

CGF-UNA PROPUESTA TERAPEUTICA para la medicina regenerativa

por Massimo Corigliano*, Luigi Sacco*, Edoardo Baldoni**

*International Academy
of Implantoprosthesis and Osteoconnection

** Universidad de Sassari.
Escuela de especialización en cirugía odontológica
Dir. Prof. Edoardo Baldoni

PALABRAS CLAVE

GF, muestras de sangre, CGF, hueso autólogo, suero, plasma, fibrina, particulado, plaquetas, células madre unipotenciales

RESUMEN

La medicina regenerativa es uno de los objetivos más importantes en la terapias de rehabilitación modernas. Teniendo en cuenta que el mejor sistema de estimulación de tejidos es inducir la regeneración a través de factores de crecimiento autólogos, para este fin se han utilizado con relativo éxito, productos y técnicas que van desde el Tissucol al PRP y del PDGF al PRF, etc.

Desafortunadamente, sin embargo ninguno de estos sistemas ha permitido una estimulación global adecuada. El problema radica en el hecho de que ninguna de las técnicas mencionadas anteriormente utiliza por completo la capacidad de reparación de la sangre enteramente.

Con el CGF estamos tratando de llenar este vacío, aplicando cualquiera de las partes sanguíneas adecuadamente separadas y puestas a disposición de forma individualizada para la bioestimulación de las células o tejidos de su competencia.

INTRODUCCION

La voluntad y el deseo de ser capaz de realizar la reconstrucción de partes de tejidos dañados o perdidos ha sido uno de los aspectos terapéuticos más estudiados por la medicina moderna.

En odontología, con el advenimiento de la GBR hubo un aumento significativo en la investigación de materiales y factores de crecimiento aplicables a técnicas de regeneración ósea (1-29). Se ha pasado luego a través de diferentes técnicas y especialmente por el uso de diferentes tipos de materiales naturales y de síntesis para construir tanto las membranas como los materiales de relleno de la cavidad.

Hemos visto pues que fueron utilizados desde el Gore-Tex al pericardio, de la hidroxiapatita al biovidrio, del fosfato tricálcico al ácido poliglicólico, del hueso animal al hueso humano de banco y muchos otros materiales todos con la intención de bioestimular y osteoinducir la regeneración ósea, pero que en última estancia funciona especialmente bien como relleno.

De hecho todos estos materiales representan la historia del GBR, y todos ellos comparten un hecho fundamental: que no están vivos.

Tal vez esta particularidad parece poco, pero a efectos de una osteoinducción real o una regeneración ósea se vuelve fundamental.

En la medicina regenerativa los factores que promueven el fenómeno son múltiples y son administrados principalmente por el metabolismo bioquímico y hormonal del paciente.

A continuación encontrará algunos de los factores que contribuyen a la regeneración de los tejidos.

LAS CELULAS MADRE

Estas responden a una escala de capacidad proliferativa con diferente potencial en función del estado de diferenciación y se clasifican en:

- Progenitor de otras células
- Indiferenciada
- No especializada
- De proliferación ilimitada o prolongada

Las células madre bajo la estimulación adecuada pueden diferenciarse y especializarse, pudiendo expresar las siguientes características:

- **Totipotenciales**
- **Pluripotenciales**
- **Unipotenciales**

Las células madre unipotenciales están presentes en la sangre.

MODULADORES LOCALES NATURALES

Los productos moduladores locales para la estimulación y remodelación ósea son:

Factores de crecimiento de la insulina (IGF)

Los factores de crecimiento similares a la insulina son polipéptidos que dependen de las hormonas y difieren en IGF-I e IGF-II. Encuentra una elevada expresión en el periostio, en el callo fibroso de la fractura, en el hueso ectópico inducido por la matriz ósea demineralizada. Son producidas por células óseas, pero se pueden incorporar en la matriz calcificada y ser liberados durante la reabsorción. Ejercen sus efectos principalmente sobre los precursores de osteoblastos, la estimulación de la diferenciación y la proliferación, sino también en los propios osteoblastos que se estimulan para replicarse. También promueven la expresión del colágeno tipo-I y la síntesis de la matriz ósea, ayudando a acelerar el proceso de curación.

Factores de crecimiento de fibroblastos (FGF)

Son una familia numerosa de polipéptidos (de FGF-1 a FGF-18), los más importantes son FGF-a ácido) y FGF-b (básico), también conocidos como factores de crecimiento unidos a la heparina. Encuentran su expresión en la curación ósea después de fracturas, así como durante el desarrollo de los sistemas vasculares, nervioso y esquelético, y en una variedad de tejidos normales y neoplásicos. Favorecen la angiogénesis, la quimiotaxis y la mitogénesis, la estimulación del crecimiento de los fibroblastos, mioblastos, osteoblastos, células endoteliales y células neuronales.

Las citoquinas

Las citoquinas, sobre todo IL-1 y TNF- α son un potente estimulante de la reabsorción ósea:

- La IL-1 actúa directamente sobre el hueso a través de la activación de los factores de transcripción NF- κ B, induce la síntesis de otras sustancias reabsorventes, como IL-6, el TNF- α , y el PGE2
- La IL-6 y TNF- α además de estimular la reabsorción del hueso, también promueven la replicación de las células osteoclasticas (osteoclastogénesis);
- La PGE2 de una parte media en la reabsorción ósea inducida por la IL-6 y por la otra promueve el reclutamiento de células de la línea osteoblástica estimulando la síntesis de colágeno.
- La VEGF (Vascular Endotelial Growth Factor) es un potente promotor de crecimiento vascular. Es producido por células periféricas de la sangre (macrófagos y células T) pero sobre todo por las plaquetas. Tiene un papel directo en el control de las células endoteliales y en particular en su proliferación, la migración y la especialización. La mera presencia de esta citoquina es suficiente para estimular la angiogénesis.

FACTORES DE CRECIMIENTO DEL HUESO (GF)

Ya se ha evidenciado como la regeneración ósea se lleva a cabo bajo la influencia sistémica de las hormonas tales como la Paratormona, Calcitonina y la vitamina C, etc., que contribuyen a los procesos de reabsorción y neoaposisión ósea.

Los factores más activos se codifican como BMP (proteínas morfogenéticas óseas) y su función es estimular y mediar en el crecimiento de células diana a través de una interacción entre las interfases ligante-receptor de las superficies celulares (Andreana y Ciancio 1993).

Los factores de crecimiento están presentes en diferentes tejidos o parte de ellos:

- En la sangre y el plasma
- En la matriz ósea

Donde tienen un papel importante en la osteoneoformogénesis y en la reorganización y remodelación además de participar en el proceso de reparación ósea.

Factores de crecimiento similares a la insulina

Los factores de crecimiento similares a la insulina (IGF-I e IGF-II) o somatomedinas, estimulan la actividad de los osteoblastos de los cuales son producidos y aumentados la producción de colágeno.

La Osteoprotegerina (OPG)

La osteoprotegerina (ÓPG) es una citoquina de la familia de Factores de Necrosis Tumoral que a diferencia del TNF- α , tiene una potente acción inhibidora de la osteoclastogénesis.

Factores de crecimiento transformadores (TGF)

Los factores de hueso transformadores (TGF) comprenden una superfamilia de moléculas que disputan el control de muchos aspectos de la función celular. Son plaquetas sintetizadas, macrófagos, células endoteliales, queratinocitos y condrocitos. Los TGFs- β son principalmente expresiones de los osteoblastos maduros en plena actividad, tanto durante el desarrollo o el crecimiento óseo como durante la curación de las fracturas. Estos factores en particular el TGF- β tienen un papel destacado sobre el crecimiento y la diferenciación de numerosas células, incluyendo los osteoblastos. Su producción en los osteoblastos es estimulada por la vitamina D, PTH, estrógenos y testosterona. Estos factores inhiben la reabsorción ósea, previniendo la formación de precursores osteoclasticos de los osteoclastos maduros.

La proteína morfogenética del hueso (BMP)

La proteína morfogenética del hueso (BMP) estimula las células pluripotentes a diferenciarse en células productoras de tejido cartilaginoso y óseo. Se expresan durante la edad de desarrollo y de crecimiento y también en el callo óseo después de una fractura

y localmente después de la implantación de sustratos programables. además están implicados en la morfogénesis y el desarrollo de otros numerosos tejidos y órganos como los folículos pilosos, corazón, riñón, ovocitos, próstata y especialmente importante están implicados en la morfogénesis del tejido del diente.

Factores de crecimiento de los fibroblastos (FGF)

Los factores de crecimiento de los fibroblastos (FGF) juegan un papel importante en el desarrollo y regeneración del hueso y en el proceso de reparación de la fractura; su actividad se lleva a cabo principalmente a través de la estimulación de la angiogénesis ósea un acontecimiento crítico para la formación de tejido óseo.

MODULADORES LOCALES DE SINTESIS

Los moduladores locales de síntesis para estimulación y remodelación ósea, han sido objeto de numerosas investigaciones, de las cuales hemos visto diferentes sistemas de preparación y concentración de factores de crecimiento, sistemas que enumeramos a continuación.

Tecnologías conocidas;

- **Adhesivo de Fibrina** (Tissucol Baxter)
- **Concentrado de Plaquetas cPRP** (Marx 1998)
- **Plasma Rico en Plaquetas (PRP)**
- **Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF)** - E. Anitúa 1998)
- **Plasma Rico en Fibrina (PRF)** - J. Choukroun 2001)
- **Factores de crecimiento Concentrados (C.G.F)** - Concentrated Growth Factors 2006, IAIO)

Adhesivo de fibrina

El adhesivo de fibrina humana es un pegamento biológico tratado con calor, no tóxico y bien tolerado. Contiene fibrinógeno y factor XIII (reconstituido a 37° con una solución de aprotinina, que tiene la función de determinar una reabsorción más lenta de la fibrinólisis local). La trombina bovina se reconstituye en una solución de cloruro de calcio a la concentración de 4 U.I./ml o de 500 U.I./ml. La solución, mantenida a 37°, se une formando el adhesivo de fibrina en el momento de empleo. Para unir las dos sustancias se utiliza una jeringa de dos vías llamada duploject, que permite que las dos soluciones reaccionen solo cuando salen por la punta.

Actualmente el adhesivo de fibrina más utilizado es el Tissucol (Baxter) , donde se obtiene el concentrado de fibrinógeno a través de repetidos pasajes de precipitación termoquímica y donde las concentraciones de fibrinógeno y factor XIII son muy altas. Las soluciones de trombina se preparan con plasma humano⁽³⁰⁻⁴⁹⁾.

Plasma Rico en Plaquetas (PRP)

El concentrado de plaquetas, obtenido a partir de la sangre del paciente, permite utilizar los factores de crecimiento autólogos (PDGF, IGF-I, IGF-II, TGF- β 5) no inmunogénicos ni tóxicos, capaces de acelerar los procesos normales de regeneración ósea y de incrementar la calidad y cantidad de hueso neoformado. Cuando el concentrado de plaquetas, preparado en forma de gel, se mezcla con material de relleno, del cual la mejor expresión es el hueso autólogo, se obtiene un injerto de características óptimas, para facilitar la estabilización y el tiempo de mineralización, en teoría, significativamente superior al hueso autógeno solo. La técnica requiere la recolección de aproximadamente 60 ml de sangre venosa del paciente y permite obtener un concentrado de plaquetas en unos 45 minutos mediante dos pasos de centrifugación diferentes, del cual el producto intermedio es un Plasma Rico en Plaquetas (PRP).

- Para su elaboración es necesario utilizar un aparato de análisis específico de laboratorio y la colaboración de un hematólogo.

Obteniendo al final un concentrado plaquetario (PRP) que viene activado para formar un gel de injerto mediante la adicción de 80 mM de Cloruro de Calcio y Botropase⁽⁵⁰⁻¹⁶²⁾

El PRP, en la práctica por lo tanto es un concentrado de plaquetas que en su destrucción libera factores de crecimiento llamados Platelet Derived Growth Factors (PDGFs) que promueven la osteogénesis. El PDGF promueve la angiogénesis y actúa sobre los precursores de los osteoblastos, en los cuales se induce una notable actividad mitogénica.

Aumentando por lo tanto el número de células de la línea blanca osteoblástica, que son capaces de estimular los osteoblastos por sí mismos a la replicación celular y a la sintetización del colágeno, pero su función diferenciadora y morfogenética contra el tejido óseo es sin duda inferior al de otros factores de crecimiento. De hecho la bibliografía internacional documenta un crecimiento óseo, inducida por PRO, de alrededor del 10% del volumen aplicado. Así a pesar de su potencialidad biológica, el PRP tiene un rendimiento osteogénico relativamente bajo (Malchiodi 2001, CED Rome, bib. 163-166).

Por esta razón se han desarrollado tecnologías alternativas tales como el PRF.

Plasma Rico en Factores de Crecimiento

Platelet Rich Growth Factors (PRGF E. Anitua 1998) El PRGF es una fase producida por centrifugación de la sangre venosa situada debajo de la capa leucocitaria y que se recoge mediante una pipeta.

El uso de PRGF, mezclado con biomateriales, matriz de fibrina o utilizado directamente en el sitio, consiente la bioestimulación del tejido para regeneración , potenciando la acción reparadora localmente⁽¹⁶⁷⁻²¹⁷⁾

Plasma Rico en Fibrina

Platelet Rich Fibrin (PRF, Choukroun): es un producto realizado utilizando sangre venosa recién extraída. Para lograrlo, tal como indica el protocolo descrito por Choukroun y col. en 2001 (214-257), es suficiente centrifugar la sangre para separar los componentes. El PRF, aún siendo un producto de la sangre no está sujeto a manipulación, pudiendo realizarse en la práctica dental, siempre y cuando se utilice una centrifuga certificata para este uso.

El PRF se presenta como un gel denso y rico en fibrina, resistente a la tracción y al cizallamiento. No necesita de cobertura y puede actuar como una membrana. El mecanismo de funcionamiento del PRF es la bioestimulación del tejido sobre el que se aplica.

El PRF tiene un efecto analgésico, anti-inflamatorio y analgésico muy apreciado.

El PRF se realiza por centrifugación de la sangre durante 12 minutos a 2700 rev/min y una vez separado de los otros componentes de la sangre, se almacena temporalmente en ambiente refrigerado a una temperatura constante comprendida entre 12 y 15 °C.

FACTORES DE CRECIMIENTO CONCENTRADOS (CGF)

Porque creemos en la extraordinaria capacidad regenerativa inducida por la sangre, y sabiendo que todos los componentes necesarios para la regeneración están libres y circulantes en la misma, hemos estudiado como utilizar todo su potencial reparador y regenerador, no limitándonos solamente a utilizar ciertas partes, como ha sido hasta ahora propuesto por los otros protocolos. El CGF es un protocolo terapéutico que se obtiene a diferencia del PRP, PRGF y PRF, por separación de sangre venosa, a temperatura constante, mediante un rotor a velocidades alternas y controlada con una aceleración siempre por debajo de RCF300.

Es característico en los CGF observar cuatro fases:

1. Una fase superior representada por el suero (plasma sanguineo sin fibrinógeno ni factores de la coagulación).
2. Una fase intermedia compuesta por una matriz de fibrina polimerizada muy grande y densa.
3. Una fase líquida que contiene GF, células de la línea blanca y células madre a la espera de identificación para la identificación definitiva.
4. La porción inferior es representada por un coágulo rojo viscoso, denso y rico en plaquetas. (Fig. 1).

1) Suero

El suero es la parte más ligera y líquida de la sangre. Es fundamental para nuestra técnica, ya que es el líquido de amalgamación para todos los injertos, además de aportar muchos componentes y activadores bioquímicos.

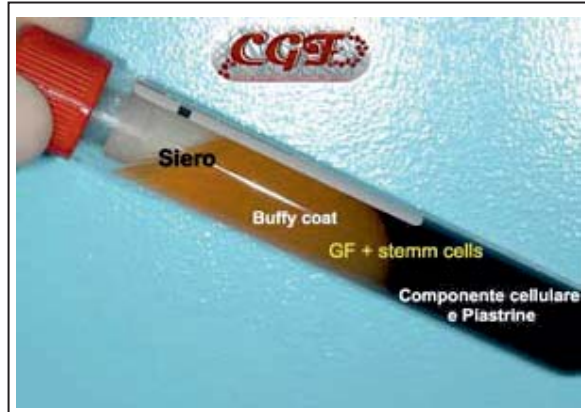


Fig. 1 Imagen de una probeta en la cual la sangre se ha transformado en las 4 fases del CGF: suero, matriz de fibrina, GF y células madre, coágulo.

Está libre de fibrinógeno y escaso de células. Se debe mantener fresco y debe mezclarse rápidamente para no evitar la desnaturalización de las proteínas.

Tiene un color amarillo paja y se compone de:

- 92% H₂O
- 7% proteínas, sales minerales, CO₂:
- Proteínas: albúmina, Anticuerpos
- Nutrientes: hidratos de carbono, aminoácidos, lípidos
- Enzimas
- Hormonas
- Eletrólitos inorgánicos

El suero se utiliza para el lavado de las cavidades que deben ser regeneradas y como líquido de cobertura y protectorio para todas las porciones regeneradas.

2) Matriz de Fibrina

Gracias a la rotación calibrada realizada con la centrifuga (Silfradent, Italia) se produce la polimerización de las moléculas de fibrinógeno (FG) en una forma de gel, esta matriz de fibrina está formada por una red polimérica tridimensional de fibras entrelazadas todas recogidas en una sola fase.

Durante la polimerización las fibras aumentan de diámetro hasta el final de la reacción (Fig. 2-3).

Este concepto explica porqué es importante ajustar el aparato de una manera específica que garantice la máxima explotación del potencial de la sangre mediante el control de los siguientes parámetros;

- Velocidad
- Temperatura
- Tiempo
- Aceleración y velocidad controlada
- Aceleración gravitacional de alrededor de RCF200

La realización y el crecimiento de la matriz de fibrina durante la rotación, consiente en la fase de polimerización un aumento volumétrico de las cadenas en todas las direcciones (Fig. 4).

De esta manera quedan atrapados muchos componentes corpusculares que determinan numerosas actividades terapéuticas como son;

- Citoquinas plasmáticas y plaquetas: efecto reparador, antiinflamatorio, y analgésico. Expresados durante la reparación (TNF-a).
- Plaquetas: transmisión de las señales y la liberación de GF. Las más importantes son el PDGF-BB el TGF13 y el IGF-1 (Fig. 5).

Obtenemos entonces una matriz de fibrina en gel con un notable volumen y una óptima resistencia que podemos utilizar como:

- Rellenos de cavidades
- Sostén auxiliar para membranas.
- Membranas autólogas.
- Particulado para ser mezclado con otro material de relleno.

Esto se traduce en una gran facilidad de trabajo, en una elevada capacidad de inducción regenerativa y en una mayor versatilidad de uso de la matriz de fibrina en sus diferentes usos, que van desde la matriz entera al particulado o la membrana.

3) Factores de crecimiento y células madre unipotenciales

Suspendido debajo de la capa leucocitaria y antes de la porción del coágulo denso. Esta fase puede ser aspirada mediante una pipeta de laboratorio o una jeringa y se mezcla directamente con hueso autólogo para obtener un injerto activado de alto rendimiento.

4) Coágulo

En la técnica CGF la fase roja está compuesta del concentrado de glóbulos rojos, blancos, plaquetas y factores de crecimiento. Tiene un aspecto de gel denso de color marrón rojizo y puede ser utilizado completamente o mezclado con el particulado de fibrina y/o con hueso autólogo o heterólogo para el relleno de cavidades voluminosas.

Por lo tanto podemos decir que el CGF en la medicina regenerativa debe ser visto como un sistema de estimulación multifactorial, utilizando efectivamente todos los componentes dependiendo de las necesidades específicas.

Esta versatilidad y aplicabilidad multifuncional lo caracteriza y lo diferencia de todas las técnicas propuestas hasta ahora.



Fig. 2-5 CGF: Esta secuencia muestra como las moléculas de la matriz de fibrina del CGF se estructuran de una manera estrechamente regular, permitiendo la encastración de moléculas, de anticuerpos, células blancas, rojas, madre y plaquetas.



Fig. 6 Muestra venosa realizada con el sistema estéril Vacuette

MATERIALES Y METODO

La realización de CGF se inicia tomando una muestra de sangre venosa usando una aguja de mariposa, una probeta Vacuette Z Serum Clot activador de 9 ml y una aguja Vacuette de medida 21 x 3/4, (Greiner bio., one, Austria, Fig. 6).

Una vez llenas, las probetas se pusieron, no contra ellas, en el porta probetas de la centrífuga Medifuge (Silfradent, Italia, Fig. 7), que tiene unas características únicas en cuanto a:

- las características estructurales y mecánicas. como por ejemplo el porta-probetas monolítico esterilizable (Fig. 8)
- la inclinación calibrada de las probetas (Fig. 9)
- la temperatura de trabajo
- la desinfección de la cámara de rotación
- las características dinámicas
- el ajuste de las indicaciones, de la aceleración de la velocidad y del freno que se imprime al fluido centrifugado.
- la desinfección automática con la tapa cerrada.

Dando todo esto lugar, en la probeta, a la consecución de los componentes más diferenciados.



Fig. 7 Separador de fases hématicas Medifuge (Silfradent Italia). Este aparato está configurado para asegurar el control de la velocidad y de la aceleración adecuada para la separación de la fase hemática sin dañar los componentes.

- después de casi 13 minutos de rotación, con un set estéril apropiado (Fig. 10), el suero se separa de las fases restantes de CGF y se preserva.
- la fase de fibrina se separa y se conserva en una solución antibiótica diluida (Lincocin 600 mg).
- la porción inicial del coágulo, contiene GF y células madre, y es inmediatamente conservada en un contenedor especial.
- el coágulo, rico en glóbulos rojos y plaquetas además de hierro y calcio y otros componentes fundamentales, se prepara para ser utilizado como masa de relleno, para mezclar con biomaterial o hueso autólogo tomado por osteotomía (Fig.11).

La matriz de fibrina en cambio, separada de la fase roja, se prepara para ser transformado de acuerdo con las necesidades de la cavidad para su acoplamiento directo en forma de membrana con una pinza (Fig. 12 y 13) o en un particulado de injerto mezclado con biomaterial y hueso autólogo vivo (Fig. 14).

- En el caso de que quiera realizar un injerto de CGF para una cavidad amplia, se requiere una preparación específica, que describimos a continuación.

La matriz de fibrina se corta en partículas de aproximadamente 1-2 mm mientras que el coágulo se se fragmenta y se mezcla.



Fig. 8 Imagen del portaprobetas monolítico Medifuge Este componente es fácilmente desmontable y puede ser esterilizado en autoclave.



Fig. 9 Medifuge con las tubos insertados en el portaprobetas



Fig. 10 - Conjunto de dappen estériles que permiten la separación y almacenamiento de las fases sanguíneas de Medifuge



Fig. 11 Separación del coágulo de la matriz de fibrina. Esta porción se deposita en un dappen estéril cerrado para evitar una oxidación excesiva de la hemoglobina, de los glóbulos rojos y la excesiva disgregación de las plaquetas.

el particulado de fibrina se mezcla con sangre fresca al material de injerto adicional, del que es la máxima expresión el hueso autólogo. Para aumentar la pastosidad de la mezcla, se añade una cuota de suero y se mezcla, homogeinizando todo mecánicamente con el dispositivo Round Up (Silfradent, Italia) durante aproximadamente 6 segundos (Fig. 15).

Esta preparación, resulta en una pasta densa y particularmente adhesiva, se inserta en la cavidad o en el defecto óseo, y tiene una alta capacidad plástica que permite una perfecta adaptación al defecto.

El total se recubre con membranas de CGF realizadas apretando la matriz de fibrina con la pinza formadora. Para cubrir las heridas o las zonas reconstruidas se utilizan membranas de CGF, que al ser muy adhesivas se pueden unir unas con otras y que al ser muy elásticas también se pueden suturar. Otra de las ventajas de la membrana de CGF es que puede quedarse expuesta sin el riesgo de infectarse.

Un procedimiento adicional que realizamos al final de la terapia, es pincelar la herida con suero.



Fig. 12 Imagen de la membrana realizada. comprimiendo la matriz de fibrina con la pinza formadora



Fig. 14 Imagen del particulado de fibrina mezclado con material de injerto. La mezcla homogénea se realiza con el aparato Round-up en solo 6 segundos.

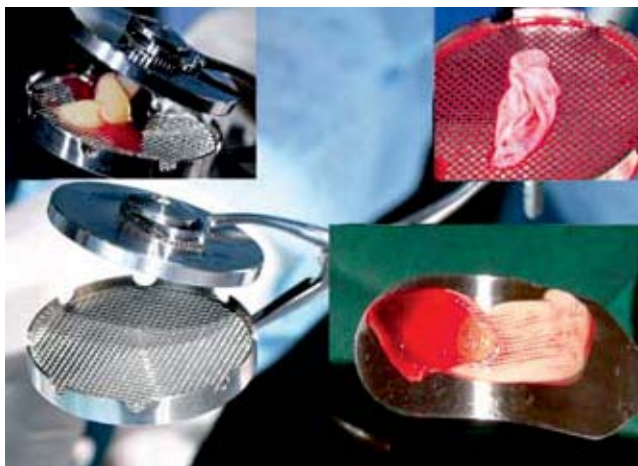


Fig. 13 - Imagen de la membrana impresa con la pinza formadora y posicionada sobre la espátula, lo que permite el correcto y simplificado posicionamiento.



Fig. 15 Round Up aparato de mezcla homogenizador