callo óseo de mayor tamaño observado en la zona de unión del tendón al túnel óseo cuando se aplica PRP, pone en evidencia que la aplicación de PRP estimula como mínimo el proceso de formación ósea. El aumento de formación ósea en la zona de inserción con protusión de este tejido bajo la piel pudiera considerarse no deseable, ya que en el humano podría ocasionar como mínimo un problema estético.

En la inserción normal de un tendón o un ligamento en el hueso se distinguen cuatro zonas: tendón, fibrocartílago no mineralizado, fibrocartílago mineralizado y hueso¹⁸⁹. El fibrocartílago no mineralizado se separa del mineralizado por la "marca de agua"¹⁹⁰. Los injertos tendinosos sin pastilla ósea presentan un proceso de cicatrización en el interior del túnel óseo diferente a los que sí la tienen, no se produce una cicatrización directa hueso-hueso, sino que la unión se establece mediante un tejido celular fibroso, que con el

tiempo va aumentando, apareciendo zonas de continuidad entre las fibras de colágeno tendinosas y el hueso, y posteriormente estas se organizan y remodelan según la dirección de las fuerzas de tracción^{143,192,193}, con¹⁹² o sin^{143,193} la formación de una zona intermedia de fibrocartílago. Al igual que el estudio de Sano et al¹⁹² observamos una zona de fibrocartílago entre hueso y tendón, pero no se visualiza la “marca de agua”¹⁹⁰ que separa el cartílago mineralizado del no mineralizado. Es decir, no se reproduce la histología normal de la inserción indirecta de un tendón o ligamento a través de las fibras de Sharpey que se anclan en el hueso¹⁸⁵.

Los tipos tisulares que observamos en la unión del tendón al túnel óseo en los casos de los grupos Control sacrificados a la 2ª y 4ª semanas, son los mismos que se aprecian en la inserción indirecta normal de los tendones, con la excepción de la no presencia de la “marca de agua”, y coinciden con los descritos por Sano et al¹⁹² en el mismo modelo animal tras trasplantar una fascia en una trinchera ósea en el húmero. No obstante, Liu et al¹⁹³ utilizando también al conejo como modelo experimental no observan fibrocartílago en la unión tendinosa a la 6 semana de la implantación experimental del tendón *flexor hallucis longus* en un túnel óseo.

Estudios recientes sugieren que la cicatrización de un tendón en el interior de un túnel óseo es específica del tipo de hueso, así la incorporación y remodelado es más rápida en el hueso esponjoso femoral que en el tibial¹⁹⁴. Las solicitaciones a las que está sometido el tendón pueden intervenir en la formación de fibrocartílago, ya que las fuerzas de tracción favorecen la unión directa del tendón al hueso¹⁹⁵ y las de compresión favorecen la formación de tejido condroide. Si comparamos la aparición de fibrocartílago en la zona

de unión hueso-tendón en los grupos control con la descrita en otros estudios que no utilizan PRP^{143,192,193}, vemos que aparece al mismo tiempo, mientras que si la comparamos con su respectivos grupos Experimentales, observamos que en estos últimos el tejido fibrocartilaginoso aparece de forma más precoz. Esta diferencia puede atribuirse solo a la aplicación del PRP, ya que si se debiera a otros factores como el diferente modelo experimental¹⁴³, tipo de tendón utilizado^{143,192,193}, tipo de hueso donde se inserta¹⁹²⁻¹⁹⁴, ángulo de inserción del mismo, tipo de fijación utilizado y las solicitaciones a que está sometido^{187,195}, no hubiéramos apreciado diferencias entre los dos grupos, Experimental y Control.

Así pues, en este estudio la aplicación de PRP estimuló la formación y maduración de la zona de fibrocartílago respecto al grupo Control a partir de la 2ª semana y estimuló la formación de tejido óseo a partir de la 4ª semana, como también se ha descrito en otros estudios que utilizan un solo FC como la BMP-2¹⁴². La administración de PRP en nuestros grupos Experimentales, tanto de los animales sacrificados a la 2ª como a la 4ª semana, dio lugar a una mayor cantidad de los elementos tisulares fibrosos, cartilaginosos y osteoides, y un mayor grado de ordenación celular en el fibrocartílago y sustancia osteoide, respecto a sus respectivos grupos Control. Además se observan zonas de unión directa del tendón al hueso (zonas de anclaje) en dos extremidades del grupo Experimental de los animales sacrificados a la 4ª semana, no encontradas en ningún caso Control, y solo evidenciadas en estudios que no utilizan PRP en intervalos de tiempo superiores^{192,193}.

La proporción y tipo de fibras de colágeno de la zona de unión hueso-tendón, muestra una secuencia y patrón específico que refleja la progresión del proceso de curación^{185,190,192}, aumentando la cantidad de fibras tipo I y II, y disminuyendo el tipo III¹⁹³ a medida que progresa la cicatrización en el tiempo. La cantidad, el tipo y la disposición del colágeno influyen en la capacidad del tendón o ligamento para soportar las cargas que se le aplican en su inserción. El colágeno tipo II aparece en la interfase de unión hueso-tendón a la 2ª semana tras su implantación, concomitantemente a la aparición de los condrocitos, y su área de tinción aumenta progresivamente en relación con el aumento del número de éstos. No apreciamos diferencias en el patrón de distribución del colágeno tipo II en la zona de unión del tendón al túnel óseo entre la 2ª y la 4ª semana, ni entre el grupo Control y Experimental. La aplicación de PRP, por tanto, no varió el inicio de la síntesis ni el patrón de distribución del colágeno tipo II, pero si incrementó la cantidad sintetizada, ya que en el grupo Experimental, con PRP, la cantidad de tejido cartilaginosa era cualitativamente mayor que en el grupo Control.

Este estudio presenta una serie de limitaciones, como el pequeño número de animales por grupo, no evaluar los resultados a largo plazo después de la cirugía, la valoración cualitativa de los resultados de la observación microscópica, no valorar las propiedades mecánicas del injerto, y no reproducir ni el ambiente intraarticular, ni las sollicitaciones exactas a las que es sometido un injerto utilizado para la reparación del LCA. Además, a pesar de no haber observado efectos perjudiciales con el uso del PRP, no debemos descartar su existencia^{296,297}. Tal vez su aplicación una sola una vez durante la cirugía, y directamente en tendón y túnel óseo, sean las razones de no haberlos encontrado.

A pesar de estas limitaciones, creemos que este estudio es válido porque al utilizar la extremidad contralateral del mismo animal como control, podemos afirmar que las diferencias histológicas observadas no se deben a diferencias genéticas, de nutrición, o alteraciones en la carga o peso de los animales, sino al tratamiento realizado.

Estos datos permiten afirmar que probablemente la aplicación de PRP en la zona de unión del tendón al hueso estimula la actividad y proliferación celular, la síntesis de matriz extracelular, y la maduración de los diferentes tejidos que intervienen en el proceso reparativo de un autoinjerto tendinoso en el interior de un túnel óseo, como confirma el hallazgo de una mayor cantidad de elementos y la presencia elementos característicos de intervalos de tiempo posteriores del proceso de cicatrización en el grupo Experimental, tratado con PRP, respecto a su respectivo grupo Control.

Probablemente, la utilización de PRP en la práctica clínica en humanos, podría reproducir estos resultados, estimulando la actividad y proliferación celular, y acelerando la maduración celular del proceso de integración de la plastia tendinosa en el interior de un túnel óseo. No obstante, no se ha realizado ningún estudio histológico en humanos que pueda demostrar los cambios que se producen a este nivel. Los estudios clínicos existentes con la aplicación de PRP para favorecer la incorporación del injerto utilizado para la reconstrucción de LCA muestran resultados contradictorios a favor²¹⁸ y en contra²⁶⁷ de su utilización, probablemente debidos al diferente método utilizado en la técnica quirúrgica, método de evaluar la incorporación del injerto, o tiempo de evaluación.

Conclusiones

IX. CONCLUSIONES

El análisis de los resultados y valoración de la comparación creada entre los grupos de investigación concluye:

a).- Estudio microscópico:

1º.- El grupo Experimental de los animales sacrificados a la 2ª semana presenta niveles superiores de tejido condroide, tejido fibrocartilaginoso organizado, sustancia osteoide y trabéculas óseas neoformadas que su respectivo grupo Control.

2º.- El grupo Experimental de los animales sacrificados a la 4ª semana presenta niveles superiores de tejido fibrocartilaginoso organizado, sustancia osteoide, trabéculas óseas y posiblemente de zonas de anclaje hueso-tendón que su respectivo grupo Control.

3º.- El grupo Experimental de los animales sacrificados a la 2ª semana presenta valores superiores de fibroblastos, tejido fibrocartilaginoso organizado, sustancia osteoide, y posiblemente también de matriz extracelular, tejido condroide y trabéculas óseas que el grupo Control sacrificado a la 4ª semana.

4º.- El momento de aparición y el patrón de distribución del colágeno tipo II no muestra diferencias entre los dos grupos a estudio, pero si se aprecia una mayor área de tinción para el colágeno tipo II en los grupos Experimentales, tanto a la 2ª como 4ª semana, al ser comparados con sus respectivos grupos Control, debido a la mayor cantidad de tejido

fibrocartilaginoso existente.

b). Estudio radiográfico y macroscópico:

5°.- Presencia de una reacción ósea de mayor tamaño en la zona de entrada del tendón en el interior del túnel óseo tibial en los grupos Experimentales, que recibieron PRP, respecto a sus correspondientes grupos Control, y en el grupo Experimental de los animales sacrificados a la 4ª semana respecto al resto de grupos.

Consecuentemente, microscópica, radiográfica y macroscópicamente, este estudio demuestra que la administración de PRP como fuente de FC afecta al proceso de reparación del autoinjerto tendinoso dentro de un túnel óseo en nuestro modelo experimental. El PRP aceleró la curación, anticipando en el tiempo la aparición de elementos celulares y tisulares propios de fases posteriores del proceso de cicatrización, y además incrementó de la cantidad éstos.

Así, las tres cuestiones inicialmente planteadas son respondidas afirmativamente, por lo que podemos confirmar nuestra **hipótesis alternativa o de trabajo**:

“La presencia de PRP autólogo como aporte de FC en la interfase injerto tendinoso-hueso estimula y acelera la reparación de los tejidos locales mediante un mecanismo que reproduce las etapas fisiológicas de la cicatrización tisular”.

Bibliografía

X. BIBLIOGRAFÍA

1. Freedman KB, D'Amato MJ, Nedeff DD, Kaz A, Bach BR, Jr. Arthroscopic anterior cruciate ligament reconstruction: a metaanalysis comparing patellar tendon and hamstring tendon autografts. *Am J Sports Med* 2003;**31**(1):2-11.
2. Hashemi J, Chandrashekar N, Mansouri H, Slauterbeck JR, Hardy DM. The human anterior cruciate ligament: sex differences in ultrastructure and correlation with biomechanical properties. *J Orthop Res* 2008;**26**(7):945-50.
3. Wojtys EM, Huston LJ, Schock HJ, Boylan JP, Ashton-Miller JA. Gender differences in muscular protection of the knee in torsion in size-matched athletes. *J Bone Joint Surg Am* 2003;**85-A**(5):782-9.
4. Schmitz RJ, Ficklin TK, Shimokochi Y, et al. Varus/valgus and internal/external torsional knee joint stiffness differs between sexes. *Am J Sports Med* 2008;**36**(7):1380-8.
5. Robson MAW. Ruptured cruciate ligaments and their repair by operation. *Ann. Surg.* 1903;**37**:716-718.
6. Andrews JR, Sanders R. A "mini-reconstruction" technique in treating anterolateral rotatory instability (ALRI). *Clin Orthop Relat Res* 1983(172):93-6.
7. Bray RC, Flanagan JP, Dandy DJ. Reconstruction for chronic anterior cruciate instability. A comparison of two methods after six years. *J Bone Joint Surg Br* 1988;**70**(1):100-5.
8. Draganich LF, Reider B, Ling M, Samuelson M. An in vitro study of an intraarticular and extraarticular reconstruction in the anterior cruciate ligament deficient knee. *Am J Sports Med* 1990;**18**(3):262-6.
9. Engebretsen L, Lew WD, Lewis JL, Hunter RE. The effect of an iliotibial tenodesis on intraarticular graft forces and knee joint motion. *Am J Sports Med* 1990;**18**(2):169-76.
10. Fox JM, Blazina ME, Del Pizzo W, Ivey FM, Broukhim B. Extra-articular stabilization of the knee joint for anterior instability. *Clin Orthop Relat Res* 1980(147):56-61.
11. Ireland J, Trickey EL. Macintosh tenodesis for anterolateral instability of the knee. *J Bone Joint Surg Br* 1980;**62**(3):340-5.
12. Frank C, Jackson RW. Lateral substitution for chronic isolated anterior cruciate ligament deficiency. *J Bone Joint Surg Br* 1988;**70**(3):407-11.

13. Reid JS, Hanks GA, Kalenak A, Kottmeier S, Aronoff V. The Ellison iliotibial-band transfer for a torn anterior cruciate ligament of the knee. Long-term follow-up. *J Bone Joint Surg Am* 1992;**74**(9):1392-402.
14. Thomas OL, Oni OO, Howard L. Clinical evaluation of the LeMaire anterior cruciate [correction of concrete] ligament lateral substitution procedure. A quality audit of the Leicester modification. *Injury* 1998;**29**(6):417-9.
15. Noyes FR, Butler DL, Paulos LE, Grood ES. Intra-articular cruciate reconstruction. I: Perspectives on graft strength, vascularization, and immediate motion after replacement. *Clin Orthop Relat Res* 1983 (172):71-7.
16. Bach BR, Jr., Tradonsky S, Bojchuk J, Levy ME, Bush-Joseph CA, Khan NH. Arthroscopically assisted anterior cruciate ligament reconstruction using patellar tendon autograft. Five- to nine-year follow-up evaluation. *Am J Sports Med* 1998;**26**(1):20-9.
17. Jomha NM, Pinczewski LA, Clingeleffer A, Otto DD. Arthroscopic reconstruction of the anterior cruciate ligament with patellar-tendon autograft and interference screw fixation. The results at seven years. *J Bone Joint Surg Br* 1999;**81**(5):775-9.
18. O'Neill DB. Arthroscopically assisted reconstruction of the anterior cruciate ligament. A prospective randomized analysis of three techniques. *J Bone Joint Surg Am* 1996;**78**(6):803-13.
19. Webb JM, Corry IS, Clingeleffer AJ, Pinczewski LA. Endoscopic reconstruction for isolated anterior cruciate ligament rupture. *J Bone Joint Surg Br* 1998;**80**(2):288-94.
20. Alm A, Gillquist J. Reconstruction of the anterior cruciate ligament by using the medial third of the patellar ligament. Treatment and results. *Acta Chir Scand* 1974;**140**(4):289-96.
21. Cabot Dalmau J, Casañas Sintés J, García García J, Hernández Hermoso J, Jimeno Urbán F. Ligamentoplastias con prótesis de dacron en lesiones agudas del ligamento cruzado anterior. *Rev Ortop Traumatol* 1993;**37**:414-417.
22. Indelicato PA, Bittar ES, Prevot TJ, Woods GA, Branch TP, Huegel M. Clinical comparison of freeze-dried and fresh frozen patellar tendon allografts for anterior cruciate ligament reconstruction of the knee. *Am J Sports Med* 1990;**18**(4):335-42.

23. Otero AL, Hutcheson L. A comparison of the doubled semitendinosus/gracilis and central third of the patellar tendon autografts in arthroscopic anterior cruciate ligament reconstruction. *Arthroscopy* 1993;**9**(2):143-8.
24. Jacobsen K. Osteoarthritis following insufficiency of the cruciate ligaments in man. A clinical study. *Acta Orthop Scand* 1977;**48**(5):520-6.
25. McDaniel WJ, Jr., Dameron TB, Jr. Untreated ruptures of the anterior cruciate ligament. A follow-up study. *J Bone Joint Surg Am* 1980;**62**(5):696-705.
26. Shelbourne KD, Whitaker HJ, McCarroll JR, Rettig AC, Hirschman LD. Anterior cruciate ligament injury: evaluation of intraarticular reconstruction of acute tears without repair. Two to seven year followup of 155 athletes. *Am J Sports Med* 1990;**18**(5):484-8; discussion 488-9.
27. Sherman MF, Warren RF, Marshall JL, Savatsky GJ. A clinical and radiographical analysis of 127 anterior cruciate insufficient knees. *Clin Orthop Relat Res* 1988;**227**:229-37.
28. Hawkins RJ, Misamore GW, Merritt TR. Followup of the acute nonoperated isolated anterior cruciate ligament tear. *Am J Sports Med* 1986;**14**(3):205-10.
29. Vaquero Martín J, Calvo Haro J, Forriol Campos F. Reconstrucción del ligamento cruzado anterior. *Trauma Fundación MAPFRE* 2008;**19**(1):22-38.
30. Aune AK, Holm I, Risberg MA, Jensen HK, Steen H. Four-strand hamstring tendon autograft compared with patellar tendon-bone autograft for anterior cruciate ligament reconstruction. A randomized study with two-year follow-up. *Am J Sports Med* 2001;**29**(6):722-8.
31. Fu FH, Bennett CH, Lattermann C, Ma CB. Current trends in anterior cruciate ligament reconstruction. Part I: Biology and biomechanics of reconstruction. *Am J Sports Med* 1999;**27**(6):821-30.
32. Fu FH, Bennett CH, Ma CB, Menetrey J, Lattermann C. Current trends in anterior cruciate ligament reconstruction. Part II. Operative procedures and clinical correlations. *Am J Sports Med* 2000;**28**(1): 124-30.
33. Hamner DL, Brown CH, Jr., Steiner ME, Hecker AT, Hayes WC. Hamstring tendon grafts for reconstruction of the anterior cruciate ligament: biomechanical evaluation of the use of multiple strands and tensioning techniques. *J Bone Joint Surg Am* 1999;**81**(4):549-57.

34. Jansson KA, Linko E, Sandelin J, Harilainen A. A prospective randomized study of patellar versus hamstring tendon autografts for anterior cruciate ligament reconstruction. *Am J Sports Med* 2003;**31**(1):12-8.
35. Muneta T, Sekiya I, Ogiuchi T, Yagishita K, Yamamoto H, Shinomiya K. Effects of aggressive early rehabilitation on the outcome of anterior cruciate ligament reconstruction with multi-strand semitendinosus tendon. *Int Orthop* 1998;**22**(6):352-6.
36. Sgaglione NA, Del Pizzo W, Fox JM, Friedman MJ. Arthroscopically assisted anterior cruciate ligament reconstruction with the pes anserine tendons. Comparison of results in acute and chronic ligament deficiency. *Am J Sports Med* 1993;**21**(2):249-56.
37. Steiner ME, Hecker AT, Brown CH, Jr., Hayes WC. Anterior cruciate ligament graft fixation. Comparison of hamstring and patellar tendon grafts. *Am J Sports Med* 1994;**22**(2):240-6; discussion 246-7.
38. Eriksson K, Anderberg P, Hamberg P, et al. A comparison of quadruple semitendinosus and patellar tendon grafts in reconstruction of the anterior cruciate ligament. *J Bone Joint Surg Br* 2001;**83**(3):348-54.
39. Clancy WG, Jr., Nelson DA, Reider B, Narechania RG. Anterior cruciate ligament reconstruction using one-third of the patellar ligament, augmented by extra-articular tendon transfers. *J Bone Joint Surg Am* 1982;**64**(3):352-9.
40. Buss DD, Warren RF, Wickiewicz TL, Galinat BJ, Panariello R. Arthroscopically assisted reconstruction of the anterior cruciate ligament with use of autogenous patellar-ligament grafts. Results after twenty-four to forty-two months. *J Bone Joint Surg Am* 1993;**75**(9):1346-55.
41. Cooper DE, Deng XH, Burstein AL, Warren RF. The strength of the central third patellar tendon graft. A biomechanical study. *Am J Sports Med* 1993;**21**(6):818-23; discussion 823-4.
42. Dye SF. The knee as a biologic transmission with an envelope of function: a theory. *Clin Orthop Relat Res* 1996(325):10-8.
43. Frank CB, Jackson DW. The science of reconstruction of the anterior cruciate ligament. *J Bone Joint Surg Am* 1997;**79**(10):1556-76.
44. Jaureguito JW, Paulos LE. Why grafts fail. *Clin Orthop Relat Res* 1996(325):25-41.

45. Jones KG. Reconstruction Of The Anterior Cruciate Ligament. A Technique Using The Central One-Third Of The Patellar Ligament. *J Bone Joint Surg Am* 1963;**45**:925-32.
46. Jones KG. Reconstruction of the anterior cruciate ligament using the central one-third of the patellar ligament. A follow-up report. *J Bone Joint Surg Am* 1970;**52**(7):1302-8.
47. O'Brien SJ, Warren RF, Pavlov H, Panariello R, Wickiewicz TL. Reconstruction of the chronically insufficient anterior cruciate ligament with the central third of the patellar ligament. *J Bone Joint Surg Am* 1991;**73**(2):278-86.
48. Bonamo JJ, Krinick RM, Sporn AA. Rupture of the patellar ligament after use of its central third for anterior cruciate reconstruction. A report of two cases. *J Bone Joint Surg Am* 1984;**66**(8):1294-7.
49. Corsetti JR, Jackson DW. Failure of anterior cruciate ligament reconstruction: the biologic basis. *Clin Orthop Relat Res* 1996(325):42-9.
50. Aglietti P, Buzzi R, D'Andria S, Zaccherotti G. Patellofemoral problems after intraarticular anterior cruciate ligament reconstruction. *Clin Orthop Relat Res* 1993(288):195-204.
51. Andersson C, Odensten M, Good L, Gillquist J. Surgical or non-surgical treatment of acute rupture of the anterior cruciate ligament. A randomized study with long-term follow-up. *J Bone Joint Surg Am* 1989;**71**(7):965-74.
52. Fu FH, Schulte KR. Anterior cruciate ligament surgery 1996. State of the art? *Clin Orthop Relat Res* 1996 (325):19-24.
53. Krackow KA, Thomas SC, Jones LC. A new stitch for ligament-tendon fixation. Brief note. *J Bone Joint Surg Am* 1986;**68**(5):764-6.
54. Krackow KA, Thomas SC, Jones LC. Ligament-tendon fixation: analysis of a new stitch and comparison with standard techniques. *Orthopedics* 1988;**11**(6):909-17.
55. Otto D, Pinczewski LA, Clingeleffer A, Odell R. Five-year results of single-incision arthroscopic anterior cruciate ligament reconstruction with patellar tendon autograft. *Am J Sports Med* 1998;**26**(2):181-8.
56. Tsuda E, Okamura Y, Ishibashi Y, Otsuka H, Toh S. Techniques for reducing anterior knee symptoms after anterior cruciate ligament reconstruction using a bone-patellar tendon-bone autograft. *Am J Sports Med* 2001;**29**(4):450-6.

57. Curtis RJ, Delee JC, Drez DJ, Jr. Reconstruction of the anterior cruciate ligament with freeze dried fascia lata allografts in dogs. A preliminary report. *Am J Sports Med* 1985;**13**(6):408-14.
58. Webster DA, Werner FW. Mechanical and functional properties of implanted freeze-dried flexor tendons. *Clin Orthop Relat Res* 1983(180):301-9.
59. Yoshiya S, Andrish JT, Manley MT, Bauer TW. Graft tension in anterior cruciate ligament reconstruction. An in vivo study in dogs. *Am J Sports Med* 1987;**15**(5):464-70.
60. Tkaczuk H. Tensile properties of human lumbar longitudinal ligaments. *Acta Orthop Scand* 1968:Suppl 115:1+.
61. Noyes FR, Butler DL, Grood ES, Zernicke RF, Hefzy MS. Biomechanical analysis of human ligament grafts used in knee-ligament repairs and reconstructions. *J Bone Joint Surg Am* 1984;**66**(3):344-52.
62. Noyes FR, Barber-Westin SD, Roberts CS. Use of allografts after failed treatment of rupture of the anterior cruciate ligament. *J Bone Joint Surg Am* 1994;**76**(7):1019-31.
63. Sanchís Alfonso V, Gomar Sancho F. Sustitución del ligamento cruzado anterior mediante aloinjertos tendinosos criopreservados: I. Comportamiento biológico del implante a nivel intraarticular. Estudio experimental. *Rev Ortop Traumatol* 1993;**37**:87-97.
64. Sanchís Alfonso V, Gomar Sancho F. Sustitución del ligamento cruzado anterior mediante aloinjertos tendinosos criopreservados: II. Comportamiento del implante a nivel del túnel óseo. Estudio experimental. *Rev Ortop Traumatol* 1993;**37**:98-103.
65. Butler DL, Kay MD, Stouffer DC. Comparison of material properties in fascicle-bone units from human patellar tendon and knee ligaments. *J Biomech* 1986;**19**(6):425-32.
66. Jackson DW, Grood ES, Arnoczky SP, Butler DL, Simon TM. Freeze dried anterior cruciate ligament allografts. Preliminary studies in a goat model. *Am J Sports Med* 1987;**15**(4):295-303.
67. Jackson DW, Grood ES, Arnoczky SP, Butler DL, Simon TM. Cruciate reconstruction using freeze dried anterior cruciate ligament allograft and a ligament augmentation device (LAD). An experimental study in a goat model. *Am J Sports Med* 1987;**15**(6):528-38.
68. McMaster WC. Bovine xenograft collateral ligament replacement in the dog. *J Orthop Res* 1985;**3**(4):492-8.

69. Johnson RJ, Beynnon BD, Nichols CE, Renstrom PA. The treatment of injuries of the anterior cruciate ligament. *J Bone Joint Surg Am* 1992;**74**(1):140-51.
70. Prodromos C, Joyce B, Shi K. A meta-analysis of stability of autografts compared to allografts after anterior cruciate ligament reconstruction. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2007;**15**(7):851-6.
71. Butler DL, Noyes FR, Grood ES. Ligamentous restraints to anterior-posterior drawer in the human knee. A biomechanical study. *J Bone Joint Surg Am* 1980;**62**(2):259-70.
72. Liu SH, Kabo JM, Osti L. Biomechanics of two types of bone-tendon-bone graft for ACL reconstruction. *J Bone Joint Surg Br* 1995;**77**(2):232-5.
73. Liu SH, Osti L, Henry M, Bocchi L. The diagnosis of acute complete tears of the anterior cruciate ligament. Comparison of MRI, arthrometry and clinical examination. *J Bone Joint Surg Br* 1995;**77**(4):586-8.
74. Woo SL, Hollis JM, Adams DJ, Lyon RM, Takai S. Tensile properties of the human femur-anterior cruciate ligament-tibia complex. The effects of specimen age and orientation. *Am J Sports Med* 1991;**19**(3):217-25.
75. West RV, Harner CD. Graft selection in anterior cruciate ligament reconstruction. *J Am Acad Orthop Surg* 2005;**13**(3):197-207.
76. Forward AD, Cowan RJ. Experimental suture of tendon to bone. *Surg Forum* 1960;**11**:458-60.
77. Caborn DN, Selby JB. Allograft anterior tibialis tendon with bioabsorbable interference screw fixation in anterior cruciate ligament reconstruction. *Arthroscopy* 2002;**18**(1):102-5.
78. Pinczewski LA, Clingeleffer AJ, Otto DD, Bonar SF, Corry IS. Integration of hamstring tendon graft with bone in reconstruction of the anterior cruciate ligament. *Arthroscopy* 1997;**13**(5):641-3.
79. Rodeo SA, Arnoczky SP, Torzilli PA, Hidaka C, Warren RF. Tendon-healing in a bone tunnel. A biomechanical and histological study in the dog. *J Bone Joint Surg Am* 1993;**75**(12):1795-803.
80. Whiston TB, Walmsley R. Some observations on the reactions of bone and tendon after tunnelling of bone and insertion of tendon. *J Bone Joint Surg Br* 1960;**42-B**:377-86.
81. Barber FA. Tripled semitendinosus-cancellous bone anterior cruciate ligament reconstruction with bioscrew fixation. *Arthroscopy* 1999;**15**(4):360-7.

82. Stahelin AC, Weiler A. All-inside anterior cruciate ligament reconstruction using semitendinosus tendon and soft threaded biodegradable interference screw fixation. *Arthroscopy* 1997;**13**(6):773-9.
83. Simonian PT, Sussmann PS, Baldini TH, Crockett HC, Wickiewicz TL. Interference screw position and hamstring graft location for anterior cruciate ligament reconstruction. *Arthroscopy* 1998;**14**(5):459-64.
84. Bonnet A. Traité des maladies des articulations. 2^{ème} édition ed. Paris: Baillière, 1853.
85. Bonnet A. Traité des maladies des articulations. avec atlas ed. Paris: Baillière, 1845.
86. Eberhardt C, Jager A, Schwetlick G, Rauschmann MA. History of surgery of the anterior cruciate ligament. *Orthopade* 2002;**31**(8):702-9.
87. Shelbourne KD, Patel DV. Management of combined injuries of the anterior cruciate and medial collateral ligaments. *Instr Course Lect* 1996;**45**:275-80.
88. Giurea M, Zorilla P, Amis AA, Aichroth P. Comparative pull-out and cyclic-loading strength tests of anchorage of hamstring tendon grafts in anterior cruciate ligament reconstruction. *Am J Sports Med* 1999;**27**(5):621-5.
89. Schiavone Panni A, Fabbriciani C, Delcogliano A, Franzese S. Bone-ligament interaction in patellar tendon reconstruction of the ACL. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 1993;**1**(1):4-8.
90. Petersen W, Laprell H. Insertion of autologous tendon grafts to the bone: a histological and immunohistochemical study of hamstring and patellar tendon grafts. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2000;**8**(1):26-31.
91. Arnoczky ST, GB, y Marshall, JL. Reconstruction of the anterior cruciate ligament by using the medial third of the patellar ligament. *Acta Chir Scand* 1974;**140**:289-296.
92. Aglietti P, Buzzi R, Zaccherotti G, De Biase P. Patellar tendon versus doubled semitendinosus and gracilis tendons for anterior cruciate ligament reconstruction. *Am J Sports Med* 1994;**22**(2):211-7; discussion 217-8.
93. Singhatat W, Lawhorn KW, Howell SM, Hull ML. How four weeks of implantation affect the strength and stiffness of a tendon graft in a bone tunnel: a study of two fixation devices in an extraarticular model in ovine. *Am J Sports Med* 2002;**30**(4):506-13.

94. Greis PE, Burks RT, Bachus K, Luker MG. The influence of tendon length and fit on the strength of a tendon-bone tunnel complex. A biomechanical and histologic study in the dog. *Am J Sports Med* 2001;**29**(4):493-7.
95. Shino K, Pflaster D. Comparison of eccentric and concentric screw placement for hamstring graft fixation in the tibial tunnel. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2000;**8**(2):2.
96. Barrett GR, Papendick L, Miller C. Endobutton button endoscopic fixation technique in anterior cruciate ligament reconstruction. *Arthroscopy* 1995;**11**(3):340-3.
97. Grana WA, Egle DM, Mahnken R, Goodhart CW. An analysis of autograft fixation after anterior cruciate ligament reconstruction in a rabbit model. *Am J Sports Med* 1994;**22**(3):344-51.
98. Robertson DB, Daniel DM, Biden E. Soft tissue fixation to bone. *Am J Sports Med* 1986;**14**(5):398-403.
99. Moisala AS, Jarvela T, Honkonen S, Paakkala A, Kannus P, Jarvinen M. Arthroscopic anterior cruciate ligament reconstruction using a hamstring graft with interference screw fixation. *Scand J Surg* 2007;**96**(1):83-7.
100. Salmon LJ, Russell VJ, Refshauge K, et al. Long-term outcome of endoscopic anterior cruciate ligament reconstruction with patellar tendon autograft: minimum 13-year review. *Am J Sports Med* 2006;**34**(5):721-32.
101. Clatworthy MG, Annear P, Bulow JU, Bartlett RJ. Tunnel widening in anterior cruciate ligament reconstruction: a prospective evaluation of hamstring and patella tendon grafts. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 1999;**7**(3):138-45.
102. L'Insalata JC, Klatt B, Fu FH, Harner CD. Tunnel expansion following anterior cruciate ligament reconstruction: a comparison of hamstring and patellar tendon autografts. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 1997;**5**(4):234-8.
103. Hoher J, Moller HD, Fu FH. Bone tunnel enlargement after anterior cruciate ligament reconstruction: fact or fiction? *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 1998;**6**(4):231-40.
104. Nebelung W, Becker R, Merkel M, Ropke M. Bone tunnel enlargement after anterior cruciate ligament reconstruction with semitendinosus tendon using Endobutton fixation on the femoral side. *Arthroscopy* 1998;**14**(8):810-5.

105. Kurosaka M, Yoshiya S, Andrish JT. A biomechanical comparison of different surgical techniques of graft fixation in anterior cruciate ligament reconstruction. *Am J Sports Med* 1987;**15**(3):225-9.
106. Caborn DN, Coen M, Neef R, Hamilton D, Nyland J, Johnson DL. Quadrupled semitendinosus-gracilis autograft fixation in the femoral tunnel: a comparison between a metal and a bioabsorbable interference screw. *Arthroscopy* 1998;**14**(3):241-5.
107. Johnson LL, vanDyk GE. Metal and biodegradable interference screws: comparison of failure strength. *Arthroscopy* 1996;**12**(4):452-6.
108. Magen HE, Howell SM, Hull ML. Structural properties of six tibial fixation methods for anterior cruciate ligament soft tissue grafts. *Am J Sports Med* 1999;**27**(1):35-43.
109. Corry IS, Webb JM, Clingeffer AJ, Pinczewski LA. Arthroscopic reconstruction of the anterior cruciate ligament. A comparison of patellar tendon autograft and four-strand hamstring tendon autograft. *Am J Sports Med* 1999;**27**(4):444-54.
110. Scheffler SU, Unterhauser FN, Weiler A. Graft remodeling and ligamentization after cruciate ligament reconstruction. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2008;**16**(9):834-42.
111. Arnoczky SP, Rubin RM, Marshall JL. Microvasculature of the cruciate ligaments and its response to injury. An experimental study in dogs. *J Bone Joint Surg Am* 1979;**61**(8):1221-9.
112. Bosch U, Gassler N, Decker B. Alterations of glycosaminoglycans during patellar tendon autograft healing after posterior cruciate ligament replacement. A biochemical study in a sheep model. *Am J Sports Med* 1998;**26**(1):103-8.
113. Muramatsu K, Hachiya Y, Izawa H. Serial evaluation of human anterior cruciate ligament grafts by contrast-enhanced magnetic resonance imaging: comparison of allografts and autografts. *Arthroscopy* 2008;**24**(9):1038-44.
114. Amiel D, Kleiner JB, Akeson WH. The natural history of the anterior cruciate ligament autograft of patellar tendon origin. *Am J Sports Med* 1986;**14**(6):449-62.
115. Ejerhed L, Kartus J, Sernert N, Kohler K, Karlsson J. Patellar tendon or semitendinosus tendon autografts for anterior cruciate ligament reconstruction? A prospective randomized study with a two-year follow-up. *Am J Sports Med* 2003;**31**(1):19-25.

116. Shaieb MD, Kan DM, Chang SK, Marumoto JM, Richardson AB. A prospective randomized comparison of patellar tendon versus semitendinosus and gracilis tendon autografts for anterior cruciate ligament reconstruction. *Am J Sports Med* 2002;**30**(2):214-20.
117. Marder RA, Raskind JR, Carroll M. Prospective evaluation of arthroscopically assisted anterior cruciate ligament reconstruction. Patellar tendon versus semitendinosus and gracilis tendons. *Am J Sports Med* 1991;**19**(5):478-84.
118. Beynnon BD, Johnson RJ, Fleming BC, et al. Anterior cruciate ligament replacement: comparison of bone-patellar tendon-bone grafts with two-strand hamstring grafts. A prospective, randomized study. *J Bone Joint Surg Am* 2002;**84-A**(9):1503-13.
119. Anderson AF, Snyder RB, Lipscomb AB, Jr. Anterior cruciate ligament reconstruction. A prospective randomized study of three surgical methods. *Am J Sports Med* 2001;**29**(3):272-9.
120. Yunes M, Richmond JC, Engels EA, Pinczewski LA. Patellar versus hamstring tendons in anterior cruciate ligament reconstruction: A meta-analysis. *Arthroscopy* 2001;**17**(3):248-257.
121. Beard DJ, Anderson JL, Davies S, Price AJ, Dodd CA. Hamstrings vs. patella tendon for anterior cruciate ligament reconstruction: a randomised controlled trial. *Knee* 2001;**8**(1):45-50.
122. Pinczewski LA, Deehan DJ, Salmon LJ, Russell VJ, Clingeleffer A. A five-year comparison of patellar tendon versus four-strand hamstring tendon autograft for arthroscopic reconstruction of the anterior cruciate ligament. *Am J Sports Med* 2002;**30**(4):523-36.
123. Roe J, Pinczewski LA, Russell VJ, Salmon LJ, Kawamata T, Chew M. A 7-year follow-up of patellar tendon and hamstring tendon grafts for arthroscopic anterior cruciate ligament reconstruction: differences and similarities. *Am J Sports Med* 2005;**33**(9):1337-45.
124. Wagner M, Kaab MJ, Schallock J, Haas NP, Weiler A. Hamstring tendon versus patellar tendon anterior cruciate ligament reconstruction using biodegradable interference fit fixation: a prospective matched-group analysis. *Am J Sports Med* 2005;**33**(9):1327-36.
125. Sajovic M, Vengust V, Komadina R, Tavcar R, Skaza K. A prospective, randomized comparison of semitendinosus and gracilis tendon versus patellar tendon autografts for anterior cruciate ligament reconstruction: five-year follow-up. *Am J Sports Med* 2006;**34**(12):1933-40.

126. Laxdal G, Sernert N, Ejerhed L, Karlsson J, Kartus JT. A prospective comparison of bone-patellar tendon-bone and hamstring tendon grafts for anterior cruciate ligament reconstruction in male patients. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2007;**15**(2):115-25.
127. Pinczewski LA, Lyman J, Salmon LJ, Russell VJ, Roe J, Linklater J. A 10-year comparison of anterior cruciate ligament reconstructions with hamstring tendon and patellar tendon autograft: a controlled, prospective trial. *Am J Sports Med* 2007;**35**(4):564-74.
128. Liden M, Ejerhed L, Sernert N, Laxdal G, Kartus J. Patellar tendon or semitendinosus tendon autografts for anterior cruciate ligament reconstruction: a prospective, randomized study with a 7-Year follow-up. *Am J Sports Med* 2007;**35**(5):740-8.
129. Maletis GB, Cameron SL, Tengan JJ, Burchette RJ. A prospective randomized study of anterior cruciate ligament reconstruction: a comparison of patellar tendon and quadruple-strand semitendinosus/gracilis tendons fixed with bioabsorbable interference screws. *Am J Sports Med* 2007;**35**(3):384-94.
130. Hefti F, Muller W, Jakob RP, Staubli HU. Evaluation of knee ligament injuries with the IKDC form. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 1993;**1**(3-4):226-34.
131. McGuire DA, Barber FA, Elrod BF, Paulos LE. Bioabsorbable interference screws for graft fixation in anterior cruciate ligament reconstruction. *Arthroscopy* 1999;**15**(5):463-73.
132. Kartus J, Movin T, Karlsson J. Donor-site morbidity and anterior knee problems after anterior cruciate ligament reconstruction using autografts. *Arthroscopy* 2001;**17**(9):971-80.
133. Sachs RA, Daniel DM, Stone ML, Garfein RF. Patellofemoral problems after anterior cruciate ligament reconstruction. *Am J Sports Med* 1989;**17**(6):760-5.
134. Shelbourne KD, Trumper RV. Preventing anterior knee pain after anterior cruciate ligament reconstruction. *Am J Sports Med* 1997;**25**(1):41-7.
135. Fox JA, Nedeff DD, Bach Jr BR, Spindler KP. Anterior cruciate ligament reconstruction with patellar autograft tendon. *Clin Orthop Relat Res* 2002(402):53-63.
136. Tetsumura S, Fujita A, Nakajima M, Abe M. Biomechanical comparison of different fixation methods on the tibial side in anterior cruciate ligament reconstruction: a biomechanical study in porcine tibial bone. *J Orthop Sci* 2006;**11**(3):278-82.

137. Noojin FK, Barrett GR, Hartzog CW, Nash CR. Clinical comparison of intraarticular anterior cruciate ligament reconstruction using autogenous semitendinosus and gracilis tendons in men versus women. *Am J Sports Med* 2000;**28**(6):783-9.
138. Barrett GR, Noojin FK, Hartzog CW, Nash CR. Reconstruction of the anterior cruciate ligament in females: A comparison of hamstring versus patellar tendon autograft. *Arthroscopy* 2002;**18**(1):46-54.
139. Aune AK, Ekeland A, Cawley PW. Interference screw fixation of hamstring vs patellar tendon grafts for anterior cruciate ligament reconstruction. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 1998;**6**(2):99-102.
140. Novak PJ, Wexler GM, Williams JS, Jr., Bach BR, Jr., Bush-Joseph CA. Comparison of screw post fixation and free bone block interference fixation for anterior cruciate ligament soft tissue grafts: biomechanical considerations. *Arthroscopy* 1996;**12**(4):470-3.
141. Weiler A, Hoffmann RF, Stahelin AC, Bail HJ, Siepe CJ, Sudkamp NP. Hamstring tendon fixation using interference screws: a biomechanical study in calf tibial bone. *Arthroscopy* 1998;**14**(1):29-37.
142. Martinek V, Latterman C, Usas A, et al. Enhancement of tendon-bone integration of anterior cruciate ligament grafts with bone morphogenetic protein-2 gene transfer: a histological and biomechanical study. *J Bone Joint Surg Am* 2002;**84-A**(7):1123-31.
143. Rodeo SA, Suzuki K, Deng XH, Wozney J, Warren RF. Use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 to enhance tendon healing in a bone tunnel. *Am J Sports Med* 1999;**27**(4):476-88.
144. Weiler A, Forster C, Hunt P, et al. The influence of locally applied platelet-derived growth factor-BB on free tendon graft remodeling after anterior cruciate ligament reconstruction. *Am J Sports Med* 2004;**32**(4):881-91.
145. Ouyang HW, Goh JC, Lee EH. Use of bone marrow stromal cells for tendon graft-to-bone healing: histological and immunohistochemical studies in a rabbit model. *Am J Sports Med* 2004;**32**(2):321-7.
146. Hopper RA, Zhang JR, Fourasier VL, et al. Effect of isolation of periosteum and dura on the healing of rabbit calvarial inlay bone grafts. *Plast Reconstr Surg* 2001;**107**(2):454-62.
147. Ritsila VA, Santavirta S, Alhopuro S, et al. Periosteal and perichondral grafting in reconstructive surgery. *Clin Orthop Relat Res* 1994(302):259-65.

148. Chen CH, Chen WJ, Shih CH, Chou SW. Arthroscopic anterior cruciate ligament reconstruction with periosteum-enveloping hamstring tendon graft. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2004;**12**(5): 398-405.
149. Bennett NT, Schultz GS. Growth factors and wound healing: biochemical properties of growth factors and their receptors. *Am J Surg* 1993;**165**(6):728-37.
150. Bennett NT, Schultz GS. Growth factors and wound healing: Part II. Role in normal and chronic wound healing. *Am J Surg* 1993;**166**(1):74-81.
151. Díaz-Ricart M EG, Ordinas A. Composición química y funciones de las plaquetas. Barcelona: Mosby/ Doyma, 1995.
152. Frojmovic MM, Panjwani R. Geometry of normal mammalian platelets by quantitative microscopic studies. *Biophys J* 1976;**16**(9):1071-89.
153. White JG. An overview of platelet structural physiology. *Scanning Microsc* 1987;**1**(4):1677-700.
154. Nurden AT. Platelet membrane glycoproteins and their role in platelet adhesion and aggregation. *Agents Actions Suppl* 1986;**20**:29-44.
155. Newman PJ. Platelet GPIIb-IIIa: molecular variations and alloantigens. *Thromb Haemost* 1991;**66**(1): 111-8.
156. McEver RP. Selectins: novel receptors that mediate leukocyte adhesion during inflammation. *Thromb Haemost* 1991;**65**(3):223-8.
157. Larsen E, Celi A, Gilbert GE, et al. PADGEM protein: a receptor that mediates the interaction of activated platelets with neutrophils and monocytes. *Cell* 1989;**59**(2):305-12.
158. Hamburger SA, McEver RP. GMP-140 mediates adhesion of stimulated platelets to neutrophils. *Blood* 1990;**75**(3):550-4.
159. Blann AD, Lip GY. Hypothesis: is soluble P-selectin a new marker of platelet activation? *Atherosclerosis* 1997;**128**(2):135-8.
160. Blann AD, Lip GY, Beevers DG, McCollum CN. Soluble P-selectin in atherosclerosis: a comparison with endothelial cell and platelet markers. *Thromb Haemost* 1997;**77**(6):1077-80.

161. Okita JR, Pidard D, Newman PJ, Montgomery RR, Kunicki TJ. On the association of glycoprotein Ib and actin-binding protein in human platelets. *J Cell Biol* 1985;**100**(1):317-21.
162. Jandrot-Perrus M, Huisse MG, Ternisien C, Bezeaud A, Guillin MC. Thrombin binding to platelet membrane glycoprotein Ib. *Semin Thromb Hemost* 1992;**18**(2):261-6.
163. Solum NO, Olsen TM. Effects of diamide and dibucaine on platelet glycoprotein Ib, actin-binding protein and cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta* 1985;**817**(2):249-60.
164. Bennett JS, Vilaire G. Exposure of platelet fibrinogen receptors by ADP and epinephrine. *J Clin Invest* 1979;**64**(5):1393-401.
165. Colman RW. Surface-mediated defense reactions. The plasma contact activation system. *J Clin Invest* 1984;**73**(5):1249-53.
166. Harrison P, Cramer EM. Platelet alpha-granules. *Blood Rev* 1993;**7**(1):52-62.
167. Collier BS. Antiplatelet agents in the prevention and therapy of thrombosis. *Annu Rev Med* 1992;**43**:171-80.
168. Marcus AJ, Safier LB. Thromboregulation: multicellular modulation of platelet reactivity in hemostasis and thrombosis. *Faseb J* 1993;**7**(6):516-22.
169. Kessler CM, Floyd CM, Rick ME, Krizek DM, Lee SL, Galnick HR. Collagen-factor VIII/von Willebrand factor protein interaction. *Blood* 1984;**63**(6):1291-8.
170. Martin P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science* 1997;**276**(5309):75-81.
171. Slavin J. The role of cytokines in wound healing. *J Pathol* 1996;**178**(1):5-10.
172. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994;**76**(2):301-14.
173. Wahl SM, Hunt DA, Wakefield LM, et al. Transforming growth factor type beta induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;**84**(16):5788-92.
174. Leibovich SJ, Ross R. The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *Am J Pathol* 1975;**78**(1):71-100.
175. Grant M, Jerdan J, Merimee TJ. Insulin-like growth factor-I modulates endothelial cell chemotaxis. *J Clin Endocrinol Metab* 1987;**65**(2):370-1.

176. Massague J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 1998;**67**:753-91.
177. Schultz GS, Grant MB. Neovascular growth factors. *Eye* 1991;**5 (Pt 2)**:170-80.
178. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995;**146**(5):1029-39.
179. Broadley KN, Aquino AM, Woodward SC, et al. Monospecific antibodies implicate basic fibroblast growth factor in normal wound repair. *Lab Invest* 1989;**61**(5):571-5.
180. Leibowitz HM, Morello S, Jr., Stern M, Kupferman A. Effect of topically administered epidermal growth factor on corneal wound strength. *Arch Ophthalmol* 1990;**108**(5):734-7.
181. Raff MC. Size control: the regulation of cell numbers in animal development. *Cell* 1996;**86**(2):173-5.
182. Hubner G, Hu Q, Smola H, Werner S. Strong induction of activin expression after injury suggests an important role of activin in wound repair. *Dev Biol* 1996;**173**(2):490-8.
183. Desmouliere A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol* 1993;**122**(1):103-11.
184. He Y, Grinnell F. Stress relaxation of fibroblasts activates a cyclic AMP signaling pathway. *J Cell Biol* 1994;**126**(2):457-64.
185. Woo S MJ, Butler D, Lyon R, Torzilli P, Akeson W. Ligament, tendon, and joint capsule insertions to bone: The American Academy of Orthopaedic Surgeons, 1988.
186. Woo SL-Y, An K-N, Arnoczky SP, Wayne JS, Fithian DC, Myers BS. Anatomy, biology, and biomechanics of tendon, ligament, and meniscus. In: Rosemont SS, ed. *Orthopaedic Basic Science*. Illinois: The American Academy of Orthopaedic Surgeons, 1994: 45-87.
187. Benjamin M, Tyers RN, Ralphs JR. Age-related changes in tendon fibrocartilage. *J Anat* 1991;**179**:127-36.
188. Rufai A, Benjamin M, Ralphs JR. Development and ageing of phenotypically distinct fibrocartilages associated with the rat Achilles tendon. *Anat Embryol (Berl)* 1992;**186**(6):611-8.
189. Cooper RR, Misol S. Tendon and ligament insertion. A light and electron microscopic study. *J Bone Joint Surg Am* 1970;**52**(1):1-20.

190. Kumagai J, Sarkar K, Uthoff HK, Okawara Y, Ooshima A. Immunohistochemical distribution of type I, II and III collagens in the rabbit supraspinatus tendon insertion. *J Anat* 1994;**185 (Pt 2)**:279-84.
191. Kurita K, Hashimoto Y, Takei T, Kawai T, Hayakawa T. Changes in collagen types during the healing of rabbit tooth extraction wounds. *J Dent Res* 1985;**64(1)**:28-32.
192. Sano H, Kumagai J, Sawai T. Experimental fascial autografting for the supraspinatus tendon defect: remodeling process of the grafted fascia and the insertion into bone. *J Shoulder Elbow Surg* 2002;**11(2)**:166-73.
193. Liu SH, Panossian V, al-Shaikh R, et al. Morphology and matrix composition during early tendon to bone healing. *Clin Orthop Relat Res* 1997;**339**:253-60.
194. Grassman SR, McDonald DB, Thornton GM, Shrive NG, Frank CB. Early healing processes of free tendon grafts within bone tunnels is bone-specific: a morphological study in a rabbit model. *Knee* 2002;**9(1)**:21-6.
195. Yamakado K, Kitaoka K, Yamada H, Hashiba K, Nakamura R, Tomita K. The influence of mechanical stress on graft healing in a bone tunnel. *Arthroscopy* 2002;**18(1)**:82-90.
196. Ralphs JR, Tyers RN, Benjamin M. Development of functionally distinct fibrocartilages at two sites in the quadriceps tendon of the rat: the suprapatella and the attachment to the patella. *Anat Embryol (Berl)* 1992;**185(2)**:181-7.
197. Putney SD, Burke PA. Improving protein therapeutics with sustained-release formulations. *Nat Biotechnol* 1998;**16(2)**:153-7.
198. DeGroot LJ, J Larry. Endocrinology. 4th ed. ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co, 2001.
199. Herndon DN, Nguyen TT, Gilpin DA. Growth factors. Local and systemic. *Arch Surg* 1993;**128(11)**:1227-33.
200. De Pedro Moro JA dLTEB, Blanco Blanco JF, Salvado Munoz M, Vazquez Lasa B, San Roman del Barrio J. Estudio experimental de la aplicacion y biocompatibilidad de un nuevo cemento óseo de baja toxicidad. *Medicina Balear* 2003(18):30-38.
201. Cuadrado MA dLF, de Pedro JA, Tome JL, Penas A, Lorenzo P. Trasplante múltiple tisular. Evaluación del metabolismo óseo y muscular. *Arch Fac Med Zaragoza* 1988(28):166.

202. Cuadrado MA dPJ, Tainta JR, Navarrete FG, Tome JL, Asenjo JA. Inducción ósea por proteína morfogenética parcialmente purificada. II Congreso de la SEEA 1989, León.
203. Cuadrado MA dPJ, Garda de Lucas F, Tainta JR, Cebrian JL, Asenjo JA. Evaluación de la proteína morfogenética ósea y la fibronectina en la inducción ósea y regeneración. VI Congreso de la Sociedad Española de Investigaciones Quirúrgicas 1990, Barcelona: 85.
204. De Pedro JA CM, Asenjo JA, Tainta JR, García de Lucas F, López-Duran L. Regeneración ósea BMP-inducida. Aplicación en la reparación de grandes defectos óseos. 3º Simp. SEIOMM 1991, Madrid: 34.
205. Grageda E. Platelet-rich plasma and bone graft materials: a review and a standardized research protocol. *Implant Dent* 2004;**13**(4):301-9.
206. Heldin CH, Westermark B. PDGF-like growth factors in autocrine stimulation of growth. *J Cell Physiol Suppl* 1987;**Suppl 5**:31-4.
207. Cuadrado MA dPJ, Furio V, Tainta JR, Fernandez-Criado F, Valor R. Investigación experimental de la inducción ósea mediada por BMP. Aspectos ultraestructurales. 3º Simp. SEIOMM 1991, Madrid: 35.
208. De Pedro JA. Biomodelos tisulares en Ortopedia. Abstracts. III Congreso Nacional SEEA 1991;29-30.
209. Molloy T, Wang Y, Murrell G. The roles of growth factors in tendon and ligament healing. *Sports Med* 2003;**33**(5):381-94.
210. García de Lucas F DPJ, López Bravo A, San Roman J, Cuadrado MA, Pérez-Caballer AJ. Oseorregeneración inducida por biomateriales y BMP en defectos diafisarios. *Rev Ortop Traumatol* 1995;**39**:350-61.
211. De La Torre B VB, Garía de Lucas F, de Pedro JA, Lopez Bravo A, P Guillen P. Cementos óseos acrílicos de baja toxicidad. Parámetros de curado, propiedades y análisis de su biocompatibilidad. II Congreso General INVESCOT 1999, Pamplona: 32.
212. De La Torre Escuredo B VB, De Pedro JA, López Bravo A, San Roman J, García De Lucas F. Cementos óseos acrílicos de baja toxicidad. Parámetros de curado, propiedades y análisis de su biocompatibilidad. XXXVI Congreso Nacional SECOT 1999, Valencia: 211.

213. De La Torre B VB, Calvo-Fernández T, García de Lucas F, De Pedro JA, Casado I. In vivo response of acrylic bone cements with activators of low toxicity. I Iberic Congress on Biomaterials. XXIII Meeting of the Sociedad Iberica de Biomecanica y Biomateriales 2000, Avila: 59-60.
214. De La Torre B VB, Fernández M, García de Lucas F, Guillén P, De Pedro JA. Estudio experimental de cementos óseos acrílicos de reducida toxicidad par Cirugía Ortopédica. *Mapfre Medicina* 2002;**13**:155-64.
215. De La Torre Escuredo B VB, Calvo-Fernández Babiano T, López Bravo A, García De Lucas F, De Pedro JA. Estudio histologico de un nuevo cemento oseo de baja toxicidad. XXXVII Congreso Nacional SECOT 2000, Madrid: 571.
216. Garg AK. The use of platelet-rich plasma to enhance the success of bone grafts around dental implants. *Dent Implantol Update* 2000;**11**(3):17-21.
217. Salvado Muñoz M SJVA, Domínguez Hernández I, Amigo Linares I., Pérez Ochagavia F, de Pedro Moro JA. Valoracion histológica de un cemento óseo activado. *Span J Surg Res* 2002;**5**:113.
218. Orrego M, Larrain C, Rosales J, et al. Effects of platelet concentrate and a bone plug on the healing of hamstring tendons in a bone tunnel. *Arthroscopy* 2008;**24**(12):1373-80.
219. González Corchón MA SMM, De La Torre Escuredo B, Martín Rodríguez P, Vázquez Lasa B, De Pedro Moro JA. Estudio de la regeneración ósea experimental influenciada por nuevas formulaciones de cementos óseos. 40º Congreso Nacional SECOT 2003, Tenerife: 349-350.
220. Menetrey J, Kasemkijwattana C, Day CS, et al. Growth factors improve muscle healing in vivo. *J Bone Joint Surg Br* 2000;**82**(1):131-7.
221. Kurtz CA, Loebig TG, Anderson DD, DeMeo PJ, Campbell PG. Insulin-like growth factor I accelerates functional recovery from Achilles tendon injury in a rat model. *Am J Sports Med* 1999;**27**(3):363-9.
222. De Pedro JA dLF, Navarrete FG, Cuadrado MA, Alsua A, Lorenzo P. Transplantations tissulaires composites: Appreciation du metabolisme osseux. *Rev Chir Orthop* 1989;**75**(S1):193-194.
223. Cuadrado MA dPJ, de Lucas FG, Tome JL, López-Duran L. Osteoinduction by BMP. SIROT 1990, Montreal: 73.

224. Efthimiadou A, Asimakopoulos B, Nikolettos N, et al. Angiogenic effect of intramuscular administration of basic and acidic fibroblast growth factor on skeletal muscles and influence of exercise on muscle angiogenesis. *Br J Sports Med* 2006;**40**(1):35-9; discussion 35-9.
225. Bejcek BE, Li DY, Deuel TF. Transformation by v-sis occurs by an internal autoactivation mechanism. *Science* 1989;**245**(4925):1496-9.
226. Koch CA, Anderson D, Moran MF, Ellis C, Pawson T. SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins. *Science* 1991;**252**(5006):668-74.
227. Claesson-Welsh L. Platelet-derived growth factor receptor signals. *J Biol Chem* 1994;**269**(51):32023-6.
228. Hill CS, Treisman R. Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. *Cell* 1995;**80**(2):199-211.
229. Sanchez I, Hughes RT, Mayer BJ, et al. Role of SAPK/ERK kinase-1 in the stress-activated pathway regulating transcription factor c-Jun. *Nature* 1994;**372**(6508):794-8.
230. Levander G. A study of bone regeneration. *Surg Gynecol Obstet* 1938;**67**:705-714.
231. Lacroix P. Recent investigations on the growth of bone. *Nature* 1945;**156**:576-577.
232. Urist MR, Schjeide AO. The partition of calcium and protein in the blood of oviparous vertebrates during estrus. *J Gen Physiol* 1961;**44**:743-56.
233. Wang EA, Rosen V, Cordes P, et al. Purification and characterization of other distinct bone-inducing factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;**85**(24):9484-8.
234. Wozney JM. The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. *Mol Reprod Dev* 1992;**32**(2): 160-7.
235. Song JJ, Celeste AJ, Kong FM, Jirtle RL, Rosen V, Thies RS. Bone morphogenetic protein-9 binds to liver cells and stimulates proliferation. *Endocrinology* 1995;**136**(10):4293-7.
236. Griffin XL, Smith CM, Costa ML. The clinical use of platelet-rich plasma in the promotion of bone healing: a systematic review. *Injury* 2009;**40**(2):158-62.
237. Ranly DM, Lohmann CH, Andreacchio D, Boyan BD, Schwartz Z. Platelet-rich plasma inhibits demineralized bone matrix-induced bone formation in nude mice. *J Bone Joint Surg Am* 2007;**89**(1): 139-47.

238. de Mos M, van der Windt AE, Jahr H, et al. Can platelet-rich plasma enhance tendon repair? A cell culture study. *Am J Sports Med* 2008;**36**(6):1171-8.
239. Hammond JW, Hinton RY, Curl LA, Muriel JM, Lovering RM. Use of autologous platelet-rich plasma to treat muscle strain injuries. *Am J Sports Med* 2009;**37**(6):1135-42.
240. Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg* 2004;**62**(4):489-96.
241. Sanchez M, Anitua E, Azofra J, Andia I, Padilla S, Mujika I. Comparison of surgically repaired Achilles tendon tears using platelet-rich fibrin matrices. *Am J Sports Med* 2007;**35**(2):245-51.
242. Eppley BL, Woodell JE, Higgins J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plast Reconstr Surg* 2004;**114**(6):1502-8.
243. Schneider BS, Tiidus PM. Neutrophil infiltration in exercise-injured skeletal muscle: how do we resolve the controversy? *Sports Med* 2007;**37**(10):837-56.
244. Anitua E. Protocolo de obtención y evaluación clínica e histológica de plasma rico en factores de crecimiento para la preparación de áreas futuras en implantología. Estudio con SEM y evaluación clínica e histológica: Universidad de Valencia, 2002.
245. Lynch SE, Colvin RB, Antoniades HN. Growth factors in wound healing. Single and synergistic effects on partial thickness porcine skin wounds. *J Clin Invest* 1989;**84**(2):640-6.
246. Cochran DL, Schenk R, Buser D, Wozney JM, Jones AA. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulation of bone formation around endosseous dental implants. *J Periodontol* 1999;**70**(2):139-50.
247. Slater M, Patava J, Kingham K, Mason RS. Involvement of platelets in stimulating osteogenic activity. *J Orthop Res* 1995;**13**(5):655-63.
248. Kevy SV, Jacobson MS. Comparison of methods for point of care preparation of autologous platelet gel. *J Extra Corpor Technol* 2004;**36**(1):28-35.
249. Gonshor A. Technique for producing platelet-rich plasma and platelet concentrate: background and process. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2002;**22**(6):547-57.

250. López-Oliva Muñoz F VEC, Almoguera Villa-canas JR. Plasma rico en plaquetas. Análisis comparativo de cuatro presentaciones comerciales. *Patología del Aparato Locomotor*. 2003; 1: 59-66. 2003;**1**:59-66.
251. Anitua E, Andia I, Ardanza B, Nurden P, Nurden AT. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost* 2004;**91**(1):4-15.
252. Weibrich G, Kleis WK, Hitzler WE, Hafner G. Comparison of the platelet concentrate collection system with the plasma-rich-in-growth-factors kit to produce platelet-rich plasma: a technical report. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2005;**20**(1):118-23.
253. Mishra A, Pavelko T. Treatment of chronic elbow tendinosis with buffered platelet-rich plasma. *Am J Sports Med* 2006;**34**(11):1774-8.
254. Fufa D, Shealy B, Jacobson M, Kevy S, Murray MM. Activation of platelet-rich plasma using soluble type I collagen. *J Oral Maxillofac Surg* 2008;**66**(4):684-90.
255. Anitua E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999;**14**(4):529-35.
256. Carter CA, Jolly DG, Worden CE, Sr., Hendren DG, Kane CJ. Platelet-rich plasma gel promotes differentiation and regeneration during equine wound healing. *Exp Mol Pathol* 2003;**74**(3):244-55.
257. Creaney L, Hamilton B. Growth factor delivery methods in the management of sports injuries: the state of play. *Br J Sports Med* 2008;**42**(5):314-20.
258. Sanchez AR, Sheridan PJ, Kupp LI. Is platelet-rich plasma the perfect enhancement factor? A current review. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2003;**18**(1):93-103.
259. Hall MP, Band PA, Meislin RJ, Jazrawi LM, Cardone DA. Platelet-rich plasma: current concepts and application in sports medicine. *J Am Acad Orthop Surg* 2009;**17**(10):602-8.
260. Bielecki TM, Gazdzik TS, Arendt J, Szczepanski T, Krol W, Wielkoszynski T. Antibacterial effect of autologous platelet gel enriched with growth factors and other active substances: an in vitro study. *J Bone Joint Surg Br* 2007;**89**(3):417-20.

261. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998;**85**(6):638-46.
262. Zhang CQ, Yuan T, Zeng BF. Experimental study of the effect of platelet-rich plasma on osteogenesis in rabbit. *Chin Med J (Engl)* 2004;**117**(12):1853-5.
263. Knighton DR, Phillips GD, Fiegel VD. Wound healing angiogenesis: indirect stimulation by basic fibroblast growth factor. *J Trauma* 1990;**30**(12 Suppl):S134-44.
264. Ganio C, Tenewitz FE, Wilson RC, Moyles BG. The treatment of chronic nonhealing wounds using autologous platelet-derived growth factors. *J Foot Ankle Surg* 1993;**32**(3):263-8.
265. Lowery GL, Kulkarni S, Pennisi AE. Use of autologous growth factors in lumbar spinal fusion. *Bone* 1999;**25**(2 Suppl):47S-50S.
266. Sánchez M AJ, Aizpurúa B, Elorriaga R, Anitua E, Andía I. Use of autologous plasma rich in growth factors in arthroscopic surgery. *Cuadernos de Artroscopia* 2003;**10**:12-19.
267. Silva A, Sampaio R. Anatomic ACL reconstruction: does the platelet-rich plasma accelerate tendon healing? *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2009;**17**(6):676-82.
268. Sanchez M, Azofra J, Anitua E, et al. Plasma rich in growth factors to treat an articular cartilage avulsion: a case report. *Med Sci Sports Exerc* 2003;**35**(10):1648-52.
269. Gandhi A, Bibbo C, Pinzur M, Lin SS. The role of platelet-rich plasma in foot and ankle surgery. *Foot Ankle Clin* 2005;**10**(4):621-37, viii.
270. Gardner MJ, Demetrakopoulos D, Klepchick PR, Mooar PA. The efficacy of autologous platelet gel in pain control and blood loss in total knee arthroplasty. An analysis of the haemoglobin, narcotic requirement and range of motion. *Int Orthop* 2007;**31**(3):309-13.
271. Ranly DM, McMillan J, Keller T, et al. Platelet-derived growth factor inhibits demineralized bone matrix-induced intramuscular cartilage and bone formation. A study of immunocompromised mice. *J Bone Joint Surg Am* 2005;**87**(9):2052-64.

272. Peng L, Malloy PJ, Wang J, Feldman D. Growth inhibitory concentrations of androgens up-regulate insulin-like growth factor binding protein-3 expression via an androgen response element in LNCaP human prostate cancer cells. *Endocrinology* 2006;**147**(10):4599-607.
273. Mehta S, Watson JT. Platelet rich concentrate: basic science and current clinical applications. *J Orthop Trauma* 2008;**22**(6):432-8.
274. Anitua E, Andia I, Sanchez 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**(2):281-6.
275. Kajikawa Y, Morihara T, Sakamoto H, et al. Platelet-rich plasma enhances the initial mobilization of circulation-derived cells for tendon healing. *J Cell Physiol* 2008;**215**(3):837-45.
276. Virchenko O, Aspenberg P. How can one platelet injection after tendon injury lead to a stronger tendon after 4 weeks? Interplay between early regeneration and mechanical stimulation. *Acta Orthop* 2006;**77**(5):806-12.
277. Lefaucheur JP, Gjata B, Lafont H, Sebille A. Angiogenic and inflammatory responses following skeletal muscle injury are altered by immune neutralization of endogenous basic fibroblast growth factor, insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta 1. *J Neuroimmunol* 1996;**70**(1): 37-44.
278. Sanchez M, Azofra J, Anitua E, al. e. Use of a preparation rich in growth factors in the operative treatment of rupture Achilles tendon. In: Presentation P, ed. 2nd International Conference on Regenerative Medicine. Granada. Spain., 2005.
279. Mishra A, Woodall J, Jr., Vieira A. Treatment of tendon and muscle using platelet-rich plasma. *Clin Sports Med* 2009;**28**(1):113-25.
280. Kon E, Filardo G, Delcogliano M, et al. Platelet-rich plasma: new clinical application: a pilot study for treatment of jumper's knee. *Injury* 2009;**40**(6):598-603.
281. Barrett S, Erredge S. Growth factors for chronic plantar fasciitis. *Podiatry Today* 2004;**17**:37-42.
282. Sanchez M, Anitua E, Andia I. Application of autologous growth factors on skeletal muscle healing. In: Presentation P, ed. 2nd International Conference on Regenerative Medicine. Granada. Spain., 2005.

283. Sanchez M, Anitua E, Azofra J, Aguirre JJ, Andia I. Intra-articular injection of an autologous preparation rich in growth factors for the treatment of knee OA: a retrospective cohort study. *Clin Exp Rheumatol* 2008;**26**(5):910-3.
284. Randelli PS, Arrigoni P, Cabitza P, Volpi P, Maffulli N. Autologous platelet rich plasma for arthroscopic rotator cuff repair. A pilot study. *Disabil Rehabil* 2008;**30**(20-22):1584-9.
285. Everts PA, Devilee RJ, Brown Mahoney C, et al. Exogenous application of platelet-leukocyte gel during open subacromial decompression contributes to improved patient outcome. A prospective randomized double-blind study. *Eur Surg Res* 2008;**40**(2):203-10.
286. Shih SD, Rees TD, Miller EG, Wright JM, Iacopino AM. The effects of platelet-derived growth factor-BB and insulin-like growth factor-1 on epithelial dysplasia. *J Periodontol* 1996;**67**(11):1224-32.
287. Zúñiga J TMJ, Milocco S, Piñeiro R. Ciencia y tecnología en protección y experimentación animal. Madrid: McGraw-Hill / Interamericana, 2001.
288. Manning PJ, DH. R. *The biology of the Laboratory Rabbit*. New York: Academic Press Inc, 1994.
289. Mckelvey D, K.W. H. *Small Animal Anesthesia & Analgesia*. Saint Louis: Mosby-year, 2000.
290. Anitua E. Un nuevo enfoque en la regeneración ósea. Plasma rico en factores de crecimiento (PRGF). Vitoria, 2000.
291. Goldblatt JP, Fitzsimmons SE, Balk E, Richmond JC. Reconstruction of the anterior cruciate ligament: meta-analysis of patellar tendon versus hamstring tendon autograft. *Arthroscopy* 2005;**21**(7):791-803.
292. Shelbourne KD, Nitz P. Accelerated rehabilitation after anterior cruciate ligament reconstruction. *Am J Sports Med* 1990;**18**(3):292-9.
293. Harkness JE. Rabbit husbandry and medicine. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1987;**17**(5):1019-44.
294. Cabaud HE, Rodkey WG, Feagin JA. Experimental studies of acute anterior cruciate ligament injury and repair. *Am J Sports Med* 1979;**7**(1):18-22.
295. Lynch SE, Nixon JC, Colvin RB, Antoniades HN. Role of platelet-derived growth factor in wound healing: synergistic effects with other growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;**84**(21):7696-700.

296. Hulth A, Johnell O, Miyazono K, Lindberg L, Heinegard D, Heldin CH. Effect of transforming growth factor-beta and platelet-derived growth factor-BB on articular cartilage in rats. *J Orthop Res* 1996;**14**(4):547-53.
297. van Beuningen HM, van der Kraan PM, Arntz OJ, van den Berg WB. Transforming growth factor-beta 1 stimulates articular chondrocyte proteoglycan synthesis and induces osteophyte formation in the murine knee joint. *Lab Invest* 1994;**71**(2):279-90.

X. 1

ANEXO BIBLIOGRÁFICO

Nuestro Estudio Clínico comparativo de los resultados de la reconstrucción del LCA mediante autoinjerto de HTH rotuliano y TI ha sido comunicado en los siguientes congresos:

- XLIIº Congreso Nacional de la SECOT. Sevilla. 4 - 7 de octubre de 2.005
Comunicación Oral: “ESTUDIO COMPARATIVO EN LA RECONSTRUCCIÓN DEL LCA MEDIANTE ST-RI EN 4 FASCÍCULOS Y HTH PATELAR AUTÓLOGO”.
- XXXIII Simposium Internacional de Traumatología-Ortopedia FREMAP: “Evaluación y tratamiento de las secuelas postraumáticas II: Pelvis y miembros inferiores”. Majadahonda (Madrid). 14 - 16 de junio de 2.006. 1º PREMIO a la mejor Comunicación Oral: “RESULTADOS DE LA RECONSTRUCCIÓN DEL LCA CON PLASTIA HTH vs STRI”.
- XXVº Congreso de la Asociación Española de Artroscopia. 16 - 18 de mayo de 2.007. Sevilla. Comunicación Oral: “TENDÓN ROTULIANO vs ISQUIOTIBIALES EN EL TRATAMIENTO DE LA LESIÓN DEL LIGAMENTO CRUZADO ANTERIOR”.
- XIIIº ESSKA 2000 Congress, May 21-24, 2008, Porto, Portugal. Poster: “INCISION TECHNIQUE BONE-TENDON-BONE VERSUS HAMSTRING IN ANTERIOR CRUCIATE LIGAMENT REPLACEMENT” .

- Hermoso J.A., Ruiz-Macrrilla L. Incision technique bone-tendon-bone versus hamstring in anterior cruciate ligament replacement . Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc (2008) **16** (Suppl 1): S117