

# Efectos de la aplicación de plasma rico en factores de crecimiento sobre la viabilidad y celularidad en colgajos cutáneos tallados al azar

Dr. Rafael Arenas Quintana,\* Dr. José Antonio Saucedo Ortiz,\* Dr. Sergio Raymundo López Pérez\*

## RESUMEN

El presente trabajo reporta sobre el estudio de la regeneración tisular utilizando plasma rico en factores de crecimiento (PRFC) en los colgajos cutáneos al azar, su viabilidad, efectos sobre la celularidad y neovascularidad por medio de un análisis histológico. Se realizaron colgajos dérmicos dorsales con relación 1:5 en 16 cobayos divididos en 2 grupos de 8. A un grupo se le aplicó de forma aleatoria PRFC sobre el lecho y al otro grupo se le aplicó solución salina (SS), al término de 14 días se determinó clínicamente la viabilidad del colgajo, se resecó y analizó bajo microscopía. El porcentaje de mayor viabilidad en el grupo de PRFC (69%) contra el de SS (41%) fue significativo  $p = 0.04$ . En el grupo de PRFC hubo una disminución significativa en los macrófagos ( $p = 0.03$ ), linfocitos ( $p = 0.001$ ), y células plasmáticas ( $p = 0.02$ ), elevación significativa de fibroblastos ( $p = 0.001$ ) y colágena ( $p = 0.038$ ), lo cual no se presentó en el grupo de SS. No hubo cambios significativos en inflamación o neovascularización. El presente estudio demostró que el PRFC mejora la sobrevivencia de los colgajos cutáneos al azar, así como la migración de fibroblastos y producción de colágena.

**Palabras clave:** Plasma rico en factores de crecimiento, colgajos cutáneos al azar, colágena, fibroblastos.

## SUMMARY

*The following paper reports on a study of tissue regeneration using Plasma Rich in Growth Factors (PRGF) on random skin flaps. Viability, effects on cellularity and neovascularity are determined by histological analysis. Dermal flaps with ratio 1:5 were made cut into the dorsal skin of 16 Guinea pigs divided into 2 groups of 8. PRGF was applied randomly on the bed of the flap on one group, while saline solution (SS) was applied to the other group. 14 days later the viability of the flaps was determined clinically and then resected and studied under the microscope. The PRGF group exhibited greater percentage of viability (69%) versus the SS group (41%) with a significant  $p = 0.04$ . The PRGF group presented a significant decrease in macrophages ( $p = 0.03$ ), lymphocytes ( $p = 0.001$ ), plasma cells ( $p = 0.02$ ), as well as a significant increase in fibroblasts ( $p = 0.001$ ) and collagen ( $p = 0.038$ ), which did not occur in the SS group. No significant changes in inflammation or neovascularization were observed. The present study demonstrates that PRGF improves the survival of random skin flaps, as well as the migration of fibroblasts and the production of collagen.*

**Key words:** Plasma rich in growth factors, random skin flaps, collagen, fibroblasts.

## INTRODUCCIÓN

Los colgajos cutáneos con patrón al azar son un recurso ampliamente utilizado y de gran valía en la re-

construcción de lesiones oncológicas, por quemadura, trauma contuso-cortante, avulsión o machacamiento. Se utilizan en la cara, tronco y extremidades, siguiendo la escalera reconstructiva, de acuerdo al caso específico de cada paciente. Sus aplicaciones se limitan a cubrir lesiones que cumplan los límites de ancho por largo preestablecidos para las diferentes partes del cuerpo, siendo esta relación de 1:1 en las extremidades inferiores, de 1:4 en cara y cuello, y en el resto con un prome-

\* Departamento de Cirugía Plástica y Reconstructiva del Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional de Occidente. IMSS. Guadalajara, Jalisco, México.

dio de 1:1.5. Esta situación hace que en ocasiones se opte por procedimientos de mayor complejidad.<sup>1</sup>

La disponibilidad de sitios donadores está limitada por la actividad vascular intrínseca de cada colgajo, donde el proceso de cicatrización no sólo depende de las dimensiones ancho por largo del diseño, sino de la adherencia a la piel vecina y al lecho donde se coloca, en el que ocurre el proceso normal de cicatrización dependiendo de las condiciones de éste.<sup>1</sup>

La cicatrización involucra tres componentes durante su proceso: angiogénesis, fibrosis y remodelado, teniendo como objetivo final la curación de los tejidos, que se lleva a cabo por reparación (el tejido no se restaura completamente), o regeneración (el tejido se restaura por completo).<sup>2</sup>

Existen dos razones por las que un tejido se repara en vez de regenerarse: la diferencia en la velocidad de reproducción celular del tejido, o que puede contener las células necesarias para la regeneración, pero le faltan las señales estimuladoras que desencadenen los acontecimientos necesarios para la regeneración, donde al acelerar este proceso la morbilidad disminuye.<sup>2,3</sup>

Existen reportes acerca de los estímulos inducidos por los factores de crecimiento como un método para mejorar la sobrevida tisular.<sup>4-7</sup> Yang,<sup>8</sup> demostró una mayor viabilidad tisular en colgajos al azar en un grupo de ratas a las que les infiltró factor de crecimiento vascular endotelial, contra solución salina. Kryger,<sup>9</sup> por su parte demostró la efectividad del factor de crecimiento vascular endotelial en la supervivencia de colgajos al azar, utilizando varias rutas de administración, como la intravenosa, subfascial, subdérmica y tópica, encontrando mejoría en todos los grupos comparado con el grupo control.

Los factores de crecimiento son proteínas que pertenecen a la familia de las citocinas. Estas proteínas son producidas por un gran número de células, incluyendo las plaquetas y trombocitos. Los factores de crecimiento se unen a receptores específicos sobre la superficie celular; éstos se fosforilan activando cascadas de señalización hacia el interior de la célula, finalizando en la transcripción de genes que codifican para la producción de proteínas, favoreciendo la angiogénesis, revascularización y regeneración de tejidos.<sup>10,11</sup> Entre las principales funciones que realizan los factores de crecimiento se encuentran la supervivencia, mitogénesis, migración celular y apoptosis.

Entre los principales factores de crecimiento se encuentran el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento transformante tipo Beta (TGF- $\beta$ ) y factor de crecimiento de insulina (IGF), factor de crecimiento de vascular endotelial (VEGF), factor de crecimiento fibroblástico (FGF).<sup>2</sup>

El plasma rico en factores de crecimiento (PRFC) se obtiene a partir de una muestra de sangre periférica. El objetivo es obtener un precipitado de plaquetas utilizando los parámetros de tiempo y velocidad establecidos. El resultado es una mezcla de proteínas autólogas preparadas a partir de un determinado volumen de plasma rico en plaquetas. La secreción de factores de crecimiento se inicia con la activación plaquetaria y el PRGF utiliza el calcio para inducirlo.<sup>10</sup>

Los estudios en el campo de la cirugía plástica son aún escasos, aunque progresivamente hay mayor interés en su aplicación.<sup>4</sup> Los hallazgos en estos trabajos no son uniformes y dependen del factor de crecimiento específico, de la dosis, de la vía de aplicación y la utilización de métodos adyuvantes para la supervivencia del tejido en estudio.<sup>3,9</sup>

## MATERIAL Y MÉTODO

Se llevó a cabo un estudio experimental en 16 cobayos (*cavia porcellus*) machos de 600 a 700 gramos de peso. Se calculó el tamaño de la muestra para diferencia de medias que dio un resultado mínimo de cinco animales por grupo experimental, con base en el estudio de Taran,<sup>11</sup> donde utilizó un medio de cultivo celular enriquecido y encontró una mejoría entre el grupo de estudio y el control de más del 20% de mejoría en la supervivencia de colgajo dorsal en ratas. Para este estudio se decidió incluir a 8 cobayos por grupo (SS y PRFC).

## Escalas de medición

La valoración de la viabilidad se determinó en porcentaje de tejido viable, tomando cada milímetro de supervivencia a un equivalente del 1%.

Para los cambios celulares las muestras se observaron bajo microscopia midiendo cuantitativamente 300 leucocitos, tomándose como un valor de 100%, del cual se determinó el porcentaje de células inflamatorias (linfocitos, células plasmáticas, macrófagos, eosinófilos y neutrófilos). La angiogénesis, colagenización, fibrina y fibroblastos se determinaron cualitativamente en campos de 40x, clasificando los hallazgos como: sin cambios, leve, moderado y abundante, asignándoles arbitrariamente los valores de 0, 1, 2 y 3, respectivamente.

En relación a la intensidad de la inflamación, los resultados se reportaron como leve si los elementos inflamatorios en relación a las áreas no inflamadas de los controles se incrementaron entre el 5 y 25%, moderada si fue entre el 25 y 50%, y severa si fue mayor del 50%.

En relación a la angiogénesis, colagenización, fibrina y fibroblastos, los resultados se reportaron como escasos cuando fueron en igual número que los controles, moderados cuando se incrementaron entre el 25 y 50% y abundantes cuando se incrementaron más del 50%.

Los parámetros utilizados para valorar la inflamación en diversos tejidos son arbitrarios, pero reproducibles con variación no mayor del 50%, tanto intra e interobservadores.

Los resultados obtenidos se evaluaron por medio de análisis estadístico con SPSS (*Statistical Packages for Social Sciences* v. 10.0). Dado que la distribución de datos no sigue una curva normal se aplicó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney y Wilcoxon.

En la esfera ética, se siguieron los lineamientos especificados en el Diario Oficial de la Federación, del apartado: animales en condiciones de bioterio "Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio".

## RESULTADOS

### Viabilidad del colgajo

En la evaluación de la viabilidad de los colgajos, se pudo observar en el grupo de SS una media de supervivencia de 41% a los 14 días y en el grupo de estudio tratado con PRFC de 69%. Al comparar los porcentajes de viabilidad a los 14 días entre ambos tratamientos se obtuvo una  $p = 0.04$  para el grupo de PRFC.

### Valoración de población de células inflamatorias y fenómeno de inflamación

#### Grupo de solución salina

**Células inflamatorias:** Al comparar los promedios entre el grupo prequirúrgico y postquirúrgico, los neutrófilos ( $33.13 \pm 4.85$  y  $38.5 \pm 4.9$ ) presentaron un aumento, el cual fue significativo ( $p = 0.038$ ), no así entre la celularidad prequirúrgica y postquirúrgica en los eosinófilos ( $1.25 \pm 1.04$  y  $1.5 \pm 0.93$ ), linfocitos ( $52.88 \pm 2.53$  y  $51.75 \pm 2.82$ ), células plasmáticas ( $6.38 \pm 2.13$  y  $5.13 \pm 0.64$ ) y macrófagos ( $6.38 \pm 4.24$  y  $3.13 \pm 3.04$ ) en los cuales el cambio no fue significativo.

**Inflamación, fibrina, colágena, fibroblastos y angiogénesis:** Los resultados mostraron una disminución en la angiogénesis ( $4.00$  y  $3.5 \pm 0.93$ ) y la fibrina ( $1.5 \pm 0.53$  y  $1.0$ ), que no fue significativa, como tampoco lo fueron los cambios en la inflamación ( $2.13 \pm 0.35$  y  $2.13 \pm 0.35$ ), colágena ( $1.0$  y  $1.0$ ) y fibro-

blastos ( $1.0$  y  $1.0$ ) entre las muestras prequirúrgicas y postquirúrgicas.

#### Grupo de plasma rico en factores de crecimiento

**Células inflamatorias:** Se encontró una disminución significativa en los linfocitos con  $p = 0.001$  ( $52 \pm 2.14$  y  $47.38 \pm 1.51$ ), células plasmáticas con  $p = 0.02$  ( $5.63 \pm 1.06$  y  $4.5 \pm 0.76$ ), macrófagos con  $p = 0.03$  ( $5.88 \pm 2.75$  y  $3.63 \pm 1.3$ ). Los neutrófilos aumentaron significativamente con  $p = 0.002$  ( $34.88 \pm 4.09$  y  $42.25 \pm 2.96$ ). Los eosinófilos ( $1.63 \pm 0.52$  y  $2.25 \pm 0.71$ ) fueron las únicas células que no presentaron un cambio significativo.

**Inflamación, fibrina, colágena, fibroblastos y angiogénesis:** En el análisis prequirúrgico y postquirúrgico se observó un aumento en la inflamación ( $2.75 \pm 0.46$  y  $3.0$ ), una disminución en la angiogénesis ( $2.25 \pm 0.71$  y  $2$ ) sin ser significativos. No hubo cambios en la fibrina ( $2.0$  y  $2.0$ ). En la colágena  $p = 0.038$  (media  $1.0$  y  $1.63 \pm 0.52$ ) y fibroblastos  $p = 0.001$  (media  $1.0$  y  $2.0$ ) la elevación fue significativa.

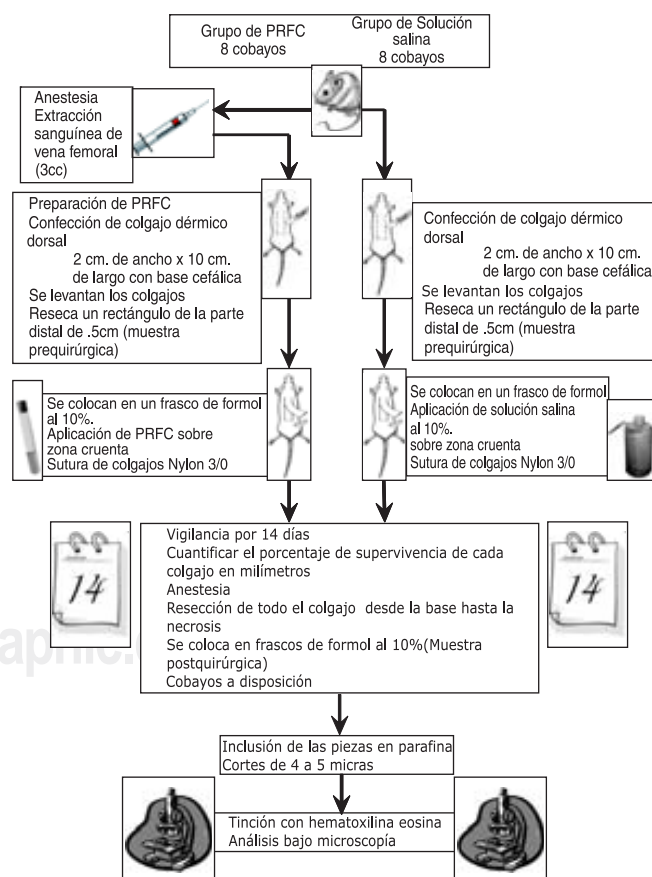


Figura 1. Desarrollo experimental.

## DISCUSIÓN

Los avances en los conocimientos de la función celular y obtención de las sustancias activas y/o células con determinada actividad, han promovido una aplicación sistemática para los procedimientos quirúrgicos. Las sustancias activas que intervienen en la reparación de los tejidos dañados se conocen como factores de crecimiento (fundamentalmente los plaquetarios), citocinas y quimiocinas.<sup>5</sup> Las células que intervienen en la producción de factores de crecimiento son las plaquetas, monocitos, linfocitos, neutrófilos y astrocitos.

Debido al gran auge en el que se encuentra el uso de los factores de crecimiento en el área de traumatología y maxilofacial,<sup>10,12</sup> uno de los objetivos de este estudio fue determinar la viabilidad tisular de colgajos cutáneos al azar utilizando PRFC, así como evaluar sus efectos sobre la celularidad y la neoformación de vasos por medio de un análisis histológico.

La viabilidad de los colgajos fue mayor en el grupo tratado con PRFC.

En el análisis histológico de las muestras prequirúrgicas y postquirúrgicas del grupo SS y del grupo PRFC, los neutrófilos, que tienen como acción la fagocitosis, presentaron un aumento significativo en ambos grupos y los macrófagos, que funcionan como fagocitos y estimulan la liberación de factores de crecimiento que promueven la angiogénesis,<sup>2,13</sup> tuvieron una disminución en ambos grupos, pero sólo significativa en el grupo de PRFC.

Los linfocitos disminuyeron en ambos grupos, lo cual sólo fue significativo en el grupo de PRFC. Aunque se ha demostrado que los linfocitos no se requieren en el proceso de cicatrización de las heridas, son importantes después, en el proceso de reparación del tejido.<sup>2,14</sup> Las células plasmáticas, que se encargan de sintetizar y secretar las inmunoglobulinas disminuyeron en ambos grupos, siendo sólo significativas en el grupo de PRFC.

Los fibroblastos se mantuvieron sin cambios significativos en el grupo de SS y aumentaron significativamente en el grupo de PRFC. La colágena se

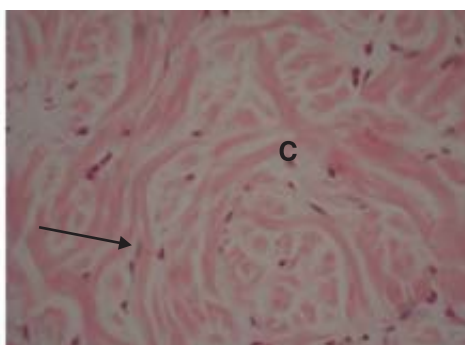
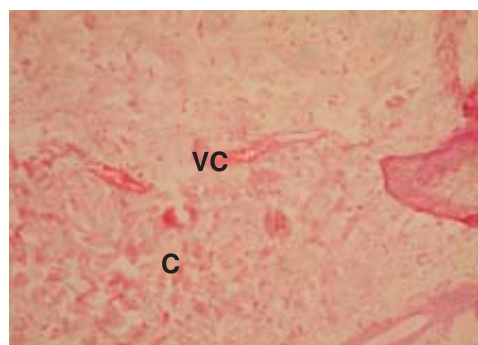
Colgajo con SS  
postop y a 14 días



Colgajo con PRFC  
postop y a 14 días



**Figura 2.** Grupo de solución salina (izquierda) y grupo de PRFC (derecha) en postoperatorio inmediato (arriba) y a los 14 días (abajo).



**Figura 3.** Izquierda: Caso con solución salina con leve aumento de colágena (C), y leve aumento de vasos capilares (VC). Derecha: Caso con PRFC con aumento de colágena (C) y fibroblastos (flecha).



mantuvo en los mismos niveles en el grupo de SS antes y después de la cirugía y aumentó significativamente en el grupo tratado con PRFC. Se ha reportado que los fibroblastos son fuente importante de citocinas, además de que al llegar a las heridas éstos producen una nueva matriz y la colágena se deposita sobre y entre este material amorfo.<sup>2,15</sup> Los tejidos epiteliales pueden entonces migrar sobre éste, cuando se ha formado la matriz, consistente de colágena, elastina, fibronectina, ácido hialurónico y proteoglicanos. Estas estructuras le dan fuerza y soporte y permiten la expansión y contracción, lo que provee una superficie para movimiento de las células, lo que favorece que las reacciones químicas ocurran, proporcionando el estímulo angiogénico inicial.<sup>15</sup>

En este estudio se demostró una mayor viabilidad tisular en los casos tratados con PRFC, lo cual fue clínicamente significativo. A pesar de que se ha demostrado que el PRFC eleva las células inflamatorias,<sup>10</sup> en nuestro estudio se presentó una disminución significativa en los macrófagos, linfocitos y células plasmáticas y no hubo disminución significativa en la inflamación, como era de esperar.<sup>6,10</sup> Aunque el resultado clínico mostró reparación tisular, ésta se pudo deber a la influencia de los factores de crecimiento sobre la duración de los periodos de las fases de inflamación, permitiendo la migración de los fibroblastos y la producción de colágena, los que se encontraron elevados en forma significativa. Esto favoreció la reparación tisular de los colgajos a pesar de no haber una diferencia significativa en la neoformación de vasos, por lo que probablemente, los cambios estructurales y de los grupos celulares previamente mencionados prepararon el lecho receptor, favoreciendo su vascularidad.

El PRFC contiene proteínas tales como PDGF, TGFb, EGF, VEGF, IGF-I y HGF, así como fibrina, fibronectina y vitronectina, entre otras,<sup>10</sup> y en el presente estudio cabe la posibilidad de que estas sustancias interactuaron favorablemente para el incremento de la viabilidad tisular de los colgajos, lo que sólo se comprobaría con estudios de inmunohistoquímica y de densidad vascular.

## CONCLUSIONES

El PRFC incrementó la viabilidad de los colgajos cutáneos al azar, elevó los valores de fibroblastos y colágena, no influyendo en el resto de las células inflamatorias o la neovascularización. La aplicación de PRFC es una alternativa en la elaboración y diseño

de colgajos cutáneos al azar con vascularidad comprometida, ya que su preparación es sencilla, inocua, con tejido autólogo y reproducible.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Achauer BM et al. *Plastic surgery: Indications, operations and outcomes*. Ed. Hardcover 1994: 261-280.
2. 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: 95-120.
3. Lineaweaver WC, Lei MP. Vascular endothelium growth factor, surgical delay, and skin flap survival. *Ann Surg* 2004; 239(6): 866-875.
4. Carroll CMA. Augmentation of skeletal muscle flap survival using platelet derived growth factor. *Plast Reconstr Surg* 1998; 102: 407-15.
5. O'toole G. A review of the therapeutic angiogenesis and considerations of its potential applications to plastic and reconstructive surgery. *Br J Plast Surg* 2000; 54: 1-7.
6. Escotto SI, Padilla SL. Factores de crecimiento en el tratamiento de úlceras de pacientes diabéticos. Mitos y realidades. *Rev Mex Ang* 2001; 9(3): 75-82.
7. Anitua E, Sanchez M. New insights into and novel applications for platelet-rich fibrin therapies. *Tr Biotech* 2006; 24(5).
8. 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; 58: 339-347.
9. Kryger Z, Zhang F, Dogan T. The effects of VEGF on survival of random flap in the rat: examination of various routes of administration. *Br J Plast Surg* 2000; 43: 234-9.
10. Anitua E. PRGF (plasma rico en factores de crecimiento). *Dent Dial* 2004; 2.
11. Taran A. Improved vitality of experimental random dorsal skin flaps in rats treated with enriched cell culture medium. *Plast Reconstr Surg* 1999; 104: 148-51.
12. Anitua E. La utilización de los factores de crecimiento plasmáticos en cirugía oral, maxilofacial y periodoncia. *RCOE* 2001; 6(3): 305-15.
13. Brewster D. The effects of macrophages on the survival of random skin flaps in swine. *Laryngoscope* 1996; 106(9): 1094-1098.
14. Schaffer M, Barbul A. Lymphocyte function in wound healing and following injury. *Br J Surg* 1998; 85(4): 444-460.
15. Taub PJ, Lester S. Plastic surgical perspectives on vascular endothelial growth factor as gene therapy for angiogenesis. *Plast Reconstr Surg* 2000; 105(3): 1034-1042.

Dirección para correspondencia:

Dr. Rafael Arenas Quintana  
Greco Núm. 561 Dpto. 201-D,  
Col. Providencia  
44670. Guadalajara, Jalisco, México  
Tel. (33) 36-42-99-84  
Cel. (045) 33-38-08-87-02  
Correo electrónico: arenasqrmd@hotmail.com