



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

ESPECIALIDAD EN ORTODONCIA

TESIS

**CRECIMIENTO Y REGENERACIÓN ÓSEA CON PLASMA RICO EN
PLAQUETAS. REVISIÓN**

PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA EN ORTODONCIA

PRESENTA:

C.D. Eric Rodríguez González

Asesor:

Dr. Renato Nieto Aguilar

Revisor:

Dr. Asdrúbal Aguilera Méndez

Revisora:

Dra. Deyanira Serrato Ochoa

Morelia, Michoacán; Noviembre 2015.

AGRADECIMIENTOS

Con cariño y admiración:

A mi esposa Anais;

A mi madre Alicia, a mis hermanos María de Jesús y Adelfo;

A mis amigas Ana Luisa Campos† y Virginia Campos;

*Al Dr. Renato Nieto, a la Dra. Deyanira Serrato y al Dr. Asdrúbal Aguilera, a la
C.D.E.O. María del Rosario Zavala y al C.D.E.O. Vidal Almanza;*

A mis profesores.

ÍNDICE

RESUMEN.....	9
INTRODUCCIÓN.....	12
ANTECEDENTES	15
Hueso	16
Tipos de hueso	17
Composición de la matriz ósea	18
Células óseas.....	19
Componentes del hueso	20
Formación de hueso	21
Mecanotransducción.....	22
Remodelado óseo	22
Biomarcadores del remodelamiento óseo.....	24
Marcadores de formación ósea.....	25
Marcadores de resorción.....	26
Reparación ósea.....	27
Regeneración ósea	28
Fractura y reparación.....	28
1) Fase reactiva.....	28
2) Fase Reparativa.	29
3) Fase de remodelación.	30
Injertos óseos.....	31
Inflamación	33
Proliferación.....	33
Cicatrización.....	34
Plasma rico en plaquetas	34
Obtención del Plasma Rico en Plaquetas	35
Factores de crecimiento	36
OBJETIVOS	37
Objetivo General:.....	38
JUSTIFICACIÓN.....	39

MATERIALES	42
DISCUSIÓN.....	44
CONCLUSIONES.....	49
SUGERENCIAS PARA TRABAJOS FUTUROS	51
RECOMENDACIONES.....	53
BIBLIOGRAFÍA.....	55

GLOSARIO

Aloinjerto. Un aloinjerto es un injerto que se obtiene de una persona para ser trasplantada en otra.

Andamio. Es un material de soporte empleado para guiar el crecimiento óseo.

Autoinjerto. Es un tipo de tejido que se obtiene de una persona y se injerta en alguna parte de su cuerpo.

Biomarcador. Los marcadores bioquímicos del recambio óseo son o una enzima relacionada directamente con la actividad de osteoblastos u osteoclastos, o un constituyente de la matriz ósea liberado a la circulación, cuantificable en sangre u orina.

Células osteoprogenitoras. Son células no especializadas, precursoras que pueden dar origen a los osteoblastos.

Colagenasa. Es una enzima, que degrada al colágeno.

Colágeno. Es una proteína que forma parte de diversos tejidos como el hueso y el cartílago.

Distracción ósea. Es un fenómeno que consiste en la separación progresiva de dos partes de un hueso, mediante una fuerza aplicada por un distractor, para provocar nueva formación ósea.

Factores de crecimiento. Son un grupo de proteínas que inducen a la liberación de sustancias vinculadas a la reparación de diversos tejidos del cuerpo humano ante un daño.

Fosfatasa alcalina. Es una proteína que puede ser localizada a través de un examen de sangre que puede indicar formación ósea.

Hueso esponjoso. El hueso esponjoso es un poroso que se encuentra distribuido en los huesos del cuerpo humano, también se le conoce como hueso trabecular.

Hueso compacto. Es el tejido óseo que forma la cortical externa de los huesos. Se compone de osteones formados por canales haversianos, se le conoce con el nombre de hueso cortical.

Inflamación. Reacción de defensa del cuerpo humano ante la invasión de cuerpos extraños, microorganismos patógenos o debido a traumatismos que provocan inflamación, rubor y calor en la zona afectada.

Ingeniería Tisular. Área de la medicina que emplea tejidos celulares para sustituir los tejidos dañados y sus funciones fisiológicas.

Injerto. Es un tejido u órgano que puede ser trasplantado en un individuo o en otra persona.

Ley de Wolff. Ley que refiere a que la forma adoptada por un hueso, se debe a la remodelación que éste sufre debido a su capacidad para adaptarse a las tensiones que inciden sobre él.

Osteoblastos. Células con morfología cuadrangular. Tienen un núcleo central con nucléolo, y también organelas. Su función es sintetizar la matriz extracelular.

Osteocalcina. Es una hormona peptídica lineal formada por 49 aminoácidos y producida por los osteoblastos durante la formación ósea, incorporándose dentro de la matriz del hueso. Este péptido tiene una vida media muy corta; se metaboliza en el hígado y el riñón rápidamente.

Osteocitos. Son células que se forman a partir de la diferenciación de los osteoblastos, que a su vez derivan de las células osteoprogenitoras. Todos estos tipos celulares, junto con los osteoclastos (de distinto origen), constituyen los elementos celulares del tejido óseo.

Osteoclastos. Los osteoclastos son células multinucleadas que contienen numerosas mitocondrias y lisosomas. Son las responsables de la destrucción del tejido óseo.

Osteoconductores. Los materiales osteoconductores son materiales que al incorporarse en el defecto óseo, hacen que el tejido óseo y conjuntivo, crezcan por aposición como las cerámicas, polímeros y composites.

Osteogénesis. La Osteogénesis se produce cuando los osteoblastos vitales procedentes del material de injerto óseo contribuyen al crecimiento de hueso nuevo junto con el crecimiento del hueso generado a través de los otros dos mecanismos.

Osteoinductores. Son aquellos que promueven la formación de hueso a partir de células indiferenciadas que se transforman en osteoblastos o condroblastos.

Osteona. Sistema de Havers es la unidad anatómica y funcional del tejido óseo. Está constituido por un canal de havers, alrededor del cual se agrupan laminillas con lagunas conteniendo células óseas, ya sean osteocitos u osteoblastos.

Osteonectina. Es una proteína ligada al calcio con afinidad al colágeno.

Osteopontina. Es una proteína que se puede unir al calcio y a la hidroxapatita y desempeña un rol fundamental en la mineralización ósea.

Plasma rico en plaquetas. Es un concentrado autólogo que contiene factores de crecimiento y que se obtiene a través de centrifugación de los elementos que constituyen la sangre.

Proteínas morfogenéticas óseas (BMP). Las proteínas morfogenéticas del hueso, o *Bone Morphogenetic Proteins* (BMPs) es una familia de factores de crecimiento que pueden inducir la formación de hueso.

Reabsorción ósea. Es el proceso por el cual los osteoclastos remueven tejido óseo.

Regeneración ósea. Es una respuesta generada a partir de un trauma, que produce la estimulación de células especializadas que se encargan de volver a producir hueso en el sitio afectado.

Remodelación ósea. Es el proceso por el cual el hueso cambia su configuración estructural debido a las cargas que actúan sobre él.

Xenoinjerto. Sustituto óseo xenoinjerto de diferente especie que tiene su origen en una especie distinta de humanos, como la bovina.

RESUMEN

El plasma rico en plaquetas es un concentrado autólogo que aumenta la reparación de las heridas (Wroblewski *et al.*, 2010).

El empleo del plasma rico en plaquetas ha sido ampliamente difundido debido a que se han obtenido resultados favorables en áreas como la Ortopedia, Odontología, Neurocirugía, y Cirugía Maxilofacial (Marx *et al.*, 1998).

El objetivo de este estudio consistió en la realización de una revisión bibliográfica sistemática en las bases de datos PUBMED, Cochrane Library y artículos de journals contenidos en Springer, Elsevier y Wiley en un período comprendido desde enero del año 2014 al mes de junio del año 2015.

En los criterios de búsqueda se incluyeron estudios aleatorios comparativos que pretendían conocer los efectos del plasma rico en plaquetas. Los estudios se realizaron en laboratorio, en animales y en seres humanos sobre padecimientos músculo-esqueléticos, en los que se aplicó sólo o combinado con autoinjertos, xenoinjertos o materiales sintéticos.

Palabras clave: plasma rico en plaquetas, hueso, crecimiento óseo, ingeniería tisular.

ABSTRACT

The platelet rich plasma is an autologous concentrate containing growth factors associated with the process of bone regeneration and growth.

The use of PRP has been widely publicized because it has reported they have favorable results in health areas such as orthopedics, dentistry, neurosurgery, and Maxillofacial Surgery.

The aim of this study was to conduct a systematic literature review in PubMed, Cochrane Library and journal articles contained in Springer, Elsevier and Wiley data in a period from January 2014 to June 2015.

Search criteria included comparative randomized studies which determine the effects of platelet-rich plasma. In laboratory animals and humans over-skeletal muscle conditions in which it was applied alone or combined with autografts, xenografts or synthetic materials.

Keywords: platelet rich plasma, bone, bone growth, tissue engineering.

INTRODUCCIÓN

Los recientes avances en las áreas de la química, la física, la biología, la medicina, la ingeniería y la interconexión entre estos campos se están abriendo nuevas y perspectivas interesantes que podrían revolucionar los servicios de salud y mejorar la calidad de vida de la población en todo el mundo. La ingeniería tisular (TE) es un campo científico multidisciplinar emergente que tiene como objetivo restaurar, mantener o mejorar las funciones de tejidos y órganos (Bártolo *et al.*, 2011).

El conocimiento de estos mecanismos ha permitido el desarrollo de tejido óseo a partir de células osteoprogenitoras, combinados con osteoinductores y osteoconductores que permiten restaurar, mantener la formación de nuevo tejido óseo que puede sustituir y devolver la funcionalidad del tejido perdido (Langer y Vacanti, 1993).

En este sentido, el plasma rico en plaquetas ha sido empleado como un osteoinductor y promotor de la curación de las heridas en procedimientos dentales y cirugía oral, aunado a ello, es seguro por tratarse de la sangre del propio paciente y es de fácil obtención (Lee *et al.*, 2011).

Debido a lo anterior, en este trabajo de titulación de especialidad se abordará una revisión exhaustiva del tema crecimiento y regeneración ósea con plasma rico en plaquetas.

ANTECEDENTES

Aplicaciones de la ingeniería tisular en el crecimiento y regeneración ósea

La ingeniería tisular ha tenido importantes aplicaciones en medicina regenerativa, en la reconstrucción o regeneración tisular (Pramanik *et al.*, 2012). Es una disciplina en la que se ha logrado un aumento del entendimiento sobre los procesos que promueven y regulan el crecimiento, así como la manera en que la proliferación y diferenciación celular propician la regeneración de tejido humano para restaurarlo, reconstruirlo y mejorar sus funciones (Pörtner *et al.*, 2005); o en su defecto, reparar o reemplazar tejidos y órganos dañados (Butler *et al.*, 2000).

Una cualidad de la ingeniería tisular es que aprovecha el potencial del crecimiento celular y su capacidad para proliferar y diferenciarse, situación que permite, tanto su cultivo en el laboratorio, como su transporte hasta el sitio afectado (Langer y Vacanti, 1993). En la ingeniería tisular se emplean: 1) células combinadas con un andamio (Felicity y Oreffob, 2002), 2) factores de crecimiento, y 3) una matriz extracelular (Stock y Vacanti, 2001), que permiten guiar el crecimiento celular.

Las células que emplea la ingeniería tisular pueden ser de origen autólogo, alogénico y xenogénico (Butler *et al.*, 2000). Las células autólogas provienen del mismo huésped sobre el cual se emplearán, por esta razón, son las más viables. Debido a que reducen el riesgo de desencadenar respuestas adversas al tiempo que evitan la transmisión de enfermedades (Germain, 2002), comparadas con células alogénicas y xenogénicas, en las que se han observado una mínima respuesta del huésped (Faustman, 2002).

Un elemento esencial para la ingeniería tisular es la utilización de un andamio para promover el desarrollo tisular (Chan y Leong, 2008), porque proporciona tanto las propiedades mecánicas estructurales, como las condiciones necesarias para la proliferación y diferenciación celular. Un andamio puede ser de origen natural o sintético y debe ser funcional, estructural y mecánicamente igual o mejor que el tejido que se sustituirá (Kim y Evans, 2005). En relación a las características que

deben poseer los andamios orientados a la regeneración ósea es que deben ser biocompatibles, absorbibles, radiolúcidos, osteoconductivos, de fácil manejo, que sea posible su esterilización y que tenga un tamaño de poro que oscile entre 200-900 μm (Logeart-Avramoglou, 2005).

Otro de los aspectos que deben contemplarse en la selección de un andamio es su grado de biodegradabilidad, pues este atributo le permitirá disolverse en los tejidos circundantes una vez terminada su función. De esta manera, el constructo es acogido en el seno del tejido en tratamiento regenerativo (Amoabediny *et al.*, 2011).

Uno de los tejidos vivos en los que pueden ser empleados satisfactoriamente las células en combinación con andamios y que tiene un amplio campo de uso en la ingeniería tisular es el tejido óseo. El tejido empleado dentro de la regeneración ósea puede ser por su origen; *in vivo*, si se estimula la regeneración propia del organismo o *ex vivo*, cuando las células son cultivadas en laboratorio mediante un andamio y reimplantadas en el huésped (Butler, 2000).

Debido a que este trabajo de investigación contempla el estudio del comportamiento de hueso humano en los procesos de regeneración en cultivo *ex vivo*, mediante técnicas de ingeniería tisular, se hablará a continuación de este tejido ampliamente.

Hueso

El hueso es un órgano que se forma durante el primer trimestre *in útero* (Little, 2011). Es un tejido dinámico, que desempeña funciones físicas, mecánicas y biológicas vitales para la vida humana (Stern y Nicolella, 2013).

El hueso es uno de los tejidos más duros del cuerpo humano que conforma la mayor parte del esqueleto y desempeña varias funciones: sirve como sitio de unión para los músculos, protege de órganos vitales, (Feng, 2010), es un sitio de almacenamiento de células vinculadas con la reparación ósea (Jae-Young, 1998), con potencial regenerativo y por último, es una reserva de minerales que permite

la incorporación del fósforo, magnesio y calcio en la sangre cuando se requiere nivelar la cantidad circulante de estos iones (Doblaré, 2004).

Tipos de hueso

Hay cuatro tipos de huesos: huesos largos (fémur, tibia, cúbito y radio), huesos cortos (carpo y tarso), huesos planos (cráneo, esternón y la escápula) y los huesos de forma irregular (vértebra y etmoidales). Estos huesos se forman a través de diferentes mecanismos durante el desarrollo embrionario. La mayoría de los huesos largos se forman por un mecanismo endocondral y los huesos planos lo hacen a través de osificación intramembranosa. Algunos huesos, como la clavícula tienen ambos tipos de formación de hueso. Tanto los huesos largos y planos se organizan con una región difusa, pero relativamente delgada, externa compuesta de hueso denso, compacto llamado corteza o hueso cortical. Dentro de la corteza está la cavidad ósea que contiene elementos hematopoyéticos, grasa y espículas de hueso esponjoso. Las espículas óseas también se conocen como hueso trabecular o esponjoso (Khurana *et al.*, 2010).

Por otro lado, existen dos variedades de hueso: el hueso compacto (cortical) y el esponjoso (trabecular). El hueso cortical forma la pared externa de un hueso, le proporciona apoyo mecánico y contiene vasos sanguíneos, mientras el hueso esponjoso está formado de trabéculas que están altamente vascularizadas en su interior (Buckwalter *et al.*, 1996).

A su vez, el tejido óseo puede clasificarse de acuerdo a la disposición de las fibras de colágeno en dos tipos: hueso reticulado y hueso laminar. El primero se compone de fibras de colágeno orientadas al azar, con un gran número de osteoblastos (células osteoprogenitoras) a su lado. Bajo la luz polarizada puede ser reconocido por tener una estructura desordenada. Se produce en las regiones de crecimiento rápido, como en el esqueleto especialmente en el embrión (Khurana *et al.*, 2010).

El segundo, hueso laminar (hueso maduro), se identifica fácilmente en el microscopio de luz polarizada como líneas paralelas de hueso depositado. Los estudios han demostrado que este hueso tiene una disposición bien organizada de fibras de colágeno. El hueso laminar se forma cuando la velocidad de deposición es lenta. En general, sólo se forma en el hueso preexistente. La organización secundaria es un sello distintivo de hueso laminar. En la corteza, las laminillas están dispuestas en circunferencia, así como disposiciones tubulares. La disposición tubular se denomina osteona. Bajo el microscopio, estos tubos se pueden ver como círculos o láminas paralelas dependiendo de la forma en que se cortan para hacer cortes histológicos. La parte central del tubo es el canal de Havers, que contiene vasos sanguíneos y linfáticos y nervios. Las células óseas llamadas osteocitos se encuentran entre las laminillas (Khurana *et al.*, 2010).

Composición de la matriz ósea

Sobre la forma en que se compone el hueso se identifica una matriz extracelular mineralizada, que se encuentra conformada por contenido orgánico e inorgánico, lo cual le confiere al hueso propiedades de resistencia ante fuerzas mecánicas de tensión y compresión respectivamente y al cizallamiento (Doblaré, 2004).

En lo que respecta a la porción orgánica que conforma un treinta y cinco por ciento, está representada principalmente por las fibras de colágeno tipo I, las cuales se encuentran bien organizadas en el hueso maduro y orientadas paralelamente entre sí, mientras que el resto de componente orgánico está formado por fosfolípidos, factores de crecimiento, glicoproteínas, proteoglucanos y otras proteínas como la osteonectina, la osteocalcina y la fosfatasa, que son liberadas por los osteoblastos para la calcificación (Meyer y Wiesmann, 2006).

En lo referente a la porción inorgánica que conforma un sesenta y cinco por ciento, se distinguen en mayor proporción, sales de fosfato de calcio cristalino en forma de hidroxiapatita (Mescher, 2010).

El contenido de la matriz ósea se complementa con otros elementos como fosfato de calcio amorfo, citrato, bicarbonato, magnesio, fluoruro, potasio, cobre, zinc y sodio; y la presencia de osteoblastos, osteocitos y osteoclastos (Little, 2011).

Células óseas

La generación de hueso es un proceso complejo que requiere la participación coordinada de las células osteoprogenitoras, osteoblastos, osteocitos y osteoclastos (Mescher, 2010).

Los osteoblastos son células mononucleares cuboidales o columnares (cuando se encuentran activas) o aplanadas (al disminuir su actividad), que sintetizan y secretan tanto componente orgánico como inorgánico. Son células pluripotentes que derivan de células osteoprogenitoras influenciadas por el *factor de crecimiento de fibroblastos* (FGF, por sus siglas en inglés), el *factor derivado de plaquetas* (PDGF), las *proteínas morfogenéticas óseas* (BMPs) y el *factor de crecimiento transformador β* (TGF- β). Pueden diferenciarse hasta osteoblastos, fibroblastos o condroblastos descendientes de las células osteoprogenitoras. Se trata de células completamente diferenciadas que son responsables de la producción de los elementos que constituyen la matriz ósea que posteriormente se calcifica en presencia de iones calcio y fosfato para dar origen a los cristales de hidroxiapatita (Andrades *et al.*, 2013), no sólo son responsables de formar y mineralizar hueso, sino que también de generar la matriz orgánica ósea de colágeno tipo I, glicoproteínas y proteoglicanos (Little, 2011).

Tanto los osteoblastos como los osteocitos derivan de células madre mesenquimales (Matsuo, 2008). Los osteocitos, representan aproximadamente el noventa y cinco por ciento en el tejido óseo maduro (Oranger *et al.*, 2014). Estas células derivan de los osteoblastos; son osteoblastos maduros rodeados por matriz de colágena mineralizada (Shapiro, 2008) que se alojan en cavidades o espacios lagunares entre las delgadas laminillas concéntricas de la matriz ósea. Los osteocitos tienen prolongaciones citoplasmáticas que se irradian desde el cuerpo celular y pasan a través de canalículos para unirse con los procesos

citoplasmáticos de otros osteocitos vecinos, mediante uniones comunicantes “*gap junctions*” (Oranger *et al.*, 2014).

Los osteocitos se han identificado como los principales reguladores de la homeostasis, la formación de hueso y el mantenimiento de la matriz (Chen, 2013). Esta función la desempeñan debido a la microvasculatura de los canales centrales de las osteonas y a los canalículos cilíndricos que interconectan a los espacios lagunares, lo cual permite el flujo de nutrientes. Asimismo, se les ha asociado como células que detectan las fuerzas mecánicas que inciden sobre la estructura ósea, por lo que se les ha identificado como mecanosensores que participan en la remodelación ósea (Oranger *et al.*, 2014).

Finalmente, por lo que respecta a los osteoclastos, estas células grandes multinucleadas (formadas debido a la combinación de varias células), proceden de células madre hematopoyéticas (Matsuo, 2008).

Componentes del hueso

Esencialmente, el hueso es considerado como un órgano y un tejido bien vascularizado integrado por una matriz, células, agua y minerales. Estos componentes pueden ser clasificados dentro de dos grupos: el componente orgánico que corresponde en un treinta y cinco por ciento representado por fibras de colágeno tipo I y la sustancia fundamental constituida por proteoglicanos, osteonectina, osteocalcina y fosfatasa alcalina. El componente inorgánico corresponde a un sesenta y cinco por ciento predominantemente de hidroxiapatita de calcio y otros minerales como magnesio, potasio y sodio (Shapiro, 2008). Retomando la conformación ósea externa y sus propiedades mecánicas inherentes a dicha conformación, el hueso presenta algunas variantes anatómicas macroscópicas y microscópicas descritas a continuación.

Formación de hueso

La osteogénesis se lleva a cabo mediante dos etapas: osteogénesis primaria y osteogénesis secundaria. La primera sucede cuando se forma el hueso por primera vez; o bien, cuando se reparan las fracturas. Este hueso inmaduro y esponjoso se reemplazará posteriormente por hueso secundario, a través de osificación endocondral o intramembranosa que servirá como molde para la formación de hueso primario con la presencia de vesículas de matriz extracelular, a las que se ha vinculado con la mineralización (Bonucci, 1992).

En la osteogénesis secundaria el hueso reticular sufre remodelación y se forma hueso laminar que se encuentra organizado en unidades denominadas osteonas y un sistema de canales haversianos dependiente de factores internos como: la vascularización, el oxígeno, el *pH* del ambiente y las fuerzas externas, cuya incidencia puede alterar la formación del callo óseo. (Bonucci, 1992).

Dentro de los mecanismos del desarrollo del hueso se describen dos tipos (Shapiro, 2008): 1) intramembranosa y 2) endocondral. El hueso intramembranoso se produce a partir de la diferenciación de los osteoblastos del mesénquima, sin formación previa de un molde cartilaginoso. En el hueso intramembranoso las células mesenquimales se diferencian de preosteoblastos a osteoblastos y secretan osteoide (hueso inmaduro), los fibroblastos se convierten en osteoblastos y forman hueso dentro de tejido conectivo fibroso. La osificación membranosa es propia de los huesos planos, se le llama así por la formación de pequeñas condensaciones de mesénquima embrionario. En el interior de estas condensaciones se producen centros de osificación, en los que las células mesenquimales se diferencian en células osteoprogenitoras que forman capas de osteoblastos, que secretan a su vez material osteoide que forma las trabéculas óseas reticulares (Lieberman y Friedlaender, 2005).

En tanto, en la osificación endocondral, las células mesenquimales forman una matriz de cartílago hialino con osteoblastos presentes que producirán material osteoide, esta matriz servirá de molde para su reemplazo por hueso (Lieberman y Friedlaender, 2005).

Mecanotransducción

Los huesos desempeñan una función de soporte para el cuerpo humano, ellos proveen una estructura rígida para la unión muscular que constituye un sistema de palancas que permiten el movimiento corporal (Meyer y Wiesmann, 2006).

Las fuerzas generadas le permiten al tejido óseo adaptarse a ellas a través de un mecanismo de mecanotransducción y de remodelación ósea. La mecanotransducción ósea es la conversión de una fuerza física que estimula a una respuesta celular (Meyer *et al.*, 1997).

La mecanotransducción consiste en 4 etapas: *acoplamiento mecánico*, *acoplamiento bioquímico*, *transmisión de señales bioquímicas* y *respuesta de células efectoras* (Turner y Pavalko, 1998). El acoplamiento mecánico es la transducción de la fuerza mecánica aplicada al tejido en una señal mecánica percibida por una célula ósea; el acoplamiento bioquímico es la transducción de una señal mecánica local en una cascada de señales bioquímicas que alteran la expresión génica o la activación de proteínas; la transmisión de las señales a partir de células sensores a células efectoras, que de hecho forman o remueven hueso; y la respuesta de células efectoras cuando las cargas son aplicadas sobre el hueso, este empieza a deformarse causando tensiones locales (Meyer y Wiesmann, 2006). Durante este proceso se ha vinculado a los osteoblastos y osteocitos que actúan como sensores del hueso (Meyer *et al.*, 1997).

De esta forma, el hueso tiene la capacidad de adaptarse ante las cargas que inciden sobre él en combinación con el remodelado óseo.

Remodelado óseo

El hueso es un tejido dinámico que constantemente es formado y reabsorbido en respuesta a cambios en las cargas mecánicas que soporta (Sims, 2008). De esta forma, se adapta a su ambiente a través del proceso denominado remodelación. Este proceso consiste en la reabsorción de hueso viejo y la formación de nuevo

hueso realizado por los osteoclastos y osteoblastos, respectivamente (Chen y Schuetz, 2010) e implica la participación de osteoblastos, osteoclastos y osteocitos. Este fenómeno se compone de cuatro fases: 1) activación, 2) resorción, 3) inversión y 4) formación (Sims, 2008). La activación se da cuando el hueso recibe una señal y cambia de estar en reposo a la remodelación; en la resorción, participan los osteoclastos maduros, los cuales se ubican en el sitio de futura resorción que secretan enzimas proteolíticas y resorben el hueso original, formando lagunas de Howship en la unión del osteoclasto a la matriz ósea (esta fase dura siete días); durante la inversión (se lleva a cabo durante cinco a quince días), se envía una señal desde la cavidad de resorción para atraer a esta zona a los osteoblastos progenitores. Durante el remodelado, se forma nuevo hueso sintetizándose primero matriz orgánica y después se mineraliza (Vicente-Rodríguez, 2008).

Durante la osteoformación (se realiza de uno a tres meses) las lagunas de reabsorción se llenan gradualmente de material osteoide producido por los osteoblastos, posteriormente se depositan cristales de hidroxapatita en el osteoide (Vicente-Rodríguez, 2008).

A pesar de que el hueso sufre constantes alteraciones, tiene la propiedad de remodelarse ante la incidencia de fuerzas que actúan sobre él, modificando su estructura; esto es, sufre una adaptación ante el estrés mecánico (Price *et al.*, 2011). Este proceso se ha vinculado a la capacidad de las células de percibir estímulos mecánicos y responder a través de la generación de señales intracelulares, liberación de sustancias químicas y reclutamiento celular mediante la mecanotransducción. Se cree que en este fenómeno participan principalmente los osteocitos (Bonewald, 2008), ya que se ha observado que debido a su ubicación en la matriz ósea se encuentran expuestos a tensión, cizallamiento y cambio de presión (Thompson, 2012).

El hueso es un tejido dinámico que bajo condiciones normales se remodela entre el cinco al diez por ciento al año durante toda la vida a través de los procesos de

formación de la matriz osteoide y relleno de la cavidad creada; y reabsorción de los osteoclastos (Fernández-Tresguerres, 2006).

La remodelación implica el depósito y resorción de hueso tanto de periostio como del endostio. Durante este proceso los osteoclastos resorben al hueso, mientras los osteoblastos se encargan de formar una nueva matriz ósea. Estos procesos aparecen ahora como relevantes para que la remodelación, regeneración y reparación sucedan (De Long, 2007). La remodelación se observa a lo largo del tiempo, se da de manera equilibrada hasta la tercera década de vida. Posteriormente aproximadamente a los cincuenta años se establece un desequilibrio de este proceso, el cual se caracteriza por un predominio del fenómeno de reabsorción y una disminución en la formación ósea y en consecuencia, una reducción de densidad ósea (Fernández-Tresguerres, 2006).

Biomarcadores del remodelamiento óseo

El proceso de remodelamiento es un fenómeno donde participan; por un lado, los osteoclastos, que generan resorción y; por otro lado, los osteoblastos que forman nuevo hueso (Chen y Schuetz, 2010).

Hasta antes de la vida adulta se lleva a cabo de una manera balanceada. Sin embargo, se ha observado que durante la vida adulta aproximadamente un 25% de hueso esponjoso se remodela anualmente, comparado con un tres por ciento de resorción en hueso cortical. Este proceso ocurre en las unidades de remodelado óseo (Watts, 1999). Las sustancias que promueven el remodelado óseo, entre otras, pueden ser identificadas como biomarcadores. Un biomarcador es una medición objetiva que actúa como un indicador de procesos biológicos normales o procesos patológicos que puede ser medido en fluidos biológicos a través de la sangre y orina (Brown *et al*, 2014.).

Un tejido susceptible de ser monitoreado mediante el empleo de estos marcadores bioquímicos es el tejido óseo. Estos biomarcadores óseos, son indicadores a menudo de origen proteico y ellos permiten determinar los procesos que suceden

durante el metabolismo óseo normal, comprender las alteraciones en los procesos patológicos, o bien, los cambios observados como respuesta a la administración de algún fármaco (Downing, 2001).

Actualmente, se emplean los diversos biomarcadores en el remodelado óseo a través de los cuales se puede conocer cuándo se lleva a cabo la formación de hueso nuevo (aposisión), así como su pérdida (resorción ósea); lo cual, en su conjunto producen el remodelado óseo (Leeming *et al.*, 2006).

Los marcadores bioquímicos de recambio óseo se basan en la medición de péptidos, enzimas y otras moléculas sintetizadas por los osteoclastos y osteoblastos o de productos de degradación de osteoclastos generados de la matriz ósea, que suelen medirse en la orina o en la sangre (Leeming *et al.*, 2006).

Los biomarcadores del remodelado óseo, de acuerdo a su participación en uno u otro proceso se clasifican en: biomarcadores de formación y biomarcadores de resorción ósea. Con los biomarcadores de formación ósea, se mide la actividad enzimática de los osteoblastos, las proteínas de hueso y fragmentos de los procolágenos liberados durante la formación de hueso (Leeming *et al.*, 2006).

Por otro lado, con los biomarcadores de resorción ósea se pretende medir los productos de degradación del colágeno tipo I y otros componentes que se liberan durante la resorción osteoclástica del hueso (Leeming *et al.*, 2006).

Una de las técnicas empleadas para la cuantificación del remodelamiento óseo es la técnica ELISA o ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (por sus siglas en inglés) que fue desarrollada por Eva Engvall y Peter Perlmann (Engvall & Perlmann, 1971).

Marcadores de formación ósea

Los biomarcadores de formación ósea son derivados de enzimas de la actividad de los osteoblastos, como: la fosfatasa alcalina y la osteocalcina (Eyre, 1997).

Fosfatasa alcalina (FA): Se conocen varias isoformas de esta enzima, de las cuales, de acuerdo a su origen las hepáticas y óseas son las más abundantes. Esta enzima se ha empleado durante muchos años y se ha asociado con la formación osteoide aunque su liberación puede indicar, a su vez, la fase de maduración de la matriz ósea. Puede ser medida en suero mediante electroforesis, desnaturalización por calor, precipitación de lectina, inhibición selectiva e inmunoensayos (Rosalki y Foo, 1984).

Osteocalcina (OC): La osteocalcina conocida también como proteína Gla ósea (*gammacarboxyglutamic acid*) es una proteína pequeña, no colágena más abundante en la matriz ósea y sintetizada por los osteoblastos maduros, que ha sido vinculada a la fase tardía de formación ósea, fue descubierta por Hauschka y colaboradores en 1975 (Hauschka, 1975). Es eliminada desde el plasma principalmente por el riñón y puede ser medida en el suero a través de técnicas de radioinmunoensayo o ELISA (Price, 1980).

Marcadores de resorción

Hidroxirolina. Es un aminoácido encontrado en el colágeno maduro. Cuando se incrementa el remodelado óseo, aumenta el nivel de esta proteína. Sin embargo, no es fácil de realizar ni muy confiable debido a las variaciones en sus niveles que presenta diariamente por la dieta (Bettica *et al.*, 1992).

Sialoproteína ósea (BSP). Es una proteína no colágena adherida a la matriz extracelular ósea, es a su vez, una de las más abundantes. Se adhiere a la matriz extracelular y se puede detectar mediante la realización de inmunoensayo o una prueba ELISA (Leeming *et al.*, 2006). *Fosfatasa ácida tartrato-resistente*. De esta enzima, actualmente se han identificado 6 isoenzimas, de las cuales, sobresale la número 5 que resiste a la inhibición por tartrato. Es una enzima lisosomal del osteoclasto que se asocia con la degradación de la matriz ósea. No obstante, ha sido cuestionada su utilidad como indicador de la actividad osteoclástica (Bollerslev, 1993).

Una vez revisado lo referente al empleo de los biomarcadores, resulta pertinente describir los procesos relacionados con la reparación y cicatrización del tejido óseo.

Reparación ósea

Ante la lesión provocada en el hueso se desencadena una serie de eventos en los que se describe la destrucción de la matriz ósea y sus elementos (periostio y endostio), causando una lesión en los vasos sanguíneos que generan un coágulo sanguíneo y en los demás tejidos circundantes. De esta forma, se interrumpe la circulación sanguínea pero se forman nuevas vías limitadas a la forma de la médula ósea y llegan hasta este sitio macrófagos y fibroblastos liberados por el periostio y endostio. Aparecen los fibroblastos que forman tejido conectivo fibroso, los macrófagos; eliminan el coágulo sanguíneo que pueblan este lugar y producen a su vez el tejido de granulación del sitio afectado (Gartner y Hiatt, 2012).

La presencia de un hematoma se origina posteriormente como respuesta a la lesión que envuelve al sitio afectado, a través del cual se transportan elementos que aportan sustancias formadoras del coágulo sanguíneo que taponan la herida (en caso de fractura) para evitar una hemorragia y evita la pérdida de elementos celulares necesarios para la hemostasia. La formación del coágulo es necesaria durante la etapa de la reparación del daño, aunque posteriormente es eliminado por los macrófagos y neutrófilos para dar oportunidad de que se forme tejido de granulación. Estas células se encargan de fagocitar tejido muerto y bacterias, al tiempo que secretan factores de crecimiento y citocinas, finalmente los neutrófilos mueren y son eliminados por los macrófagos (Gartner y Hiatt, 2012).

La reparación ósea implica la formación y remodelación ósea (Little, 2011). Este proceso involucra la participación de las células que poblarán el sitio de la lesión. Estos mecanismos son indispensables para el conocimiento de la regeneración ósea (Little, 2011).

Regeneración ósea

El hueso está expuesto a situaciones que pueden afectar su integridad. Sin embargo, ante un trauma tiene la capacidad de promover su propia regeneración y reparación. La regeneración se caracteriza por la remodelación ósea de la osteona sin formación previa de tejido cartilaginoso. La regeneración ósea es un mecanismo fisiológico que se observa en la cicatrización de fracturas y durante la vida adulta (Andrades *et al.*, 2013). Sin embargo, pese a esto, aunque el hueso sufre remodelación, puede verse afectado de manera temporal o permanente debido a traumas, infecciones, tumores o enfermedades de etiología genética. Tal es el caso del esqueleto facial, que puede verse afectado por una variedad de factores como: trauma, infección, quistes, neoplasmas, defectos congénitos, deformidades del desarrollo, enfermedad periodontal, extracción dental, atrofia y pérdida de hueso en desdentados (Vukicevic y Sampath, 2008).

Fractura y reparación

De acuerdo a Westerman y colaboradores, la reparación de una fractura depende de algunos factores como: el aporte sanguíneo, de la cantidad de fuerza que produjo la fractura y de la condición de los tejidos blandos. Dicha reparación se lleva a cabo en tres fases: la fase reactiva, la fase reparativa y la fase de reparación (Westerman, 2012).

1) Fase reactiva

Inflamación y formación de hematoma. En la fase reactiva se produce inflamación y formación de un hematoma como respuesta al daño se produce un hematoma por el sangrado del hueso y los tejidos blandos que lo rodean, posteriormente aparece un coágulo de fibrina insoluble para evitar detener el sangrado, este coágulo proporciona un marco de fibras que favorece la migración de neutrófilos, linfocitos, monocitos, macrófagos, mastocitos y plaquetas que liberan citocinas, factores de crecimiento, interleucinas 1 y 6. Asimismo, los mastocitos y las plaquetas liberan histamina que aumenta la permeabilidad capilar, quimiotaxis y la dilatación de vasos pequeños (Westerman, 2012).

Formación de tejido de granulación. La fractura inicial tiene un significativo movimiento interfragmentario, lo cual produce una deformación interfragmentaria. El tejido de granulación se forma en condiciones de alta deformación (por encima del cien por ciento), mientras el hueso no puede formarse en esta área, como los osteoblastos solo toleran una deformación muy baja (menor al uno por ciento), el tejido de granulación madura y reduce la deformación a través del sitio de fractura. Los osteoclastos, por su parte, comienzan a reabsorber los extremos del hueso muerto mientras los fagocitos eliminan el otro tejido necrótico (Westerman, 2012).

2) Fase Reparativa.

Formación de callo cartilaginoso. Se llena el sitio de la fractura dentro de dos semanas con puentes de callo cartilaginoso, una vez que la tensión interfragmentaria cae por debajo de diez por ciento. Si los extremos de los huesos no se tocan, se formarán puentes de callo. El colágeno de tipo II se produce temprano en la curación de fracturas dentro de la matriz del cartílago y es seguido por la expresión de colágeno tipo I como hueso nuevo (Westerman, 2012).

El micromovimiento cíclico estimula el crecimiento de cartílago y luego el hueso. El tamaño óptimo de estos movimientos es de aproximadamente un milímetro. Conforme el callo crece en tamaño, se hace más rígido y facilita la osteogénesis (Westerman, 2012).

Generalmente, la cantidad de callo formado es inversamente proporcional a la estabilidad de la fractura. Sin embargo, las fracturas muy inestables no se unirán, como la tensión es demasiado grande, la osificación falla y sólo puede ocurrir una unión fibrosa (Westerman, 2012).

Hueso reticular. La osificación endocondral es el proceso de mineralización del callo cartilaginoso (visible en la radiografía), la conversión a tejido óseo una vez que la deformación cae por debajo del uno por ciento. Los condrocitos se hipertrofian, se calcifican y mueren, lo que permite que se

produzca la angiogénesis. Los osteoblastos se fijan al tejido óseo en este marco de colágeno dejada por los condrocitos. Los micromovimientos cíclicos estimulan el crecimiento del callo (Westerman, 2012).

3) Fase de remodelación.

Hueso trabecular. Una vez que la fractura ha sido puenteadada por un callo, el hueso recién formado se remodela. Cualquier exceso de callo se elimina y el tejido de hueso “osteoides” es remodelado en el hueso trabecular “lamelar”. El canal medular y la forma del hueso son posteriormente restaurados. La remodelación continúa mucho después de que la fractura se haya sanado clínicamente (Westerman, 2012).

Gradualmente se coloca hueso adicional en áreas de estrés mecánico y es removido de las zonas donde hay muy poco. Esta remodelación, que es en realidad una extensión de recambio óseo normal, se conoce como la ley de Wolff, la cual se refiere a que la forma adoptada por el hueso está determinada a la función que este realiza, a través de un mecanismo de remodelación ósea que se produce por las fuerzas que inciden sobre su superficie (Wolff, 2012). De este modo, esta técnica promueve la producción ósea entre las superficies óseas vasculares, separadas por una distracción gradual de un milímetro por día de acuerdo a la técnica de Ilizarov (Ilizarov, 1989).

Durante la distracción ósea se provoca una fractura gradual. La reparación de dicha fractura involucra la actividad osteogénica de los fibroblastos del periostio para la formación de fibrocartílago. En una fractura, sucede una irrupción de los vasos sanguíneos, lo cual genera una hemorragia o hematoma. Los macrófagos realizan la función de eliminar el coágulo con otros restos de tejido dañado. Debido a la proliferación celular en el sitio de la fractura, se produce un callo fibrocartilaginoso, que cubre los extremos del hueso fracturado. Este callo es sustituido paulatinamente por material resistente creado a partir de una combinación de osificación endocondral e intramebranosa que posteriormente se

calcificará hasta un callo óseo. Éste se remodelará con la actividad del paciente, de esta forma, el hueso inmaduro será sustituido por hueso laminar (Gartner y Hiatt, 2012).

La distracción ósea es un proceso dependiente de neoformación vascular en la que deben establecerse redes tridimensionales de nuevos vasos sanguíneos, para lograr la permanencia del tejido nuevo producido, a través de la provisión de nutrientes, inmunidad celular y restos de tejidos (Jain, 1998). Este hecho, implica un intercambio de nutrientes y metabolitos que permitan el progreso adecuado de un injerto, así como, la comunicación con el andamio y las células involucradas (Choi *et al.*, 2000).

En este contexto del campo de la distracción ósea guiada se emplean con cierta frecuencia: injertos óseos autógenos, aloinjertos, xenoinjertos, membranas de barreras, factores de crecimiento y plasma rico en plaquetas (Esposito *et al.*, 2009), entre otros, así como técnicas para corregir discrepancias verticales y horizontales y levantamiento de seno (Tonetti *et al.*, 2008).

Injertos óseos

La utilización de un injerto como alternativa para promover la regeneración y reparación ósea surge a partir de la capacidad que el hueso tiene sobre la regeneración y reparación. Un injerto es un material que promueve la cicatrización ósea sólo o combinado con otros materiales (Elsalanty y Genecov, 2009) que se colocan en un sitio específico para rellenar un espacio de hueso perdido, el cual, requiere un procedimiento quirúrgico. Este puede ser natural o sintético, de la misma especie pero de diferente persona (alogénico), del mismo individuo (autólogo) o de diferente (heterólogo), cortical, esponjoso o una combinación de ambos. Los autoinjertos son descritos por algunos autores como los ideales, debido a que no promueven una respuesta inmunológica y se reducen los riesgos de adquisición de infecciones (Hipp y Atala, 2004). Los autoinjertos en general son más rápidamente integrados en el huésped que los aloinjertos. Sin embargo,

debido a la falta de autoinjerto insuficiente y a la morbilidad latente, se han utilizado aloinjertos (Chapman, 1989).

La función desempeñada por los injertos óseos tiene relación con la osteogénesis y el soporte. La incorporación del injerto óseo depende de la activación orquestada de numerosos factores de crecimiento y citocinas en el organismo receptor y el injerto (Chappuis *et al.*, 2012). De ahí que un injerto ideal deba cumplir algunas características para su elección. En este sentido, el injerto debe ser osteoconductor, osteoinductor y osteogénico (Chappuis *et al.*, 2012).

El término *osteoconductor* se refiere a la capacidad del injerto de proveer una matriz donde se puedan adherir las células formadoras de hueso; *osteoinducción*, es promover la mitogénesis de células indiferenciadas para que se transformen en células osteoprogenitoras para la formación de nuevo hueso. Entre las sustancias osteoinductivas conocidas se encuentran: la *matriz ósea desmineralizada* (DBM), las *proteínas morfogenéticas óseas* (Reddi, 1998) (BMPs) y el *plasma rico en plaquetas* (PRP) (Maddox *et al.*, 2000; Reddi, 1998; Thorwarth, 2006).

Finalmente, la osteogénesis es la habilidad de producir hueso a partir de las células precursoras formadoras de hueso (Tal, 2012). El hueso es uno de los pocos tejidos que poseen la capacidad de regenerarse. Sin embargo, en ciertos casos, es incapaz de repararse ante estímulos dañinos. Ante tal circunstancia, se puede recurrir al empleo de sustancias que inicien y modulen la reparación de heridas en tejidos blandos y duros, que le permitan a este tejido funcionar de una manera óptima a través de los denominados factores de crecimiento (Eppley *et al.*, 2004).

Los procesos de reparación implican una serie de eventos moleculares, bioquímicos y celulares, que se pueden agrupar en tres fases: inflamación, proliferación y remodelación.

Inflamación

La inflamación es una respuesta innata que permite la regeneración y surge ante un daño tisular u orgánico. Es considerada como un fenómeno biológico de defensa del cuerpo humano ante alguna invasión microbiana (infección) o lesión inducida por agentes físicos o químicos. En tanto se da esta fase (de uno a cuatro días), aparecen de manera simultánea algunos mediadores químicos que han sido identificados durante la respuesta al daño tisular como la histamina, serotonina, quinina, el sistema del complemento, enzimas y óxido nítrico. También se han reconocido leucocitos en los que abundan neutrófilos, eosinófilos, basófilos, macrófagos y monocitos, que realizan acciones en contra de agentes patógenos desde su adhesión a las paredes vasculares, hasta su digestión (Lieberman y Friedlaender, 2005).

Para llevar a cabo este proceso, el papel que desempeñan las plaquetas es fundamental al estimular la dilatación de vasos sanguíneos y posteriormente las células endoteliales se encargan de producir un fenómeno opuesto, la vasoconstricción. Las plaquetas son células sanguíneas que favorecen la homeostasia a través de la producción de un coágulo de fibrina o trombo, que evita la salida de la sangre que circula a través de los vasos sanguíneos (Lieberman y Friedlaender, 2005).

Como será visto más adelante y por ser motivo de este trabajo, serán analizadas ampliamente las funciones inherentes a estos componentes sanguíneos, en la reparación y regeneración tisular ósea.

Proliferación

La proliferación se observa durante el transcurso de cuatro y veintiún días después de la cicatrización, los fibroblastos son estimulados para invadir este sitio y producir componentes de la matriz extracelular (Sivolella *et al.*, 2013).

Cicatrización

Otro fenómeno que surge ante una lesión tisular u orgánica es la cicatrización de las heridas durante la cual se produce inflamación, liberación de mediadores químicos, reclutamiento y migración celular desde el torrente sanguíneo hasta el sitio afectado (Lieberman y Friedlaender, 2005).

La cicatrización se integra de las siguientes fases: hemostasia, diferenciación de células mensequimales, proliferación y migración hacia el sitio de la herida, angiogénesis y remodelación de tejido o resolución. Durante la cicatrización se han identificado diversos compuestos proteicos entre los que destacan los factores de crecimiento y las citocinas. Los factores de crecimiento son producidos y liberados por las plaquetas; por su parte, las citocinas son producidas en linfocitos y monocitos. Algunos de los factores de crecimiento detectados son: el *factor de crecimiento transformativo (TGF-B)*, *factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)*, *factor de crecimiento de fibroblastos* y *factor de crecimiento epidérmico (EGF)*, entre otros (Lieberman y Friedlaender, 2005).

Plasma rico en plaquetas

La sangre es un tejido conjuntivo especializado que tiene un *pH* aproximado de 7,4. Es de consistencia viscosa y está compuesto por proteínas del plasma, células y plaquetas. El plasma es un líquido amarillento que contiene agua, proteínas, factores de coagulación y fibrinógeno (Gartner y Hiatt, 2012).

La composición celular se constituye de eritrocitos, leucocitos y plaquetas. Los eritrocitos proporcionan oxígeno a las células del cuerpo; los leucocitos, previenen de infecciones al cuerpo humano y; las plaquetas, son las células sanguíneas son células anucleadas, grandes, producidas por fragmentos derivados del citoplasma de megacariocitos, tienen un diámetro aproximado de 1-4 micras (Lana *et al.*, 2014). Las plaquetas están constituidas por una membrana y el citoplasma. La membrana consiste en una bicapa de fosfolípidos. En el citoplasma por su parte, existen dos tipos de gránulos secretores: 1) el primer tipo, se trata de gránulos densos que secretan ADP y calcio; el segundo tipo, se refiere a los gránulos α que

secretan proteínas, su número normal es de 150,000 a 350,000/ μ L (George, 2000).

Las plaquetas son las células sanguíneas más pequeñas que sobreviven aproximadamente diez días (George, 2000). Estas contienen actina y miosina, las cuales desempeñan un rol importante durante la hemostasia y participan en la formación de nuevo tejido conectivo y la revascularización (Blockmans, 1995). Miden aproximadamente 3 μ m de diámetro y un micrómetro de espesor. Tienen normalmente una forma de disco, la cual, cambia adoptando un aspecto aplanado con prolongaciones dendríticas cuando se activan.

Obtención del Plasma Rico en Plaquetas

Al extraer sangre y transportarla a un tubo de ensaye, la sangre se coagula a excepción de que contenga un anticoagulante. Al someter a la sangre a fuerzas centrífugas a un determinado tiempo y a una pequeña porción de leucocitos por diferencias de densidades y por la influencia gravitatoria, se sedimentan las partículas cuya densidad es mayor y flotan aquellas que presentan densidades menores (Lana *et al.*, 2014). De esta manera, la sangre se separa en sus componentes principales, es decir, elementos formes o células, que se sedimentan hasta el fondo y presentan una capa transparente que corresponde a la capa de leucocitos, mientras el plasma sobrenada en la parte superior. Una vez que el plasma se ha colocado en un tubo puede ser dividido en tres tercios: 1) el tercio superior que plaquetas contiene en mayor proporción y plasma, 2) el tercio medio que presenta leucocitos apenas perceptibles y 3) el tercio inferior que corresponde a una aglomeración de glóbulos rojos con cantidades de leucocitos y plaquetas (Lana *et al.*, 2014).

La recolección del plasma rico en plaquetas puede llevarse a cabo mediante bolsas de sangre, *kits* desechables y mediante tubos. La obtención del plasma rico en plaquetas se realiza por medio de la bolsa, se extrae una cantidad de sangre en bolsa, se separa el plasma rico en plaquetas y se activa con cloruro de calcio para su empleo. Mediante los *kits* descartables es posible separar del plasma rico

en plaquetas de manera automatizada. Por otro lado, existe el método mediante tubos de vidrio o plástico al vacío que permite la extracción sencilla de una cantidad de sangre (Lana *et al.*, 2014).

Factores de crecimiento

Las plaquetas son células que derivan del citoplasma de megacariocitos y están formados por organelos, túbulos y gránulos. Las plaquetas tienen la capacidad de producir factores de crecimiento (Vinícius y Moraes, 2014). Los factores de crecimiento son sustancias proteicas producidas y liberadas por las plaquetas en la matriz ósea, los cuales desempeñan un importante papel durante los procesos de osteogénesis y remodelado. Son mediadores biológicos que incrementan la atracción química, proliferación y diferenciación celular, regulando los eventos esenciales celulares (Giannobile, 1996).

Los factores de crecimiento facilitan el crecimiento tisular *in vitro* y su reparación *in vivo*. Un factor de crecimiento es un señalador biomolecular que se une a receptores específicos sobre la misma célula que secreta los factores, iniciando una serie de eventos como proliferación celular, diferenciación, maduración, producción de otros factores de crecimiento y de matriz extracelular, que resulta en la producción de tejidos específicos (Andrades *et al.*, 2013).

Los factores de crecimiento pueden ser empleados con frecuencia para realizar un aumento alveolar óseo, previo a la colocación de un implante o la rehabilitación protésica, ante la pérdida ósea debida a periodontitis, quistes, tumores o traumas (Sivolella *et al.*, 2013).

OBJETIVOS

Objetivo General:

Conocer la capacidad de regeneración de tejido óseo adicionando plasma rico en plaquetas para su uso experimental y terapéutico, mediante una revisión bibliográfica.

JUSTIFICACIÓN

El hueso es un tejido dinámico que sufre remodelación a lo largo de la vida. Asimismo, posee la capacidad de regenerarse y repararse ante un daño o adaptarse ante la incidencia de fuerzas que actúan sobre él. Sin embargo, estas propiedades del tejido óseo se ven limitadas ante traumas mecánicos, infecciones, tumores o enfermedades de etiología genética. Estos estados patológicos lo pueden conducir a daños estructurales y funcionales que en ocasiones se producen de manera irreversible.

En lo relativo al área odontológica, se puede observar pérdida ósea debido a enfermedad periodontal, tumores, quistes, ausencia de órganos dentarios, atrofia de rebordes residuales, con las consecuencias que esto conlleva para el paciente. Para enfrentar tales padecimientos, actualmente se dispone de los siguientes procedimientos: 1) ingeniería tisular (Darwish *et al.*, 2014), 2) regeneración ósea guiada (Li *et al.*, 2012) con o sin injertos óseos (Kim *et al.*, 2013), con membranas tisulares (Dahlin, 1991), 3) distracción osteogénica (Maeda *et al.*, 2008); o bien, 4) una combinación de estos procesos (Ferraz *et al.*, 2013), con los cuales se han conseguido resultados satisfactorios.

Alternativamente, en algunos padecimientos se ha optado por la utilización del plasma rico en plaquetas, el cual, es un concentrado autólogo de factores de crecimiento que se han asociado en los procesos de regeneración y crecimiento de tejidos blandos y duros. Esta capacidad, ha hecho pensar que la aplicación del plasma rico en plaquetas en una mayor concentración, podría generar una reparación más rápida, lo cual, redundaría en numerosos beneficios para el paciente: evita transmisión de enfermedades y reacciones inmunológicas (Lana *et al.*, 2014).

Asimismo, es de fácil obtención y contiene factores de crecimiento que participan en los procesos de reparación y regeneración ósea dentoalveolares propiciando un ambiente adecuado para la diferenciación celular y reflejando un beneficio tangible para el paciente al tener un menor tiempo de recuperación, una cicatrización más rápida y fuerte y menor dolor durante la recuperación (Tischler,

2002) (Dugrillonf, 2002) (Weibrich *et al.*, 2002) (Lian *et al.*, 2014) (Wroblewski, 2010).

Por ello, esta revisión contemplará una descripción de investigaciones realizadas sobre el empleo del plasma rico en plaquetas para producir crecimiento y regeneración ósea, para lo cual, resulta pertinente realizar una explicación previa de cómo se dan los procesos relacionados con el metabolismo óseo, así como la reparación del tejido óseo.

MATERIALES

Como objetivo principal se estableció conocer los efectos provocados por el plasma rico en plaquetas estudios *in vitro*, en animales, así como los realizados en seres humanos.

Se realizó la búsqueda de artículos en PUBMED, Cochrane Library y artículos de journals contenidos en Springer, Elsevier y Wiley en un período comprendido desde enero del año 2014 al mes de junio del año 2015.

En los criterios de búsqueda se incluyeron estudios aleatorios comparativos que pretendían conocer los efectos del plasma rico en plaquetas.

Las palabras clave de búsqueda fueron: “*platelet rich plasma*”, “*platelet rich plasma wound heal*”, “*platelet rich plasma used in dentistry*”, “*platelet rich plasma used in maxillofacial surgery*” and “*platelet rich plasma used in periodontology*”.

DISCUSIÓN

El empleo del plasma rico en plaquetas ha sido ampliamente difundido debido a que se ha observado que su utilización podría estimular la formación ósea en el proceso de curación en áreas como la Ortopedia, Odontología, Neurocirugía, y Cirugía Maxilofacial con resultados satisfactorios (Sanchez *et al.*, 2003; Nikolidakis y Jansen, 2008; Griffin, 2009; Gruber *et al.*, 2002; Wroblewski, 2010).

Respecto al área de la cirugía oral, el empleo del plasma rico en plaquetas fue descrita por Whitman y colaboradores (Whitman *et al.*, 1997) y un año más tarde, Marx y colaboradores (Marx *et al.*, 1998).

Dentro del contenido de las investigaciones consultadas se encontraron algunos factores, cuyos autores los consideraron determinantes para el éxito de la regeneración ósea, estos fueron, de acuerdo a Hosseinkhani y colaboradores la presencia de: 1) células, 2) andamios, que promueven la proliferación y diferenciación celular y 3) factores de crecimiento que aceleren la inducción de regeneración ósea (Hosseinkhani *et al.*, 2012) y el empleo de membranas absorbibles en el caso de la combinación de plasma rico en plaquetas con hueso bovino poroso mineral (Camargo *et al.*, 2002).

Otro de los factores clave mencionados para la regeneración ósea, es la neoformación vascular. A este respecto, Rai y colaboradores encontraron una aceleración de este fenómeno a través de sus estudios, al combinar el plasma rico en plaquetas con material poroso sintético (Rai *et al.*, 2007).

Entre los estudios consultados se encontraron algunos que apoyan el uso del plasma rico en plaquetas como el realizado por Camargo y colaboradores (Camargo *et al.*, 2002), quienes realizaron un estudio en el que dieciocho pacientes fueron divididos en dos grupos y tratados quirúrgicamente para corregir defectos óseos causados por periodontitis severa. Un grupo se trató sólo con una membrana absorbible de ácido poliláctico para la regeneración tisular guiada; mientras que en el otro, se empleó plasma rico en plaquetas, mineral óseo poroso bovino y regeneración tisular guiada. En ambos grupos se observó una disminución significativa del defecto óseo. Sin embargo, los pacientes en los se

empleó plasma rico en plaquetas, mineral óseo poroso bovino y regeneración tisular guiada, los resultados fueron estadísticamente más significativos (Camargo *et al.*, 2002), respecto de aquellos donde sólo se le realizó regeneración tisular guiada (Camargo *et al.*, 2002).

En otro estudio y haciendo énfasis principalmente en el uso del autoinjerto por los beneficios que ya han sido descritos anteriormente. Plachokova y colaboradores destacan la capacidad de regeneración ósea del plasma rico en plaquetas combinado con injerto óseo al observar una formación de hueso incrementada debido a una mejor capacidad osteogénica (Plachokova *et al.*, 2009).

Estos reportes son similares a los vertidos por Wiltfang y colaboradores, quienes no obtuvieron los mismos beneficios al mezclar sustituto óseo xenogénico con plasma rico en plaquetas, comparados con el grupo sobre el cual se empleó hueso autógeno (Wiltfang *et al.*, 2004)

Sarkar y colaboradores, por su parte, recomendaron combinar el plasma rico en plaquetas con biomateriales, autoinjertos, células precursoras o factores de crecimiento que sean capaces de producir la osteoinducción; ya que el sólo efecto provocado por el plasma rico en plaquetas es insuficiente en defectos de tamaño crítico con un potencial de regeneración baja (Sarkar *et al.*, 2005). Tal recomendación produjo efectos positivos en las investigaciones realizadas por Fennis y colaboradores en el que mejoraron la reparación ósea en cabras, utilizando plasma rico en plaquetas mezclado con hueso particulado para la reconstrucción mandibular (Fennis *et al.*, 2002).

Por otro lado, se encontraron varios grupos de investigadores (Choi *et al.*, 2004; (Arenaz-Búa *et al.*, 2010; Taschieri *et al.*, 2015; Griffin *et al.*, 2009) que rechazaban el empleo del plasma rico en plaquetas para los fines a los que se ha hecho alusión en este trabajo. Sus fundamentos se deben a que en sus estudios, no obtuvieron resultados significativos que justifiquen su utilización en casos donde se requiera implementar este concentrado autólogo para producir la regeneración ósea. Este grupo sugiere realizar estudios clínicos aleatorios más robustos en

seres humanos para comprobar la efectividad de su utilización. Muestra de ello, es un estudio realizado en perros por Choi y colaboradores en el que mezclaron el plasma rico en plaquetas con hueso autógeno y concluyeron que esto no mejoró la formación de nuevo hueso (Choi *et al.*, 2004).

Por su parte, Arenaz-Búa y colaboradores llevaron a cabo un estudio comparativo del plasma rico en plaquetas, hidroxiapatita, matriz ósea desmineralizada y hueso autógeno con la finalidad de promover la regeneración ósea después de la extracción de un tercer molar mandibular impactado. Adicionalmente, compararon los síntomas postoperatorios. Derivado de sus estudios observaron una mayor aceleración en la formación ósea en el grupo que emplearon hueso autógeno y matriz ósea desmineralizada. No obstante, no encontraron diferencias estadísticamente significativas respecto al dolor, inflamación e infección a lo largo del período posoperatorio (Arenaz-Búa *et al.*, 2010).

Recientemente, Taschieri y colaboradores estudiaron en seis pacientes el efecto del plasma rico en plaquetas solo y combinado, en los que no encontraron diferencias significativas en los dos grupos (Taschieri *et al.*, 2015).

Debido a las controversias generadas en torno al tema del empleo del plasma rico en plaquetas en la reparación de los tejidos y la regeneración de tejido óseo, especialmente, Griffin y colaboradores sugieren, de manera concluyente, realizar estudios clínicos aleatorizados más robustos en seres humanos para comprobar la efectividad de su utilización, ya que no encontraron hallazgos suficientes para apoyar el uso rutinario del plasma rico en plaquetas en la curación del hueso (Griffin *et al.*, 2009).

Asimismo, Albanese y colaboradores realizaron una revisión de la cual comentan que la seguridad que proporciona al huésped y la facilidad con la que se emplean estos preparados podrían ser empleados en los procedimientos quirúrgicos. Sin embargo, opinan sobre este tema con mesura al considerar que la efectividad del plasma rico en plaquetas sigue siendo controversial, de acuerdo a estos

investigadores, esto se debe a la escasez de pruebas controladas aleatorizadas que apoyen los beneficios que se han difundido (Albanese *et al.*, 2013).

En este contexto, en este trabajo se ha demostrado la importancia de las plaquetas tanto en el proceso de la hemostasia como en la regeneración ósea, debido a la capacidad osteoinductiva de los factores de crecimiento que contienen.

Con el empleo del plasma rico en plaquetas no sólo se produciría la aceleración del proceso de curación de las heridas, sino que además, se busca realizar la sustitución de tejidos o la reparación más rápida de estos a través de procedimientos más conservadores y de esta forma contribuir notablemente en beneficios que redunden en la recuperación del paciente.

La utilización del plasma rico en plaquetas en diversos campos de la medicina, incluida el área de la odontología, tiene un fundamento vinculado a su alta concentración de plaquetas y a los factores de crecimiento que ellas contienen. Asimismo, el plasma rico en plaquetas es considerado por algunos autores como preparado muy prometedor y elegible ante diversos procedimientos, ya que al tratarse de un concentrado autólogo no se transmiten enfermedades ni se genera una respuesta inmune al ser aplicado; aunado a ello, su obtención es simple y rápida, lo cual se traduce en una recuperación más rápida del paciente y un tratamiento menos costoso.

CONCLUSIONES

Las virtudes del plasma rico en plaquetas encontradas por diversos autores, han sido obtenidas debido a las investigaciones realizadas en mayor proporción *in vitro*, y en una menor escala, de los estudios experimentados en seres humanos.

Hasta la fecha existe controversia sobre el empleo del plasma rico en plaquetas y carencia de unanimidad en los criterios de selección sobre la técnica que se empleará para la obtención, preparación y aplicación que permita estandarizar estos procesos.

Mientras algunos investigadores alientan el empleo del plasma rico en plaquetas (Camargo *et al.*, 2002; Plachokova *et al.*, 2009; Wiltfang *et al.*, 2004; Sarkar *et al.*, 2005; Fennis *et al.*, 2002) para promover crecimiento y regeneración ósea otros no justifican su uso (Choi *et al.*, 2004; Arenaz-Búa *et al.*, 2010; Taschieri *et al.*, 2015; Griffin *et al.*, 2009).

Se concluye de esta revisión, que existen mayores investigadores que demuestran una aceleración de la regeneración ósea (55.6%) con el empleo del plasma rico en plaquetas sobre aquellos que no justifican su uso al no encontrar un aumento de este proceso en sus estudios (44.4%).

SUGERENCIAS PARA TRABAJOS FUTUROS

Derivado de los resultados de este trabajo se sugiere realizar una revisión más extensa del tema abordado, ya que no se encontró una técnica o método más efectivo durante la obtención y aplicación del plasma rico en plaquetas.

RECOMENDACIONES

Se recomienda la consulta de más revisiones y de mayores estudios aleatorizados en el que se hayan empleado el plasma rico en plaquetas, sólo o combinado con osteoinductores y osteoconductores con la finalidad de provocar una regeneración ósea. Incluso generar un metaanálisis referente al tema.

Asimismo, se recomienda emplear el plasma rico en fibrina con biotina, ya que de acuerdo a algunos investigadores se han obtenido resultados satisfactorios combinado con otras sustancias osteoinductoras.

BIBLIOGRAFÍA

Albanese, A. (2013). Platelet-rich plasma (PRP) in dental and oral surgery: from the wound healing to bone regeneration. *Immunity & Ageing* , 10:23.

Arenaz-Búa, J. (2010). A comparative study of platelet-rich plasma, hydroxyapatite, demineralized bone matrix and autologous bone to promote bone regeneration after mandibular impacted third molar extraction . *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* , 483-9.

Bártolo, P. J., Domingos, M., Patrício, T., Cometa, S., & Mironov, V. (2011). Biofabrication strategies for tissue engineering. In *Advances on Modeling in Tissue Engineering* (pp. 137-176). Springer Netherlands.

Bettica, P., Moro, L., Robins, S. P., Taylor, A. K., Talbot, J., Singer, F. R., & Baylink, D. J. (1992). Bone-resorption markers galactosyl hydroxylysine, pyridinium crosslinks, and hydroxyproline compared. *Clinical chemistry*, 38(11), 2313-2318.

Blockmans, D. (1995). Platelet activation. *Blood Reviews* , 143-156.

Bonucci, E. (1992). *The role of matrix vesicles in calcification*. USA, Boca Raton: CRC Press.

Brown, J. E., Zeng, L., & Wilson, C. (2014). Bone biomarkers in research and clinical practice. In *Bone Metastases* (pp. 95-124). Springer Netherlands.

Buckwalter, J. A., Einhorn, T. A., Bolander, M. E., & Cruess, R. L. (1996). Healing of the musculoskeletal tissues. *Fractures in adults*, 1, 267-83. Citado en: Hu, Y. C. (2014). *Gene Therapy for Cartilage and Bone Tissue Engineering*. Springer Berlin Heidelberg.

Butler, D. (2000). Functional Tissue Engineering: The Role of Biomechanics. *Journal of Biomechanical Engineering* , (6):570-5.

Camargo, P. (2002). Platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral combined with guided tissue regeneration in the treatment of intrabony defects in humans. *J Periodont Res* , 300–306.

Chapman, Y. &. (1989). Morbidity of bone graft donor sites. *J. Orthop. Trauma* , 3(3), 1. 192–195.

Chen, G., Schuetz, M., & Pearcy, M. (2010). Mechanobiology of Bone Development and computational simulations. In *Bone and Development* (pp. 279-295). Springer London.

Choi, B. (2004). Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in autogenous bone graft. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* , 33: 56–59.

Doblaré, M. (2004). Modelling bone tissue fracture and healing: a review. *Engineering Fracture Mechanics* , 1809-1840.

Downing, D. (2001). For the Biomarkers Definitions Working Group, NIH, Bethesda, MD, USA, Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clin. Pharmacol. Ther.* , 89-95.

Dusse *et al*, L. M. (2008). Platelet Rich Plasma and its application in dentistry. *Rev. bras. anal. clin* , 193-197.

Engvall, E., & Perlmann, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Quantitative assay of immunoglobulin G. Immunochemistry*, 871–4.

Eyre, D. R. (1997). Bone biomarkers as tools in osteoporosis management. *Spine*, 22(24), 17S-24S.

Faustman, D. (2002). Cells for repair. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* , 45-7.

Felicity, R. R., & Oreffo, R. O. (2002). Bone Tissue Engineering: Hope vs Hype. *Biochemical and Biophysical Research Communications* , 1-7.

Fennis, J. (2002). Mandibular reconstruction: A clinical and radiographic animal study on the use of autogenous scaffolds and platelet-rich plasma. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* , 31: 281–286.

Germain L, Goulet F, Moulin V, Berthod F, Auger F A., Engineering human tissues for in vivo applications; *Ann N Y Acad Sci*, 2002;961, 268-70

Griffin, X. (2009). The clinical use of platelet-rich plasma in the promotion of bone healing: A systematic review. *Injury, Int. J. Care Injured* , 158–162.

Hauschka, P. V., Lian, J. B., & Gallop, P. M. (1975). Direct identification of the calcium-binding amino acid, gamma-carboxyglutamate, in mineralized tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 72(10), 3925-3929.

Insel, P. (2011). *Nutrition* (Quinta edición ed.). United States of America.

Khurana, J. S., McCarthy, E. F., & Zhang, P. J. (2010). *Essentials in bone and soft-tissue pathology*. Springer Science & Business Media.

Lana, J. F. S. D., Santana, M. H. A., Belangero, W. D., & Luzo, A. C. M. (2013). *Platelet-Rich Plasma: Regenerative Medicine: Sports Medicine, Orthopedic, and Recovery of Musculoskeletal Injuries*. Springer Science & Business Media.

Langer, R., & Vacanti, J. P. (1993). Tissue engineering. *Science* , 920–926.

Lee, J. Y., Nam, H., Park, Y. J., Lee, S. J., Chung, C. P., Han, S. B., & Lee, G. (2011). The effects of platelet-rich plasma derived from human umbilical cord blood on the osteogenic differentiation of human dental stem cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 47(2), 157-164.

Leeming, D. J., Alexandersen, P., Karsdal, M. A., Qvist, P., Schaller, S., & Tanko, L. B. (2006). An update on biomarkers of bone turnover and their utility in biomedical research and clinical practice. *European journal of clinical pharmacology*, 62(10), 781-792.

Lieberman, J. R., & Friedlaender, G. E. (2005). Bone regeneration and repair. Humana Press Totowa, NJ.

Little, N. (2011). Bone formation, remodelling and healing. *Surgery (Oxford)* , 141-145.

Logeart-Avramoglou. (2005). Engineering Bone: Challenges and Obstacles. *J Cell Mol Med* , 72-84.

Maddox *et al.*, E. (2000). Optimizing Human Demineralized Bone Matrix for Clinical Application. *Tissue Eng* , 441-8.

Marx, R. E., Carlson, E. R., Eichstaedt, R. M., Schimmele, S. R., Strauss, J. E., & Georgeff, K. R. (1998). Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 85(6), 638-646.

Masaaki TAKAHASHI, e. a. (1997). Investigation of the performance of ELISA for N-terminal midfragment of osteocalcin. *J Bone Miner Metab* , 132-137.

Mescher, A. L. (2010). *Junqueira's basic histology: text & atlas* (Vol. 12). New York: McGraw-Hill Medical.

Penny Blackwell, I. M. (2007). Biochemical Markers of Bone Turnover. En M. C. Pearson Derek, *Clinical Trials in Osteoporosis* (págs. 247-262). London, UK: Springer.

Plachokova, A. (2009). Bone regenerative properties of rat, goat and human platelet-rich plasma. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* , 38: 861-869.

Pörtner R, (2005). Bioreactor Design for Tissue Engineering. *Journal of Bioscience and Bioengineering* , 100(3):235-45.

Pramanik, S. (2012). Progress of key strategies in development of electrospun scaffolds: bone tissue. *Science and Technology of Advanced Materials* , 13 (4), 043002.

Price PA, N. S. (1980). Radioimmunoassay for the vitamin K-dependent protein of bone and its discovery in plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* , 2234-2238.

Rai, B. (2007). Combination of platelet-rich plasma with polycaprolactone-tricalcium phosphate scaffolds for segmental bone defect repair. *J Biomed Mater Res* , 888–899.

Rosalki, S. B., & Foo, A. Y. (1984). Two new methods for separating and quantifying bone and liver alkaline phosphatase isoenzymes in plasma. *Clinical chemistry*, 30(7), 1182-1186.

Sánchez, A. R., Sheridan, P. J., & Kupp, L. I. (2002). Is platelet-rich plasma the perfect enhancement factor? A current review. *The International journal of oral & maxillofacial implants*, 18(1), 93-103.

Santo, V. E., Gomes, M. E., Mano, J. F., & Reis, R. L. (2013). Controlled release strategies for bone, cartilage, and osteochondral engineering—part I: recapitulation of native tissue healing and variables for the design of delivery systems. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 19(4), 308-326. Citado en Hu, Y. C. (2014). *Gene Therapy for Cartilage and Bone Tissue Engineering*. Springer Berlin Heidelberg.

Sarkar, M. (2005). Bone formation in a long bone defect model using a platelet-rich plasma-loaded collagen scaffold. *Biomaterials* , 1817–1823.

Stern, A. R., & Nicoletta, D. P. (2013). Measurement and estimation of osteocyte mechanical strain. *Bone*, 54(2), 191-195.

Takechi, R. e. (2008). Biotin Deficiency Affects the Proliferation of Human Embryonic Palatal Mesenchymal Cells in Culture. *The Journal of Nutrition Biochemical, Molecular, and Genetic Mechanisms* , 138: 680–684.

Taschieri, S. (2015). Platelet-Rich Plasma and Deproteinized Bovine Bone Matrix in Maxillary Sinus Lift Surgery: A Split-Mouth Histomorphometric Evaluation. *Implant Dent*.

Tischler, M. (2002). Platelet Rich Plasma - Utilizing autologous growth factors for dental surgery to enhance bone and soft tissue grafts. *Dental Journal* .

Tissue engineering: current state and prospects2001 *Annu Rev Med* 443-451

Tissue engineering: state of the art in oral rehabilitation 2009 *Journal of Oral Rehabilitation* 368–389

Turner, & Pavalko. (1998). Mechanotransduction and functional response of the skeleton to physical stress: The mechanisms and mechanics of bone adaptation. *Journal of Orthopaedic Science* , 3, 346-355.

Vinícius y Moraes. (2014). Platelet-rich therapies for musculoskeletal soft tissue injuries. *Cochrane Database of Systematic Reviews* , 1.

Vukicevic, S., & Sampath, K. (Eds.). (2008). *Bone morphogenetic proteins: from local to systemic therapeutics*. Springer Science & Business Media.

Watts, N. (1999). Clinical utility of biochemical markers of bone remodeling. *Clin Chem* , 45:1359-1368.

Wiltfang, J. (2004). Effects of platelet-rich plasma on bone healing in combination with autogenous bone and bone substitutes in critical-size defects An animal experiment. *Clin. Oral Impl. Res.* , 187–193.

Wolff, J. (2012). *The law of bone remodelling*. Springer Science & Business Media.

Wroblewski, A. (2010). Application of Platelet-Rich Plasma to Enhance Tissue Repair. *Operative Techniques in Orthopaedics*, 20:98-105.

