

Artículo de revisión

Plasma Rico en Plaquetas vs. Plasma rico en factores de crecimiento.

J. CARRASCO*, D. BONETE**, F. GOMAR *

*DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA. UNIVERSIDAD DE VALENCIA. **SERVICIO DE TRAUMATOLOGÍA. HOSPITAL LA FE VALENCIA.

Resumen. El desarrollo de los preparados plasmáticos ha generado grandes expectativas en la reparación ósea y han alcanzado gran desarrollo comercial de los kits de obtención del Plasma Rico en Plaquetas (PRP), también conocido como concentrado rico en plaquetas (PRC), gel de plaquetas autólogo, y plasma rico en factores de crecimiento (PRF) y su efecto sobre la regeneración esquelética. La generación de concentrados plasmáticos de plaquetas tiene como objetivo la liberación de factores de crecimiento sostenida en el tiempo de forma autóloga. Existe muy poca evidencia clínica de sus efectos, y una gran variabilidad a la hora de preparar los concentrados, con grandes diferencias en la cantidad de plaquetas y factores de crecimiento que contienen, lo que no permite protocolizar su uso clínico. No hay una relación directa entre el número de plaquetas del concentrado plaquetario obtenido y la concentración final de factores de crecimiento, por lo que PRP y el PRF no son exactamente el mismo producto. Hay que insistir en la importancia de diferenciar entre las funciones que desempeñan los factores de crecimiento "per se", y las que realiza el preparado plaquetario. En la literatura actual no se encuentra ninguna evidencia científica que demuestre la supuesta aceleración de la curación de las fracturas con la aplicación del PRP/PRF. Los buenos resultados de su aplicación en lesiones musculares, tendinosas, o en su empleo en cirugía artroscópica, son estudios clínicos preliminares que deben ser mejor evaluados. Es necesario profundizar en el estudio de estos concentrados, determinando y cuantificando los factores de crecimiento "in situ" tras su aplicación para poder valorar su verdadero efecto en la regeneración de los distintos tejidos, incluido el óseo, para valorar su verdadera utilidad clínica y poder protocolizar su uso.

Platelet-rich plasma vs. Plasma rich in growth factors.

Summary. The development of plasma prepared in the scientific community has high expectations and a wide dissemination of commercial kits for obtaining platelet-rich plasma (PRP), also known as platelet-rich concentrate (PRC), platelet gel, autologous or plasma rich in growth factors (PRF) and its effect on bone regeneration. The generation of concentrated plasma as working hypothesis is a step forward because the concentration in the number of platelets allows the release of growth factors sustained over time in linear form relationship. There is very little clinical evidence, and a great variability in the preparation of concentrates as well as the amount of platelets and growth factors to provide them as a basis for their use. There is no significant relationship between the number of platelets and the concentration of growth factors which do actually consider whether the PRP and PRF are exactly the same product. We stress the importance of differentiating between the roles played by growth factors "per se", and which performs the platelet ready. The current literature not found any evidence showing the alleged acceleration of healing fractures to the implementation of PRP/PRF. There are reports on its use in muscle, tendon, injuries or their employment in arthroscopic surgery, but it is a preliminary discusses clinical studies. It is therefore necessary to advance in the experimental study that includes the identification and quantification of growth factors in situ in the application of PRP on the regeneration of injuries that allows us to deepen our understanding of the biological behavior of platelet growth factors in bone repair.

Correspondencia:

Joaquín Carrasco Luna.
Departamento de Cirugía
Facultad de Medicina y Odontología
Avd/Blasco Ibáñez 17
46010 Valencia
Joaquin.Carrasco@uv.es

Introducción

El hueso se encuentra entre los pocos órganos que presentan procesos de regeneración más que una simple

reparación. La reparación ósea puede considerarse como un fenómeno regenerativo debido a que se reestablece la organización estructural característica, incluida la médula ósea y sus componentes¹.

Cuando el hueso presenta soluciones de continuidad, ya sea por fracturas u otros defectos, se ponen en marcha de inmediato los mecanismos osteoformadores con la finalidad de restaurar el tejido óseo en el lugar de la lesión. Habitualmente, la biología del hueso es suficiente para reconstruir los defectos menores, no obstante, en

pérdidas mayores de masa ósea es imprescindible recurrir al aporte de sustitutivos óseos para obtener la reparación²⁻⁴.

La necesidad de tratar defectos óseos de diferente etiología, magnitud y localización ha estimulado enormemente la búsqueda y desarrollo de materiales capaces de sustituir al hueso.

Actualmente el mejor sustitutivo óseo es el hueso mismo, ya sea autólogo, como en el caso del autoinjerto óseo, o bien obtenido de un donante, aloinjerto óseo. El autoinjerto o injerto autólogo continua siendo el único biomaterial que posee la capacidad osteogénica, osteoinductora y osteoconductora, pero este genera una gran morbilidad de la zona donante y su disponibilidad es limitada⁵.

La progresiva complejidad de los procedimientos de reconstrucción, así como la disponibilidad de tejido musculoesquelético procedente de donantes humanos, ha potenciado la creciente utilización de injertos en cirugía ortopédica. La congelación de los injertos (por debajo de -60° C) produce una reducción de la respuesta inmunológica, mientras que otros métodos de procesado, como la liofilización, a la vez que reducen significativamente la reacción inmunológica, deterioran otras cualidades, como las propiedades físicas y biológicas, reduciendo la capacidad osteoinductiva por degradación de las proteínas⁶.

En la utilización de autoinjertos frescos y congelados se observa radiográficamente formación de callo óseo en la unión proximal a los 15 días y en aloinjertos congelados a los 22 días, siendo los aloinjertos frescos más tardía alrededor de 25 días. La consolidación global de los injertos es de 80.5% a las 8 semanas de evolución hay una revascularización de los injertos por vasos procedentes de las partes blandas. Los procesos de reabsorción y formación de hueso es más intensa en el extremo proximal⁷.

Una parte de las células de un injerto óseo se mantienen vivas, y con capacidad osteogénica, en ello radica las ventajas del injerto autólogo fresco sobre los criopreservados y sobre todo, sobre los aloinjertos. La estructura del injerto se comporta como osteoconductora permitiendo el crecimiento de nuevo hueso que debe sustituir al injerto. La incorporación de los injertos está favorecida por la fragmentación de las piezas, ya que sobrevive un mayor número de células, ya que el aumento de superficie del injerto favorece su nutrición, y el fenómeno de sustitución por nuevo hueso en el denominado proceso de "sustitución por arrastre" (creeping substitution)⁸.

Las situaciones clínicas en las que existen grandes pérdidas de hueso, bien por su evolución o bien por el

tratamiento efectuado, son cada vez más frecuentes y los objetivos de la cirugía cada vez más ambiciosos. En estas condiciones la utilización de injertos autólogos están restringidos por la limitación de zonas donantes, sin olvidar la alta morbilidad en la extracción de los injertos; por su parte los aloinjertos tienen sus limitaciones, alto coste y no están totalmente exentos de riesgos biológicos. Son necesarias nuevas propuestas para la reparación de los defectos óseos.

Desde hace años hemos asistido al desarrollo de nuevos biomateriales que aportan sus propiedades mecánicas y actúan como andamiaje que favorecen la invasión de hueso originado desde el hueso vivo vecino. Por otro lado, la investigación celular ha avanzado extraordinariamente, permitiendo obtener y reproducir las células madres, o células inmaduras, orientando su diferenciación a la extrirpe tisular que nos interese. Finalmente se van conociendo y aislando los distintos factores de crecimiento que actúan en todas las fases del ciclo celular y su actividad metabólica, pudiendo actuar sobre ella. Surgió hace tiempo el concepto de ingeniería celular, la construcción de un nuevo tejido a partir de nuevas células, andamiajes tisulares adecuados y estímulo mediante factores de crecimiento⁶. Las grandes esperanzas que han levantado están muy lejos de conseguir después de bastantes años de investigación

Si bien las soluciones mecánicas han sido el pilar de intervenciones ortopédicas para trastornos musculoesqueléticos, en la actualidad está en marcha la búsqueda de nuevas estrategias de tratamiento⁹. Los productos denominados ortobiológicos abarcan una amplia gama de productos, a nivel macroscópico, como son los sustitutos de injerto óseo (polímeros, cerámica, etc.) Hasta a nivel microscópico, como son tratamientos con factores de crecimiento, proteínas morfogenéticas y otros sustitutivos como P15, etc.

El tratamiento quirúrgico de las fracturas no consolidadas a menudo requiere el uso de materiales osteogénicos en la presencia de una adecuada estabilización para establecer una continuidad ósea. El P15-BGS parece ofrecer una alternativa segura, económica y clínicamente útil al autoinjerto en la reparación de este tipo de fracturas¹⁰.

Cada vez se hace más necesaria la utilización de una serie de sustancias promotoras del crecimiento en las zonas donde el sistema músculo-esquelético tiene una lesión, con un importante papel en la reparación ósea. Así el factor β transformador del crecimiento, las proteínas óseas morfogenéticas, los factores de crecimiento de fibroblastos, los factores de crecimiento tipo insulina y

los factores de crecimiento derivados de plaquetas¹¹, son los tipos más usuales de sustancias utilizados¹².

Existen tres importantes áreas condicionantes en la reparación de las heridas:

- 1°. Ambiental. La herida debe ser estable, cerrada, bien vascularizada y libre de infección
- 2°. Celular. Las células reparadoras deben ser capaces de migrar a los bordes de las heridas desde el tejido sano.
- 3°. Bioquímica. Los factores de crecimiento y otras citocinas deben estar presentes en concentración suficiente para estimular los mecanismos de reparación tisular¹³.

Los factores de crecimiento tienen un elevado coste económico, y son necesarias dosis repetidas para conseguir un efecto terapéutico clínicamente evidente^{14,15}. Por este motivo, la hipótesis de trabajo que ha conducido al desarrollo del PRP es que en un producto con mayor concentración de plaquetas, los niveles de factor de crecimiento aumentarían en relación lineal con el número de plaquetas¹⁶. La producción de este gel permitiría por tanto una liberación sostenida de los factores de crecimiento.

De todas estas soluciones hay muy poca evidencia clínica para proporcionar una base para su uso. Esto es especialmente cierto para el plasma enriquecido en plaquetas, también conocido como plasma rico en plaquetas (PRP), concentrado rico en plaquetas (PRC), o gel de plaquetas autólogo.

Plaquetas

Las plaquetas son el producto final de los megacariocitos y se forman en la médula ósea. No tienen núcleo y no se pueden replicar¹⁷.

Las plaquetas ayudan a prevenir la pérdida de sangre en las heridas vasculares para ello adhieren agregados y forman una superficie precoagulante favoreciendo la generación de trombina y fibrina¹⁸. Las plaquetas actúan en la curación de las heridas de la siguiente manera:

- 1°. Aparecen inmediatamente en el lugar de la herida en grandes cantidades
- 2°. Crean el ambiente local (in situ) necesario para la regeneración tisular gracias a la liberación de proteínas secretadas por la activación de los gránulos alfa.

Además las plaquetas expresan y liberan sustancias que favorecen la reparación tisular e influyen en los procesos de angiogénesis, inflamatorios y respuesta inmune¹⁹.

Desde los años 90 se ha venido utilizando preparados plasmáticos autólogos con unas diferencias muy significativas con respecto al proceso natural del hematoma. Así la composición natural en el lugar de la herida supone 95% de células rojas, 4% de plaquetas y un 1% de serie blanca, en cambio en los preparados autólogos de plaquetas, el 95% son plaquetas, 4% células rojas y 1% de serie blanca¹⁷.

Ya en 1994, se empezó a utilizar un adhesivo de fibrina autógena en el hueso esponjoso durante la reconstrucción mandibular²⁰. Para ello recurrieron a la separación de una muestra de sangre en sus componentes y emplearon la fracción plasmática como crioprecipitado. Observaron una consolidación ósea precoz, reduciendo el tiempo de 8 semanas a 4 semanas que se atribuyó al mayor número de células osteocompetentes que quedaban en la red de fibrina.

En 1997, Whitman utilizó el gel de plaquetas en cirugía oral y máxilofacial, utilizándolo no sólo como adhesivo tisular sino también como procedimiento para la consolidación inicial de injertos córtico-esponjosos en los maxilares²¹.

Posteriormente se desarrolló la técnica del gel plaquetario con todas las proteínas plaquetarias y menor concentración de fibrinógeno²².

Marx y cols.²³ observaron la presencia de 2 factores de crecimiento: PDGF, TGF-β1 en los concentrados de plaquetas utilizados. Observaron que las células esponjosas tenían receptores para estos factores de crecimiento, y concluyeron que:

1. La adición de PRP aceleraba la velocidad de formación ósea y el grado de formación ósea durante al menos 6 meses.
2. Era técnicamente posible secuestrar, concentrar y añadir un mayor número de plaquetas (y en consecuencia de factores de crecimiento) a los injertos óseos.
3. Las células madre de la médula esponjosa contenían receptores para los factores de crecimiento.

Se hace necesario estudiar por tanto las características del PRP, el procedimiento de aplicación, los periodos de tiempo en su aplicación en conjunción con la naturaleza de las heridas¹⁵.

PRP

El plasma rico en plaquetas es un volumen de plasma autólogo que posee una concentración de plaquetas superior a los valores basales. El valor medio de plaquetas plasmáticas es de 200.000/μl aproximadamente. Se ha



Figura 1: Coagulo de PRP.

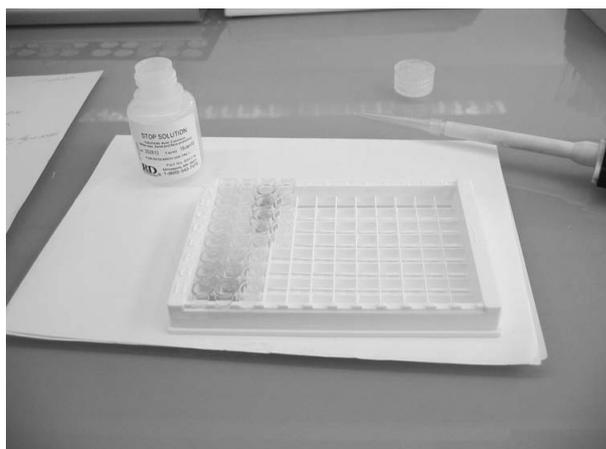


Figura 2: La determinación de los distintos factores de crecimiento se lleva a cabo mediante un ensayo que utiliza la técnica ELISA, mediante anticuerpos monoclonales específicos para cada uno de los factores de crecimiento.

considerado que la concentración de 1.000.000 plaquetas por μl es el valor ideal para asegurar un aporte de factores de crecimiento óptimo para potenciar la consolidación de huesos y tejidos blandos. Por otro lado se ha demostrado que concentraciones superiores no tienen efecto o es un efecto negativo.

En la tabla 1 podemos observar los distintos métodos de enriquecimiento en el número de plaquetas según los diferentes autores.

El plasma rico en plaquetas (PRP) ha supuesto un avance decisivo en la estimulación y la aceleración de la consolidación de huesos y partes blandas. Es una biotecnología relativamente nueva que representa el interés creciente que despierta actualmente la ingeniería de tejidos y terapia celular. Esta tecnología, no está exenta del riesgo de que no se comprenda con exactitud su manipulación y se realice un uso incorrecto²⁴.

Hay autores que consideran el PRP óptimo se consigue mediante una sola centrifugación, en cambio²⁵, Max et al aseguran que el PRP obtenido con una sola centrifugación no es un PRP, sino una mezcla de PRP y PPP (plasma pobre en plaquetas). Valores de PRP por debajo de 4 veces el nivel basal es un PRP diluido. Según el método utilizado se obtienen entre 3-8 veces el nivel basal.

El PRP contiene dos tipos de componentes uno fibrilar y otro celular. Esta estructura perfectamente reconocible en microscopía electrónica le permite actuar como vehículo para transportar células y moléculas proteicas²⁶.

El PRP autólogo es la combinación de factores de crecimiento naturales dentro de un coágulo normal que actúa de portador (Fig. 1).

El coágulo se compone de fibrina, fibronectina, y vitronectina, que son moléculas de adhesión celular requeridas para la migración celular como la que se aprecia en la osteoconducción y la epitelización de lesiones. Los gránulos alfa de las plaquetas contienen más de 30 proteínas bioactivas, muchas de las cuales tienen un papel fundamental en la hemostasia y / o reparación de los tejidos^{27,28}.

El plasma rico en plaquetas no es osteoinductivo, no puede inducir la formación de hueso nuevo ex novo. Sólo las proteínas morfogénicas óseas BMP²⁹ inducen hueso ex novo. El PRP actúa sobre las células con capacidad de consolidación con el objeto de incrementar su número (mitogénicos) y estimular el crecimiento vascular interno (angiogénico). Por lo tanto, es poco probable que estimule la formación de sustitutos óseos y otros materiales para injerto que no sean de tipo celular. Se ha demostrado que estimulan los autoinjertos medulares, pero existe poca probabilidad de que favorezcan la formación ósea al aplicarlo en combinaciones de sustitutos óseos no celulares y hueso alógeno. Estas moléculas producto de la degranulación de las plaquetas no son las únicas sustancias que aparecen en el gel plaquetario. Existen proteínas plasmáticas, proteínas reguladoras negativas PF4 y sustancias vasoactivas del contenido de los gránulos densos de las plaquetas³⁰.

PRF

El Plasma rico en factores de crecimiento PRF representa un nuevo paso en el concepto del uso del gel plaquetario como terapéutica. Supondría el uso de un con-

TABLA 1. Recuento plaquetario

	Nivel basal	PRP	ampliación
Gruber et al 2002 ⁷⁴	Nd	3.10 ⁹ /ml diluido en: I 2.10 ⁸ /ml II 4.10 ⁷ /ml III 8.10 ⁶ /ml IV 1.6.10 ⁶ /ml V 3.2.10 ⁵ /ml	
Jakse et al 2003 ⁵⁷	268±67.10 ⁶ /ml	I 821±78510 ⁶ /ml II 3810±246810 ⁶ /ml	8 veces
Eppley et al 2004 ⁸⁴	197±42.10 ³ /ml	1600±330. .10 ³ /ml	8 veces
Anitua et al 2005 ³⁰	5.25±3.8.10 ⁶ /ml	460,25±124,04.10 ⁶ /ml	
Christgau et al 2006 ⁷¹	273±56.10 ³ /ml	2134±782. 10 ³ /ml	7.8 veces
Dallari et al 2008 ⁶⁹	Nd	1. 10 ⁶ /ml	
Anitua et al 2007 ⁷⁰	Nd	506±124. 10 ⁶ /ml	
Kawasumi et al 2008 ⁷⁶	Nd	413±54.103/ml diluido en: H 4358±265.10 ³ /ml M 1453±88.10 ³ /ml L 48±29.10 ³ /ml PPP 8±2.10 ³ /ml	Hasta 9 veces
Hatakeyama et al 2008 ⁵⁴	Nd	Método anitua una centrifugación 1.09±0.6610 ⁶ /ml Método Sonnleitner dos centrifugaciones 4.60±7.7110 ⁶ /ml	1.09 veces 4.6 veces

centrado plaquetario en el que la concentración y determinación de los factores de crecimiento es conocida de antemano y pasaría a denominarse como concentrado en factores de crecimiento. Los datos clínicos nos revelan que el uso de PRF actuaría como una matriz favorable para el desarrollo de la curación sin procesos inflamatorios excesivos generando la liberación de citoquinas³¹.

Las plaquetas contienen cierto número de factores de crecimiento. Los factores de crecimiento son proteínas que desempeñan un papel esencial en la migración, diferenciación y proliferación celular³².

Estas proteínas incluyen PDGF (Growth factor derived from platelets, incluidos los isómeros aa, bb, ab), el TGF-β (Transformed beta growth factor, incluyendo los isómeros β1 y β2), factor plaquetario³³, la interleuquina-1, derivado de plaquetas factor de la angiogénesis, VEGF (Vascular endothelial growth factor), factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento endotelial, factor de crecimiento epitelial, similar a la insulina, la osteocalcina, osteonectina, fibrinógeno, vitronectina, fibronectina, y thrombospondin-1²⁸. Las plaquetas comienzan secretando activamente estas proteínas dentro de los 10 minutos después de la coagulación, con más del 95% de los factores de crecimiento presintetizados secre-

tados en el intervalo de 1 hora³³. Después de esta primera segregación de los factores de crecimiento, las plaquetas sintetizan y secretan factores de crecimiento adicionales durante varios días tras la lesión³³.

Recientemente Anitua y cols.³⁴ estudiando el efecto del PRP sobre células de tendón cultivado, encontraron un incremento en la proliferación de tenocitos, los cuales, además, sintetizan VEGF, y éste en un sistema in vivo, promueve la neoangiogénesis³⁰.

A pesar del entusiasmo que ha despertado el desarrollo del producto entre algunos autores y la difusión que han realizado las empresas que comercializan los kits de obtención del PRP, siguen existiendo dudas sobre la verdadera eficacia del Plasma Rico en Plaquetas sobre la regeneración esquelética³⁵.

Sánchez y cols. utilizan la denominación de plasma rico en factores de crecimiento en un estudio clínico sobre la reparación de fracturas de difícil consolidación, y observaron que la infiltración percutánea mejoraba la regeneración ósea tras una media de 3 infiltraciones in situ en un periodo de 4,9 meses¹⁵.

El anticoagulante utilizado en la mayoría de procesos es citrato sódico, aunque otros autores han visto que la adición de dextrosa mejora la estabilidad de los prepara-

TABLA 2. Métodos de obtención PRP/PRF. En tabla Método por método.

	anticoagulante	Método Sedimentación	activación
Gruber et al 2002 ⁷⁴	Citrato Dextrosa ³⁶ 1:10	1400 g 10 min. Plaquetas resuspendidas en wash tyrode buffer pH 6.4	Trombina
Jakse et al 2003 ⁵⁷	Citrato Dextrosa ³⁶ 1:10	800 g 15 min	Nd
Eppley et al 2004 ⁸³	Citrato Dextrosa ³⁶ 1:10	3200 rpm 12 min.	Trombina 1000 U 10 % CaCl ₂ /ml
Anitua et al 2005 ³⁰	Citrato sódico 3.8 %	PRP 460 g 8 min PPP 4500 g 12 min	22.8 mM CaCl ₂
Ranly et al 2005 ⁸⁰		Harvest preparation	Trombina
Gandhi et al 2006 ⁵⁹	EDTA	1º 1800 rpm 10 min 2º 3600 rpm 10 min	Trombina 1000 U/ 10 % CaCl ₂
Christgau et al 2006 ⁷¹		Apheresis 5 horas hasta alcanzar 10 ¹⁰ trombocitos	
Fdez Barbero et al 2006 ²⁶	Citrato sódico 3.8 %	1500 rpm 6 min.	CaCl ₂ + baño caliente 20 minutos
Duhan et al 2006 ³¹	Sin anticoagulante	400 g 10 min PRP 3000 rpm 10 min PPP	Se dejan 30 min. hasta coagular
Duhan et al 2006 ³¹	EDTA	1000 g 15min suero (det. Factores) 1000 g 15 min. plasma (det. Factores)	
Chiang et al 2007 ⁶³	Citrato Dextrosa ³⁶ 1:10	1º 3650 rpm 6 min 2º 3000 rpm 6 min	Trombina 1000 U 10 % CaCl ₂ /ml
O'Connell et al 2007 ⁴²		1100 g 6 min	Sin activación Trombina 1000 U /ml
Anitua et al 2007 ⁷⁰	Citrato sódico 3.8 %	460 g 8 min PRP 4500 g 12 min PPP	10 % CaCl ₂ /ml
Kawasumi et al 2008 ⁶⁸	Nd	1100 g 10 min. PRP Sobrenadante 2º centrifugación PPP	
Hatakeyama et al 2008 ⁵⁴	Citrato sódico 3.8 %	Método anitua una centrifugación 1300 rpm 7 min. Método Sonnleitner dos centrifugaciones 1º 1000 rpm 20 min. 2º 1600 rpm 15 min.	10 % CaCl ₂ /ml
Sánchez et al 2009 ¹⁵	Citrato sódico 3.8 %	640 g 8 min. PRP + membrana de Fibrina	10 % CaCl ₂ /ml
Sarkar et al ⁶⁶	Citrato sódico	840 g 10 min. 1310 g 10 min.	Se añade collageno tipo I

dos así como la reducción de volumen para obtener los mismos resultados³⁶. La mayoría de procesos de activación del PRF se basan en la adición de trombina exógena, aunque algunos autores lo utilizan en conjunción con CaCl₂. Landesberg³⁷ demostró que la activación de las plaquetas se ve afectada por muchos factores como son la liberación de los factores del crecimiento, el tipo de coagulante utilizado, la velocidad de centrifugación y su duración así como la preparación del gel³⁸⁻⁴⁰.

La utilización de trombina en conjunto con CaCl₂ está cada vez mas recomendado¹³.

Seth⁴¹ afirma que la falta de trombina en el proceso de preparación del PRP previene la activación prematura de las plaquetas y la degranulación. Y observa que la adición de trombina produce la liberación inmediata de

citoquinas. Para sus estudios propone la utilización de PRFM, matriz de plaquetas ricas en fibrina preparada sin trombina exógena.

El concentrado de factores de crecimiento es un producto inestable y difícil de administrar en numerosas aplicaciones clínicas en igual condiciones.

Para producir una textura estable se suele utilizar CaCl₂ + trombina exógena para activar las plaquetas y los residuos de fibrina. Un exceso de trombina genera la degranulación irreversible de las plaquetas con la pérdida de integridad de las plaquetas y la consecuente liberación de factores de crecimiento de forma inmediata. Los métodos de obtención de concentrado de plaquetas denominado PRFM sin la adición de trombina consigue la liberación paulatina de factores de crecimiento durante al menos 7 días⁴².

Por tanto un aumento suprafisiológico de plaquetas autólogas tendría beneficios en la curación de las heridas. En la Tabla 2 se recogen los distintos métodos de obtención de preparados ricos en plaquetas, atendiendo tanto al uso de anticoagulantes, método de sedimentación utilizado, como los distintos procesos de activación de las plaquetas.

Los factores de crecimiento son proteínas secretadas por unas células que estimulan un receptor específico y afectan a la función celular como la migración, diferenciación y proliferación celular durante el crecimiento y desarrollo del tejido, así como en las agresiones o lesiones y en la reparación. Existen tres tipos de efectos: Efecto paracrino, autocrino y endocrino.

Los efectos de los factores de crecimiento pueden ser descritos atendiendo también a la respuesta mediada por el tipo de receptor: así:

Receptores tirosinquinasa
Receptores asociados a proteína G
Receptores serin/treonin quinasa⁴³

Se han descrito un gran número de estas proteínas, pero las más estudiadas y con efectos más determinantes son PDGF (Growth factor derived from platelets) TGF- β (Transformed beta growth factor), FGF (Fibroblast growth factor), VEGF (Vascular endothelial growth factor), e IGF (Insulin-Growth factor).

TGF- β El factor transformante beta se encuentra en muchos tejidos pero su localización más importante y abundante son las plaquetas, en las células mesenquimales pluripotenciales, osteoblastos, condrocitos y en callo de fractura. Este factor se encuentra en el hematoma fracturario en las primeras 24 horas tras el traumatismo. El efecto de estimular la síntesis proteica en condrocitos y osteoblastos *in vitro*, su elevada concentración en la matriz ósea extracelular y la liberación por parte de las plaquetas en el hematoma de la fractura hacen pensar que el TGF- β es el mayor factor de crecimiento implicado en la regulación de la formación ósea y cartilaginosa tras una lesión y tras el crecimiento normal y remodelación⁴⁴.

PDGF El factor de crecimiento derivado de las plaquetas se encuentra en elevadas concentraciones en las plaquetas, en los macrófagos y en las células endoteliales vasculares aunque están presentes en otros tipos de células.

La síntesis de PDGF se ve favorecida como respuesta a estímulos externos, tensión de oxígeno baja, trombina o la estimulación por otros factores de crecimiento.

Esta proteína se almacena en los gránulos alfa de las plaquetas y se libera cuando las plaquetas se agregan y se inicia la cascada de la coagulación. Las células del tejido conectivo responden iniciando un proceso de replicación. Antoniades purificó la molécula mediante electroforesis en 1981, y se definió más tarde su estructura⁴⁵.

La función principal de PDGF es promover la quimiotaxis. Este factor está secretado por las plaquetas en el callo de fractura y en lugar de la lesión, este factor puede producir el reclutamiento de células mesenquimales y otras células reparativas⁴⁶. El efecto mitogénico sobre los osteoblastos es el reflejo de su acción primaria en el hueso.

IGF Se sintetiza en el hígado junto con su receptor el IGF BP-3 pasa a las plaquetas en sangre y se acumula en los gránulos alfa.

HGF mitógeno para hepatocitos. Se acumula en los gránulos alfa.

VEGF Presenta 5 isoformas distintas actúa en los receptores de tirosinquinasa de las células endoteliales. Es un potente angiogénico.

FGF ligado a la heparina incluye 9 proteínas. La FGF2 presente en las plaquetas aumenta la proliferación de células endoteliales

EGF estimula epitelización y actúa sobre los fibroblastos y músculo liso. Se encuentra en la saliva.

La EGF junto con TGF y HGF, explican el efecto curativo de la saliva en los animales. Los factores de crecimiento plaquetarios, en concreto se han demostrado como un método eficaz en implantología maxilar favoreciendo o promoviendo la respuesta osteogénica⁴⁷.

La determinación de los factores de crecimiento en los preparados plasmáticos autólogos es un paso muy importante en la comprensión del efecto terapéutico de los mismos y así mismo la constatación del aumento de concentración por el proceso de activación del preparado. Tabla 3

Factores negativos en la utilización de PRP/PRF

Los concentrados de uso clínico de factores de crecimiento podrían actuar, más que como iniciadores, como promotores en la carcinogénesis, favoreciendo la división y promoción de células previamente mutadas o "iniciadas" en la carcinogénesis. Se postula por tanto en una posible relación entre el uso de PRP/PRF con la aparición de tumores malignos, debido a que en la carcinogénesis las sustancias promotoras van a actuar únicamente sobre el aumento de la proliferación celular⁴⁸.

TABLA 3. Determinación de Factores de Crecimiento en Plasma Rico en Factores. Sistema Quantikine Elisa Kits (R&S Mineapolis USA).

	PDGF		TGF b		VEGF		EGF		IGF		HGF	
	basal	activado	basal	activado	basal	activado	basal	activado	basal	activado	basal	activado
Jakse et al 2003 ⁵⁷	Nd	42.0±27 pg/ml	Nd	997.58±1187.7 pg/ml								
Eppley et al 2004 ⁸³	3,3±0.9 (ng/ml)	17±8 (ng/ml)	35±8 (ng/ml)	120±42 (ng/ml)	155±110 pg/ml	955±1033 pg/ml	129±61 pg/ml	470±320 pg/ml				
Anitua et al 2005 ³⁰	0.45±0.3 (ng/ml)	13.33±0.26 (ng/ml)	1.37±0.26 (ng/ml)	37.83±14 (ng/ml)	>0.03 (ng/ml)	0.297±0.238 (ng/ml)	>0.02 (ng/ml)	0.44±0.07 (ng/ml)	102.8±34.6 (ng/ml)	Nd	0.36±0.07 (ng/ml)	0.43±0.11 (ng/ml)
Ranly et al 2005 ⁸⁰			16.7 (ng/ml)	35.1 (ng/ml)								
Christgau et al 2006 ⁷¹	Nd	39±18 (ng/ml)	Nd	331±155 (ng/ml)	Nd	0.4±0.4 (ng/ml)	Nd	1.8±1.0 (ng/ml)	Nd	78.1±21.5 (ng/ml)	Nd	Nd
Gandhi et al 2006 ⁵⁹	53.3±11.7 pg/ml	219±57 pg/ml	74.6±19.8 pg/ml	226±69 pg/ml	1.7±0.5 pg/ml	5.0±1.2 pg/ml						
Duhan et al 2006 ³¹					20 pg/ml	150 pg/ml						
Anitua et al 2007 ⁷⁰	24.45±9.21 (ng/ml)		48.69±9.21 (ng/ml)									

En la activación del PRP se utiliza trombina bovina, la cual ha sido relacionada con el desarrollo de anticuerpos contra el factor V y XI dando lugar a la aparición de coagulopatías mortales. Además este fenómeno no parece ser un fenómeno dosis-dependiente^{49,50}.

Marx supone que en el uso de PRP se utiliza trombina bovina para gelificar la preparación, y que no entra en contacto directo con la circulación sistémica, por lo que su utilización no presenta ningún riesgo²⁵.

Un punto importante a tener en cuenta en la reparación de tejidos es cuando la cantidad de factores de crecimiento genera un efecto catabólico en vez de un efecto anabólico como correspondería. Esta complicación no se puede evitar en las técnicas actuales porque el efecto terapéutico no se puede controlar. Así el uso de factores angiogénicos, al promover la neovascularización y el crecimiento de nuevos vasos produce un exceso de actividad anabólica dando como resultado una artrofibrosis. Del mismo modo la aparición de osificación heterotópica es debida a una diferenciación aberrante de condrocitos y fibroblastos. Por tanto queda pendiente un control preciso de la respuesta a la adición de factores exógenos y su futura validación como terapia⁴³.

Existen informes sobre su aplicación en lesiones musculares, tendinosas, o en su empleo en cirugía artroscópica, pero se tratan de estudios clínicos preliminares sin seguimientos a largo plazo⁵¹.

Existen varios trabajos publicados en los que la utilización PRP/PRF no tiene efecto o incluso su efecto es negativo^{5,25,52-57}.

Últimos avances en investigación sobre regeneración ósea

El PRP/PRF se considera como un biomaterial regenerativo que actúa mediante una matriz polimerizada de fibrina rica en plaquetas, leucocitos y citoquinas que favorecen la circulación de las células madres, proliferación de fibroblastos y síntesis de Colágeno tipo I^{48,58}.

Se le supone un efecto osteopromotor más que osteoinductor⁹. Hay una gran variabilidad de trabajos clínicos y ensayos experimentales que estudian el papel de PRP/PRF y su efecto en la curación de las fracturas tras una lesión traumática⁵⁹⁻⁶¹.

El efecto del PRP/PRF se debe evaluar mediante el estudio radiológico, e histológico incluso complementado con el análisis de parámetros objetivos histomorfométricos.

Consolidación de fracturas

La aplicación de las proteínas liberadas a partir de las plaquetas es especialmente importante en condiciones patológicas como la curación de fracturas comprometidas como consecuencia de un ambiente biológico inadecuado con concentraciones muy reducidas de TGF, IGF e PDGF⁶².

La hipótesis de trabajo de la mayor parte de los estudios presentados es que la adición de PRP a un material de injerto autógeno o alogénico tiene un efecto positivo sobre la cicatrización ósea. Así el uso de injerto óseo enriquecido con PRP autógeno en fracturas de tibia y

fémur de difícil consolidación recalcitrante consiguen la formación de unión sólida en un 91,7% de los pacientes a las 32 semanas⁶³.

En un estudio sobre hueso parietal de conejo injertando un defecto quirúrgico con hueso autógeno, PRP o una combinación de ambos. El análisis radiográfico, histológico e histomorfométrico permitió observar una ligera tendencia a mayor densidad de hueso con la adición de PRP que sin él. Sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas^{54,64}. En otro estudio similar pero con hueso bovino desmineralizado se observó una mejor densidad ósea en los casos injertados con hueso autógeno, que en aquellos injertados con hueso bovino desmineralizado y PRP⁶⁵.

En un estudio en ratas, se observó que la aplicación de PRP no potenciaba la formación de hueso nuevo con hueso inorgánico bovino ni en injertos de hueso autógeno⁵².

Por otro lado en un estudio en conejos mediante defecto cortical en tibia y peroné, la utilización del PRP y PPP no se observó correlación significativa entre el recuento plaquetario y las variables geométricas y densitométricas analizadas. La utilización del PRP no modifica los procesos de reparación y cicatrización respecto al grupo control⁵.

Por último Sarkar y cols.⁶⁶ en un modelo experimental en ovejas, demostraron con su estudio, que el PRP/PRF no era un buen promotor de la regeneración ósea en defectos de tamaño crítico con muy baja capacidad regenerativa. De hecho, no creen que sea una alternativa para la reconstrucción de defectos diafisarios en huesos largos.

Osteointegración

En un estudio experimental en perros, donde se colocaban implantes de titanio en la cresta ilíaca, se rellenaba los defectos peri-implantarios con una combinación de dentina/yeso, en presencia y ausencia de PRP. Se observó que la osteointegración mejoraba en los perros tratados con PRP⁶⁷. En otro estudio mediante polvo de hueso desmineralizado se vió que en la osteointegración de los implantes dentales en cresta ilíaca, mejoraban el contacto óseo cuando el hueso se combinaba con PRP⁶⁸. Los trabajos mencionados anteriormente son además difícilmente aplicables a la situación clínica habitual, dado que se aplican los implantes en hueso externo a la cavidad oral, donde las condiciones de contaminación bacteriana son diferentes³⁵.

En otro estudio en cerdos, la preparación del lecho del injerto con PRP no parece tener influencia sobre la osteointegración de implantes en el hueso frontal⁵³.

La adición de gel plaquetario combinado con células madre de médula de hueso esponjoso (cresta ilíaca) es utilizado como aloinjerto liofilizado incrementa el potencial osteogénicos y es una herramienta útil en el tratamiento de pacientes con pérdida ósea masiva. A las 6 semanas aparece un aumento de osteoblastos y una mayor revascularización.

Al año la osteointegración es mayor en los grupos con aloinjerto +PRF, que en el grupo control sin PRF⁶⁹.

Hatakeyama⁵⁴ ha realizado un estudio experimental mediante la adición de PRP a autoinjerto preparado mediante dos métodos distintos Método Anitua (una sola centrifugación) y Método Sonleitner (dos centrifugaciones) (ver condiciones Tabla 2), a los 15 días radiográficamente se observa la formación de hueso nuevo en los bordes de la lesión, primera fase de hueso nuevo con disposición trabecular delimitando pequeñas cavidades donde el tejido medular se está organizando, los fragmentos de hueso maduro del injerto son incorporados por el hueso nuevo, sin invasión del periostio. No presenta diferencias significativas en cuanto a la densitometría y la cantidad de matriz ósea, entre el control, sin PRP y con el PRP método Anitua y Método Sonleitner.

Neovascularización

El equilibrio entre TGF y las fuentes de moléculas secretadas por las plaquetas tiene importantes implicaciones terapéuticas en el control de la angiogénesis y fibrosis⁷⁰. TGF tiene efecto en la síntesis de VEGF de manera que un aumento de TGF genera un aumento en VEGF, por otro lado se constata que el TGF inhibe la producción de HGF ya que la inhibición de TGF (neutralización) genera un aumento sustancial de la producción de HGF⁷¹.

Choukron⁷² presentó su método de obtención del PRF como novedad, el PRP de segunda generación, con un procesado simplificado y sin manipulación bioquímica. Clínicamente es conocido que el PRF acelera la cicatrización tisular debido al desarrollo de la neovascularización, la remodelación del tejido cicatricial en ausencia total de infección.

Por otro lado in vitro en cultivo celular de ratas se ha visto que el PRP participa en el desarrollo del proceso de angiogénesis, activa las células endoteliales e inicia la regeneración del hueso, mediante la elevación significativa de la actividad fosfatasa y un aumento del contenido de colágeno I y m RNA (expresan VEGF y PDGF)⁷³.

Cirugía Maxilofacial

La adición de PRF a aloinjertos reduce el periodo de curación de 8 a 4 meses en procesos regenerativos en la elevación del seno alveolar.

En dos estudios en cabras a las que se practicó una resección mandibular y posterior reconstrucción con hueso ilíaco particulado con y sin PRP, la evaluación radiológica, histológica e histomorfométrica reveló que el uso del PRP mejoraba considerablemente la curación ósea a las 6 y 12 semanas²²⁻²³.

La comparación de la curación ósea de un defecto de resección mandibular reconstruido con hueso autógeno aislado, o combinado con PRP en perros determinó en las biopsias a las 6 semanas y la microscopía por fluorescencia que el PRP no mejoró la neoformación ósea²⁵.

Jakse sometió a 12 ovejas adultas a un procedimiento de elevación del hueso del seno bilateralmente con hueso de cresta ósea. Añadió PRP unilateralmente al injerto óseo, y observó que no había diferencias significativas tras 12 semanas de evolución⁵⁷.

Fennis sugiere el efecto beneficioso del PRP cuando se añade a un injerto autólogo en cabras. En condiciones de trabajo comparables a las habituales del empleo de PRP en cirugía oral y maxilofacial^{14,60}. Sus resultados no son concluyentes sobre la relación dosis-respuesta del PRP, así como del periodo de tiempo durante el que muestra actividad.

El concentrado de plaquetas contiene relativamente altos contenidos de PDGF, TGF IGF pero su potencial influencia en la regeneración periodontal permanece poco claro. No existe una correlación significativa $r^2 < 0.42$ entre el número de plaquetas y la concentración final de factores de crecimiento liberados⁷¹.

Proliferación celular

Las plaquetas están implicadas en la aceleración de la regeneración ósea mediante la proliferación de los osteoblastos, aumentando hasta 50 veces la síntesis de DNA en cultivos de hueso humano. El aumento de la actividad mitogénica, aumenta la presencia de tejido mineralizado. Por el contrario la neutralización del PDGF, hace decrecer la proliferación celular⁷⁴.

También in vitro se ha visto que el aumento de la concentración de TGF β estimula la síntesis de proteoglicanos y colágeno en hipoxia (5% de O₂) similar a las condiciones in vivo⁷⁵. Kawasumi⁷⁶ estudió el efecto del PRP, dependiendo de la concentración de plaquetas, así, PRP lo denominó (H alto 1000%), (M medio 350%) (L bajo 117%) P (pobre menos que el basal), observando que tan solo el PRP H con 9 veces más plaquetas que el nivel basal, incrementó la proliferación celular, los PRP M, L y P, no tenían efecto alguno. Para mejorar la terapia del PRP es necesario determinar la concentración óptima de plaquetas y lograr así la proliferación y diferenciación

óptimas. El PRP aumenta la proliferación celular pero por el contrario no aumenta la velocidad de diferenciación de los osteoblastos.

Choi⁷⁷ mostró que altas concentraciones de PRP inhibían la proliferación y viabilidad de células alveolares por el contrario bajas concentraciones de PRP, tenían cierta estimulación.

Kanno⁵⁶ observó que el PRP en humanos inhibía la actividad osteoblástica. En cambio las concentraciones moderadas de PRP estimulaban la diferenciación osteoblástica⁷⁸.

Lucarelli⁷⁹ determinó que la concentración óptima es aumentar un 10% la concentración PRP.

Zechner, en cambio, crea defectos mandibulares en doce cerdos enanos, aplica PRP e instala implantes, observando una mejor regeneración ósea peri-implantaria en las fases iniciales (6 semanas), igualándose a las 12 semanas, la estimulación de la proliferación celular osteogénica¹⁶.

En el estudio de la condrogénesis en ratones inmunocomprometidos se observó que el PDGF retarda la reabsorción de hueso demineralizado y reduce la osteoinducción, al mismo tiempo la concentración de cartílago aumenta hasta los 14 días, después del implante pero su concentración disminuye conforme aumenta la concentración de PDGF. De igual manera se ha constatado que la formación de hueso se reduce de forma dependiente de la concentración de PDGF⁸⁰. Por otro lado, en uno de los pocos estudios in vitro presentados¹⁶ se estudia la estimulación de la proliferación celular en la médula ósea de ratas. No se pudo demostrar efectos comparables con el BMP⁸¹.

La utilización de PRP en el sitio de fractura confirma la importancia de la expresión y producción de factores de crecimiento a nivel local (herida). El PRP en animales diabéticos normaliza todos los parámetros previos a la curación. Se iguala la recuperación de las heridas sin diferencias significativas entre diabéticos y no diabéticos.

Es necesario distinguir el efecto de cada uno de los factores de crecimiento derivados de las plaquetas para valorar su mecanismo de acción⁸².

La activación con cloruro de calcio del gel plaquetario se basa en la participación del Calcio en el proceso de activación de las plaquetas^{50,82}. En cambio en un estudio in vitro se comprobó que la adición de CaCl₂ no activaba las plaquetas, consecuentemente no aparecía degranulación y no se liberaban por tanto factores de crecimiento⁸³.

Se hace necesario la utilización del CaCl_2 con otros activadores. Esta puede ser una causa para la disparidad de resultados clínicos y habría que realizar nuevos experimentos que los confirmen.

Estos resultados tan dispares son debidos a las diferencias entre las líneas celulares utilizadas, así como los diferentes procedimientos de producción del PRP, lo cual genera distintas liberaciones de factores de crecimiento. Estos estudios parecen proponer que el PRP puede tener efectos beneficiosos en la proliferación de las células madre de la médula sin promocionar la diferenciación osteoblástica.

Conclusiones

Insistimos en la importancia de diferenciar entre las funciones que desempeñan los distintos factores de crecimiento y el efecto de su concentración suprafisiológica, y los supuestos beneficios que se obtienen en la utilización de geles plaquetarios.

En la literatura actual no se encuentra ninguna evidencia científica que demuestre la supuesta aceleración de la curación de las fracturas.

No existe ninguna evidencia sobre un efecto dosis respuesta entre la concentración de plaquetas y su supuesto efecto curativo.

La falta de consenso sobre la composición y la producción de los concentrados plasmáticos hace imposible el establecimiento de un estándar que integre a todos los trabajos de investigación.

Es necesario realizar estudios experimentales en los que se incluya, la determinación y cuantificación de los factores de crecimiento in situ en la aplicación del PRP en la regeneración de las lesiones que nos permita profundizar en el conocimiento del comportamiento biológico de los factores de crecimiento plaquetarios en la reparación ósea.

Hay que determinar por qué los productos ricos en plaquetas son muy efectivos en unos determinados casos, pero ineficaces en otros.

Bibliografía:

1. Sánchez Martín M. Traumatología y Ortopedia. CEA; Aula Medica p. 37-42.
2. Einhorn TA. The Cell and Molecular Biology of Fracture Healing. Clin Orthop 1998; 355s:7-21.
3. Munuera L, Cordero J. Ingeniería Tisular ósea: Cursos de actualización. 38 Congreso Nacional de la Sociedad Española de Cirugía Ortopédica y Traumatológica: 2001 Octubre Bilbao nº 65-79188.
4. Passuti N, Delecrin J, Gouin F, Heymann D. Substituts osseux. En Encycl Méd Chir Appareil locomoteur; Paris, Elsevier 1999. 14-015-B-10, 6 p.
5. Bonete Lluch D. Tesis Doctoral "Valoración de la regeneración ósea en un modelo animal: utilización del plasma rico en plaquetas en la curación de los defectos óseos. Estudio preliminar para un diseño experimental en conejos". Universidad de Valencia 2006
6. Valle Ortiz, Bauer TW, Muschler GF. Bone graft materials. An overview of the basic science. Clin Orthop 2000; 371:10-27
7. Amillo S, González F, Illescas JA. Incorporación de aloinjertos óseos intercalares corticales. Estudio experimental en conejos. An Sist Sanit Navar 2003; 26:365-72
8. De Boer HH. The history of bone grafts. Clin Orthop 1988; 226:292-7.
9. Mehta S, Tracy Watson J. Platelet Rich Concentrate: Basic Science and Current Clinical Applications. Orthop Trauma 2008; 22:433-38.
10. Gomar F, Orozco R, Villar JL, Arrizabalaga F. P15 small peptide bone graft substitute in the treatment of non-unions and delayed union. A pilot clinical trial. Int Orthop 2007; 31:93-9.
11. Lane JM, Tomin E, Bostrom MPG. Byosynthetic bone grafting. Clin Orthop 1999; 367S:107-17.
12. Gil Albarova J, Garrido Lahiguera R, Gil Albarova R, Melgosa Gil M. Materiales para la reparación y sustitución ósea; Factores de crecimiento y terapia genética en Cirugía Ortopédica y Traumatología. Mapfre Medicina 2003; 14:51-65
13. López-Oliva Muñoz F, Vicario Espinosa C, Almoguera Villacañas IR. Plasma rico en plaquetas. Análisis comparativo de cuatro presentaciones comerciales. Patología del Aparato Locomotor 2003; 1:59-66
14. Fennis JPM, Stoelinga PJW, Jansen JA. Mandibular reconstruction: a clinical and radiographical animal study on the use of autogenous scaffolds and platelet rich plasma. Int J Oral Maxillofac Surg 2002; 31:281-6.
15. Sanchez M, Anitua E, Cugant R, Azofra J, Guadilla J, Seijas R, y cols. Nonunions treated with autologous preparation Rich in growth factors. J Orthop Trauma 2009; 23:68-71.
16. Zechner W, Tangl S, Tepper G, Furst G, Bernhart T, Haas R, et al. Influence of platelet rich plasma on osseous healing of dental implants: a histologic and histomorphometric study in minipigs. Int J Oral Maxillofac Implants 2003; 18:15-22.
17. Arpornmaeklong P, Kochel M, Depprich R, Kübler NR, Würzler KK. Influence of platelet rich plasma on osteogenic differentiation of rat bone stromal cells. An in vivo study. Int J Oral Maxillofac Surg 2004; 33:60-70.
18. Pietrzak WS, Eppley BL. Platelet Rich Plasma: Biology and New Technology. J Craniof Surg 2005; 16:1043-54.
19. Nurden A, Nurden P, Sanchez M, Andia I, Anitua E. Platelets and wound healing. Frontiers in Bioscience 2008; 13:3525-48.
20. Tayapongsak P, O'Brien DA, Monteiro CB. Autologous fibrin adhesive in mandibular reconstruction with particulate cancellous bone and marrow. J Oral Maxillofac Surg 1994; 52:161-6.
21. 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; 55:1294-8.
22. Anitua E. Un nuevo enfoque en la regeneración ósea. Plasma rico en factores de crecimiento. (PRGF). Vitoria: En Puesta al día S.L; 2000.
23. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt, et al. Platelet rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1998; 85: 638-46.
24. Sanchez AR, Sheridan PJ, Kupp LI. Is platelet-rich plasma the perfect enhancement factor? A current review. Int J Oral Maxillofac Implants 2003; 18:93-103.
25. Marx R. Quantification of Growth factor levels using a simplified method of Platelet-Rich Plasma Gel Preparation. J Oral Maxillofac Surg 2000; 58:300-1
26. Fernandez Barbero JE, Galindo-Moreno P, Avila-Ortiz G, Caba O, Sanchez Fernandez E, Wang HL. Flow cytometric and morphological characterization of platelet rich plasma gel. Clin Oral Implant Res 2006; 17:687-93.
27. Anitua E, Andia I, Ardanza J, et al. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. Thromb Haemost 2004; 91:4-15.
28. Harrison P, Cramer EM. Platelet alpha-granules. Blood Rev 1993; 7: 52-62.
29. Simpson AH, Mills L, Noble B. The role of growth factors and related agents in accelerating fracture healing. J Bone Joint Surg 2006; 88-B:701-5.
30. Anitua E, Andia I, Sánchez M, Azofra R, Zaldueño M, de la Fuente M, et al. Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture. J Orthop Res 2005; 23:281-6
31. 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; 101E: 51-5.
32. Yao E, Eriksson E. Gene therapy in wound repair and regeneration. Wound Repair Regener 2000; 8:443-51.
33. Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. J Oral Maxillofac Surg 2004; 62:489-96.
34. Adler SC, Kent KJ. Enhancing wound healing with growth factors. Facial Plast Surg Clin North Am 2002; 10:129-46.
35. González Lagunas J. Plasma Rico en Plaquetas. Rev Esp Cirug Oral y Maxilofac 2006; 28:89-99.
36. Torrella A, Toledo R, Hondares M, Calañas L. Evaluación del Anticoagulante citrate dextrose fosfato. Rev Mex Patol Clin 2003; 50:77-81.
37. Landesberg R, Roy M, Glickman RSF. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet rich plasma gel preparation. J. Oral Maxillofac Surg 2000; 58:297-300 discussion 300-1.
38. Eppley BL, Pietrzak WS, Blanton M. Platelet rich plasma: a review of biology and applications in plastic surgery. Plast Reconstr Surg 2006; 11:147-59.
39. Everts PA, Knape JT, Weibrich G. et al. Platelet rich plasma and platelet gel: a review. J. Extra Corpor Technol 2006; 38:174-87.
40. Gandhi A, Bibbo C, Pinzur M, Lin SS. The role of platelet-rich plasma in foot and ankle surgery. Foot Ankle Clin 2005; 10:621-37.
41. Gamradt Seth C, Rodeo Scott A, Warren Russell F. Platelet rich plasma in rotator Cuff Repair. Technics in Orthopedics 2007; 22:126-33.

42. O'Connell SM, Carroll RJ, Beavis A, Arnoczky SP. Flow cytometric characterization of cascade Platelet Rich Fibrin Matrix PRFM. Impact of exogenous thrombin on platelet concentrates. Musculoskeletal Transplant Foundation 2007; 128-XM: 207Te2
43. Angel MJ, Sgaglione A, Grande DA. Clinical applications of bioactive factors in sports medicine. Current concepts and future trends. Sports Med Arthrosc Rev 2006; 14:138-45
44. Laurencin CT. Bone graft substitutes. Rossemont Illinois: ASTM international; 2003.
45. Antonaides HN, Williams LT. Human platelet-derived growth factor: structures and functions. Federation Proc 1983; 42:2630-4.
46. Ross R, Raines EW, Bowen-Pope DF. The biology of platelet-derived growth factor. Cell 1986; 46:155-69.
47. Anitua E. The use of plasma-rich growth factors (PRGF) in oral surgery. Pract Proced Aesthet Dent 2001; 13:487-93.
48. Martínez-González JM, Cano Sanchez J, Gonzalo Lafuente JC, y cols. Do ambulatory use of platelet rich plasma (PRP) concentrates present risks? Med Oral 2002; 7:375-90.
49. Velilla M, et al. Recuerdo y actualización de las técnicas en regeneración ósea para el práctico general. A propósito de dos casos. Gaceta Dental 2002; 127:52-63.
50. Anitua E. Expansión de cresta con osteotomos: Estado actual. Utilización de plasma rico en factores de crecimiento (P.R.G.F). Rev Esp Cirug Oral y Maxilofacial 2001; 23:158-62
51. Foitzik C, Strauss H, Lefort I. Osteotomy in atrophied maxilla and bone regeneration with pure phase beta tricalcium phosphate and PRP. Implant Dent 2003; 12:132-9.
52. Roldan JC, Jepsen S, Miller J, Freitag S, Rueger DC, Acil Y, Terheyden H. Bone formation in the presence of platelet rich plasma versus bone morphogenetic protein 7. Bone 2004; 34:80-90.
53. Schlegel KA, Kloss FR, Kessler P, Schultze-Mosgau S, Nkenke E, Wiltfang J. Bone conditioning to enhance implant osseointegration: an experimental study in pigs. Int J Oral Maxillofac Implants 2003; 18:505-11.
54. Hatakeyama MM, Beletti ME, Zanetta-Barbosa D, Dechichi P. Radiographic and histomorphometric analysis of bone healing using autogenous graft associated with platelet rich plasma obtained by 2 different methods. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2008; 105:13-18
55. Choi BH, Zhu SJ, Kim BY, et al. Effect of platelet-rich plasma (PRP) concentration on the viability and proliferation of alveolar bone cells: an in vitro study. Int J Oral Maxillofac Surg 2005; 34:420-4.
56. 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; 63:362-9.
57. Jakse N, Tangl S, Gilli R, Berghold A, Lorenzoni M, Eskici A, Haas R, Pertl C. Influence of PRP on autogenous sinus grafts. An experimental study on sheep. Clin Oral Implants Res 2003; 14:578-83
58. Liu Y, Kalen A, Risto O, et al. Fibroblast proliferation due to exposure to platelet concentrate in vitro is pH dependent. Wound Repair Regen 2002; 10:336-40.
59. Gandhi A, Doumas C, O'Connor P, Russell Parsons J, Lin SS. The effect of local platelet rich plasma delivery on diabetic fracture healing. Bone 2006; 38:540-6.
60. Fennis JP, Stoelinga PJW, Jansen JA. Mandibular reconstruction: an histological and histomorphometric study on the use of autogenous scaffolds, particulate corticocancellous bone grafts and platelet rich plasma in goats. Int J Oral Maxillofac Surg 2004; 33:48-55.
61. Fennis JP, Stoelinga PJ, Jansen JA. Reconstruction of the mandible with an autogenous irradiated cortical scaffold, autogenous corticocancellous bone-graft and autogenous platelet-rich-plasma: an animal experiment. Int J Oral Maxillofac Surg 2005; 34:158-66.
62. Wildemann B, Schmidmaier G, Brenner N, et al. Quantification, localization, and expression of IGF-I and TGF- β 1 during growth factor-stimulated fracture healing. Calcif Tissue Int 2004; 74:388-97.
63. Chiang C, Su C, Huang C, Chen W, Chen T, Tzeng Y. Early experience and results of bone graft enriched with autologous platelet gel for recalcitrant nonunions of lower extremity. J Trauma 2007; 63:655-61.
64. Aghaloo TL, Moy PK, Freymiller EG. Investigation of platelet rich plasma in rabbit cranial defects: a pilot study. J Oral Maxillofac Surg 2002; 60:1176-81.
65. Aghaloo TL, Moy PK, Freymiller EG. Evaluation of platelet rich plasma in combination with anorganic bovine bone in the rabbit cranium: a pilot study. Int J Oral Maxillofac Implants 2004; 19:59-65.
66. Sarkar MR, Augat P, Shefelbine SJ, Shorlemmer S, Huber-Lang M, Claes L, Kinzl L, Ignatius A. Bone formation in long bone defect model using platelet rich plasma loaded collagen scaffold. Biomaterials 2006; 27:1817-23.
67. Kim SG, Kim WK, Park JC, Kim HJ. A comparative study of osseointegration of Avana implants in a demineralized freeze-dried bone alone or with platelet rich plasma. J Oral Maxillofac Surg 2002; 60:1018-25.
68. Kim SG, Chung CH, KimYK, Park JC, Lim SC. Use of particulate dentin-plaster of Paris combination with/without platelet rich plasma in the treatment of bony defects around implants. Int J Oral Maxillofac Implants 2002; 17:86-94.
69. Dallari D, Savarino L, Stagni C, Cenni E, Cenacchi A, Fornasari PM, et al. Enhanced Tibial Osteotomy healing with use of bone grafts supplemented with platelet gel or platelet gel and Bone Marrow stromal cells. J Bone Joint Surg Am 2007; 89:2413-20.
70. Anitua E, Sanchez M, Nurden AT, Zalduendo M, de la Fuente M, Azofra J, et al. Reciprocal actions of platelet secreted TGF β 1 on the production of VEGF and HGF by human tendon cells. Plast Reconstr Surg 2007; 119:950-9.
71. Christgau M, Moder D, Hiller KA, Dada A, Schimitz G, Schmalz G. Growth factors and cytokines in autologous platelet concentrate and their correlation to periodontal regeneration outcomes. J Clin Periodontol 2006; 33:837-45.
72. Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, Girard MO, Schoeffler C, Dohan SL, et al. Platelet Rich fibrin (PRF): A second generation platelet concentrate. Part IV: clinical effects on tissue healing. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2006; 101:56-60.
73. Zhenming Hu, Peel SAF, Ho SKC, Sandor GKB, Clokie CML. Platelet rich plasma induces mRNA expression of VEGF and PDGF in rat bone marrow stromal cell differentiation. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2009; 107:43-8.
74. Gruber R, Varga F, Fisher MB, Watzek G. Platelets stimulate proliferation of bone cells: involvement of platelet derived growth factor, microparticles and membranes. Clin Oral Implants Res 2002; 13:529-35.
75. Yuniko Abe, Asanura K, Tonomura H, Kimura T, Masuda K. Transforming growth factor α 3 stimulates proteoglycan and collagen synthesis under low oxygen tension by bovine intervertebral disc cell in alginate beads. Proceedings of the 34th Annual Meeting of the International Society for the Study of the Lumbar Spine: 2007 June 10-14: Hong Kong, China Abstracts n° 52.
76. Kawasumi H, Kitoh KA, Siwicki N, Ishiguro. The effect of the platelet concentration in platelet-rich plasma gel on the regeneration of bone J Bone Joint Surg [Br] 2008; 90-B:966-72.

77. Choi BH, Im CJ, Huh JY, Suh JJ, Lee SH. Effect of platelet rich plasma on bone regeneration in autogenous bone graft. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004; 33:56-9.
78. Graziani F, Ivanovski S, Cei S, et al. The in vitro effect of different PRP concentrations on osteoblasts and fibroblasts. *Clin Oral Implants Res* 2006; 17:12-9.
79. Lucarelli E, Beccheroni A, Donati D, Sangiorgi L, Cenacchi A, Del Vento et al. Platelet derived growth factors enhance proliferation of human stromal stem cell. *Biomaterials* 2003; 24:3095-100.
80. Ranly DM, McMillan J, Keller T, Lohmann CH, Meunch T, Cochran L, et al. Platelet derived growth factor inhibits demineralised bone Matrix-induced intramuscular cartilage and bone formation. A study of immunocompromised Mice. *J Bone Joint Surg Am* 2005; 87A:2052-64.
81. Simpson AHR, Mills I, Noble B. The role of growth factors and related agents in accelerating fracture healing. *J Bone Joint Surg Br* 2006; 88B:701-5.
82. Anitua E. Plasma Rich in growth Factors: Preliminary results o use in the preparation of Future Sites for Implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999; 14:529-35.
83. Gasperini G. Avaliação da ativação plaquetária no plasma rico em plaquetas após dois protocolos de obtenção em humanos. (dissertation) Uberlândia (MG): Dentistry School/Federal University of Uberlândia 2005.
84. Eppley BL, Woodell JE, Higgins J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plast Reconstr Surg* 2004; 114:1502-08.