



Tercer Congreso virtual de Ciencias Morfológicas.

Tercera Jornada Científica de la Cátedra Santiago Ramón y Cajal.

ANALISIS HISTOLOGICO DEL EFECTO DE PLASMA RICO EN FACTORES DE CRECIMIENTO (PRFC) EN LA CICATRIZACION DE PIEL EN CONEJOS

Patricia Alejandra Bertone¹, Juan Tomás Wheeler¹, Maria Cristina Romanini¹, Claudio Marcelo Boaglio¹, Francisco Oscar Ruiz², Alicia Carmen Suarez¹, Alejandro Aramayo¹, María Elena Torretta¹

¹ Docente Investigador Facultad de Agronomía y Veterinaria Universidad Nacional de Río Cuarto.

² Becario posdoctorado Facultad de Ciencias Exactas, Físico - Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Río Cuarto. Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

e-mail: patriciabertone@gmail.com.ar

RESUMEN

El Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRFC) es un volumen de plasma autólogo, se obtiene de un ciclo de centrifugado único, con parámetros de tiempo y velocidad establecidos, tiene como finalidad la liberación de factores de crecimiento sostenida en el tiempo. El objetivo fue analizar mediante estudios histológicos los efectos del PRFC durante la cicatrización de heridas provocadas por colgajos de piel en conejos. Diseño de tipo experimental. Se realizaron dos colgajos cutáneos en conejos (n: 12), en el derecho se aplicó PRFC, activado con ClCa y en el izquierdo ClNa 0,9%, como control. Se realizó estudio histopatológico de biopsias de piel a 3, 5, 7, 15 y 30 días para evaluar el proceso cicatrizal. Los hallazgos del ensayo para las variables estudiadas: mononucleares, proliferación vascular, fibroblastos, colágeno y reepitelización fueron significativos ($p < 0,05$). No hubo diferencias significativas en relación a la variable polimorfonucleares entre tratados y control. En el modelo evaluado el PRFC presentó mejores registros histológicos que el control, lo que coincide con hallazgos de autores que proponen a este concentrado plaquetario como una alternativa bioterapéutica para favorecer la cicatrización de piel en conejos.

Palabras clave: cicatrización, plasma rico en factores de crecimiento, histología.

INTRODUCCIÓN

La curación de una herida cutánea es un fenómeno fisiológico que se inicia a partir de la pérdida de la integridad de la piel y comienza con la formación de coágulos y desgranulación plaquetaria, conduciendo a la liberación de factores de coagulación y múltiples citoquinas que modulan la respuesta inflamatoria¹⁻². La cicatrización en los tejidos está dirigida por la combinación de complejos mecanismos celulares, moleculares, fisiológicos y bioquímicos, que por medio de la quimiotaxis, proliferación, depósito y reorganización de la matriz extracelular conducen a la reparación o incluso a la regeneración de los tejidos lesionados.³⁻⁴

Durante la cicatrización de la herida suceden varios procesos que ocurren de manera superpuesta y que para su estudio se ha dividido en distintas fases: hemostasia, inflamación, proliferación (síntesis de matriz, neovascularización y reepitelización) y maduración.⁵⁻⁶

La fase proliferativa del proceso de cicatrización comienza 24 horas después de ocurrida la lesión. Histológicamente en esta fase se contemplan, al menos, tres procesos; fibroplasia, angiogénesis y reepitelización. En el primero, a partir de los fibroblastos de la dermis ocurre la síntesis de fibras colágenas que van ocupando el espacio correspondiente a la nueva dermis. Durante el segundo, se forman nuevos capilares a partir de células endoteliales que migran hacia el tejido cicatricial, estimulados por una combinación de diversas moléculas endógenas (heparina, fibronectina, factor de crecimiento derivado de plaquetas (FCDP), factor de crecimiento del endotelio vascular (FCEV), factor de crecimiento epidérmico (FCE), y condiciones de baja tensión de oxígeno y concentración de ácido láctico). En la última fase de reepitelización, los queratinocitos basales de los bordes de la herida se aplanan y migran para cubrir de granulaciones el tejido que está en formación⁵. En particular, las plaquetas representan elementos claves en la cicatrización de las heridas. Estos fragmentos citoplasmáticos además de tener propiedades hemostáticas, también poseen propiedades proinflamatorias, reguladoras y regenerativas, mediando la interacción con neutrófilos y células endoteliales y fundamentalmente, por la liberación de factores de crecimiento y citoquinas^{7,9}. De esta manera, desempeñan un papel significativo en la regeneración y reparación de tejidos.

Desde hace ya algunos años, en diversos campos de la medicina ha resurgido el interés por sustancias o materiales que favorezcan la regeneración tisular. En algunos trabajos científicos se propuso oportunamente el uso de factores de crecimiento sintéticos. Sin embargo, la obtención, procesamiento, síntesis y aplicación de estos, posee un elevado costo económico y se requieren dosis repetidas para conseguir un efecto terapéutico clínicamente evidente.¹⁰ Por este motivo, el desarrollo de concentrados plasmáticos biológicos derivados de las plaquetas resultan en un producto con mayor concentración de plaquetas y los niveles de los factores de crecimiento aumentarían en relación lineal con el número de plaquetas sostenida en el tiempo, relacionados con la aceleración del proceso curativo de lesiones variadas.⁹

El Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRFC) es un volumen de plasma autólogo que tiene una concentración de plaquetas al menos el doble de la concentración fisiológica (200.000 plaquetas/uL). Se obtiene de un ciclo de centrifugado único, con parámetros de tiempo y velocidad establecidos, a partir de una muestra de sangre periférica¹¹ y se activa con Cloruro Cálcico.⁹

Los datos clínicos revelan que el uso de PRFC actuaría como una matriz favorable para el desarrollo de la curación sin procesos inflamatorios excesivos generando la liberación de citoquinas¹², en tanto estudios histológicos revelan que favorece la proliferación de fibroblastos¹³, la síntesis de Colágeno tipo I¹⁴, estimula la angiogénesis, mitogénesis, la permeabilidad e induce el crecimiento del tejido epitelial.¹⁵⁻¹⁶

En este contexto, iniciar el estudio y desarrollo de concentrados plasmáticos autólogos derivados de plaquetas resulta alentador y el PRFC podría constituir un nuevo paso en el concepto del uso del gel plaquetario como terapéutica para la cirugía reconstructiva.

OBJETIVO

El objetivo de este estudio fue analizar mediante estudios histológicos los efectos del Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRFC) durante el proceso de cicatrización en heridas provocadas por los colgajos de piel en conejos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1- Modelo animal y toma de muestra

Las experiencias *in vivo* se realizaron en un lote de 12 conejos albinos neozelandeses (*Oryctolagus cuniculi*) machos y hembras, clínicamente sanos, de peso y tamaño uniforme (4,5 Kg). Todos los procedimientos de manipulación del modelo animal seleccionado fueron previamente aprobados por el Comité de Ética de la UNRC. En cada conejo se tomó muestras de sangre venosa con anticoagulante (Citrato de Sodio 3,8%) y se centrifugaron a 1800 rpm durante 8 min. En los tubos se obtuvieron 3 fracciones de separación, una serie inferior roja, una media blanca y una superior, correspondiente al plasma. El sobrenadante plasmático próximo a la serie blanca es el que se extrajo asépticamente mediante el empleo de una pipeta Pasteur estéril y se colocó en un nuevo tubo estéril conteniendo los volúmenes de PFRC.ç

2- Diseño experimental *in vivo*

2.1- Procedimiento quirúrgico, inoculación y evaluación histológica

Todos los conejos se sometieron a procedimiento quirúrgico con anestesia general en el Hospital de Clínica Animal perteneciente a la Facultad de Agronomía y Veterinaria UNRC.

En cada animal se realizaron dos colgajos cutáneos de patrón al azar por deslizamiento de avance en cada lado del dorso (derecho e izquierdo), de forma rectangular (1x3 cm), en sentido longitudinal y paralelo a la columna vertebral, se resecó un defecto de 1x1 cm de piel y se colocó el material de estudio de la investigación. En el lecho del colgajo derecho se aplicó un volumen de PRFC, previamente activado con ClCa y en el izquierdo, se administró un volumen de ClNa (0,9%), representando el control sin tratamiento. La administración se realizó por única vez. Posteriormente, se suturó la piel con patrón de puntos simples. Durante un periodo de 30 días en todo el lote de animales se tomaron biopsias de piel de los bordes de las heridas a los 3, 5, 7, 15 y 30 días (poscirugía). Las mismas se procesaron para su evaluación histológica. Se fijaron en solución acuosa de formaldehído (10%) y se incluyó en parafina. Se realizaron cortes histológicos de 4 µm de espesor y se tiñeron con hematoxilina y eosina. El análisis histológico de los cortes se realizó por observación directa en microscopio óptico (40x) en cinco campos aleatorios de cada preparado.

Para estimar la evolución en el proceso de cicatrización del tejido se midieron las siguientes variables: células mononucleares y PMNs, proliferación vascular, fibroblastos, colágeno y reepitelización. Se empleó una escala semicuantitativa en cada

biopsia (0: ausente; 1: discreto; 2: moderado; 3: acentuado) para determinar la evolución gradual de los cambios en los colgajos.

3- Análisis Estadístico

Se realizaron comparaciones entre los colgajos tratados y control en relación a las variables. Las experiencias se realizaron por triplicado. Los datos obtenidos a partir de las variables (PMNs, mononucleares, proliferación vascular, fibroblastos, colágeno y reepitelización) se sometieron a test de Student. Para las diferencias entre las medias de los grupos se estableció una significancia estadística con un valor $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

En la evaluación histológica para la reacción inflamatoria de la herida se evaluó la presencia de células mononucleares y PMNs y no hubo diferencias estadísticamente significativas en relación a PMNs entre los colgajos tratados y control ($p = 0,82$) durante todo el periodo de estudio (30 días). En relación a la presencia de células mononucleares en los colgajos con PRFC se observó un aumento a partir del día 3 poscirugía y un incremento significativamente mayor a los 7 días en comparación al control.

De manera similar, al evaluar la proliferación de fibroblastos se observó diferencias estadísticamente significativas, fue significativamente mayor en los tratamientos con PRFC durante toda la experiencia, alcanzando valores promedios máximos a los 15 y 30 días del ensayo. En la Figura 1, se observa histológicamente en una muestra de la dermis papilar de piel de conejo una elevada proliferación de fibroblastos a los 15 días de tratamiento con PRFC. A partir del día 5 se halló un importante nivel de proliferación vascular temprana y un aumento vascular estadísticamente más significativo al finalizar la experiencia en los colgajos tratados en comparación a los controles (Figura 2). Los valores medios para colágeno y reepitelización cuando se emplea PRFC en las heridas de piel fueron significativamente mayores que los controles a partir del día 7. En la figura 3 se observa una muestra de piel tratada con PRFC a menor aumento microscópico (10x), donde claramente se evidencia un engrosamiento del epitelio plano estratificado con una abundante capa de queratina. Al finalizar la experiencia, el análisis histológico de las biopsias de piel tratadas con PRFC mostró una abundancia de

fibroblastos y fibras colágenas en la dermis papilar y una reorganización del material fibroso en la dermis reticular (Figura 4).

DISCUSIÓN

Los exámenes histopatológicos de cortes de tejidos son herramientas valiosas para estimar la evolución en la reparación de los tejidos en diversos modelos animales de experimentación. Tal lo mencionado en la bibliografía³⁻⁴ la cicatrización de la piel es un proceso de complejos mecanismos celulares, moleculares, fisiológicos y bioquímicos, que por medio de la quimiotaxis, proliferación, depósito y reorganización de la matriz extracelular conducen al cierre de los tejidos lesionados

Los hallazgos del ensayo para la inflamación fueron significativos para las células mononucleares y no así para los polimorfonucleares, estos últimos se sabe¹⁻² son reclutados después de la aparición de la lesión para realizar la fagocitosis de las bacterias, la descomposición del tejido necrótico y promover la limpieza de la herida, a continuación, por factores quimiotácticos reclutar macrófagos que trabajan en la remodelación de la matriz extracelular y también la liberación de sustancias vasoactivas y factores crecimiento para ayudar en las fases posteriores de la inflamación que modulan la respuesta inflamatoria.¹⁻²

Los resultados al evaluar la intensidad de la proliferación de fibroblastos demostraron durante todo el estudio los más altos valores medios, los fibroblastos tienen por principal función el mantenimiento de la integridad de tejido, mediante síntesis de componentes de la matriz extracelular y participan de la composición del tejido granulación.⁵ Este hallazgo acuerda con reportes¹²⁻¹⁴ que consideran al PRFC como un material biológico que actúa mediante una matriz polimerizada de fibrina rica en plaquetas y citoquinas que favorecen la proliferación de fibroblastos.

La intensa vascularización observada en este estudio después del tratamiento con el PRFC, fue similar a los hallazgos¹⁵ que demostraron la eficacia de los diferentes factores de crecimiento del plasma sobre heridas en tejidos blandos con una acelerada evolución y correlacionan este hecho con los factores de crecimiento que se encuentran en las plaquetas, responsables de actuar en las primeras etapas de curación. Además los fibroblastos tienen efectos en la proliferación y diferenciación de los queratinocitos, esencial en la reepitelización y en la deposición de colágeno, que se relaciona con los

hallazgos de este trabajo⁵ y conduce a la comprensión que el uso de PRFC en los colgajos cutáneos contribuyó el proceso de curación.

La rápida reepitelización y depósito de fibras de colágenas debida a la abundancia de fibroblastos en las biopsias de piel tratadas, demuestran el efecto regenerativo del PRFC en los tejidos del modelo animal estudiado. Estos hallazgos coinciden parcialmente con estudios¹⁶ que demostraron un efecto semejante sobre el aumento significativo de fibras colágenas en la reparación de heridas quirúrgicas de piel en un similar modelo animal con empleo de concentrado plaquetario.

Hay reportes ¹⁷⁻¹⁸ de los estímulos inducidos por los factores de crecimiento como método para mejorar la sobrevida tisular que acuerdan con nuestro estudio.

CONCLUSIONES

En conclusión, el empleo de PRFC sobre la cicatrización de heridas en este modelo animal podría constituir no solo una alternativa terapéutica para promover la regeneración de tejidos, sino también, un potencial bioproducto con futura aplicación tecnológica, a muy bajo costo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Fossum, T.W Cirugia de Pequenos Animais: In: Hedlund, C.S. Cirurgias reconstrutivas. 3.ed. São Paulo: Roca. Cap.18; 2007. p. 135-186.
2. Weibric G, Buch RS, Kleis WK, Hafner G, Hitzler WE, Wagner W. Quantification of thrombocyte growth factors in platelet concentrates produced by discontinuous cell separation. *Growth Factors*. 2002. 20(2):93-7.
3. Theoret CL. The pathophysiology of wound repair. *Vet Clin Equine* 2005. 21: 1-13.
4. Albuquerque, D.P; Oliveira, T.M.F; Maranhão Filho, A.W.A; Milhomens Filho, J; Gusmão, E.S. Aplicação clínico cirúrgica do plasma rico em plaquetas – estudo revisional. *Odontologia Clínica e Científica*, 2008; 7(2):119-122.
5. Collins T. Reparación de los tejidos: proliferación celular, fibrosis y curación de las heridas. En: Robbins S, Cotran R, Kumar V, Collins T. editores. *Patología estructural y funcional*. 6ta edición. México. McGraw-Hill Interamericana. 2000. p: 95 -120.

6. Slatter, D. Manual de cirurgia de pequenos animais: Pele e órgãos anexos. 3.ed. São Paulo: Manole.,Cap.22; 2007.p. 304-309.
7. Hartwig J, J Italiano. The birth of the platelet. *J Thromb Haemost* 2003. 1:1580-1586.
8. Mannaioni PF, GM Bello, E Masini. Platelets and inflammation: role of platelet-derived growth factor, adhesion molecules and histamine. *Inflamm Res* 1997. 46: 4-18.
9. Anitua E, I Andia, B Ardanza, P Nurden, AT Nurden. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost* 2004. 91: 4-15.
10. Liu Y, Kalen A, Risto O. Fibroblast proliferation due to exposure to platelet concentrate in vitro is pH dependent. *Wound Repair Regen* 2002. 336-340.
11. Anitua E, M Sánchez, AT Nurden, MM Zalduendo, M de la Fuente, J Azofra, I Andia. Platelet-released growth factors enhance the secretion of hyaluronic acid and induce hepatocyte growth factor production by synovial fibroblasts from arthritic patients. *Rheumatology* 2007. 46: 1769-1772.
12. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJJ, Mouhyi J, et al. Platelet -rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part III Leucocyte activation: A New feature for platelet concentrates. *Oral Surg Oral Med Pathol Oral Radiol Endod.* 2006. 51-55.
13. Bertone PA, Ritta L, Romanini MC; Mac Loughlin V ; Dauría P ; Boaglio CM; Merkis C, Critofolini A. Valoración histológica del efecto cicatrizante del Plasma Rico en Factores de Crecimiento en piel de conejos. Estudio preliminar 2016 *Revista Argentina de Morfología.* 2016, 3 (3): 15-19.
14. Liu Y, Kalen A, Risto O. Fibroblast proliferation due to exposure to platelet concentrate in vitro is pH dependent. *Wound Repair Regen* 2002. 336-340.
15. Bolta P.R.Z. Use of platelet growth factors in treating wounds and soft-tissue injuries. *Acta Dermatovenerologica Alpina, Pannonica et Adriatica* 2007. 16(4):156-165.
16. Ávila OR, Parizzi NG, Souza AP, Botini DS, Alves JY, Almeida SH. Histological response to platelet-rich plasma added to polypropylene mesh implemented in rabbits. *Int Braz J Urol.* 2016. 10:159.

17. Carroll CMA. Augmentation of skeletal muscle flap survival using platelet derived growth factor. *Plast Reconstr.Surg.* 1998.407- 415.
18. Yang LW, Zhang JX. Vascular endothelial growth factor gene therapy with intramuscular injections of plasmid DNA enhances the survival of random pattern flaps in a rat model. *Br J Plast Surg* 2005. 339-347.

ANEXOS

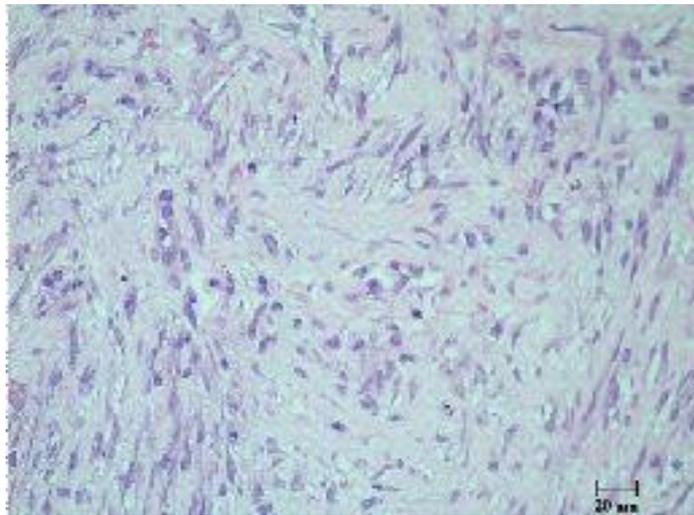


Figura 1. Corte histológico de piel de conejo. Se observa en la dermis papilar una abundancia significativa de fibroblastos a los 15 días en los colgajos tratados con PRFC (microfotografía 40x).

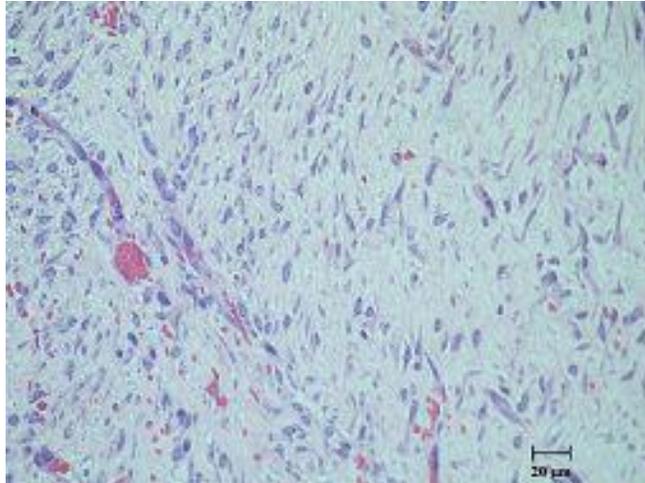


Figura 2. Abundante neo-vascularización en corte histológico de piel de conejo. A los 30 días de tratamiento con PRFC, en la zona de dermis papilar, los colgajos presentaron mayor cantidad de vasos sanguíneos (Microfotografía 40x).

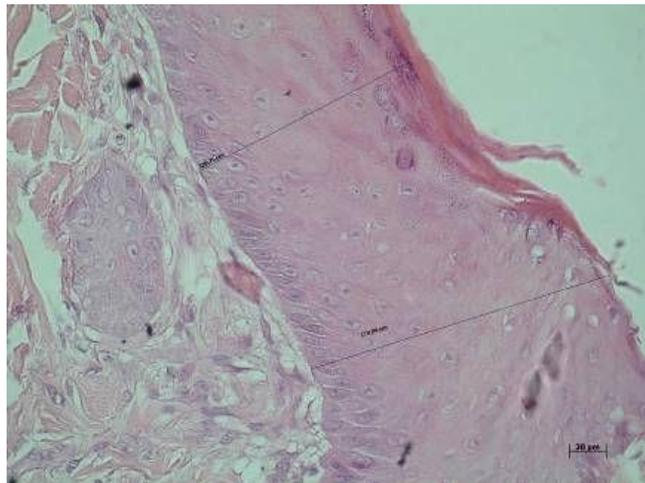


Figura 3. Corte de piel de conejo tratada durante 15 días con PRFC. Se visualiza el engrosamiento de la epidermis (epitelio plano estratificado) y una gruesa capa de queratina (microfotografía 10x)

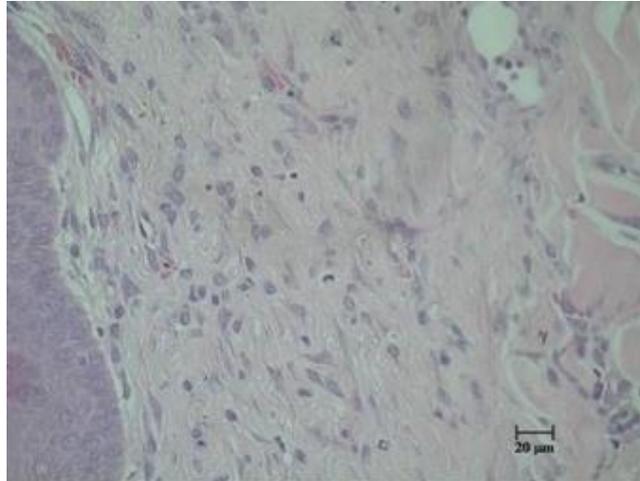


Figura 4. Corte histológico de piel de conejo a los 30 días postratamiento con PRFC. Se observa incremento de fibras colágenas y abundante presencia de fibroblastos en la dermis papilar. Existe reorganización del material fibroso en la dermis reticular (microfotografía 40x).