



Víctor J. Primo Capella

Investigador.

CIBER de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN)
Instituto de Biomecánica de Valencia (IBV)

Dr. Ing. Javier Ferrís-Oñate

Director de Innovación de Mercado. Sector Dental.
Instituto de Biomecánica de Valencia (IBV)
CIBER de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina
(CIBER-BBN)

Dr. Ing. Carlos M. Atienza-Vicente

Director de Innovación de Mercado. Tecnología Sanitaria.
Instituto de Biomecánica de Valencia (IBV)
CIBER de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina
(CIBER-BBN)

Evaluación in vivo de la osteointegración de implantes con tratamiento de plasma rico en factores de crecimiento (PRGF-Endoret)

RESUMEN

El Instituto de Biomecánica de Valencia (IBV), en colaboración con centros de investigación y con empresas del sector de productos sanitarios, participó en el proyecto CENIT INTELIMPLANT, que tenía como objetivo investigar y desarrollar nuevos biomateriales y superficies nanoestructuradas y bioactivas con propiedades innovadoras y diferenciadas a nivel estructural y funcional con respecto a los materiales actuales para su aplicación en ingeniería tisular, biotribología y monitorización de sistemas implantados.

Dentro de este gran proyecto, en colaboración con la empresa Biotechnology Institute (BTI), se llevó a cabo la evaluación de nuevos tratamientos para la mejora de la capacidad de osteointegración de implantes dentales. Dichos tratamientos se basaron, por un lado, en el desarrollo de nuevos recubrimientos para la mejora de la capacidad de adhesión celular y diferenciación de las células precursoras de tejido óseo y, por otro, en el uso de plasma rico en factores de crecimiento (*Plasma Rich in Growth Factors*, PRGF) como tratamiento osteoinductor del proceso de regeneración del tejido óseo.

En este artículo se presentarán los resultados circunscritos al estudio del efecto de la adición de plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en la osteointegración de implantes, con objeto de valorar los posibles beneficios del uso de esta terapia en la mejora de los resultados obtenidos en la osteointegración de implantes dentales. Por ello, los apartados de

material y métodos, resultados, discusión y conclusión se limitarán a esta parte del estudio completo.

Palabras clave: *in vivo*; implante; dental; osteointegración; histología; *bone-implant contact*; *Bone volumen density*; PRGF-Endoret; plaquetas; plasma rico en plaquetas; superficies, factores de crecimiento.

INTRODUCCIÓN

El éxito de las terapias de regeneración basadas en implantes se debe a las excelentes propiedades de interacción del material titanio con el hueso, descubiertas a finales de los años 50 (1). La capa de óxido que se forma espontáneamente en la superficie del titanio le protege frente a la corrosión y al desgaste, a la vez que limita en gran medida la respuesta inmune en contacto con los tejidos biológicos (2,3).

Estas características de biocompatibilidad pasiva están siendo revisadas en los últimos años con el objetivo de mejorar la osteointegración de los implantes a través de superficies que interactúen de manera activa con los tejidos circundantes. Una de estas estrategias consiste en la activación biológica de las superficies con plasma autólogo rico en plaquetas en el momento de la implantación (4-7). En este estudio nos centraremos en particular en el sistema PRGF-Endoret, el primer sistema estandarizado para su uso en clínica y con más de 10 años de resultados clínicos favorables (4,6-8).

El método se basa en la obtención, mediante un sólo pa-



so de centrifugación y a partir de sangre del propio paciente, de una fracción de plasma con de 2 a 3 veces más plaquetas respecto de la concentración basal en sangre y sin leucocitos ni glóbulos rojos. La activación plaquetaria y la coagulación se realiza con calcio, evitando el uso de trombina exógena y los riesgos inmunes asociados. El contacto del plasma activado con la superficie y el alveolo postextracción se realiza en el mismo momento de la implantación.

El proceso natural de coagulación lleva a la formación en la superficie del implante de una red biodegradable de fibrina con plaquetas y un cóctel de proteínas específico (9). Las plaquetas inician el proceso de regeneración (10) mediante la liberación de factores de crecimiento y señalizadores celulares (11,12). La presencia de estos mediadores celulares en la superficie de los implantes provee una fuente de señales bioquímicas que inducen un incremento en la vascularización y en la proliferación y diferenciación de células de mesénquima en osteoblastos (13). Estos procesos son clave para la formación de hueso nuevo y la osteointegración (11,14-16). De esta manera, los tratamientos con PRGF-Endoret en procesos de osteointegración con implantes han resultado en mejoras significativas (4,7,11,17-19). Además, este sistema ha sido adaptado a otras aplicaciones biomédicas con resultados muy satisfactorios en términos de curación de heridas y regeneración de tejidos (20).

El objetivo del presente estudio es evaluar la capacidad de mejora de la osteointegración de implantes bioactivados con PRGF en un modelo de cóndilo femoral de conejo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Modelo experimental

El modelo experimental utilizado para la evaluación biológica del efecto del tratamiento con PRGF sobre la osteointegración de implantes es el modelo de implantación de probetas cilíndricas en cóndilo femoral medial de conejo. Este fue seleccionado en base a que la estructura ósea que presenta la zona de implantación posee una cantidad de hueso trabecular adecuada para la osteointegración de la probeta, presentando además condiciones similares a las del hueso maxilar humano.

Diseño de experiencias

Como animales de experimentación se utilizaron conejos Nueva Zelanda hembras nulíparas de 20 semanas de edad. Cabe destacar que todos los procedimientos e instalaciones utilizados por el IBV en la experimentación animal están debidamente autorizados y cumplen estrictamente con las Directrices de la CEE relativas al alojamiento y a los cuidados de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (86/609/CEE), el Diario Oficial de las Comunidades Europeas 18.12.86 N° L358/1 a N° L358/28 y el Real Decreto 223/1988, de 14 de marzo, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

Para el estudio del efecto del PRGF-Endoret en el resulta-

do de la osteointegración de implantes, se seleccionó un único periodo experimental de ocho semanas con el objetivo de evaluar la osteointegración, con y sin tratamiento de PRGF-Endoret, en las fases intermedias del proceso de osteointegración de los implantes.

Con objeto de reducir al mínimo imprescindible el número de animales sin comprometer la validez del experimento, se llevó a cabo la implantación de una muestra en cada una de las dos patas traseras del animal. En la pata izquierda se implantaron las muestras sin tratamiento PRGF-Endoret (Grupo control), mientras que en la pata derecha se implantaron las muestras con PRGF-Endoret (Grupo PRGF). Como resultado se utilizaron tres animales por material, lo cual garantiza un número de muestras estadísticamente representativo (seis probetas por grupo). La **tabla 1** resume el diseño experimental seleccionado para la evaluación *in vivo*.

	Periodo de experimentación (8 Semanas)
Implante	6 implantes (3 animales)
Implante + PRGF	6 implantes (3 animales)
	12 implantes (6 animales)

Tabla 1. Diseño de experiencias utilizado.

El diseño de todas las probetas, acordado con la empresa colaboradora, se recoge en la **figura 1**. Su geometría se inscribe en un cilindro de longitud total 11 mm y diámetro 5 mm. La parte a implantar en el hueso es de geometría rosca y longitud 10 mm. Las muestras fueron fabricadas por mecanizado a partir de barras de titanio de grado médico, aptas para su uso en la fabricación de implantes dentales. Cada una de ellas fue envasada de forma individual y esterilizada debidamente.

PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO

Previamente a la cirugía, se sedó a los animales y se extrajeron 4 ml de sangre de la vena yugular. A partir de esta sangre, mediante el método de centrifugación y aplicación del PRGF-Endoret, se obtuvieron las fracciones de plasma ricas en plaquetas, que tras su activación sirvieron para recubrir los implantes correspondientes al grupo «Implante + PRGF».

Tras la sedación y anestesia del animal, se le administró un antibiótico pre-operatorio y se procedió a la preparación del campo quirúrgico. Se localizó la zona de incisión y se seccionaron, piel, fascia muscular y el músculo sartorio a nivel de su inserción, exponiendo el cuadrante superior distal del cóndilo medial que correspondía a la zona de perforación, limitando ésta con la inserción del ligamento colateral medial en la parte inferior.

Las perforaciones fueron realizadas con brocas de tamaño

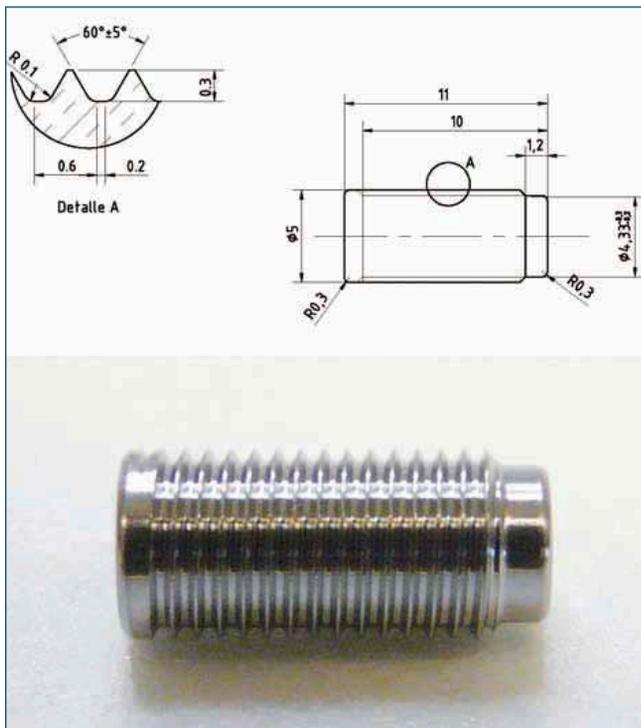


Figura 1. Diseño de las muestras de implantación.

EVALUACIÓN DE LA OSTEointegración

La evaluación de la osteointegración de los implantes se llevó a cabo mediante el estudio histomorfométrico del tejido óseo localizado alrededor del implante a partir de cortes histológicos. Debido a las características especiales de las muestras obtenidas, tejido óseo con implante metálico, se recurrió al

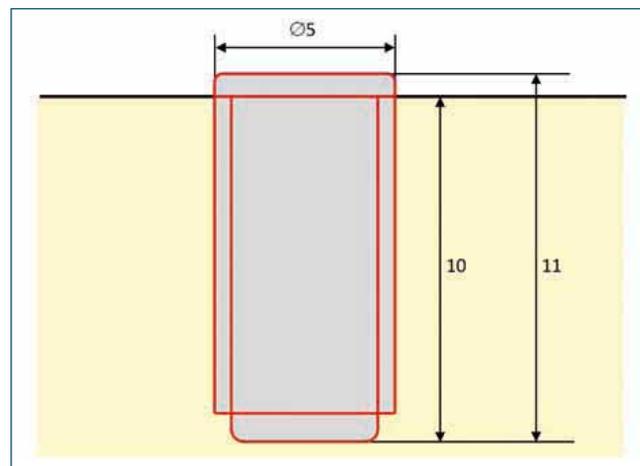


Figura 2. Disposición final del implante tras su colocación en el defecto óseo generado durante la cirugía experimental.

creciente (2 mm, 3,5 mm y 5 mm) hasta alcanzar el diámetro final del defecto, que fue de 5 mm. Todas las brocas poseían un tope que garantizó la adecuada profundidad del defecto, establecida en 10 mm. Las perforaciones se realizaron siempre bajo irrigación con suero fisiológico, con el fin de minimizar los daños en el tejido por sobrecalentamiento de la zona. Tras la generación del defecto, se lavó la zona con abundante suero fisiológico con el fin de no dejar restos de hueso en la zona de implantación.

El implante anteriormente descrito se colocó en el defecto generado mediante *press-fit*. La **figura 2** muestra la disposición geométrica de las probetas una vez implantadas en el hueso.

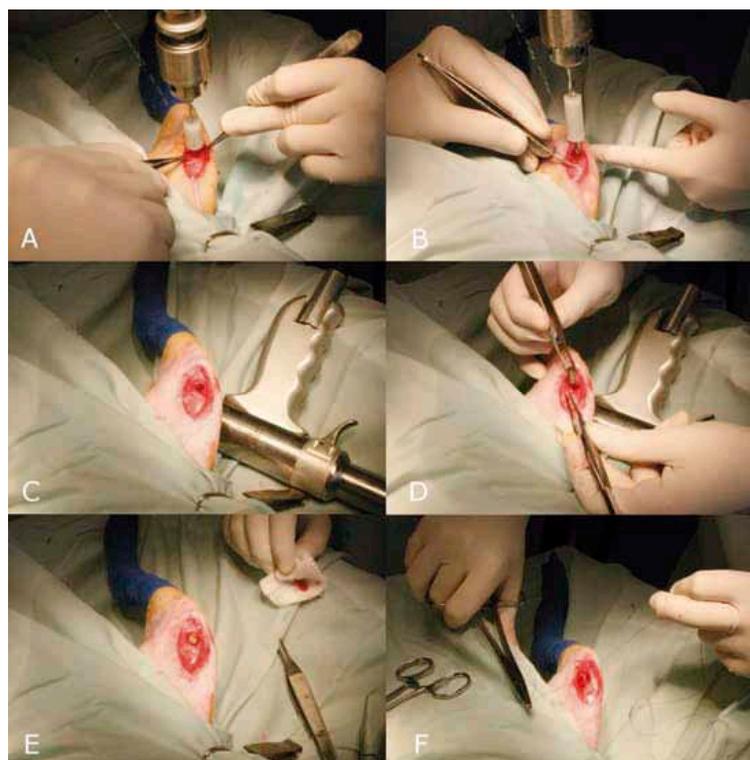
La herida se suturó por planos, se lavó y se administró analgesia y dosis antiinflamatoria. El procedimiento antibiótico y analgésico se mantuvo durante los tres días posteriores a la cirugía y el animal fue evaluado diariamente.

A las ocho semanas los animales fueron sacrificados siguiendo un estricto protocolo eutanásico con objeto de garantizar el mínimo sufrimiento posible.

Tras ello se recuperaron los cóndilos con las probetas implantadas, que fueron enviados sumergidos en alcohol para su inclusión, corte y tinción.

En la **figura 3** se presentan las imágenes más significativas de la cirugía experimental anteriormente descrita.

Figura 3. Cirugía experimental: A) Perforación con broca menor, B) Perforación con broca mayor, C) Defecto óseo, D) Implantación de la probeta, E) Probeta implantada en el defecto óseo, F) Sutura de la herida.



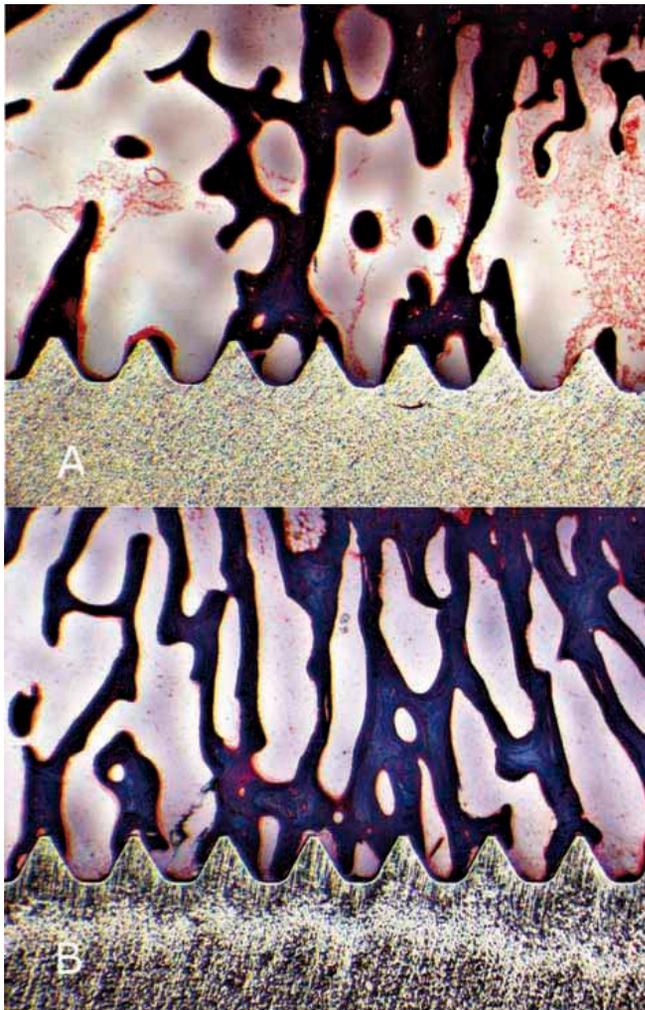


Figura 4. Cortes histológicos obtenidos a partir de las muestras implante-hueso resultantes de la experimentación in vivo. A) Corte histológico de una muestra correspondiente al grupo control. B) Corte histológico de una muestra con tratamiento PRGF.

Tabla 2. Resumen de los resultados obtenidos para las variables de interés y los grupos de estudio considerados.

	BIC (%)		BVD(%)	
	Control	PRGF	Control	PRGF
	48,09	53,64	40,05	61,19
	47,36	71,08	35,51	55,65
	38,12	57,68	20,85	26,04
	39,83	53,8	18,89	37,97
	55,16	67,47	20,29	38,27
	62,71	57,57	20,96	29,76
Media	48,545	60,207	26,092	41,48

procesado y tinción de cortes obtenidos mediante el uso de un sistema EXAKT. Este sistema de corte permite la obtención de cortes finos de muestras de alta dureza mediante su inclusión sin descalcificar en resinas especialmente adaptadas para tal fin.

Se obtuvieron tres cortes histológicos para cada una de las 12 muestras disponibles, los cuales fueron examinados mediante microscopía óptica y analizados mediante técnicas de análisis de imagen. Las variables de medida seleccionadas para evaluar la osteointegración de los implantes son las siguientes:

- BIC (*Bone-implant contact*): Relación en porcentaje de superficie de implante en contacto con tejido óseo respecto a la superficie total del implante.
- BVD (*Bone volumen density*): Relación en porcentaje del volumen de tejido óseo localizado entre espiras respecto al volumen disponible.

Tras la determinación de los valores de estas variables, se llevó a cabo el análisis estadístico de los resultados. El método seleccionado fue el test t de Student, por el cual se comprobó la existencia de posibles diferencias estadísticamente significativas entre las medias obtenidas para las variables de estudio en cada uno de los dos grupos experimentales.

RESULTADOS

En la **figura 4** se presentan dos imágenes representativas de los cortes histológicos obtenidos a partir de las muestras resultantes de la experimentación in vivo.

Como puede observarse, aparentemente existe una diferencia entre ambos grupos de estudio en cuanto a la cantidad de tejido óseo alrededor del implante, sobre todo en los espacios generados por los valles de la rosca simulada del implante. También se observa a priori una mayor cantidad de tejido óseo en contacto directo con el implante en el caso del tratamiento con PRGF. En la **tabla 2** se presentan los resultados obtenidos para las variables de estudio, anteriormente definidas, en el periodo experimental de ocho semanas y para los grupos de estudio Control y PRGF.

En la **figura 5** se muestran los diagramas de cajas correspondientes a estos resultados.

En la **tabla 3** se recogen los resultados del análisis estadístico realizado. En el caso de los resultados obtenidos para la variable BIC, el test t de Student refleja diferencias estadísticamente significativas ($p=0,0363 < 0,05$) entre los valores medios obtenidos para cada uno de los grupos de estudio.

A partir de este resultado se concluye que el porcentaje de superficie medio de implante en contacto con tejido óseo es significativamente mayor en el grupo de estudio PRGF ($60,207 \pm 7,328\%$) que en el grupo de estudio Control ($48,545 \pm 9,281\%$).

En el caso de la variable de estudio BVD, del mismo modo que sucede en el caso anterior, el test t de Student desvela diferencias estadísticamente significativas ($p=0,0487 < 0,05$) en las medias obtenidas en cada uno de los dos grupos de

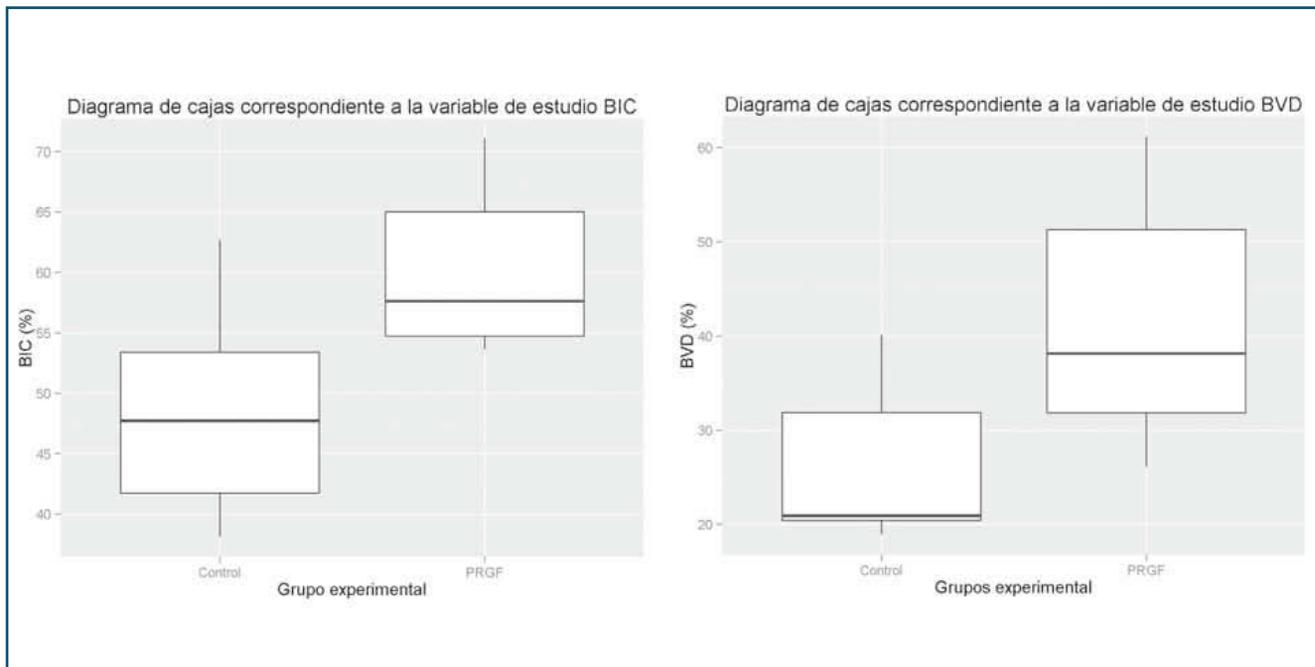


Figura 5. Diagramas de cajas correspondientes a las variables de estudio BIC y BVD obtenidos para los grupos de estudio Control y PRGF.

estudio considerados. Por ello, podemos afirmar que el porcentaje de volumen óseo medio presente alrededor de los implantes correspondientes al grupo PRGF ($41,48 \pm 14,055\%$) es significativamente mayor que el presente en los implantes del grupo de estudio Control ($26,092 \pm 9,196\%$).

Tabla 3. Resumen de los resultados estadísticos obtenidos. Test t de student.

	Estadístico t	Grados de libertad	Valor p
BIC	-2,416	10	0,0363
BVD	-2,244	10	0,0487

Nivel de significación 0,05

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos con el diseño de experiencias planteado, podemos concluir que la aplicación del protocolo PRGF-Endoret influye de manera positiva en la osteointegración de implantes a las ocho semanas de experimentación. Este hecho se ve reflejado tanto en la cantidad de tejido óseo en contacto con la superficie del implante, como en la cantidad de tejido óseo que lo rodea.

Estos resultados confirman la hipótesis de partida, que la aplicación de PRGF-Endoret como tratamiento bioactivo osteoinductor en el momento de la colocación de implantes dentales da lugar a un proceso de osteointegración del implante más rápido y efectivo. ●

Agradecimientos

A la empresa Biotechnology Institute (BTI), por su colaboración durante este estudio.

El proyecto CENIT INTELIMPLANT (Biomateriales Avanzados para una Nueva Generación de Implantes) liderado por

BTI (Biotechnology Institute, S.L.) fue uno de los 16 proyectos aprobados por el Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial (CDTI) en la tercera convocatoria del programa CENIT, que se inscribe en la iniciativa del gobierno español INGENIO 2010. N° Expediente: CENIT-2007-2018.



BIBLIOGRAFÍA

1. **Brånemark PI.** Osseointegration and its experimental background. *J Prosthet Dent.* 1983 Sep; 50 (3): 399–410.
2. **Brunette DM, Tengvall P, Textor M, Thomsen P.** Titanium in Medicine. Berlin: Springer-Verlag; 2001.
3. **Parsegian VA.** Molecular forces governing tight contact between cellular surfaces and substrates. *J Prosthet Dent.* 1983 Jun; 49 (6): 838–42.
4. **Anitua E.** Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1999 Aug; 14(4):529–35.
5. **Whitman DH, Berry RL, Green DM.** Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 1997 Nov; 55 (11): 1294–9.
6. **Anitua E, Sánchez M, Orive G, Andía I.** The potential impact of the preparation rich in growth factors (PRGF) in different medical fields. *Biomaterials.* 2007 Nov; 28 (31): 4551–60.
7. **Anitua E, Orive G, Pla R, Roman P, Serrano V, Andía I.** The effects of PRGF on bone regeneration and on titanium implant osseointegration in goats: a histologic and histomorphometric study. *J Biomed Mater Res A.* 2009 Oct; 91 (1): 158–65.
8. **Anitua E, Sánchez M, Prado R, Orive G.** Plasma rich in growth factors: the pioneering autologous technology for tissue regeneration. *J Biomed Mater Res A.* 2011 Jun 15; 97 (4): 536.
9. **Tejero R, Rossbach P, Keller B, Anitua E, Reviakine I.** Time-of-flight secondary ion mass spectrometry with principal component analysis of titania-blood plasma interfaces. *Langmuir.* 2013 Jan 22; 29 (3): 902–12.
10. **Eppley BL, Pietrzak WS, Blanton M.** Platelet-rich plasma: a review of biology and applications in plastic surgery. *Plast. Reconstr. Surg.* 2006 Nov; 118 (6): 147e–159e.
11. **Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA.** The role of growth factors in the repair of bone. *Biology and clinical applications.* *J Bone Joint Surg Am.* 2002 Jun; 84-A (6): 1032–44.
12. **Sánchez-Illárduya MB, Trouche E, Tejero R, Orive G, Reviakine I, Anitua E.** Time-dependent release of growth factors from implant surfaces treated with plasma rich in growth factors. *J Biomed Mater Res A.* 2013 May; 101 (5): 1478–88.
13. **Anitua E, Tejero R, Zaldueño MM, Orive G.** Plasma Rich in Growth Factors (PRGF-Endoret) Promotes Bone Tissue Regeneration by Stimulating Proliferation, Migration and Autocrine Secretion on Primary Human Osteoblasts. *J Periodontol.* 2012 Oct 22.
14. **Slapnicka J, Fassmann A, Strasak L, Augustin P, Vanek J.** Effects of activated and nonactivated platelet-rich plasma on proliferation of human osteoblasts in vitro. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 2008 Feb; 66 (2): 297–301.
15. **Kark LR, Karp JM, Davies JE.** Platelet releasate increases the proliferation and migration of bone marrow-derived cells cultured under osteogenic conditions. *Clin Oral Implants Res.* 2006 Jun; 17 (3): 321–7.
16. **Kanno T, Takahashi T, Tsujisawa T, Ariyoshi W, Nishihara T.** Platelet-rich plasma enhances human osteoblast-like cell proliferation and differentiation. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 2005 Mar; 63 (3): 362–9.
17. **Torres J, Tamimi F, Martinez P-P, Alkhraisat MH, Linares R, Hernández G, et al.** Effect of platelet-rich plasma on sinus lifting: a randomized-controlled clinical trial. *J. Clin. Periodontol.* 2009 Aug; 36 (8): 677–87.
18. **Quesada-García MP, Prados-Sánchez E, Olmedo-Gaya MV, Muñoz-Soto E, Vallecillo-Capilla M, Bravo M.** Dental implant stability is influenced by implant diameter and localization and by the use of plasma rich in growth factors. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 2012 Dec; 70 (12): 2761–7.
19. **Birang R, Tavakoli M, Shahabouei M, Torabi A, Dargahi A, Soolari A.** Investigation of peri-implant bone healing using autologous plasma rich in growth factors in the canine mandible after 12 weeks: a pilot study. *Open Dent J.* 2011; 5: 168–73.
20. **Anitua E, Alkhraisat MH, Orive G.** Perspectives and challenges in regenerative medicine using plasma rich in growth factors. *J Control Release.* 2012 Jan 10; 157 (1): 29–38.

INSTITUTO DE BIOMECÁNICA DE VALENCIA

El Instituto de Biomecánica de Valencia (IBV) –www.ibv.org– es una asociación sin ánimo de lucro de ámbito nacional que inició sus actividades en el año 1976, en la Universitat Politècnica de València (UPV). Se trata de un centro tecnológico, concertado entre el Instituto Valenciano de Competitividad Empresarial (IVACE) y la UPV, que tiene por fines el fomento y práctica de la investigación científica, el desarrollo tecnológico, el asesoramiento técnico y la formación de personal cualificado en Biomecánica, ciencia interdisciplinar que estudia el comportamiento del cuerpo humano y su relación con los productos, entornos y servicios que utilizan las personas.

El IBV combina conocimientos provenientes de la biomecánica y la ergonomía o la ingeniería emocional y, en la actualidad, los aplica en diez ámbitos de actividad: Automoción y Medios de Transporte, Deporte, Hábitat, Indumentaria, Niños y Puericultura, Personas Mayores y Atención a la Dependencia, Rehabilitación y Autonomía Personal, Salud Laboral, Tecnología Sanitaria y Turismo y Ocio.

Las actividades del IBV en el ámbito de Tecnología Sanitaria tienen como objetivo orientar la innovación hacia la me-

jora de la salud, el bienestar y la calidad de vida de las personas, a la vez que proporcionar a las empresas y entidades que ofrecen productos y servicios sanitarios claves de negocio para mejorar su competitividad y diferenciación.

El instituto pone sus conocimientos y experiencia al servicio de las empresas del sector dental (implantología, ortodoncia, cirugía maxilofacial, prostodoncia, endodoncia, periodoncia, etc.) para aumentar su competitividad, su capacidad de innovación y el valor añadido de sus productos y servicios. Así, el IBV ofrece una completa oferta de servicios tecnológicos para el diseño y evaluación biomecánica de productos sanitarios y biomateriales en el sector dental, así como asesoramiento para la obtención del marcado CE de los mismos.

