

TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN

Reparación tendinosa con la utilización de plasma rico en plaquetas

Estudio experimental en conejos

*MARCELO RÍO, *GUILLERMO GOTTER CAMPO, ARIEL BARRERA ORO,
**EDUARDO SANTINI ARAUJO y **RÓMULO CABRINI

**Servicio de Trauma Ortopédico, **Servicio de Anatomía Patológica
Hospital Militar Central Cir My Dr. Cosme Argerich*

RESUMEN

Introducción: Si bien se conoce bastante la actividad de los factores de crecimiento, sobre todo del factor de crecimiento derivado de las plaquetas in vitro, la información de su actividad en modelos experimentales in vivo es limitada. El objetivo del presente trabajo es crear un modelo para estimar la eficacia del plasma rico en plaquetas en la cicatrización del tendón de Aquiles de conejo.

Materiales y métodos: Se utilizaron 12 conejos de raza neozelandesa esqueléticamente maduros. Se realizó un abordaje posterior sobre la zona medial del tendón de Aquiles y sección quirúrgica a 1 cm de su inserción distal. Del lado izquierdo se efectuó la sección quirúrgica del tendón y sutura terminoterminal, y del lado derecho, sección del tendón, sutura terminoterminal y colocación de plasma rico en plaquetas.

Resultados: No se observaron diferencias significativas entre ambos grupos en la evaluación macroscópica, con resonancia magnética, histológica y de tensión con Instron 4487.

Conclusiones: Estos datos experimentales no apoyarían la utilización del plasma rico en plaquetas en las lesiones tendinosas de los seres humanos.

PALABRAS CLAVE: Factores de crecimiento. Plasma rico en plaquetas. Lesión tendinosa.

ACHILLES TENDON REPAIR USING PLATELET RICH PLASMA. AN EXPERIMENTAL STUDY IN RABBITS

Recibido el 30-10-2006. Aceptado luego de la evaluación el 04-09-2007.
Correspondencia:

Dr. MARCELO RÍO
marcelowrio@yahoo.com.ar

ABSTRACT

Background: Although sufficient information exists about growth factors' activity, especially platelet derived growth factor (PDGF) in vitro, the information about in vivo activity is limited. The purpose of this experimental study is to create a model to estimate PRP activity in Achilles tendon healing in rabbits.

Methods: We used 12 skeletically mature New Zealand rabbits. Through a posterior approach, we cut the tendon, then sutured it end-to-end on the left side while on the right side the same procedure was performed adding PRP.

Results: No significant difference was noted between both groups in the macroscopic assessment with MRI, histology and tension evaluations.

Conclusions: This experimental data does not support the use of PRP in tendon injuries in humans.

KEY WORDS: Growth factors. Platelet rich plasma. Tendon injuries.

Se denominan factores de crecimiento a un grupo de polipéptidos que intervienen en la proliferación celular, diferenciación y morfogénesis de los tejidos durante el desarrollo embrionario, el crecimiento posnatal y la edad adulta, los cuales pueden actuar favoreciendo la proliferación de ciertos tipos celulares.

El mecanismo de acción puede ser autocrino, en el que el factor de crecimiento influye en células de fenotipo similar a las que secretan los factores; paracrino, cuando afecta a células circundantes de distinto fenotipo de las que secretan los factores; y endocrino, que afecta a células de distinto fenotipo y de ubicación anatómica alejada.

En los últimos años, se han estudiado y comercializado los factores de crecimiento que están involucrados en la regeneración y formación de tejido óseo,^{2,14,16} aunque su utilización en tejidos de las partes blandas no alcanzó el mismo desarrollo experimental y los resultados son contradictorios.

A partir del plasma rico en plaquetas (PRP), que se obtiene del centrifugado de sangre y presenta alta concentración de plaquetas, se pueden obtener los siguientes factores de crecimiento: factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), factor de crecimiento beta (TGF β) y factor de crecimiento derivado de la insulina (IGF).

Estos factores tendrían actividad en la regeneración de tejidos disminuyendo el tiempo de curación, aumentarían su resistencia al estiramiento¹⁴ y favorecerían la angiogénesis, ya que incrementan la migración de células endoteliales a zonas lesionadas.¹⁰

Si bien el conocimiento sobre la actividad de los factores de crecimiento, sobre todo del PDGF in vitro es considerable, la información de su actividad en modelos experimentales in vivo es limitada.

Nuestra hipótesis de trabajo es que el plasma rico en plaquetas debido a su concentración de factores de crecimiento podría favorecer la mitogénesis y la angiogénesis, y disminuir los tiempos de curación en lesiones tendinosas, además de mejorar las propiedades biomecánicas del tendón.

El objetivo del presente trabajo es crear un modelo para estimar la eficacia del PRP en la cicatrización del tendón de Aquiles de conejo.

Materiales y métodos

El protocolo de trabajo fue aprobado por el Comité de Evaluación para Experimentación en Animales, del Bioterio de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad de Buenos Aires.

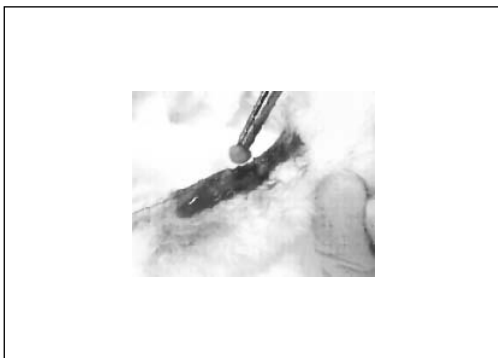


Figura 1. Del lado derecho se realizó sección quirúrgica del tendón, sutura terminoterminal, similar al lado control y colocación de plasma rico en plaquetas (grupo experimental).

Modelo animal

Se utilizaron 12 conejos machos y hembras de raza neozelandesa esqueléticamente maduros, que al comienzo de la experiencia pesaban entre 2 y 2,5 kg. Todos los animales fueron obtenidos de un criadero con certificación de calidad sanitaria otorgada por SENASA.

Los animales fueron alojados en un sistema convencional de bastidores de acero inoxidable para conejos con piso de reja y bandeja con viruta de madera blanca como material de lecho. En el período posquirúrgico, se retiró el piso de reja de los bastidores para que los conejos tomaran contacto directo con el material de lecho y facilitar así la locomoción.¹

El alojamiento durante toda la experiencia se realizó en salas donde los valores de temperatura promediaban 20-22 °C, mientras que los valores de humedad relativa ambiente promediaron 50-60%, la fase de luz-noche fue de 12 horas y se realizaron 15 cambios de aire por hora. La alimentación fue ad libitum.

Procedimiento quirúrgico

Los animales fueron anestesiados utilizando una combinación de ketamina (60-80 mg/kg) y diazepam (5-10 mg/kg), administrada por vía intramuscular 10 minutos antes de comenzar el procedimiento.

Los conejos se colocaron en decúbito ventral, se rasuraron ambos miembros inferiores y se efectuó asepsia y antisepsia. Luego se realizó el abordaje posterior sobre la zona medial del tendón de Aquiles; una vez objetivado el tendón se lo seccionó a 1 cm de su inserción distal.

En el tendón izquierdo se efectuó una sutura terminoterminal con puntos de Kessler modificados⁷ utilizando nailon 5-0 (grupo control).

Del lado derecho se realizó la sección del tendón, sutura terminoterminal similar al lado de control y colocación de plasma rico en plaquetas (grupo experimental) (Fig. 1).

Se suturó la piel con nailon 5-0 y se inmovilizaron ambas patas utilizando una férula digital y venda elástica engomada (Coban®) en flexión, de tal manera que permitiera la deambulacion (Fig. 2).

Los animales recibieron tratamiento analgésico y antibiótico durante el período posquirúrgico inmediato.



Figura 2. Luego se suturó la piel con nailon 5-0 y se inmovilizaron ambas patas utilizando una férula digital y venda elástica engomada (Coban®), en flexión de tal manera que permitiera la deambulacion del animal.

La eutanasia se practicó a las seis semanas; los animales fueron sacrificados utilizando cámara de dióxido de carbono.

La evaluación de los tendones se realizó desde el punto de vista imaginológico, mediante resonancia magnética, y desde el punto de vista macroscópico, mediante una prueba de resistencia mecánica a la tracción utilizando una máquina específica para tal fin (modelo 4487, Instron, Canton; Massachussets) (Fig. 3), realizada en el Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI), con los siguientes parámetros: humedad 55%, temperatura ambiente 23 °C y distancia inicial de 11 mm. Se realizó en primera instancia en tendones de cadáveres obtenidos para el consumo humano, a fin de tener un parámetro de su resistencia; luego se efectuó la prueba de tracción sobre el hilo de sutura utilizado para la tenorrafia a fin de constatar también su resistencia y, por último, en los tendones operados.

Se dejó para el final la evaluación histológica, para lo cual luego de efectuar la prueba de tracción se fijaron los tendones en formol buffer al 10-20%.

Obtención y elaboración del plasma rico en plaquetas

Extracción: antes de comenzar el procedimiento quirúrgico se extraen 10 cm³ de sangre del conejo de la arteria central de la oreja y se coloca en un tubo estéril con el agregado de 1 ml de citrato sódico al 3,13% como anticoagulante.

Procesamiento: la muestra se centrifuga a 5600 revoluciones por minuto, lo que permite la separación del plasma pobre en plaquetas de los glóbulos rojos y la capa leucocítica (*buffy coat*), que contiene los glóbulos blancos y las plaquetas. Se extrae esta fracción y se coloca en otro tubo para centrifugarla a 2400 rpm y permitir la separación de la serie roja de la capa.

Plasma pobre en plaquetas

Sangre ————— 5600 rpm: serie roja

Serie roja ————— 2400 rpm: plasma rico
(capa leucocítica) en plaquetas



Figura 3. Máquina utilizada para la prueba de resistencia mecánica a la tracción (modelo 4487, Instron, Canton; Massachussets).

Activación: se realiza con 10 ml de cloruro cálcico.

Luego de 5 a 7 minutos del proceso de activación se toma el coágulo y se lo coloca en el sitio quirúrgico.

Control de calidad de la muestra: se realiza con cada coágulo de plasma rico en plaquetas mediante el conteo del número de plaquetas de la muestra; es apto si presenta cuatro veces mayor número de plaquetas que los valores normales⁹ (normal en conejos 200.000-500.000/mm³).

El nivel de significación establecido fue de 0,05.

Resultados

Evaluación macroscópica

Todos los tendones (experimental y control) cicatrizaron en forma normal y presentaron continuidad en la zona de la tenorrafia (Fig. 4).

En dos casos del grupo experimental y en tres casos del grupo control fue dificultoso localizar la zona de la lesión.

Evaluación imaginológica

Se realizó resonancia magnética a cuatro de los animales inmediatamente luego de ser sacrificados, la cual fue analizada por un médico del servicio de diagnóstico por imágenes, sin que éste supiera cuál correspondía al control y cuál al experimental. En todos se observó la continuidad del tendón reparado con tejido cicatrizal.

En los tendones del grupo control se observó pérdida de la intensidad del tendón debido a cambios de origen inflamatorio, más que en el lado en el que se colocó PRP.

Evaluación histológica

Los especímenes correspondientes a la población control y experimental se estudiaron mediante realización de



Figura 4. Todos los tendones (experimental y control) cicatrizaron en forma normal y presentaron continuidad en la zona de la tenorrafia.

cortes longitudinales que cubrían el área de sección del tendón.

Se efectuaron en todos los casos cortes histológicos que muestreaban la totalidad del proceso reparativo. Las secciones fueron teñidas con hematoxilina-eosina y con tricrómico de Masson.

El estudio de las muestras evidenció la existencia de fenómenos reparativos de tipo cicatrizal con angiohiperplasia, fibrosis y algunos casos de granulomas de cuerpo extraño (hilo de sutura).

En ambas poblaciones (control y experimental) se observó diferencia de intensidad en casos aislados del proceso reparativo, sin que pudieran establecerse diferencias significativas entre la población control y la experimental.

Evaluación mecánica

Los datos obtenidos en esta evaluación fueron volcados en una base de datos (tipo Excel) y luego analizados mediante un microprocesador AMRAD 750 Mhz y el paquete estadístico STATISTICA v.5 de Statsoft Inc.1997.

Tabla 1. Cadáveres (tendones intactos). Se utilizaron para evaluar la resistencia normal de los tendones de conejos

Tendón	Carga (N)
1	173,00
2	133,00
3	229,80
4	158,70
5	133,30
6	247,70
7	186,60
8	276,50
9	190,10
10	233,40
11	190,10
12	233,40
13	243,40
14	151,00
15	154,20
16	210,000
17	173,000

N: neutonios (newton).

Se determinaron las estadísticas descriptivas adecuadas para cada variable según su escala de medición y distribución.

Cuando fue necesario se realizó (aron) el (los) siguiente (s) cálculo(s):⁵

- Estimación de intervalos de confianza del 95%.
- Prueba de la *t* de Student para muestras independientes.
- Prueba de la *t* de Student para muestras apareadas.
- Prueba de Wilcoxon.
- Prueba de Kolmogorov-Smirnov.

Las estadísticas descriptivas de carga soportada por 17 tendones cadavéricos intactos se muestran en las Tablas 1 y 2.

El promedio de carga tolerada fue de 195,12 neutonios con una desviación estándar de $\pm 43,15$.

Hilo de sutura de nailon 5-0. Se realizó esa prueba para descontar la carga que soporta este material.

Tendones cadavéricos suturados

Las diferencias entre ambas cargas no fueron estadísticamente significativas ($t = 0,993$; $p = 0,421$).

Conclusiones similares se obtuvieron cuando se aplicó la prueba no paramétrica de Kolmogorov-Smirnov para dos muestras ($p = 0,809$) (Tabla 3).

Este resultado apoya la hipótesis de que la carga soportada por un tendón recién suturado depende casi exclusivamente de la resistencia del hilo de sutura. Por otra parte, los valores de carga obtenidos son unas 15 mil veces inferiores al promedio soportado por tendones cadavéricos intactos.

De ello se puede deducir que el aporte de resistencia al estiramiento que realiza la sutura con hilo es despreciable a los fines clínicos (Tabla 4).

Tabla 2. Cargas soportadas por los tendones cadavéricos en neutonios

Nº tendones cadavéricos	Mínima	Máxima	Media	Desv. tip
17	133	276,5	195,129	$\pm 43,1587$

Tabla 3.

Tendón	Carga (N)
1	0,012
2	0,010
3	0,012
4	0,022
5	0,011

La diferencia de carga fue de 4,35 N a favor de la pata con PRP. Con todo, la diferencia entre promedios no fue estadísticamente significativa ($t = 0,36$; $p = 0,72$). Conclusiones similares se obtuvieron con la prueba no paramétrica de Wilcoxon (Tabla 4).

Con una confianza del 95% se puede esperar que la máxima diferencia de carga posible entre patas tratadas con PRP sea de 30,4 N (IC 95% para la diferencia de -21,7 a 30,4 N).

Dado el tamaño de la muestra se estimó que el error beta cometido podría llegar a ser 0,937 o, dicho de otro modo, la potencia de la prueba sería de 0,063.

Cuando se compararon los resultados de carga en tendones cadavéricos y tendones controles de los conejos se obtuvieron los resultados que se muestran en la Tabla 7.

Las diferencias entre promedios fueron estadísticamente significativas ($t = 5,654$; $p = 0,00001$).

Límite inferior 95% para diferencia de carga soportada intacto – sin PRP = 61.7688 N.

Límite superior 95% para diferencia de carga soportada intacto- sin PRP = 132.1342 N.

Las diferencias entre promedios fueron estadísticamente significativas ($t = 5,533$; $p = 0,00001$).

Límite inferior 95% para diferencia de carga soportada intacta PRP = 58.2606 N.

Límite superior 95% para diferencia de carga soportada intacto PRP = 126.9314 N.

De la interpretación de las bandas de confianza se deduce que el tendón tratado con PRP muy probablemente sería como mínimo un 30% menos resistente que el tendón intacto, mientras que el no suturado no tratado con PRP sería un 31% menos resistente que el tendón intacto (Tabla 8).

Discusión

Durante los últimos quince años ha habido, en el campo de la ortopedia¹³ y la cirugía maxilofacial,¹⁵ un considerable desarrollo en investigación sobre factores de crecimiento, en especial los relacionados con las proteínas morfogenéticas óseas. Su utilización y comercialización, aprobada en Europa y los Estados Unidos, tropieza en nuestro medio con la dificultad de su elevado costo.

Es por esto último, el costo, que ha ganado protagonismo el plasma rico en plaquetas, ya que tiene como ventajas que se realiza de sangre del propio paciente, con lo que no hay posibilidad de transmisión de enfermedades; es fácil y rápido de preparar; y no requiere gran infraestructura para su elaboración.

La mayor experiencia con PRP, ya sea en estudios de investigación básica¹¹ o clínica,⁶ proviene de la cirugía maxilofacial para el mejoramiento del capital óseo mandibular. La gran mayoría de estos trabajos no tienen un diseño experimental adecuado, puesto que las conclusiones

Tabla 4. Carga en newtonios

Grupo	N	Media	Desvío no típ
Hilo de sutura nylon 5-0	5	0,01340	± 0,004879
Tendón suturado	3	0,02700	± 0,023431

Tabla 5. Resultados de carga (en newtonios) soportada por tendones experimentales sin tratar (control) y tratados (PRP)

Tendón	Carga (N) Control	Carga (N) PRP
1	31,03	151,20
2	132,10	139,20
3	169,00	171,00
4	106,00	116,00
5	52,00	48,00
6	135,00	135,00
7	67,00	97,00
8	62,00	41,00
9	80,00	69,00
10	43,00	30,00
11	132,00	107,00
12	169,00	126,00

Tabla 6. Promedio de carga según el tratamiento recibido. Carga en newtonios

Grupo	Media	N	Desviación no típ
Tendón control	98.177	12	± 48,65
Tendón con PRP	102.53	12	± 46,10

Tabla 7. Resultados de carga (en newtonios) de tendones cadavéricos y tendones control

Tendones N casos	Media	Desv. estándar
12 suturados control	98,17	± 48,65
17 cadavéricos	195,12	± 43,15

Tabla 8. Resultados de carga (en newtonios) de tendones cadavéricos y tendones tratados

Tendones	Media	Desv. estándar
12 suturados PRP	102,53	± 46,10
17 cadavéricos	195,12	± 43,15

se informan como observaciones clínicas sin claros parámetros de medición de resultados ni grupos de control.¹¹

La bibliografía mundial en cuanto a la aplicación de PRP en tejido óseo es contradictoria; algunos autores informan que la aplicación de factores de crecimiento derivados de las plaquetas favorece la regeneración ósea;¹² otros, en cambio, no encuentran cambios en la formación ósea.⁸

Canalis y cols.¹² colocaron factor de crecimiento derivado de las plaquetas luego de realizar una osteotomía de tibia en siete conejos. Al sacrificarlos a los 28 días, observaron mayor densidad en el callo óseo, pero no encontraron aumento de la resistencia entre el grupo tratado con factor de crecimiento y el grupo control.

En cuanto a la utilización de PRP en tejidos blandos, no abundan las publicaciones. Pierce y cols.¹⁴ informan que la administración de PDGF disminuye el tiempo de cicatrización y aumenta la resistencia de las heridas. Otros

autores comunican que el PDFG aumenta ligeramente la síntesis de colágeno.¹⁶

Desde el punto de vista histológico se observa un incremento de células y de tejido de granulación en las heridas tratadas con PDGF en las primeras etapas del proceso de reparación; luego de tres meses de ocurrida la lesión, no hay diferencias entre los grupos tratados con PDGF y los grupos de control. Algo similar ocurre en cuanto a la resistencia mecánica de los tejidos.¹⁶

Nuestras observaciones no han podido demostrar histológicamente en forma determinante la mayor proliferación de células reparativas entre el grupo experimental y el grupo control, de la misma manera que no hubo mayores diferencias en cuanto a la resistencia mecánica de los tendones.

Por lo tanto, estos datos experimentales no apoyarían la utilización del plasma rico en plaquetas en las lesiones tendinosas de los seres humanos.

Agradecimientos: Al técnico Leonel Joanas, del Bioterio de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad de Buenos Aires.

Bibliografía

1. **Institute Of Laboratory Animal Resources (ILAR), Commission On Life Sciences, National Research Council.** *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*; 1996. Washington D.C.: National Academy Press.
2. **Beasley LS, Einhorn TA.** Role of growth factors in fracture healing. In: *Skeletal Growth Factors*. Canalis E editor. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins; 2000. pp. 311-22.
3. **Canalis E, McCarthy TL, Centrella M.** Effects of platelet-derived growth factor on bone formation in vitro. *J Cell Physiol.* 1989;140(3):530-7.
4. **Canalis E, Ornitz D.** Platelet-derived growth factor. Skeletal actions and regulation. In: *Skeletal Growth Factors*. Canalis E editor. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins; 2000. pp. 153-65.
5. **Dawson-Saunders B Trapp GR.** *Bioestadística Médica*. 3ª ed.; 2002. México D.F.: Manual Moderno.
6. **de Obarrio JJ, Araúz-Dutari JI, Chamberlain TM, Croston A.** The use of autologous growth factors in periodontal surgical therapy: platelet gel biotechnology-case reports. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2000;20(5):487-97.
7. **Hunter JM, Schneider LH, Macklin EJ, eds.** *Tendon surgery in the hand*. St Louis: Mosby Year book; 1987.
8. **Jensen TB, Rahbek O, Overgaard S, Soballe K.** Platelet rich plasma and fresh frozen bone allograft as enhancement of implant fixation. An experimental study in dogs. *J Orthop Res.* 2004;22(3):653-8.
9. **Landesberg R, Roy M, Glickman RS.** Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. *J Oral Maxillofac Surg.* 2000;58(3):297-300; discussion: 300-1.
10. **Lowe H, Rafty L, Collins T, Kachigian L.** Biology of platelet-derived growth factors. In: *Skeletal Growth Factors*. Canalis E editor. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins; 2000. pp. 129-51.
11. **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.
12. **Marx RE, Wong ME.** A technique for the compression and carriage of autogenous bone during bone grafting procedures. *J Oral Maxillofac Surg.* 1987;45(11):988-9.
13. **Mohan S, Baylink DJ.** Bone growth factors. *Clin Orthop Relat Res.* 1991;(263):30-48.
14. **Pierce GF, Mustoe TA, Altmock BW, Deuel TF, Thomason A.** Role of platelet-derived growth factor in wound healing. *J Cell Biochem.* 1991;45(4):319-26.
15. **Schilephake H.** Bone growth factors in maxillofacial skeletal reconstruction. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2002;31(5):469-84.
16. **Tayapongsak P, O'Brien DA, Monteiro CB, Arceo-Diaz LY.** Autologous fibrin adhesive in mandibular reconstruction with particulate cancellous bone and marrow. *J Oral Maxillofac Surg.* 1994;52(2):161-5; discussion:166.