

DEPARTAMENT ESTOMATOLOGIA

EL PLASMA RICO EN PLAQUETAS EN LA
REGENERACIÓN ÓSEA POST-EXODONCIA. ESTUDIO
RADIOGRÁFICO

M^a DEL MAR JOVANI SANCHO

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2009

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 19 de desembre de 2008 davant un tribunal format per:

- D. José Gascó Gómez de Membrillera
- D. Carlos García Ballesta
- D. Juan Ángel Vilaplana Gómez
- D. José Félix Mañez Ferrer
- D. Francisco Alpiste Illueca

Va ser dirigida per:

D. José Vicente Pascual Gil

©Copyright: Servei de Publicacions
M^a del Mar Jovani Sancho

Depòsit legal:

I.S.B.N.:978-84-370-7432-0

D.L.:V-1291-2009

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115

UNIVERSIDAD DE VALENCIA

DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGÍA



EL PLASMA RICO EN PLAQUETAS EN LA REGENERACIÓN ÓSEA POST-EXODONCIA. ESTUDIO RADIOGRÁFICO

TESIS DOCTORAL

Presentada por:
M^a del Mar Jovani Sancho

Dirigida por:
Prof. Dr. D. José Vicente Pascual Gil

Valencia, 2008



VNIVERSITAT · VALÈNCIA
Departament d'Estomatologia

D. José Vicente Pascual Gil, Profesor del Departamento de Cirugía de la Universidad de Valencia,

Certifica que,

La tesis doctoral titulada “El plasma rico en plaquetas en la regeneración ósea post-exodoncia. Estudio radiográfico” presentada por la licenciada en odontología D^a M^a del Mar Jovani Sancho, ha sido realizada bajo mi dirección y reúne las condiciones necesarias para su presentación y defensa, lo cual firmo a los efectos oportunos.

Prof. Dr. José Vicente Pascual Gil

En Valencia a 30 de Junio de 2008

AGRADECIMIENTOS

“Cuando miro atrás y veo el camino recorrido hasta alcanzar lo que hoy es esta tesis doctoral, no puedo estar más que agradecida a todas las personas que me han rodeado y ayudado.

Quisiera dar las gracias en primer lugar al Dr. D. José Vicente Pascual por haber aceptado guiarme en este proyecto, por su interés, por su dedicación y por tener ese trato humano del que tanto he aprendido.

Gracias además a todo el Servicio de Cirugía Maxilofacial del Hospital Clínico Universitario de Valencia: a Mariano, a Miguel, a Luis, a M^a Eugenia, a M^a Dolores y a Carmen. Sin su ayuda, sus críticas y sus aportaciones, la calidad de este trabajo no hubiese sido la misma.

Al recordar las mañanas de quirófano en el Hospital de la Malvarrosa, tampoco quiero dejar de dar mi agradecimiento a Rosa y a M^a Carmen por su disponibilidad y paciencia, y gracias también al Servicio de Radiología del Hospital Clínico de Valencia por su colaboración en la obtención de los resultados.

Pero es a mi padre a quien debo agradecer que esto sea hoy una realidad. Con su motivación, su ilusión, sus ganas de aprender y su capacidad para resolver problemas, ha conseguido que esta tesis llegue a buen puerto. Gracias mamá. Gracias tía, por tu ayuda logística, en general gracias familia y amigos.

Y ahora quisiera dedicar todo el esfuerzo que lleva detrás esta tesis de tiempo, de viajes, de búsqueda... a dos personas muy importantes en mi vida: a una personita que la hizo junto a mí sin ella saberlo y a Carlos. Si ti nada hubiera sido lo mismo. Gracias por TODO”.

ÍNDICE

1. Introducción.....	5
2. Objetivos.....	9
3. Revisión actual sobre los preparados plasmáticos ricos en plaquetas.....	13
3.1 El hueso.....	15
3.1.1 Características generales.....	15
3.1.2 Regeneración ósea.....	21
3.2 Métodos de estimulación de la regeneración.....	26
3.2.1 Regeneración tisular guiada.....	26
3.2.2 Sustitutos óseos.....	26
3.2.3 Preparados plasmáticos ricos en plaquetas.....	28
3.2.4 Ingeniería de tejidos: proteínas morfogenéticas de hueso.....	29
3.2.5 Osteodistracción.....	31
3.3 Primeros preparados plasmáticos plaquetarios.....	32
3.4 Plaquetas y factores de crecimiento.....	42
3.4.1 Las plaquetas.....	42
3.4.2 Los factores de crecimiento (GFs).....	44
3.4.3 Clasificación de los factores de crecimiento.....	49
3.4.4 Efectos de los factores de crecimiento recombinantes y de los preparados plasmáticos.....	61
3.5 Preparados plasmáticos ricos en plaquetas.....	65
3.5.1 Métodos de obtención.....	65
3.5.2 Centrifugadoras.....	75
3.5.3 Anticoagulantes y coagulantes.....	78
3.5.4 Características del preparado obtenido. Resultados según autores.....	83

3.6 Estudios clínicos que valoran la regeneración ósea.....	103
3.6.1 PRP + hueso autógeno.....	105
3.6.2 PRP + hueso inorgánico mineral animal.....	111
3.6.3 PRP + adhesivo de fibrina.....	115
3.6.4 PRP + sustitutos óseos.....	115
3.6.5 PRP + matriz ósea orgánica de cadáver.....	118
3.6.6 PRP usado solo.....	121
3.6.7 PRP + osteodistracción.....	125
3.6.8 PRP + células madre pluripotenciales.....	126
3.6.9 PRP + colágeno tipo I.....	127
3.7 Efectos secundarios de los factores de crecimiento.....	136
4. Material y método.....	141
4.1 Muestra clínica.....	143
4.2 Metodología.....	146
4.2.1 Protocolo de actuación.....	146
4.2.2 Protocolo de obtención del coágulo rico en plaquetas.....	149
5. Resultados.....	157
5.1 Resultados del análisis radiográfico subjetivo personal	161
5.2 Resultados del análisis radiográfico mediante sistema informatizado.....	165
6. Discusión.....	175
7. Conclusiones.....	191
8. Bibliografía.....	195

1. INTRODUCCIÓN

Debido a la alta capacidad de recuperación de los tejidos orales, los defectos alveolares o periodontales pequeños se pueden recuperar sin problemas, pero si el área afectada es mayor, la regeneración puede ser incompleta, lo que nos llevaría a un tejido no funcional o incluso a la necrosis del mismo (Hillmann y Geurtsen 2001).

La necesidad, tanto de cirujanos maxilofaciales como de odontólogos, de mejorar la regeneración ósea, ha hecho que hayan ido apareciendo diversos métodos para conseguirlo: la regeneración tisular guiada, la aplicación de sustitutos óseos o incluso de morfoproteínas.

Durante la última década se ha desarrollado lo que hoy parece ser una opción más: la aplicación en la zona a regenerar de preparados plasmáticos ricos en plaquetas. Se está usando para mejorar la regeneración de tejidos duros y blandos en periodoncia, ortopedia, cirugía maxilofacial y cirugía plástica. Esta técnica nos aporta nuevos conceptos, ya que se creía que las plaquetas tan sólo actuaban en la hemostasia de los tejidos y actualmente se sabe que también pueden influir en la reparación de las heridas.

El plasma rico en plaquetas (PRP) fue introducido por Whitman en 1997. Se decía que a través de la activación de las plaquetas en un gel, se liberaban factores de crecimiento que mejorarían la regeneración ósea al aumentar la mitosis, la producción de colágeno o la diferenciación celular; todo ello crucial en la reparación de las heridas.

Basándose en la idea de que si pocos son buenos, muchos serán mejor, se supuso que aumentando el número de plaquetas, la regeneración sería mejor y mayor (Freymiller y Aghaloo 2004).

Pero, ¿realmente conseguimos una regeneración ósea mejor y mayor con estos preparados?; ¿debemos mezclarlos con injertos óseos para que hagan efecto?; ¿qué protocolo es el que mejores resultados da?; ¿se le puede realizar a cualquier paciente?...

Son muchos los interrogantes que preocupan al clínico cuando se plantea seguir esta técnica.

La literatura es contradictoria en cuanto a los resultados obtenidos y más de una opinión alerta sobre posibles efectos no deseados. Esas aparentes contradicciones son el motivo del planteamiento de los objetivos de este trabajo.

2. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es el siguiente:

- Valorar radiográficamente el efecto del plasma rico en plaquetas en la regeneración ósea de alvéolos post-exodoncia, y por tanto, concluir su posible utilidad en la clínica.

Como consecuencia del procedimiento, se plantea un “objetivo adicional”:

- Valorar la fiabilidad comparada de la interpretación de la imagen radiográfica entre la apreciación visual subjetiva y el análisis digital informatizado.

Para ello deberemos analizar el estado actual del tema referente a los preparados plasmáticos ricos en plaquetas, y seleccionar el protocolo de obtención (de entre los posibles) más apto a nuestro fin.

**3. REVISIÓN ACTUAL SOBRE LOS
PREPARADOS PLASMÁTICOS
RICOS EN PLAQUETAS**

Analizaremos previamente las características del tejido óseo y el fisiologismo de sus procesos reparativos.

3.1 EL HUESO

3.1.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES

El hueso es un tejido mesenquimal mineralizado, muy vascularizado e innervado. Es rígido y actúa de soporte de los tejidos blandos del organismo, además de tener un papel vital en el equilibrio del calcio. No es un tejido permanente e inmutable, sino que está sometido a un continuo cambio, dependiendo de las necesidades del organismo y de las fuerzas a las que está sometido. Si no se realiza actividad, el hueso se atrofiará; si por el contrario se realiza en exceso, se hipertrofiará.

3.1.1.1 Composición:

El hueso está formado por células y por una matriz.

La **matriz** es una mezcla de:

- a) **Sales inorgánicas** (60-70%): fosfato cálcico y carbonato cálcico.
- b) **Sustancias orgánicas** (20-30%): colágeno tipo I (90%), grasas, proteínas morfogenéticas o BMPs (que suponen un gran interés en la ingeniería de tejidos), productos extravasados de la sangre y factores de crecimiento.
- c) **Agua** (20%) (Gómez de Ferraris y Campos 1999)

El **componente celular** está formado por (Fig.1):

a) **Células osteoprogenitoras:** son células de dos tipos, los preosteoblastos y los preosteoclastos. Los primeros proceden de células mesenquimatosas indiferenciadas y se localizan en el tejido conectivo que forma el periostio, el endostio y en el tejido conectivo perivascular (Gómez de Ferraris y Campos 1999). Darán lugar a los osteoblastos y a los osteocitos donde se detecta la fosfatasa alcalina de forma significativa (proteína de superficie que podría participar en la regulación de la proliferación, migración y diferenciación de las células osteoblásticas) (Fernández-Tresgueres y cols. 2006). Los preosteoclastos derivan de los monocitos o de sus precursores, y éstos darán lugar a los osteoclastos.

b) **Osteoblastos:** células metabólicamente activas que se sitúan en la superficie ósea para formar hueso.

Durante la formación de hueso, la remodelación o su reparación, producirán factores de señalización solubles (como BMPs) y la parte orgánica de la matriz, llamada *osteóide*, que posteriormente se mineralizará.

Durante la remodelación, se forman 2-3 μm de osteóide por día, hasta un grosor máximo de 20 μm que se mineralizará 1-2 μm por día.

Se espera que los valores en la reparación ósea sean similares (Hollinger y cols. 1999a).

En la superficie del osteoblasto que mira hacia la sustancia osteóide emergen gran cantidad de prolongaciones citoplasmáticas que se introducen en

esta sustancia aún no mineralizada, conectándose con las prolongaciones de los osteocitos por medio de uniones comunicantes. Los osteoblastos vecinos también establecen conexiones entre sí por medio de estas uniones intercelulares (Gómez de Ferraris y Campos 1999). La formación de la fosfatasa alcalina por los osteoblastos es un factor muy importante en la mineralización, ya que se cree que inactiva las moléculas inhibitorias de la misma. La vida media de los osteoblastos humanos es de 1 a 10 semanas, luego desaparecerán por mecanismos de apoptosis, excepto un 15% que llegarán a ser osteocitos (Hollinger y cols. 1999a, Fernández-Tresgueres y cols. 2006).

- c) **Osteocitos:** osteoblastos que han quedado incluidos en la matriz al mineralizarse. Poseen una forma estrellada y su cuerpo se sitúa en el interior de unas cavidades llamadas *osteocoles*. De estas cavidades se desprenden radialmente un gran número de conductillos, en cuyo interior se encuentran las prolongaciones citoplasmáticas de los osteocitos que contactarán con osteocitos vecinos y con los osteoblastos de superficie. En consecuencia todas estas células quedan intercomunicadas mediante el sistema de microcirculación ósea (Gómez de Ferraris y Campos 1999).

Son células relativamente inactivas pero su actividad metabólica es crucial para la viabilidad ósea y para mantener la homeostasis del cuerpo. Su vida media es de muchos años, tal vez décadas (Hollinger y cols. 1999a).

- d) **Osteoclastos:** grandes (100 μm) y multinucleados. Células de carácter fágico pertenecientes al sistema monocito-macrófago, situadas en la superficie donde se

producirá la reabsorción ósea, participando en los procesos de remodelación de los huesos. En esta remodelación, los osteoblastos y los osteoclastos tienen una interacción dinámica, influidos por los factores de señalización como la vitamina D, la hormona paratiroidea (PTH) o las ILs. Así sucede cuando la vitamina D es responsable de que los osteoblastos expresen un factor de diferenciación de osteoclastos o cuando los osteoblastos desaparecen de la superficie ósea como respuesta a la PTH, quedando el tejido osteoide mineralizado expuesto y permitiendo que éste sea atacado por los osteoclastos. Aún no se sabe bien cuál es la causa que propicia el cese del mecanismo de reabsorción (Hollinger y cols. 1999a).

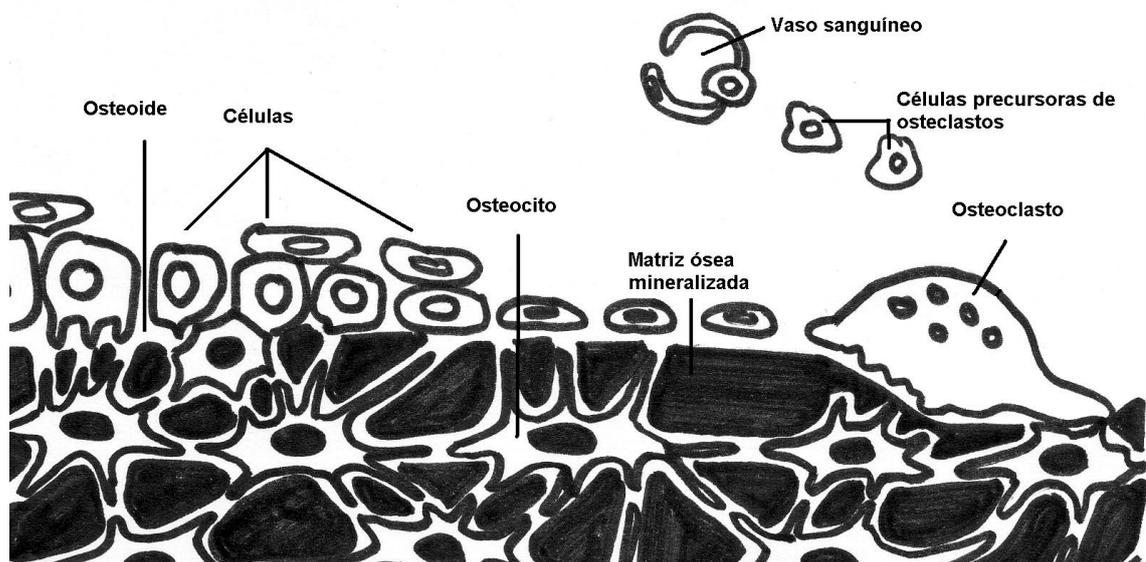


Figura 1. Diagrama que muestra las interrelaciones entre las diferentes células del tejido óseo (Basado en Gómez de Ferraris y Campos 1999).

3.1.1.2 Tipos de hueso (Fig. 2):

- a) **Hueso compacto:** aparece como una masa sólida dispuesta en láminas. Contiene cavidades dispersas que albergan, cada una, un osteocito o célula ósea. Las láminas se disponen de forma concéntrica alrededor de unos conductos paralelos al eje longitudinal del hueso llamados conductos de Havers que contienen tejido nervioso y vasos sanguíneos que proporcionan a los huesos nutrientes. Están conectados entre sí con las cavidades medulares, y con el exterior por los denominados canales de Volkman. A la unidad de hueso compacto formado por un conducto central rodeado por laminillas óseas concéntricas se le llama *osteón*.

- b) **Hueso esponjoso:** no contiene canales de Havers. Es un entramado de trabéculas o laminillas óseas que se disponen de forma tridimensional, creando cavidades comunicadas, ocupadas por una red de tejido conjuntivo que recibe el nombre de tejido medular o mieloide. La médula ósea contiene dos tipos de tejido: la médula ósea amarilla (tejido adiposo) y la roja (tejido generador de células rojas, blancas y plaquetas).

La zona externa del hueso está formada por hueso cortical que a su vez está cubierto por una membrana fibrosa vascular blanca, llamada periostio.

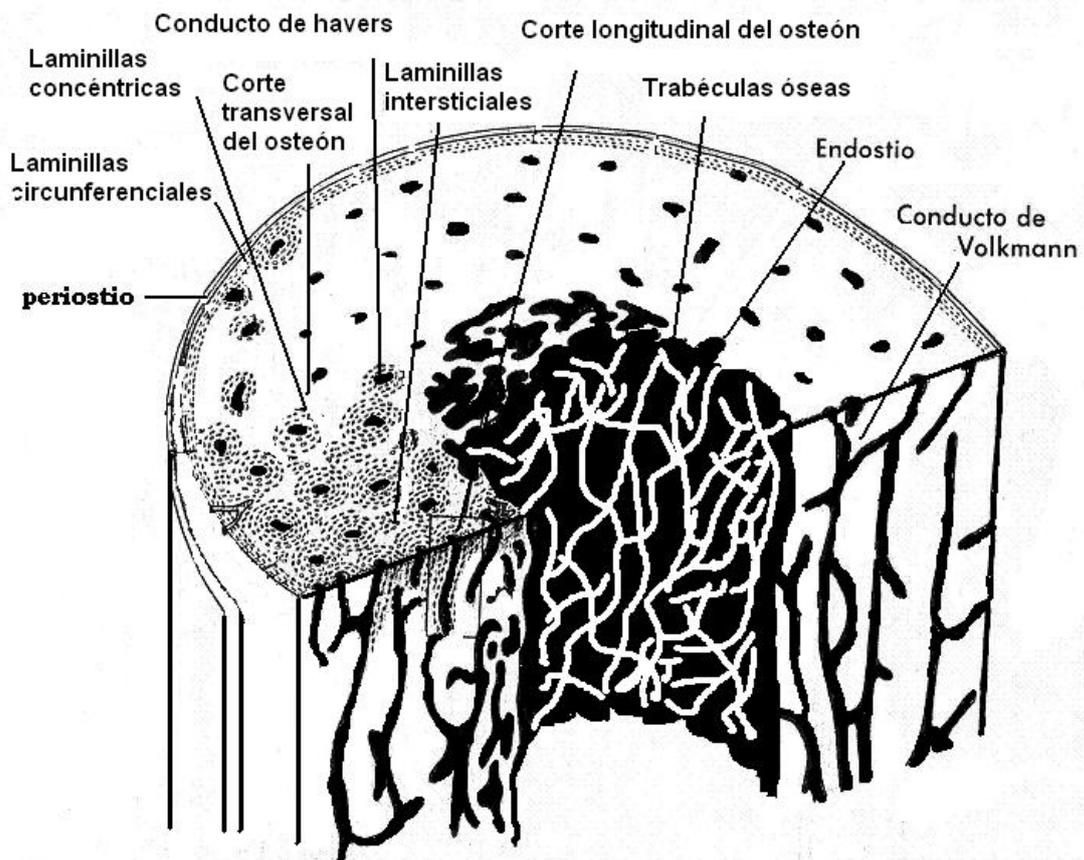


Figura 2. Modelo de hueso compacto y trabecular (Basado en Ten 1991)

3.1.2 REGENERACIÓN ÓSEA

Ante una agresión que supone una pérdida de sustancia o una extracción dentaria, el organismo responde con un proceso de restauración del tejido afectado. El proceso se inicia con la aparición de un coágulo sanguíneo que ocupará el defecto óseo. Las células osteoprogenitoras que migrarán hacia el coágulo pueden evolucionar de distinta forma: se producirá una **reparación** del tejido cuando se diferencien en un tejido fibroso, que no conservará ni la arquitectura ni su función original, siendo sus propiedades y características distintas a las que previamente existían o se producirá la **regeneración** del mismo, cuando el proceso de restauración tienda hacia la creación de un tejido similar al original sin que existan diferencias con el tejido circundante.

El que se produzca tejido fibroso (reparación) en vez de tejido óseo (regeneración), está favorecido por (Arnás y cols. 2002):

- Infección que impide que se repare el tejido conectivo perpetuando la respuesta inflamatoria.
- Alteración en el aporte sanguíneo y por tanto en el aporte de oxígeno (de origen local o por alguna enfermedad vascular como alteraciones hematológicas, tabaco, diabetes mellitus...).
- Uso de materiales no biocompatibles (la irritación crónica favorece la fibrosis).
- Insuficiente inmovilización (la movilidad está en el origen de la fibrosis).
- Falta de células necesarias o señales estimulantes o neutralizantes del proceso de regeneración, por edad o por enfermedad (para que haya regeneración han de haber células osteogénicas) (Anitua 2002).

- Invasión de los tejidos blandos en la zona a restaurar, ya que no se mantiene el espacio (Ballester y cols. 2004).
- Especialización del tejido (a mayor especialización menor regeneración se obtendrá).

La restauración de una herida ósea incluye tres etapas (Arnás y cols. 2002, Anitua 2002) (Fig. 3):

1) Control de la vasodilatación

Una lesión ósea, como la producida por una extracción dentaria, origina una hemorragia por lesión de los vasos sanguíneos. Esta sangre extravasada forma un coágulo en el que existen plaquetas (5%), leucocitos (menos de 1%) y glóbulos rojos (95%), y en el caso de haber rellenado la zona lesionada con un injerto óseo, éste es englobado por el coágulo (Marx y cols. 1998, Arnás y cols. 2002).

En esta fase, el coágulo se encuentra en una situación de hipoxia con una pO₂ de 5-10 mmHg y un pH ácido de 4-6, mientras que en la parte externa del cierre el tejido es normal con una pO₂ de 45-55 mmHg y un pH de 7 (Knighton y cols. 1981, Hollinger y Wong 1996, Marx 1999a). Además existen gran cantidad de células estructurales y pocas células primarias que ayuden a la regeneración, tan sólo 1 por cada 40.000 células estructurales en un hombre de 50 años (Caplan 1991), junto con capilares rotos con coágulos y células endoteliales expuestas (Marx y cols. 1998).

2) Eliminación del exudado inflamatorio y las células muertas

Cuando las plaquetas entran en contacto con el colágeno y la trombina, además de formar el coágulo cambiando de forma y uniéndose entre ellas, comienzan a liberar unos gránulos de su interior que contienen sustancias que actuarán como mediadores de la inflamación: enzimas proteolíticos, proteínas catiónicas, serotonina e histamina, proteínas de la coagulación, factores de crecimiento y fibrinógeno (Arnás y cols. 2002). Los factores de crecimiento son proteínas que serán enviadas de una célula a otra para transmitir una señal concreta como la migración o diferenciación celular (Greenhalgh 1996). El factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento transformado beta (TGF- β), ambos liberados por las plaquetas, atraen en primer lugar a los macrófagos, que inician la fase de limpieza fagocitando las células muertas y recanalizando el coágulo primario. Por otro lado, los neutrófilos atacan a las bacterias que consigan alcanzar el foco de fractura.

3) Regeneración de las células del tejido lesionado

La acción de las plaquetas dura menos de 5 días, pero para entonces el PDGF y la diferencia de gradiente de oxígeno que es de 30-40 mmHg (Knighton y cols. 1981, Tischler 2002) ya han atraído a macrófagos que reemplazan a las plaquetas como fuente primaria de liberación de factores de crecimiento (Bennet y Schultz 1993a).

El PDGF estimula la mitogénesis de los osteoblastos, la angiogénesis de capilares y la mitosis de células endoteliales y el TGF- β , activa a los fibroblastos, que forman una matriz de colágeno que soportará el crecimiento capilar (Marx y cols. 1998). En la Tabla I se expresan otras acciones de los factores de crecimiento.

FUNCIÓN	MEDIADORES (GFs)
Proliferación fibroblastos	PDGF, EGF, FGF
Migración fibroblastos	PDGF, EGF, FGF, TGF- β
Quimiotácticos para macrófagos	PDGF, FGF, TGF- β
Neovascularización	VEGF, FGF
Síntesis de colágeno	TGF- β , PDGF
Secreción de colágeno	PDGF, FGF, EGF

Tabla I. Papel de los factores de crecimiento (GFs) en la restauración ósea (Arnás y cols. 2002).

Al tercer día los capilares ya han penetrado en el injerto, si lo había, desde el lecho receptor y lo acaban de englobar del día 14 al 17 (Marx y cols. 1996, Marx 1999a). En este momento se equilibra el gradiente de oxígeno y se frena la angiogénesis. A los 10 días finaliza también el proceso de epitelización.

Si ha persistido la solución de continuidad, el epitelio puede invadir el espacio donde queremos que se regenere hueso, estando la formación ósea comprometida. Además las posibilidades de contaminación bacteriana y de infección serán mucho mayores.

Los osteoblastos también han proliferado desde el lecho receptor comenzando la migración por el nuevo entramado de colágeno y la formación de matriz extracelular (Anitua 2000).

El depósito de hidroxiapatita comienza aproximadamente a los 10 días de la fractura, asociado a un aumento del pH (Hollinger y Wong 1996).

Entre la tercera y la cuarta semana finaliza la formación de hueso inmaduro, un hueso desorganizado con una distribución aleatoria de las trabéculas que se irán ordenando a lo largo del segundo y tercer mes, hasta completar la estructura de hueso maduro, siendo radiográficamente indistinguible la zona de la extracción (Anitua 2000).

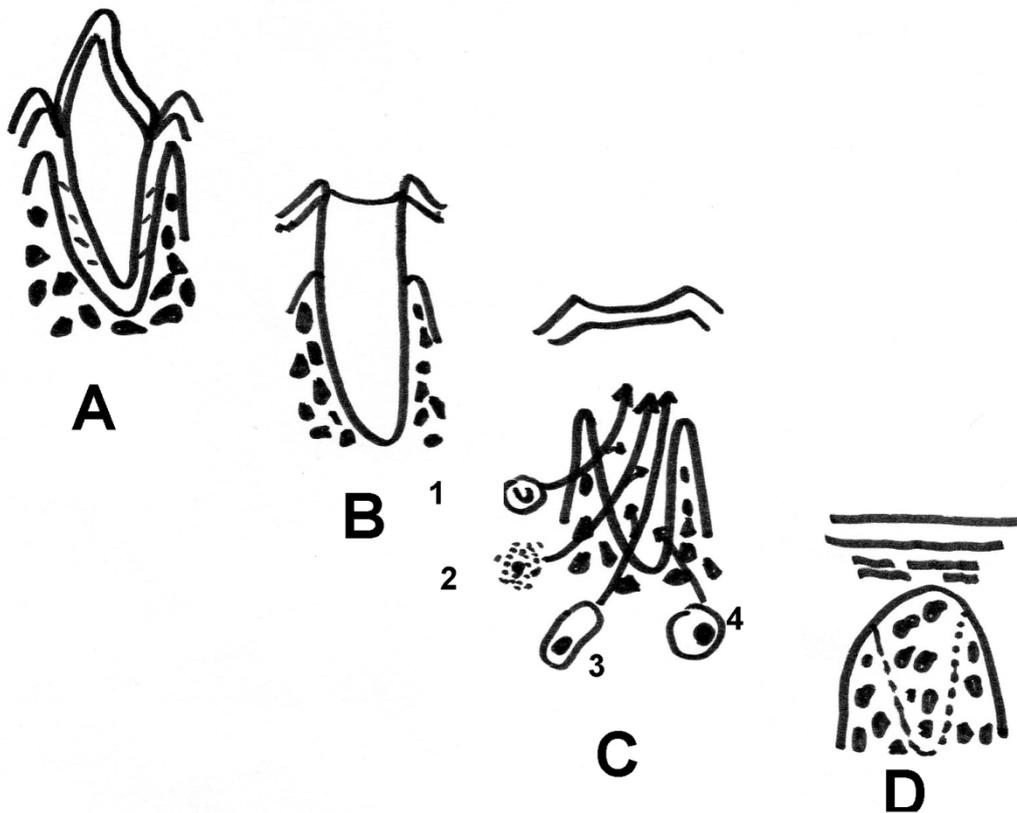


Figura 3. Respuesta del hueso ante una extracción. A: diente antes de la extracción. B: alvéolo ocupado por el coágulo. Este coágulo se resuelve en C por: (1) Respuesta polimorfonuclear, (2) Respuesta macrofágica y (3) Respuesta fibroblástica. D: la brecha ósea comienza a colonizarse con nuevos osteoblastos (4) que forman hueso. (Basado en Ten 1991).

3.2 MÉTODOS DE ESTIMULACIÓN DE LA REGENERACIÓN ÓSEA

La regeneración ósea puede favorecerse: evitando que penetre el tejido conectivo en la zona o introduciendo en ella sustancias que según su efecto, podrán ser de tres tipos: **osteogénicas** (pueden formar hueso por sí mismas), **osteoinductivas** (estimulan la formación ósea mediante la liberación de proteínas) u **osteconductivas** (proporcionan la matriz física adecuada para que se deposite hueso nuevo).

3.2.1 REGENERACIÓN TISULAR GUIADA

Es la colocación de membranas de colágeno biológico (Bio-Gide®) o de síntesis (Gore-tex®), para crear una barrera física que propicie la revascularización del defecto e impida la llegada de capilares del conectivo de zonas adyacentes (Anitua 2000). En sí no estimulan el crecimiento óseo sino que crean un ambiente propicio para que se recupere, pero sin que esta recuperación se estimule por sí misma (Marx y Meltzer 2000).

Así podemos obtener un crecimiento vertical de hasta 3 mm.

3.2.2 SUSTITUTOS ÓSEOS

- Hueso autólogo (del propio individuo): Se obtiene del mentón, de la rama ascendente mandibular o de la cresta ilíaca. Es osteogénico, osteoinductivo y osteoconductor, y conlleva un mínimo riesgo de infecciones y de antigenicidad (Rodríguez y cols. 2003, Ohya y cols. 2005).

- Hueso humano de cadáver (aloinjerto):
 - **Hueso humano liofilizado:** Hueso de cadáver congelado rápidamente a bajas temperaturas para luego ser deshidratado. Los resultados controvertidos y el riesgo de transmisión han hecho que se desarrollen alternativas aloplásticas y xenoinjertos (Sánchez y cols. 2003).
 - **Hueso humano congelado deshidratado y desmineralizado (DFDB):** Gran capacidad osteoinductiva. La desmineralización del injerto expone las proteínas osteoinductivas localizadas en la matriz ósea y puede activarlas. Estas proteínas tienen BMP inmunoreactivas. Los resultados son contradictorios (Kim y cols. 2002a).
- Hueso de origen animal (xenoinjerto): Se usa sobre todo el hueso bovino desproteinizado (Bio-Oss®), que es un hueso bovino del que se han eliminado todo los materiales orgánicos (Tsay y cols. 2005). Está totalmente desproteinizado evitando así el riesgo de la respuesta inmune. Su configuración estructural es similar a la del hueso humano, al igual que su módulo de elasticidad y la fuerza compresiva que es capaz de soportar. Es osteoconductor pero no hay evidencias de que sea osteoinductivo (Rodríguez y cols. 2003, Aghaloo y cols. 2004).
- Sustitutos de hueso artificiales (Injertos aloplásticos): Polímeros o cerámicas que pueden ser biodegradables o no (Hollinger y cols. 1996, Wiltfang y cols. 2004), y que son fácilmente valorables en una radiografía (Grageda 2004, Tsay y cols.

2005). Proporcionan un entorno adecuado para que crezca hueso y podemos decir que son osteoconductivos. Su largo tiempo de curación, su osificación no homogénea, la posible aparición de una reacción a cuerpo extraño, o una migración de partículas, son aspectos negativos para su uso (Kim y cols. 2002b).

3.2.3 PREPARADOS PLASMÁTICOS RICOS EN PLAQUETAS

Se pretende concentrar el máximo número de plaquetas posible en una cantidad manejable de volumen que pueda depositarse en la zona donde deseemos se regenere el hueso (Fikret y Demiralp 2003). Las plaquetas contienen en su interior numerosos productos bioquímicos, como los factores de crecimiento, que ejercerán diversas funciones sobre el organismo (Marx y Meltzer 2000). Marx (2001) habla de la combinación de siete factores de crecimiento naturales dentro de un coágulo que actúa como vehículo transportador, siendo el PDGF y el TGF- β los más relacionados con el crecimiento óseo. Además, sostiene que unido a un injerto multiplica por dos la tasa de crecimiento óseo, y que en tres meses se obtiene hueso viable y un 20% más de densidad ósea.

Marx (2001), Roldán y cols. (2004) y Raghoobar y cols. (2005) afirman que los preparados plasmáticos ricos en plaquetas no son osteoinductivos, ya que no pueden inducir la formación de hueso nuevo por sí mismos, necesitando de células óseas para hacerlo. Lo que sí consiguen, es que las células que participan en la regeneración ósea aumenten de número dividiéndose.

Además, su manipulación es fácil gracias a su consistencia gelatinosa y al ser autólogo no tiene riesgo de transmisión de enfermedad ni reacción inmunológica (Pryor y cols. 2005a, b). También disminuyen el sangrado postoperatorio, producen una cicatrización más rápida de tejidos blandos, ayudan en la estabilidad de los injertos y promueven más rápidamente la vascularización (Fikret y Demiralp 2003).

3.2.4 INGIENERÍA DE TEJIDOS: PROTEÍNAS MORFOGENÉTICAS DE HUESO O BMPs

La ingeniería de tejidos estudia el proceso de morfogénesis de nuevos tejidos a partir de células aisladas, polímeros biocompatibles o factores de crecimiento. Estos se transferirán in vitro a una matriz biológica o sintética que será colocada en el defecto del paciente y así inducirá la regeneración del tejido dañado (Baum y Money 2000, Hillmann y Geurtsen 2001).

Las células son pluripotenciales y se pueden diferenciar en hueso, cartílago, grasa o músculo. Esta forma de regenerar es uno de los tratamientos más prometedores que existen en la actualidad, ya que es un método mínimamente invasivo y en el caso de la regeneración ósea, elimina el problema de tener que coger hueso autógeno disminuyendo la morbilidad de la zona donante y la inmunogenicidad de los injertos alogénicos (Lucarelli y cols. 2003, Feinberg y cols. 2005, Ohya y cols. 2005).

La ingeniería de tejidos se usa actualmente en defectos periodontales con proteínas morfogenéticas de hueso o BMPs.

Urist en 1982 aisló una proteína de la matriz de hueso desmineralizado a la que llamó BMP (Bone Morphogenetic Protein), que podía formar hueso nuevo estimulando la atracción de células precursoras y facilitando que pasasen a osteocitos (osteoinductora). Desde entonces se han publicado múltiples trabajos para valorar la formación ósea en lugares ectópicos mediante la aplicación de estas proteínas (Boyne 1999, Anitua 2000).

Tienen gran solubilidad y esto hace que se dispersen inmediatamente al rellenar un defecto óseo, por lo que precisan un transportador (Peñarrocha y cols. 2001). Esto hará que su acción en la zona sea suficientemente lenta para dar tiempo a las células a actuar sin ser eliminadas por los fluidos corporales (Marx y Meltzer 2000). Se han propuesto como medio de transporte el ácido poliláctico, esponjas de colágeno, atecolágeno y la hidroxiapatita (Urist y cols. 1984).

Actualmente por bioingeniería se han conseguido fabricar seis tipos: de la BMP-2 a la BMP-7 (idénticas a las humanas). La BMP-2 induce la diferenciación de los osteoblastos para producir proteínas de la matriz ósea, la BMP-3 (osteogenina) estimula la formación de cartílago, mientras que las BMP-5, 6 y 7 actúan sobre la 2 potenciando la formación ósea. Solas tienen poco efecto (Peñarrocha y cols. 2001).

Las BMPs, aunque forman parte de la subfamilia del factor de crecimiento beta transformador, actúan de diferente forma a como actúan otros factores de crecimiento. La acción de estos últimos sobre las células presentes en el hueso hace que aumenten la mitosis y secreción de proteínas confiriéndoles una capacidad limitada de regeneración, mientras que la implantación de una sola proteína de BMP-2, regenera una cantidad ilimitada de hueso, ya que actúa sobre las células precursoras (Tabla II).

	Factores de crecimiento	BMP
Actúan sobre	Células ya existentes	Células precursoras
Acción	Aumentan mitosis	Forman hueso donde se implantan
Función	Formación limitada de hueso	Formación ilimitada

*Tabla II. Diferencias entre los factores de crecimiento y las proteínas morfogenéticas
(Peñarrocha y cols. 2001)*

Nagao y cols. (2002), estudian su efecto en perros y llegan a conclusiones positivas en cuanto a reconstrucciones del hueso mandibular.

Marukawa y cols. (2002), evalúan durante un año el hueso regenerado en monos mediante BMP-2 observando que es funcional. Lo ofrecen como una alternativa a los injertos óseos.

3.2.5 OSTEODISTRACCIÓN

Técnica reciente consistente en provocar una fractura e ir aumentando la diástasis con una aparatología específica (osteo-distractores) para crear un puente óseo entre ambos fragmentos (Anitua 2000).

Es un proceso muy dependiente de la vascularización (Robiony y cols. 2002).

3.3 PRIMEROS PREPARADOS PLASMÁTICOS PLAQUETARIOS

En cirugía es fundamental conseguir una buena hemostasia y un buen sellado de los tejidos (Jackson 2001), sobre todo en los órganos donde resulta muy complicado controlar el sangrado (hígado o riñones) y en tejidos delicados (infectados o quemados) (Anitua 2000).

Fue en 1909, al reparar Bergel en el poder hemostático de la fibrina, cuando se realizaron los primeros experimentos para controlar el sangrado, pero hubo que esperar hasta 1938, con el desarrollo de las técnicas de separación de proteínas, para obtener fibrina pura.

Young y Medawar, en 1940, publicaron un artículo donde explicaban que habían conseguido unir varios nervios periféricos de conejos con plasma sanguíneo. En 1943 Tarlov hizo experimentos similares. Trabajó con plasma de conejo autólogo y homólogo y desarrolló una técnica especial para mejorar la aposición nerviosa del muñón, pero la fuerza y estabilidad de los sellantes era pobre y las técnicas de microcirugía aún no se habían desarrollado, por lo que el número de fracasos fue alto. Tal vez esto explique por qué el método no evolucionó (Matras 1982).

La combinación de la fibrina con la trombina se usó por primera vez en 1944 por Cronkite para sujetar los injertos de piel en los soldados con graves quemaduras, pero el efecto adhesivo fue pobre: posiblemente por la baja concentración de fibrinógeno, y no fue un método aceptado.

El desarrollo de la fibrina adhesiva que actualmente se usa data de 1970 cuando Matras estaba estudiando los efectos de la fibrina sobre heridas en piel de rata. Dos circunstancias hicieron que variase la idea original: el desarrollo de técnicas más avanzadas en microcirugía y los avances que permitieron aislar factores de la coagulación del plasma. Se mejoró el adhesivo aumentando la concentración de fibrinógeno.

Matras en sus primeros estudios, cortó transversalmente el nervio ciático en conejos poniendo un segmento del lado contralateral en el defecto. Después de la adaptación fascicular, se unieron aplicando una solución de plasma de conejo crioprecipitado, que al añadir trombina formó un coágulo. Este procedimiento se usaría por primera vez en humanos en 1974 en Viena, en el servicio de traumatología para reparar un nervio digital. Se mezcló la trombina con una solución de plasma autólogo crioprecipitado obtenido de la sangre del paciente.

El adhesivo de fibrina luego se adaptó para usarse en cirugía microvascular. Se usó como modelo experimental la carótida de las ratas. Esta se cortó transversalmente tras sujetarla por proximal y distal, y los muñones fueron adaptados y estabilizados con suturas de nylon y con el adhesivo. Las anastomosis se hicieron con éxito sólo con dos suturas mientras que las anastomosis convencionales de los vasos menores de 1mm de diámetro externo requieren 12 suturas lo que puede dañar la pared del vaso. En el examen histológico de los vasos tratados con el adhesivo no se encontró ni necrosis ni tejido cicatricial de mala calidad; al revés: se encontró mayor tejido funcional con abundantes fibras elásticas (Matras 1977).

En 1978, Kletter usó por primera vez la combinación de sutura y adhesivo en neurocirugía, para anastomosis extra-intracraneales en perros. También aparecieron

estudios que usaban el adhesivo de fibrina para cerrar heridas en órganos parenquimales como bazo, riñón o hígado (Matras 1985) y otros, como Spängler, que lo aplicaban sobre piel y sobre hueso. Bösch usó hueso más adhesivo para rellenar defectos en la tibia de conejos. Hubo evidencias radiográficas e histológicas de que la reparación ósea y la formación nueva de hueso ocurría antes en la zona donde lo aplicó que en la control.

Su uso se extendió a la cirugía oral y maxilofacial sobre todo en la década de los 90. Se podía colocar en pacientes con alteración de la hemostasia tras una extracción, junto a una esponja de gelatina o colágeno en el alvéolo (Matras 1982). Tayapongsak y cols. (1994), lo aplicaron junto con hueso en 33 reconstrucciones mandibulares. Mediante ortopantomografías fueron controlando las mandíbulas de los pacientes durante 24 meses, y vieron que a las 4 semanas en 23 casos ya había remodelación ósea observándola en el resto a las 6 semanas.

El adhesivo de fibrina que desarrollaron Matras y sus colaboradores se comercializó en Europa con el nombre de Tissucol R, (Immuno AG, Viena, Austria). Existen otros productos similares en el mercado como Hemaseel, Hemacure... Han sido utilizados en Europa, Canadá y Japón durante todos estos años y su eficacia ha sido documentada por numerosos trabajos en la literatura. En EEUU se prohibió su utilización por riesgos potenciales de infección por transmisión vírica, hepatitis C y SIDA entre otros. La razón es que el fibrinógeno que contienen estos productos proviene de pools de plasma humano o bien de un único donante, pero se trata siempre de fibrinógeno homólogo (Anitua 2000). Se intentaron eliminar virus como el VIH y el VHS, o al menos inactivarlos mediante un screening del plasma y por distintos procesos en la manufacturación (Filtración, radiación UV...), pero a pesar de todos los cuidados

sigue existiendo riesgo (Spotnitz 2001). El adhesivo de fibrina puede ser el responsable de 1 caso de infección por VIH y 3 casos de infección por el parvovirus B19 (Wilson y cols. 1991, Hino y cols. 2000). Además, los pasos para inactivar los gérmenes, pueden alterar las propiedades del producto final (Spotnitz 2001).

Como consecuencia del veto a su utilización por la Food and Drug Administration (FDA), en EEUU se ha desarrollado otra modalidad: la obtención de fibrinógeno autólogo del mismo paciente, evitando así los riesgos de infección. El paciente es citado días antes de la cirugía, predona su sangre, y se aísla el fibrinógeno en el laboratorio con el que se prepara el adhesivo de fibrina autólogo (Anitua 2000).

Otro factor a tener en cuenta es que la trombina que se usa en estos preparados es de origen bovino. Según algunos autores su uso conlleva un riesgo de transmisión de encefalopatía bovina espongiforme. Esto se tendrá en cuenta a la hora de reparar una fuga de líquido cefaloraquídeo. Además existe riesgo de crear anticuerpos anti-trombina que puedan reaccionar con el factor de la coagulación humano V y producir coagulopatías. Actualmente también se usa trombina humana (Anitua 2000). Así se puede prevenir reacciones alérgicas en pacientes que hayan desarrollado anticuerpos ante proteínas bovinas y además evita la transmisión de agentes infecciosos que pueden causar la encefalopatía espongiforme (Soffer y cols. 2003).

Composición del adhesivo de fibrina autóloga

El adhesivo de fibrina tiene dos componentes.

- a) El primero contiene fibrinógeno autólogo a altas concentraciones, el factor XIII de la coagulación, fibronectina y otras proteínas del plasma como albúmina.
- b) El segundo componente lo forman trombina bovina y cloruro cálcico.

A uno de los dos componentes se le añadirá un antifibrinolítico (Matras 1982, Tayapongsak y cols. 1994, Whitman y cols. 1997, Soffer y cols. 2003).

Método de obtención del fibrinógeno

El fibrinógeno puede obtenerse por crioprecipitación (obteniendo concentraciones de fibrinógeno de 30-60 mg/ml que además contiene los factores de coagulación III y XIII) o por precipitación con sulfato de amonio (Anitua 2000). Dependiendo de la concentración de fibrinógeno, cambiará la textura de la cola, la resistencia a la rotura y la capacidad adhesiva.

- a) Técnica de precipitación con sulfato de amonio (defectos menores de 3 cm)

Se realiza en menos de 30 minutos. Se extraen al paciente 72 ml de sangre en 8 tubos con 1ml de citrato sódico al 10% y se centrifugan a 3200 rpm 10 minutos. Tras el centrifugado se elimina el plasma sobrenadante y a cada tubo se le añade 1,3 ml de

sulfato de amonio. El fibrinógeno precipitará enseguida. Se centrifuga otra vez a 3200 rpm 3 minutos y se recoge el precipitado blanquecino en otro tubo. Aproximadamente obtendremos 2 ml de fibrinógeno. Antes de aplicarlo lo refrigeraremos y lo disolveremos en una solución de cloruro cálcico (Tayapongsak y cols. 1994).

b) Técnica del crioprecipitado (defectos mayores de 3 cm)

Se tarda 2 días en realizarla. El fibrinógeno se prepara del plasma autólogo obtenido de 1 a 3 semanas antes de la cirugía tras centrifugado y se almacena a -80°C 24 horas y luego a 4°C 12 horas. El precipitado blanco se centrifuga a 6500 rpm 5 minutos y se elimina el sobrenadante dejando aproximadamente 10-15 ml de un concentrado rico en fibrinógeno. Se guarda a -80°C y para usarlo en la cirugía se descongela a 37°C 10 minutos. Se usará en 4 horas (Tayapongsak y cols. 1994).

La formación del adhesivo de fibrina imita la última fase de la coagulación sanguínea: la conversión de fibrinógeno a fibrina (Matras 1985). La obtención de fibrina se da en la última etapa de la coagulación tras unir los dos componentes. La trombina, en presencia de calcio, rompe los fibrinopéptidos A y B de la molécula de fibrinógeno originando monómeros de fibrina; además la trombina activa el factor XIII que favorece el entrecruzamiento de estos monómeros formando el coágulo. El fibrinógeno era soluble pero ahora la fibrina es insoluble. El tiempo de formación de la cola de fibrina puede ser inferior a 5 segundos con concentraciones elevadas de trombina. Si se disminuye esta concentración se puede retrasar varios minutos (Anitua 2000).

Durante la reparación de la herida, el coagulo sufrirá una lisis y se absorberá completamente. Esto es una de sus principales ventajas pero el éxito del adhesivo dependerá de que esta fibrinolisis o degradación sea controlada.

El potencial fibrinolítico del adhesivo es bajo, así que su lisis estará determinada por los activadores del plasminógeno que están en varios tejidos (sobre todo en células endoteliales) y por el infiltrado inflamatorio de neutrófilos, macrófagos y enzimas proteolíticas que aparecerán a los 3 días de colocar el adhesivo. Los tejidos altamente vascularizados como pulmones y riñones tienen una alta actividad fibrinolítica por lo que la fibrina es rápidamente degradada. Incorporaremos por tanto a este adhesivo, sustancias antifibrinolíticas como el ácido épsilonaminocaproico, el inhibidor C1-esterasa, aunque los mejores resultados se han obtenido con aprotinina. Si la cantidad de adhesivo de fibrina no es muy grande, desaparece en no más de 2 semanas (Matras 1985).

Entre las grandes ventajas de este adhesivo encontramos que es un agente hemostático tópico, sella en minutos, no es tóxico, se reabsorbe y además promueve el crecimiento y la reparación del tejido donde se aplica (Tayapongsak y cols. 1994, Anitua 2000, Soffer y cols. 2003).

El hecho de que contribuya en la reparación de las heridas puede ser atribuido al factor XIII de la coagulación, que acelera dicho proceso (existen autores que a la mezcla del adhesivo le añaden un concentrado de dicho factor) (Matras 1985, Tayapongsak y cols. 1994) y a la fibrina, que estimula el crecimiento de fibroblastos y osteoblastos.

Su eficacia se ha demostrado en distintas especialidades (cirugía cardiovascular, torácica, neurocirugía, dental y plástica).

La idea del adhesivo ha evolucionado hasta nuestros días con algunas modificaciones. Thorn y cols. (2004), proponen una nueva forma de obtener el adhesivo de fibrina con factores de crecimiento de las plaquetas junto a una trombina autóloga. Obtienen una concentración de fibrinógeno 12 veces mayor que en el PRP, cuyos niveles son similares a los del plasma y una concentración de factores de crecimiento 8 veces mayor.

El adhesivo de fibrina como ya hemos dicho tiene dos componentes: una solución de fibrinógeno con factores de crecimiento de las plaquetas y una solución de trombina. Thorn obtiene ambos de la sangre del paciente de la siguiente forma: centrifuga 200 ml de sangre a 327 x g 15 minutos para obtener PRP; 10 g de éste junto a ácido cítrico e hipoclorito se vuelven a centrifugar a 3000 x g 5 minutos a 4°C, y tras unirle cloruro cálcico, se formará un coágulo del que se eliminará la trombina líquida con una jeringa. Por otro lado, al PRP que había sobrado al principio se añadirá ácido tranexámico y etanol a 20°C, a continuación se bajará la temperatura a 0°C para que precipite el fibrinógeno y se centrifugará a esta temperatura a 3000 x g 8 minutos para separar el fibrinógeno y los trombocitos.

Como vemos a partir de 200 ml de sangre del paciente se obtienen 6 ml de fibrinógeno y 2 ml de trombina. La obtención del fibrinógeno por precipitación del sulfato amonio es rápida pero es un sistema abierto, mientras que por crioprecipitado es cerrado pero tarda 2 h. Con la precipitación con etanol que se propone se hace en un sistema cerrado en 60-90 minutos.

Lo han empezado a usar en cirugía maxilofacial y confirman que acelera el proceso de reparación, que evita la invasión de otras células y que es un buen transportador.

En 1990 surge otra línea de investigación paralela al adhesivo de fibrina, basada en la concentración de plaquetas en el plasma (**plasma rico en plaquetas o PRP**) (Marx y cols.1998). La hipótesis era que los factores de crecimiento que se encuentran en las plaquetas podían potenciar la cicatrización ósea a través de mecanismos que controlan el reclutamiento, la migración y la diferenciación celular en el lecho receptor (Ballester y cols. 2003).

En 1997, Whitman y cols., comienzan a hablar del gel de plaquetas como la modificación autóloga del adhesivo de fibrina que se podía obtener de una predonación del mismo paciente o de sangre homóloga a través del centrifugado de la sangre y Marx y cols., en 1998, publican un artículo que ha tenido gran repercusión en el campo de la cirugía oral donde nos introducen sus estudios con el PRP. En ellos demuestran que el PRP junto a un injerto de hueso autólogo es capaz de favorecer la regeneración ósea en 88 mandíbulas humanas.

En España ha aparecido otro campo de estudio: la **fibrina rica en plaquetas (PRF)**. La introdujo en Francia J. Choukroun y P. Schleicher y en España la popularizó JF Ballester. Es un nuevo método para obtener un gel de fibrina rico en factores de crecimiento sin manipulación sanguínea, simple y barato.

Se deposita la sangre entera en tubos estériles 90-i, sin ningún tipo de aditivo y se centrifugan una sola vez a 280 x g 15 minutos. La acción anticoagulante de estos tubos es suficiente para permitir la centrifugación de la sangre de modo que sólo coagulará al final de ésta, sin necesidad de ninguna manipulación. Tras la centrifugación, en una centrifugadora 90-i, obtenemos 3 fracciones: en la parte baja están los glóbulos rojos y en el tercio alto el plasma sin ninguna plaqueta. Es el tercio medio el que tiene el coágulo rico en plaquetas (PRF) que retiraremos con unas pinzas y

una vez separado de los glóbulos rojos con unas tijeras, lo depositaremos en una compresa estéril. Comprimiendo el coágulo entre dos compresas podemos obtener una membrana de PRF. Este PRF tiene el 100% de las plaquetas presentes en el volumen de sangre centrifugada, fibronectina, fibrina (osteoconductora) y la totalidad de los leucocitos (acción antimicrobiana local). El disco de fibrina rico en plaquetas tendrá un color pajizo y una consistencia de gel (Ballester y cols. 2003)

Esta técnica tiene unas ventajas frente a otros preparados (Ballester y cols. 2004):

- Evita errores en la manipulación ya que no hay que hipocoagular la sangre, ni pipetear ni coagular.
- Conseguimos que los procesos de centrifugación y coagulación se desarrollen de manera sucesiva sin ninguna manipulación.
- El resultado es independiente del manipulador.
- No se utiliza trombina bovina, ni cloruro de calcio ya que la coagulación del PRP es natural hasta convertirse en un coágulo de PRF.
- El coágulo de PRF atrapa el 100% de las plaquetas disponibles, por lo que su concentración es superior a la obtenida por cualquier otro procedimiento a partir del PRP.
- Es barato y sencillo, lo que permite su uso diario en el consultorio dental.

Como podemos ver están apareciendo numerosas formas de obtener preparados que nos ayuden a mejorar la regeneración ósea.

3.4 PLAQUETAS Y FACTORES DE CRECIMIENTO

3.4.1 LAS PLAQUETAS

Las plaquetas son porciones citoplasmáticas de los megacariocitos de la médula ósea. En sangre encontramos de 150.00 a 400.000/ μ l y como no tienen núcleo para replicarse, morirán en 7-9 días.

Además de intervenir en los procesos de hemostasis mediante la formación del coágulo, inician el proceso de reparación de las heridas (Zimmermann y cols. 2003) ya que son un reservorio fisiológico de algunos factores de crecimiento que poseen un papel activo en la regeneración de los tejidos (Carlson N y Roach 2002). Las plaquetas son una fuente rica de al menos tres factores de crecimiento, el PDGF, TGF- β 1 y TGF- β 2 (Peñarrocha y cols. 2001).

Existen trabajos *in vitro* cuyos resultados indican un aumento en la proliferación y diferenciación de osteoblastos humanos y un incremento en la síntesis de matriz extracelular cuando se cultivan dichos osteoblastos en presencia de factores de crecimiento plaquetarios (Slater M y cols. 1995).

Cuando se produce una herida, las plaquetas se unirán al colágeno expuesto de la pared vascular (adhesión) y a la vez entre sí (agregación) a través de puentes de fibrinógeno. La degranulación (activación) de las plaquetas se puede realizar por varios mecanismos, mecánicos o químicos. Uno de los más fuertes es la adhesión de las plaquetas al colágeno y otros componentes del endotelio, otro sería la presencia de trombina. Al activarse, las plaquetas obtienen una forma esferoidal y espinosa con movimientos de pseudópodos y expulsión de gránulos que liberarán a su vez factores de

crecimiento. Una plaqueta en circulación posee alrededor de 35 gránulos alfa y 5 cuerpos densos (Klinger y Jelkmann 2002) (Fig.4). También se liberan nuevos factores agregantes que, junto con la fase plasmática de la coagulación, originarán trombina y posteriormente sustituirán el fibrinógeno soluble por fibrina. Este proceso no se realizará si existe ruptura o fragmentación plaquetaria por lo que las variaciones en la obtención de los preparados plasmáticos ricos en plaquetas modificarán el contenido de factores de crecimiento final (Martínez JM y cols. 2002). *In vitro* se ha visto que la membrana de las plaquetas también estimula la actividad mitogénica de las células óseas humanas contribuyendo a la regeneración de tejidos mineralizados (Fikret y Demiralp 2003).

Tras la liberación inicial de factores de crecimiento del PRP, las plaquetas sintetizarán y liberarán más GFs durante los 7 días siguientes de su vida. Una vez mueren, los macrófagos que habrán llegado estimulados por las plaquetas, liberarán a continuación más factores de crecimiento (Marx 2004).

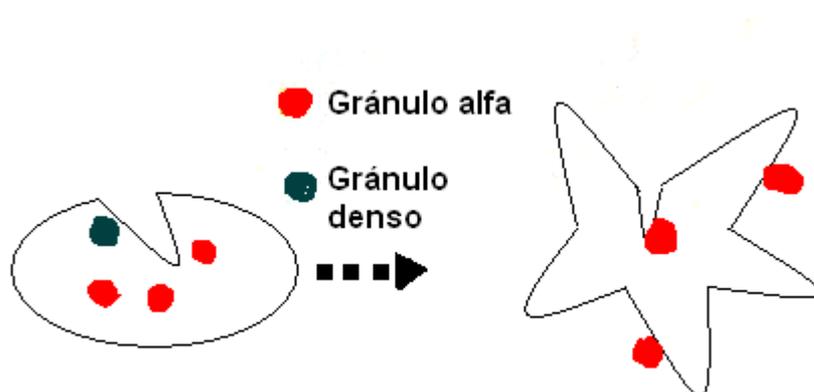


Figura 4. Activación plaquetaria con el consecuente cambio en la morfología de las plaquetas

3.4.2 LOS FACTORES DE CRECIMIENTO (GFs)

Uno de los descubrimientos de la comunidad médica dedicada a la investigación en los últimos años ha sido la caracterización de una gran familia de señales moleculares cuya función en el control del crecimiento y en la diferenciación celular se considera esencial para entender la fisiología humana y la fisiopatología en diferentes enfermedades. Su descubrimiento causó interés tanto por sus implicaciones en diferentes patologías como su posible utilización a nivel terapéutico (Serrano y Casas 1997). Actualmente se pueden aislar e incluso producir sintéticamente alguno de estos factores, como factores de crecimiento recombinantes (Greenhalgh 1996).

Se ha comprobado que los factores de crecimiento mejoran la reparación en todo tipo de heridas, en animales con diabetes (Grotendorst y cols. 1985, Broadley y cols. 1989), con malnutrición (Alberston y cols 1993), infección, hipoxia (Wu y Mustoe 1995) y tras tratamientos con agentes quimiotácticos (Lawrence y cols. 1986), esteroides y radiación. Los mecanismos de acción no están claros, pero sabemos que los esteroides, radiación y quimioterapia están diseñados para eliminar rápidamente a las células proliferantes y que los factores de crecimiento actúan estimulando la proliferación celular inhibiendo la acción de los fármacos citotóxicos (Greenhalgh 1996).

Los factores de crecimiento son proteínas que serán enviadas de una célula a otra para transmitir una señal concreta: migración, diferenciación, activación... provocando una respuesta (Greenhalgh 1996). La célula o células que reciben la señal pueden estar próximas o alejadas de la célula que ha sintetizado y liberado dicho factor (Anitua 2000, Bennet y Schultz 1993a) y en función de esta proximidad encontramos distintos tipos de respuestas (Fig. 5):

- Endocrina: las células afectadas están distantes de la célula original.
- Paracrina: la célula receptora está cerca.
- Autocrina: se unen a receptores de la misma célula que la ha liberado.
- Yuxtacrina: un factor de crecimiento se une al receptor de una célula y ésta se une a otra por contacto directo.

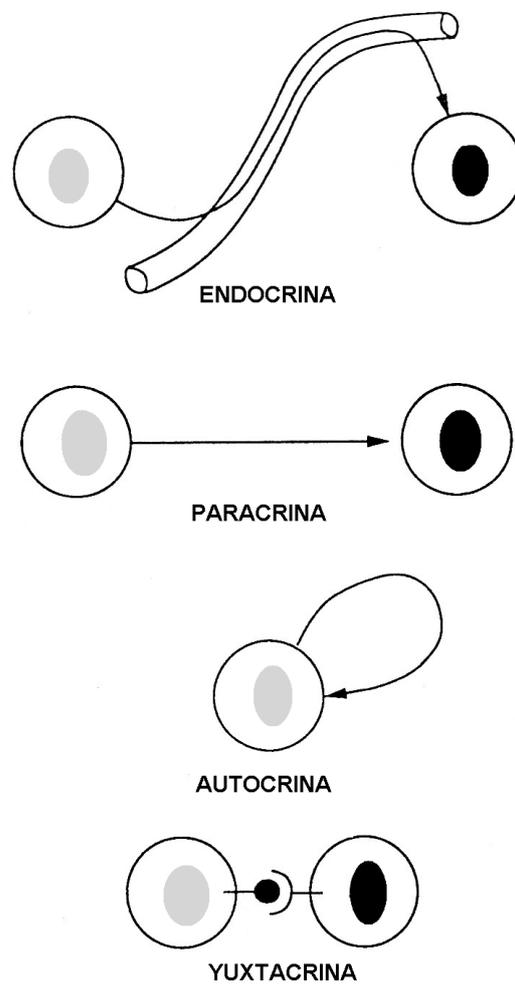


Figura 5. Interacciones de los factores de crecimiento (Basado en Bennet y Schultz 1993a). Respuesta endocrina (los factores de crecimiento actúan sobre células distantes), paracrina (células adyacentes), autocrina (sobre la célula que lo produce) y yuxtacrina (sobre el receptor de una célula que se unirá a otra por contacto directo).

Los factores de crecimiento están de forma incompleta en los gránulos. Al comenzar el proceso de coagulación que activará las plaquetas y que liberará los factores de crecimiento a través de su membrana, los GFs se unirán a cadenas de carbohidratos completándose y pasando a ser activos (Marx 2004).

Su estudio no sólo se ha limitado al hueso si no que también se ha estudiado en córneas, en el tracto gastrointestinal, hígado o incluso tejido nervioso (Bennet y Schultz 1993b).

Mecanismos por los que los factores de crecimiento mejoran la reparación de las heridas (Greenhalgh 1996, Okuda y cols. 2003)

1. Tienen actividad quimiotáctica y atraen células inflamatorias y fibroblastos a la herida.
2. Son mitógenos y estimulan la proliferación celular.
3. Estimulan la angiogénesis.
4. Producen y degradan la matriz extracelular.
5. Influyen en la síntesis de citocinas y factores de crecimiento en células vecinas.

Los nombres de los distintos factores de crecimiento reflejan su actividad o su fuente de aislamiento original (Serrano y Casas 1997). Entre los tipos celulares productores de GFs están los fibroblastos, osteoblastos, células endoteliales y leucocitos. Además existen lugares de almacenamiento como en los gránulos alfa de las plaquetas y en el hueso, adheridos a la matriz ósea.

Algunos son sintetizados por prácticamente todas las células, como el TGF- β 1, y esto significa que afectan en cierto modo a casi todos los procesos fisiológicos.

Sin embargo, cada factor de crecimiento tiene una o varias actividades concretas fundamentales y sus acciones específicas en una célula concreta dependerán del entorno celular. Para transmitir una señal concreta, una vez liberados de la célula que los fabrica, deben interaccionar con su receptor correspondiente. Estos receptores son unas proteínas que se encuentran en la membrana celular y que tienen 3 regiones: un dominio extracelular donde se unen los factores de crecimiento, uno transmembrana y otro citoplasmático (que contiene una proteína tirosinaquinasa específica). Esta proteína interviene en un sistema de segundos mensajeros que hará que la acción de los factores de crecimiento en el lugar de la lesión continúe aunque hayan desaparecido los mismos del medio (Anitua 2002).

La cantidad de factores de crecimiento liberados es indiferente ya que sólo ejercen su acción tras unirse a sus receptores específicos y estos son limitados en número. Las células normales tienen unas 20.000 moléculas receptoras por célula. Cuando el factor de crecimiento se une al dominio extracelular, provoca un cambio en el receptor que activa la proteína tirosinaquinasa (Anitua 2002). Esto hace que se fosforile una proteína que flotará en el citoplasma y transmitirá al núcleo la información. En el interior del núcleo, esta proteína hará que se expresen distintos genes (Peñarrocha y cols. 2001). La respuesta biológica vendrá determinada por la región citoplasmática y no por la extracelular, ya que los receptores para PDGF, FGF y IGF-I son todos receptores tirosinaquinasa, pero cada receptor fosforila un grupo de proteínas distinto provocando distintas acciones en una misma célula (Anitua 2002).

El sistema actúa como una cerradura de “doble llave”. No basta con que un GF se una a su receptor, es necesario que al mismo tiempo se unan los “sustratos de adhesión molecular” (SAM) a sus receptores simétricos para que actúe el segundo

mensajero, que influyendo sobre el ADN mitocondrial o nucleico inducirá la expresión de los genes específicos que desencadenarán los procesos de adhesión intercelular, migración, proliferación, diferenciación o la síntesis y secreción de proteínas (Arnás y cols. 2002).

Para evaluar la eficacia de los factores de crecimiento se utilizan distintos modelos animales, sobre todo perros y monos, y la respuesta en ambos modelos animales sería predictiva de lo que sucedería en humanos. Se puede realizar deleciones de un gen, es decir, eliminar el gen concreto que codifican los distintos GFs y ver qué sucede. Así obtenemos información sobre la función concreta de cada proteína (Anitua 2000).

Los estudios en embriología nos aportan mucha información, concretamente los mecanismos de reparación de heridas en fetos. El líquido amniótico contiene gran cantidad de factores de crecimiento y parece que el contacto tópico de la herida en un feto con este líquido, podría ser una de las causas de que las heridas fetales se reparen sin formación de cicatriz. Aún no existen trabajos definitivos que definan las combinaciones de factores de crecimiento más eficaces, así como las dosis (Anitua 2000).

3.4.3 CLASIFICACIÓN DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO

a) Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF)

- **Origen:** Se le llamó así porque se encontró por primera vez en las plaquetas dentro de los gránulos alfa. Fue Antoniades en 1981 quien lo aisló mediante electroforesis de poliacrilamida, técnica que separa las proteínas en función de su tamaño (Marx y cols. 1998, Anitua 2000).
- **Isoformas:** El PDGF es una proteína de 30 Kda de peso molecular formada por dos cadenas de aminoácidos (Aa) A y B que tienen una similitud del 60% en su estructura y que cada una está codificada por un gen diferente (Deuel y cols. 1981, Marx y cols. 1998 Anitua 1999). El gen que codifica A está en el cromosoma 7 y el que codifica B en el cromosoma 22. La cadena A está formada por 121 Aas y la B por 125. La combinación de estas dos cadenas originan tres formas: PDGF-AA, PDGF-AB y PDGF-BB y su contenido es variable según el tipo de célula. La forma AA se secreta sobre todo por los fibroblastos, células musculares lisa y osteoblastos. La forma BB está más asociada a macrófagos. Las plaquetas producen ambas formas A y B. Estudios recientes sugieren que el 65% es AB, el 23% BB y el 12% AA (Anitua 1999).
- **Receptores:** Para que las distintas isoformas de PDGF ejerzan su acción deben interaccionar con sus receptores correspondientes, que son proteínas que se encuentran insertadas en la membrana celular. Hay dos tipos de receptores de

membrana a los que se une PDGF, el alfa y el beta (Hart y cols. 1990). El alfa es una proteína de 170 Kda y el beta de 190 Kda. Ambos receptores están relacionados estructuralmente. Tienen una porción extracelular con 5 dominios tipo inmunoglobulina, una sola región transmembrana y una porción intracelular con un dominio tirosinquinasa (Heldin 1997). El receptor alfa se une a las dos cadenas A y B y por tanto a las 3 isoformas, mientras que el beta se une sólo a la cadena B y por tanto sólo a la isoforma PDGF-BB. La densidad de receptores alfa y beta varía según el tipo de célula (Hart y cols. 1988).

- **Células productoras:** Plaquetas (principalmente), macrófagos, osteoblastos (isoforma BB), condrocitos, fibroblastos y células endoteliales (Greenhalgh 1996, Marx y cols. 1998, Anitua 2000, Martínez y cols. 2002). Marx (1999b), habla de que podemos encontrar 1200 moléculas de PDGF en cada plaqueta o lo que es lo mismo, 0.06 ng de PDGF en 10^6 plaquetas. En las plaquetas se encuentran en los gránulos alfa y se liberan cuando las plaquetas se agregan e inician la cascada de la coagulación (Anitua 2000).
- **Función:** Participa en la glucogénesis. Regula el crecimiento y diferenciación celular en el sistema nervioso central durante su desarrollo (Serrano y Casas 1997). Facilita la angiogénesis por vía indirecta a través de los macrófagos que actúan sobre las células endoteliales, tiene un efecto quimiotáctico y activador sobre las células de la inflamación como macrófagos, favorecen la quimiotaxis y proliferación de células mesenquimales (mitogénico), facilita la formación de colágeno tipo I y hueso (Barnes y cols. 1999, Pierce y cols. 1989). Sin embargo,

no hace que los osteoblastos se diferencien sólo hace que se dividan y además inhibe la aposición de matriz ósea. También estimula la reabsorción ósea porque aumenta el número de osteoclastos. Su síntesis está regulada por otros factores de crecimiento como el TGF- β (Grageda 2004). Aunque como hemos dicho mejora la regeneración ósea, lo hace junto a otros factores de crecimiento, ya que no tiene propiedades osteogénicas por sí mismo. El PDGF aumenta la producción de osteopontina pero disminuye la de la sialoproteína y osteocalcina en las células óseas. También reduce la actividad de la fosfatasa alcalina y la mineralización sobre todo tras largas exposiciones. Cuando se usa en reconstrucciones óseas se encuentran resultados contradictorios. La aplicación sistémica de PDGF produce un aumento en la densidad mineral del hueso, pero se ha visto que el PDGF también inhibe la regeneración por la osteogenina en defectos craneales en ratas pero lo aumenta si se coloca una membrana como transportador (Schliephake 2002). El PDGF es el factor de crecimiento que más se ha estudiado en cuanto a su relación con el ligamento periodontal. Induce la migración de los fibroblastos y su proliferación sin producir riesgo de anquilosis (Cho y cols.1995, American Academy of Periodontology 1996, Carlson y Roach 2002). En cuanto a defectos periodontales, se ha visto que puede mejorar la altura de hueso con una dosis única en defectos en monos. Con perros beagle también se vio que el PDGF junto a membranas mejoraba la formación ósea y del ligamento. Junto a IGF produce un aumento de hueso dosis dependiente (Schliephake 2002, Pinheiro y cols. 2003) El PDGF se ha usado en terapias regenerativas periodontales pero se ha visto que la exposición prolongada de PDGF ayuda a mantener los procesos inflamatorios de la enfermedad periodontal.

- **Estudios:** Si hay una delección en el gen del receptor PDGF-alfa, en ratones patch, estos no sobreviven al nacimiento, porque durante la gestación desarrollan mutaciones graves (Bowen-Pope y cols. 1991). Además los ratones transgénicos que no tienen el gen del receptor PDGF-beta tampoco sobreviven al nacimiento y muestran trastornos hematológicos y anomalías en el desarrollo de los riñones. Esto nos indica que estos receptores son esenciales en el desarrollo embriológico y por lo tanto también lo serán en el proceso de regeneración (Anitua 2000).

b) Factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF)

- **Origen:** Originalmente se aisló a partir de cultivos celulares de la hipófisis.
- **Isoformas:** Es una proteína homodimérica cuya secuencia de aminoácidos tiene una similitud del 24% con PDGF- β , pero se unen a distintos receptores e inducen efectos biológicos distintos (Anitua 2000). Tiene 4 isoformas (Martínez y cols. 2002).
- **Células productoras:** Plaquetas, macrófagos, osteoblastos y células musculares lisas, sobre todo en estados de hipoxia (Martínez y cols. 2002).
- **Función:** Aumenta la neovascularización, favoreciendo la diferenciación, proliferación y emigración de las células endoteliales. Su acción parece estar regulada por la acción de TGF- β y PDGF (Arnás y cols. 2002).

c) **Factores de crecimiento insulínico (IGF-I y IGF-II)**

- **Isoformas:** Es una familia de proteínas con una estructura en cadena simple que poseen una semejanza del 50% con la insulina. Tiene 2 isoformas, la tipo I y II. El IGF-I es el factor de crecimiento más abundante en la matriz ósea. Es una proteína formada por 70 aminoácidos con tres puentes disulfuro. Su peso es de 7.6 KDa. El IGF-II es un péptido neutro de 67 aminoácido y un peso de 7.4- entre el IGF-I y el II hay un 62% de estructura homóloga (Serrano y Casas 1997).
- **Receptores:** Preferentemente se unen a su propio receptor pero también pueden unirse a otros. El receptor de IGF-I tiene su estructura similar al receptor de la insulina pero el del IGF-II es totalmente distinto.
- **Células productoras:** Plaquetas, macrófagos, osteoblastos, células madre mesenquimales y matriz ósea. Ambas formas están en el hueso en gran cantidad y en menor proporción están en el sistema vascular transportado por complejos con proteínas específicas de unión. Existen muchos factores que pueden modular la cantidad de IGF-I en sangre como la edad, sexo, embarazo o los estrógenos (Serrano y Casas 1997).
- **Función:** Estimula la formación de hueso induciendo la proliferación celular, la diferenciación y la biosíntesis de colágeno tipo I (Anitua 2000). El IGF-I por sí solo no es capaz de estimular la reparación ósea (Arnás y cols. 2002),

normalmente necesita estar combinado con otro factor de crecimiento como PDGF o FGF (Greenhalgh 1996, Schliephake 2002).

- **Estudios:** Hay pocos estudios donde se haya aplicado el IGF solo y haya sido evaluado. La mayoría de los estudios han usado su combinación con PDGF ya que obtienen mejores resultados (Schliephake 2002), tal es el caso del estudio de Lynch y cols. (1991b), que obtiene un 27% de contacto a las 3 semanas con PRGF + IGF-I comparado con 34,27% donde no usó factores de crecimiento.

d) Factor de crecimiento transformado (TGF)

- **Origen:** Se llama así porque se aisló por primera vez en los tejidos transformados (sarcomas). Inicialmente sólo se podían extraer de tejidos transformados, pero más tarde se descubrió la existencia de dos tipos y ambos se extrajeron de tejidos normales mediante purificaciones bioquímicas (Serrano y Casas 1997). Se identificó como un factor que promovía la transformación de los fibroblastos en cultivo celular (Burgess 1989).
- **Isoformas:** Es una mezcla de dos proteínas TGF- α y β . El TGF- β , cuyo peso es de 25 Kda, está formado por dos subunidades de 112 aminoácidos unidas por puentes disulfuro (Assoian y cols. 1989) y surge a partir de un precursor de 391 aminoácidos por una proteólisis extracelular (Serrano y Casas 1997). Su síntesis se debe a un gen localizado en el cromosoma 19 (Anitua 1999). Tiene 3 estructuras diferentes: TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3. Los tipos β 1 y β 2 se parecen

en un 72%. El β_3 es un heterodímero formado por una cadena simple de TGF- β_1 y otra del β_2 . El TGF- β se secreta de forma inactiva o latente formando dos tipos de complejos según se asocie con una o dos proteínas. Estas proteínas parece que facilitan su secreción y también contribuyen a su estabilización (Greenhalgh 1996). TGF- β tiene una vida media libre de dos minutos, mientras que en su forma latente la tiene de 90 minutos. Para que exista actividad biológica ha de estar en forma libre. El TGF- α está muy relacionado con el EGF. Se asemejan entre sí en un 42%, es decir tienen en común 21 de los 50 aminoácidos que los componen. Se sintetiza como un largo precursor de 160 aminoácidos aunque la parte activa sólo consta de 50. El precursor se encuentra anclado en la superficie interna celular, y en el proceso de separación del factor activo es consecuencia de la actuación de una proteasa de membrana específica para tal fin. Su gen está localizado en el cromosoma 2 y su peso molecular es de 5,6 (Serrano y Casas 1997). El mecanismo fisiológico de liberación del TGF de la proteína no se conoce, aunque parece que la proteólisis es una parte (Anitua 2000).

- **Receptores:** Para que TGF- β actúe deberá interaccionar con sus receptores. Tres están muy bien descritos, el I, II y III, pero el IV, V y VI no lo están (Miyazono y Heldin 1993). El TGF- α se une al mismo receptor que el EGF, estableciéndose una competencia (Serrano y Casas 1997).
- **Células productoras:** El TGF- β_1 se encuentra sobre todo en plaquetas, linfocitos y neutrófilos, mientras que el TGF- β_2 se encuentra principalmente en

hueso, linfocitos plaquetas y neutrófilos. El TGF- α es sintetizado por macrófagos, eosinófilos, hepatocitos o células gastrointestinales (Marx y cols. 1998, Martínez y cols. 2002).

- **Función:** El TGF- β parece ser el factor de crecimiento más importante en la regeneración. Bennet y Schultz (1993b), comprobaron que inyectado promovía la formación de hueso y cartílago *in vivo*. El uso de TGF- β solo, en reconstrucciones óseas se ha asociado a resultados inciertos. Tiene dos efectos sobre células indiferenciadas. A altas dosis suprime la proliferación y diferenciación osteoblástica, cosa que no sucede a bajas concentraciones. Podemos decir que modula la proliferación celular, en unos casos la estimula y en otros casos la inhibe. Sus efectos dependen de su fuente, de la dosis aplicada y del ambiente que le rodee (American Academy of Periodontology 1996). Los efectos mitogénicos observados a bajas concentraciones son ejercidos de forma indirecta por inducción de la síntesis de PDGF y ulterior acción autocrina estimuladora de la proliferación celular por este último. Por el contrario, cuando se administran concentraciones mayores de TGF- β 1, se producía una inhibición de la expresión del receptor de PDGF, lo cual conlleva a una disminución en la proliferación celular (Arnás y cols. 2002). Generalmente actúa como supresor, mejora la deposición de matriz extracelular aumentando la síntesis e inhibiendo la degradación (American Academy of Periodontology 1996, Marx y cols. 1998). Produce quimiotaxis y mitogénesis de precursores de los osteoblastos y además inhibe la acción de los osteoclastos (Anitua 1999). El TGF- β 1 en concreto es un potente estimulador de la deposición de colágeno además inhibe

su reabsorción degradación destruyendo las proteasas (Pierce y cols. 1989, Carlson y Roach 2002). Existen estudios que han demostrado que si se bloquea, se da una disminución en la cicatrización. El TGF- β 1 también es muy importante en la regulación de la inflamación. Los animales que no lo poseen pueden morir a consecuencia de la respuesta inflamatoria. El TGF β se ha usado en muchos estudios de reconstrucciones óseas, pero los resultados son ambiguos. Con transportadores de carbonato cálcico en defectos de mandíbula en perros no muestra un aumento en la formación ósea, mientras que combinado con BMP, PDGF y bFGF, producen un aumento de hueso significativo. La mejora depende del transportador que lleve (Schliephake 2002). El TGF- α favorece la proliferación de los osteoblastos, inhibe la síntesis de matriz osteoide y estimula la reabsorción del tejido esquelético (Arnás y cols. 2002). Posee muchas acciones biológicas comunes al EGF como: aumenta la proliferación y la migración de células epiteliales, libera iones calcio del hueso, inhibe la actividad de osteoblastos, tiene efecto angiogénico, interviene en el desarrollo tumoral estimulando la proliferación celular tumoral por un mecanismo autocrino e induciendo la angiogénesis tumoral usando un mecanismo paracrino (Serrano y Casas 1997).

e) **Factor de crecimiento epidérmico (EGF)**

- **Isoformas:** La molécula precursora es una glucoproteína de membrana de gran tamaño de 1217 aminoácidos que por proteólisis origina un fragmento de 53

aminoácidos con 3 puentes disulfuro en su estructura, que es el factor de crecimiento EGF (Serrano y Casas 1997, Anitua 2000). Tiene una isoforma de gran similitud al TGF- α , lo que hace que se unan al mismo receptor. Su acción biológica es similar pero no idéntica (Greenhalgh 1996).

- **Receptores:** Se ha identificado un receptor, una gran glicoproteína transmembrana con actividad tirosinaquinasa. Cada célula tiene 20.000 receptores (Bennet y Schultz 1993a).
- **Células productoras:** La mayor fuente son las glándulas salivales aunque también las producen plaquetas, fibroblastos y células endoteliales. Se ha demostrado la presencia de receptores específicos en la mucosa oral y se acepta que este factor tiene un papel importante en el mantenimiento de la integridad de los tejidos orales (Serrano y Casas 1997).
- **Función:** Tiene acciones mitogénicas, de migración y de diferenciación, no sólo sobre las células epiteliales, sino también sobre fibroblastos, células renales y células gliales a partir de células mesenquimales (Martínez y cols. 2002). También incrementa la proliferación de osteoblastos, aunque inhibe la síntesis de la matriz osteoide (Arnás y cols. 2002). Además, induce la formación rápida del diente, estimula la formación de tejido de granulación e inhibe la liberación de ácido por la mucosa gástrica (Serrano y Casas 1997).

f) **Factores de Crecimiento fibroblástico ácido y básico (aFGF y bFGF)**

- **Isoformas:** Son 9 miembros. Los primeros en descubrirse fueron el ácido o tipo I y el básico o tipo II (Greenhalgh 1996), esta última parece ser la más potente en la función mitogénica. Al contrario que el resto de los factores, los de esta familia no son liberados en forma soluble, están asociados con los componentes de la matriz extracelular y son transportados a la zona exterior celular donde interactúan con los receptores celulares. Es muy difícil detectar el ARN-mensajero que codifica el factor y que es requerido para su síntesis. Por lo tanto, estarían presentes de forma almacenada y sólo se utilizarían en caso de emergencia. El FGF básico es una cadena peptídica simple compuesta por 146 aminoácidos y un peso molecular entre 16-18 KDa. El ácido es un péptido de 140 aminoácidos con un peso molecular de 15 KDa. El factor básico está localizado en el cromosoma 4 y el ácido en el 5 (Serrano y Casas 1997).
- **Receptores:** Sólo poseen un único receptor al que se le unen los dos con actividad tirosinaquinasa (Greenhalgh 1996, Serrano y Casas 1997).
- **Células productoras:** Fibroblastos (principalmente), macrófagos, osteoblastos, plaquetas, células endoteliales (Carlson y Roach 2002) y matriz ósea (American Academy of Periodontology 1996).
- **Función:** La forma básica es más potente que la ácida. Aumentan la proliferación y la diferenciación de osteoblastos e inhiben la de osteoclastos.

Además, aumentan la proliferación de fibroblastos y favorecen la angiogénesis por su acción mitogénica y quimiotáctica sobre células endoteliales (Martínez y cols. 2002). El TGF- β es capaz de potenciar o inhibir la actividad del FGF dependiendo del tipo celular sobre el que actúa. Sobre los osteoblastos potencia la actividad del FGF básico, y sobre las células endoteliales vasculares inhibe la actividad mitogénica del FGF básico y ácido (Serrano y Casas 1997).

3.4.4. EFECTOS DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO RECOMBINANTES Y DE LOS PREPARADOS PLASMÁTICOS

Tal vez al estudiar un único factor de crecimiento pueden quedar ocultas respuestas biológicas importantes que suceden cuando los factores de crecimiento actúan sinérgicamente (Giannobile y cols.1997, Anitua 2002). Es por esto que los laboratorios están estudiando si actúan más solos o combinados, intentando aplicarlos como factores de crecimiento recombinantes.

Tampoco se conocen las concentraciones ideales de cada factor de crecimiento o la dosificación adecuada para cada situación terapéutica en concreto. En estudios *in vitro* se ha visto que puede requerirse más de un factor de crecimiento para que la célula entre en el ciclo celular. Stiles (1979) vio como células tratadas sólo con PDGF, FGF o IGF-I, no entraban en el ciclo celular, pero sí, si al PDGF o FGF se le añadía IGF-I.

También se ha visto que ciertas combinaciones de factores de crecimiento pueden tener un efecto de sinergismo o antagonismo. Hennessey y cols. (1990) observaron que el EGF más insulina tenían efecto aditivo y Giannobile y cols. (1997) vieron que existían interacciones sinérgicas entre IGF-I y PDGF-BB, bFGF y TGF- β 1 sobre la actividad mitogénica de osteoblastos y la síntesis de proteínas.

Lynch y cols., en 1987, comprobaron que el PDGF y el IGF-I tenían acciones sinérgicas para la estimulación de la regeneración ósea alrededor de implantes en perros y en 1989 (a y b), tras aplicar PDGF y IGF-I sobre las raíces de perros periodontalmente afectadas, observaron de nuevo más formación de hueso y cemento donde aplicaron los factores de crecimiento comparado con la zona control. Fue en 1991(a) cuando además vieron que no aumentaba el riesgo de anquilosis en las áreas tratadas periodontalmente

si se utilizaban sobre la superficie radicular una vez se había realizado la cirugía periodontal.

Wang y cols., en 1994, estudiaron el efecto del PDGF-BB sobre la proliferación de fibroblastos también sobre superficies radiculares de dientes de perros. Compararon la aplicación de una barrera sobre el defecto, de PDGF, de ambas combinadas y de un control. El PDGF fue capaz de estimular en una semana la proliferación de fibroblastos comparado con la membrana y con el control y vieron que el añadir una membrana al PDGF no mejoraba sus resultados.

Strayhorn y cols., en 1999, observaron los efectos de BMPs, PDGF y IGF solos o combinados sobre osteoblastos de ratas *in vitro*. Comprobaron que el IGF y las BMPs promovían la diferenciación de osteoblastos mientras que el PDGF la inhibía. En cuanto a la proliferación celular, sucedía lo contrario, el IGF y las BMPs no la aumentaban, mientras que el PDGF sí lo hacía.

Stephan y cols., en el 2000, usaron una matriz de colágeno con hueso bovino junto a PDGF-BB y vieron que esta unión hacía que los factores de crecimiento se liberaran lentamente (a los 10 días se habían liberado el 30%) obteniendo mejor proliferación de osteoblastos que si usaban sólo la matriz.

De modo que los factores de crecimiento parecen tener una relación muy estrecha con la regeneración ósea y entre ellos, el PDGF juega un papel muy importante induciendo la proliferación de células indiferenciadas, aunque *in vitro*, la diferenciación de esas células en osteoblastos es inhibida. La actividad del PDGF es modulada por las interacciones con otros GFs. Puede mejorar la formación ósea junto a IGF, TGF- β o BMP, pero no tiene propiedades osteogénicas por él mismo. La combinación con PDGF parece prometedora en defectos alrededor de implantes y en la pérdida ósea periodontal.

Tema diferente es la aplicación del plasma rico en plaquetas (PRP), donde se liberarán factores de crecimiento naturales del paciente, que son distintos a los GFs recombinantes, que se aplicarán a dosis determinadas exógenamente. Este PRP será el mismo coágulo que existe normalmente en una herida quirúrgica, pero con una concentración plaquetaria mayor, lo que muchos autores piensan ayudará en la regeneración (una de las funciones principales del coágulo). Sin embargo, Schmitz y Hollinger (2001) dicen que algunas formas de PDGF y TGF- β que están en el PRP, son inhibitorias de la reparación tisular ósea y que los efectos sobre el hueso, dependerán de cómo se liberen estos factores de crecimiento.

La actividad del PRP no equivale a la de la suma de los factores de crecimiento por separado. Kawase y cols. (2005), vieron como el PRP era capaz de aumentar la actividad de la ALP (fosfatasa alcalina), al contrario que el TGF- β 1 y el PDGF-AB.

Soffer y cols. (2004) estudiaron el lisato plaquetario humano en funciones seleccionadas como la adhesión, migración y proliferación de células óseas de ratas y la maduración y mineralización de la matriz extracelular. En cuanto a la adhesión, vieron que fue menor que en el control en la primera hora, pero a las 24h era equiparable. También observaron que en presencia del lisato plaquetario, disminuía la expresión de la actividad de la ALP, que es un marcador de la diferenciación de células óseas, y el acúmulo de calcio a corto (48h) y a largo plazo (11días), considerado un índice de mineralización de la matriz extracelular. Como vemos, por un lado mejora la migración y la proliferación celular, y por el otro inhibe su diferenciación. Estos resultados coinciden con los de Kart y cols. (2006). Es posible que breves exposiciones de células óseas al lisato mejoren la formación *in vivo* de hueso, pero las prolongadas como en la inflamación crónica, pueden inhibir la diferenciación y limitar la regeneración.

Ogino y cols. (2005) también observaron los efectos del PRP y del PPP sobre la proliferación y diferenciación de células óseas en ratas. Sus resultados son idénticos a los de Soffer y cols. (2004) y a los de Fortes y cols. (2005), el PRP mejora la proliferación comparado con el grupo control pero hace que disminuya la actividad de la fosfatasa alcalina y por tanto la diferenciación celular.

Arpornmaeklong y cols. (2004) estimularon células óseas con PRP, PPP y con rhBMP-2, dejando un grupo control. Durante 21 días midieron la proliferación celular, la actividad de la fosfatasa alcalina y el contenido de calcio. El PRP tenía una estimulación dosis dependiente de la proliferación celular mientras que disminuía la actividad de la ALP y el depósito de calcio, lo que sugería que inhibía la diferenciación de osteoblastos. En cambio la BMP-2 tuvo una respuesta celular opuesta, inducía una mayor actividad de ALP y de deposición mineral. Como vemos, el PRP no es el sustituto de la BMP-2 en la inducción osteogénica. El PPP, por otra parte, sí aumentaba la actividad de la ALP y la mineralización, tal vez debido a que el plasma también tiene factores de crecimiento capaces de promover la proliferación y la diferenciación celular.

Como hemos comprobado en los distintos artículos, no está tan claro que el plasma rico en plaquetas por sí solo vaya a favorecer la mayor formación de hueso, ya que aunque sí promueve la proliferación celular, también inhibe su diferenciación y la mineralización de la matriz extracelular. Hemos de tener en cuenta que ahora estamos hablando de plasma rico en plaquetas en general, pero no todos los PRP son iguales, ni se obtienen de la misma forma, por lo que estaremos utilizando en realidad distintos preparados plasmáticos ricos en plaquetas, lo que dificulta en ocasiones la comparación de los resultados publicados.

3.5 PREPARADOS PLASMÁTICOS RICOS EN PLAQUETAS

3.5.1 MÉTODOS DE OBTENCIÓN

Actualmente las preparaciones que contienen plaquetas humanas se pueden usar de forma **sistémica** mediante transfusiones intravenosas en pacientes con neoplasias o enfermedades gastrointestinales, para prevenir o tratar el sangrado debido a la trombocitopenia (Zimmermann y cols. 2001) y, de forma **local** junto a plasma, como fuente de factores de crecimiento (sustancias fundamentales en la regeneración ósea) (Greenhalgh 1996, Roldán y cols. 2004).

Los estudios más recientes en cuanto a la aplicación sistémica de las plaquetas, buscan conseguir solamente plaquetas, intentando reducir la contaminación por glóbulos blancos ya que éstos son los responsables de algunas reacciones adversas tras una transfusión (Wadha y cols. 1996). En cuanto a las preparaciones usadas de forma local, son muchos los estudios que proponen diversos protocolos para su obtención, según la cantidad de sangre de la que se parte y según su origen y destino. Podemos hablar de **preparados autólogos** cuando se le aplican al mismo paciente del que proviene la sangre y **homólogos**, cuando provienen de muestras de los bancos de sangre. También diferenciaremos si se obtienen en la clínica en el momento de la intervención o en el laboratorio antes de la misma.

Podemos clasificar los preparados plasmáticos ricos en plaquetas de dos formas según el tipo de separador celular que utilizemos para obtenerlos (Sánchez y cols. 2003):

1. Separadores generales: separador celular por gradiente de densidad, como el MEDTRONICS AT 500.

Estos preparados, que serán una modificación del adhesivo de fibrina, se obtienen a partir de grandes cantidades de sangre (450-250 ml) mediante el proceso de **plasmaféresis**, los días previos a la cirugía o minutos antes de la intervención.

La sangre utilizada podrá ser del propio paciente o puede provenir de donantes. Según el origen, hablaremos de un preparado plasmático rico en plaquetas autólogo u homólogo.

Para obtener un **PRP autólogo** podemos seguir distintos protocolos.

En 1998, Marx y cols., describieron el siguiente procedimiento: Extraen 450 ml de sangre al paciente a través de un catéter, a una velocidad de 50 ml/min. Mientras se extrae la sangre, se le añadirá fosfato de dextrosa citratado para impedir su coagulación y a continuación se realizarán centrifugaciones sucesivas que harán que se vayan separando las fracciones sanguíneas de menor a mayor densidad. A 5600 rpm se separará el PPP (plasma pobre en plaquetas) (200 ml), luego se baja a 2400 rpm para acabar de separar los glóbulos rojos (180 ml) del PRP (70 ml) que permanecerá a temperatura ambiente hasta que se necesite (Marx y cols.1998, Marx 1999b). En ese momento se mezclará con cloruro cálcico y trombina bovina para coagular en 5-30 segundos obteniendo un gel de plaquetas. Las plaquetas se agregarán y se degranularán, liberando de su interior los factores de crecimiento (Whitman y cols. 1997, Anitua 2000).

Las proporciones de la mezcla del cloruro y la trombina según Whitman y cols. (1997) serían: 7 ml de PRP, 2 ml de aire y 1 ml de la mezcla de 10.000 u de trombina

bovina disuelta en 10 ml de cloruro cálcico al 10%. Marx y cols. (1998), modifican levemente las proporciones. Unirían 6 ml de PRP, 1 ml de la mezcla y 1 ml de aire. Este proceso de obtención del PRP tarda 45 minutos en realizarse. Una vez finalizado, el anestesista tiene la opción de devolver al paciente las dos fracciones de sangre que no ha utilizado, el PPP y los glóbulos rojos, a través del catéter conectado a la vena central o a venas periféricas .

Tanto para Whitman como para Marx, el PRP será la fracción de plasma que contiene el buffy coat (BC), que es la capa leucoplaquetaria que se ve tras la centrifugación entre el plasma y los glóbulos rojos. Es blanquecina y tendrá de media un millón de plaquetas. Según la experiencia de Marx y según el test de Reeder (1993), las plaquetas de mayor actividad están mezcladas con el milímetro más superior de las células rojas, por lo que hay que incluir esta capa en el PRP producido, que por tanto tendrá un color rojizo.

Fuerst y cols. (2003 ,2004a, 2004b), describen otro protocolo para obtener el plasma rico en plaquetas que ellos denominarán “platelet released growth factors” (PRGF), es decir, factores de crecimiento liberados de las plaquetas. Parten de 450 ml de sangre y realizarán tres centrifugados. El primero será a 2890 x g para separar el plasma que se volverá a centrifugar a 153 x g 12 minutos. Entonces se obtendrá un concentrado de plaquetas (PC), que tras eliminar el PPP, se centrifugará de nuevo a 1400 x g 10 minutos, obteniendo por fin el PRGF. También lo harán coagular con trombina pero, hasta que se necesite, lo mantendrán congelado a - 40°C. La ventaja de esta técnica es que no hay límite de tiempo entre la extracción de sangre y la cirugía.

Otros autores obtienen PRP autólogo a partir de 250 ml de sangre sin reintroducir luego ningún componente sanguíneo al paciente.

Shanaman y cols. (2001), obtienen 50 ml de PRP a partir de 300 ml de sangre mediante aféresis. Su preparado aguanta 24 h antes de utilizarse.

Dugrillon y cols. (2002), mediante un sistema de bolsas, centrifugan 250 ml de sangre a 205 x g 20 minutos y el plasma sobrenadante lo centrifugarán de nuevo a 800 x g 15 minutos para obtener un concentrado de plaquetas.

Graziani y cols. (2005), parten también de cantidades entre 250 y 350 ml de sangre que extraen 2 días antes de la intervención. Hacen un primer centrifugado a 2500 rpm 15 minutos separando el plasma de los glóbulos rojos y, a continuación, centrifugan la capa superficial a 3000 rpm 10 minutos para obtener una capa superior de PPP y otra inferior de PRP que congelarán hasta su uso. Además usarán un crioprecipitado de fibrinógeno que obtendrán centrifugando el PPP a 2000 rpm 15 minutos a - 4°C. Tras congelarlo a - 80°C, un día antes de su uso lo llevarán a 4°C y, una vez eliminada la capa sobrenadante, seleccionarán la porción rica en fibrinógeno que usarán como adhesivo de fibrina.

El **PRP homólogo** lo obtendremos a partir de sangre total procedente del banco de sangre. Se recogerán 450ml de sangre donada en un sistema de cuatro bolsas de sangre (Maco Pharma International, Langen, Germany) y se preparará el BC (80ml) tras centrifugar la sangre a 3000 x g 13 minutos. Este se volverá a centrifugar a 400 x g 5 minutos para obtener el PRP. Si se centrifugara de nuevo a 3000 x g 15 minutos, obtendríamos entonces un concentrado de plaquetas (Gehring y cols. 1999, Zimmermann y cols. 2001).

La diferencia entre este gel de plaquetas y el adhesivo de fibrina, es que en el gel aparecen todas las proteínas plaquetarias y que la concentración de fibrinógeno es mucho menor (2-4 mg/ml), 15 veces menos que en la cola de fibrina. Esto hace que sus propiedades físicas sean distintas (Anitua 2000). El adhesivo es mucho más viscoso que el gel, pero la fuerza tensil y la capacidad adhesiva de éste también son adecuadas, y ambos controlan eficazmente el sangrado.

El uso de estas sustancias como agentes hemostáticos y de sellado ha sido uno de los grandes avances en cirugía de los últimos años. En concreto, en el campo de la cirugía maxilofacial, el gel de plaquetas se ha utilizado mezclado con injertos de hueso ilíaco en reconstrucciones óseas (Whitman y cols. 1997, Marx y cols.1998) y en elevaciones de seno (Kassolis y cols. 2000), pero esta técnica tiene algunas desventajas como que el equipo necesario es muy caro y que hay que extraer grandes cantidades de sangre, por lo que su uso en la ámbito privado no es práctico. A todo esto se añaden las críticas al uso de la trombina bovina. Anitua no la recomienda porque con ella las plaquetas van a liberar el contenido de sus gránulos rápidamente y además se ha asociado la trombina bovina con el desarrollo de anticuerpos para los factores de la coagulación V, XI y trombina (Landesberg y Moses 1998, Landesberg y cols. 2000).

A favor de la misma se encuentra Marx, que lleva usando este gel de plaquetas en 312 casos desde 1996 y aún no ha tenido ningún caso de coagulopatías. Dice que las concentraciones usadas actualmente son de 0'2 µg/ml mientras que las usadas en los casos donde aparecieron coagulopatías eran de 50 a 100 µg/ml y que además en ellos hubo contacto con la circulación sistémica, cosa que no sucede en la cirugía maxilofacial (Marx y Meltzer 2000).

2. Separadores celulares que obtienen concentrados de plaquetas

También podemos obtener preparados plaquetarios en el gabinete dental para usar de forma local a partir de cantidades de sangre menores. El uso ambulatorio se inicia con el sistema PCCS de la casa 3i al que le siguen el sistema Curasan y Harvest Technologies (The SmartPrep Centrifuge system).

a) Platelet Concentrate Coleccion System (PCCS) 3i, Implant Innovations, Palm Beach Gardens, FL (USA).

Se realiza un doble centrifugado mediante bolsas unidas que poseen un sistema de válvulas. Usan la centrifugadora modificada IEC Centra CL-2 con rotor horizontal (IEC Model 7427, Internacional equipment Company, Needham Heights, MA) (Weibrich y cols. 2005). Se carga una primera bolsa de 60 ml con 54 ml de sangre y 6 ml de citrato sódico y se centrifuga primero a 3000 rpm 3 minutos y 45 segundos. El PPP y el PRP se transferirán a la segunda bolsa tras añadir aire en la primera. A continuación se vuelve a centrifugar a 3000 rpm 13 minutos y el PPP se vuelve a transferir a la primera bolsa, permaneciendo el PC (concentrado de plaquetas) en la segunda. Se obtienen entre 5 y 7 ml de concentrado (Ballester y cols. 2003) y se tarda de 20 (Sánchez y cols. 2003) a 35 minutos en prepararlo (Appel y cols. 2002).

b) Harvest SmartPrep Platelet Concentrate System (HSPCS) (Harvest Technologies, Norwell, MA).

Procesa cantidades de sangre de 45 a 60ml para obtener de 5 a 6ml de PRP por ciclo (Peñarrocha y cols. 2001, Martínez y cols. 2002, Tischler 2002) en 15 minutos

(Sánchez y cols. 2003). Este sistema, automáticamente mediante dos centrifugados nos separa la sangre en células rojas, PPP y PRP. Con el PRP haremos el gel de plaquetas y con el PPP podemos preparar un adhesivo de fibrina. El adhesivo de fibrina obtenido de esta forma tiene una moderada concentración de fibrinógeno pero aún así es bastante efectivo. A más fibrinógeno más denso será y más podrá interferir en la curación de las heridas, porque impide el acceso de las plaquetas con sus factores de crecimiento (Man y cols. 2004), aunque Graziani y cols. (2005) lo usan junto al PRP y hueso, con resultados satisfactorios.

Las ventajas de estos dos métodos son:

- Menor volumen de sangre
- Realización rápida (35 minutos)
- Sin contaminación bacteriana por hacerse en bolsas cerradas

Desventajas:

- Concentración de plaquetas y factores de crecimiento menor
- Centrifugadoras de coste elevado
- Material específico desechable
- Manipulación compleja
- Uso de trombina bovina
- Doble centrifugado

c) Centrifugadora corriente

Para obtener el PRP mediante una centrifugadora convencional, extraeremos pequeñas cantidades de sangre al paciente sobre un anticoagulante para luego centrifugarla y obtener así las distintas fracciones plasmáticas. A continuación se separará la fracción deseada y se hará coagular antes de aplicarla localmente. Son varios los protocolos que encontramos según sean la velocidad y el tiempo del centrifugado y el número de veces que se realice, lo que influirá en la cantidad y calidad de las plaquetas y de los factores de crecimiento obtenidos. Distinguimos principalmente dos protocolos, el perteneciente al sistema Curasan (Alemania) o el descrito por el Dr. Anitua (España).

c.1) Sistema Curasan (Alemania): Se usa una centrifugadora estándar de laboratorio con 8 aplicadores, un mezclador y un kit con material desechable. Cada aplicador se llena con 7,5 ml de sangre y 1 ml de CPAD como anticoagulante. Se hará un primer centrifugado a 2400 rpm 10 minutos y tendremos la sangre dividida en tres partes, glóbulos rojos, PRP y PPP. Tanto el PRP como el PPP se volverán a centrifugar a 3600 rpm 15 minutos y así obtendremos según Appel y cols. (2002), el PC (concentrado de plaquetas).

Ventajas:

- Menor volumen de sangre
- Centrifugadora convencional

Desventajas:

- Preparación del PC más costosa y larga (70 minutos)
- Puede haber posible contaminación bacteriana.
- Doble centrifugado
- Uso de trombina bovina

c.2) Técnica PRGF System, BTI BioTechnology Institute (Spain, Anitua):

Anitua es el primero que consigue formular un protocolo realmente practicable en un consultorio dental, a partir de un volumen limitado de sangre, sin necesidad de usar trombina bovina y con una única centrifugación (Ballester y cols. 2004). Tiene muchísimas aplicaciones tanto en cirugía maxilofacial como periodontal (Assoian y cols. 1983) aunque también existen estudios en oftalmología (Gehring y cols. 1999) o en cirugía plástica (Lozada y cols. 2001) entre otros.

Extrae al paciente de 5 a 40 ml de sangre sobre citrato sódico al 3,8% y la centrifuga a 160, 270 ó 280 x g 6-7 minutos (según sus distintas publicaciones). A continuación obtiene distintas fracciones. Anitua en 1999, divide la fracción plasmática en dos, plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) y plasma pobre en factores de crecimiento (PPGF). La fracción que utilizará será la rica en factores de crecimiento junto a 1-2 mm de células rojas. En el 2000 obtiene tres fracciones, PRGF, PGF y PPGF de 0.5 ml cada una y en esta ocasión evita coger hematíes. En el 2001a las fracciones son las siguientes: porción muy rica en factores de crecimiento (PVRGF) (0.2 ml superiores a la serie roja), porción rica en factores de crecimiento (PRGF) (los siguientes 0.3 ml), porción con factores de crecimiento (PGF) (0.5 ml) y porción pobre

en factores de crecimiento (PPGF) (1ml). En esta ocasión utiliza el mm superior a la serie roja, obtenido con una pipeta para evitar crear interferencias. Conseguirá que forme un coágulo al añadir 50 microlitros de cloruro cálcico al 10% por cada ml de PRP.

Las ventajas de obtener plaquetas de esta forma son (Anitua 2001a):

- Menor volumen de sangre
- La contaminación por glóbulos blancos en el PRP obtenido a partir de una centrifugadora convencional es mucho más alta que en el resto por lo que tendremos mayor número de factores de crecimiento. Esto en según que artículos es una ventaja o un inconveniente como veremos más adelante.

- El equipo es sencillo
- Coste razonable.
- Molestias mínimas para el paciente.
- Método rápido 15 (Anitua 2000) - 25 minutos (Weibrich y cols. 2005)
- No hace falta que se realice en un medio hospitalario.
- Un centrifugado
- No se necesita la trombina bovina

Las desventajas serían (Marx 2001, Zimmermann y cols. 2003):

- No se puede usar si se precisa máxima esterilidad.
- Método que produce la mayor activación plaquetaria y por tanto la mayor pérdida de factores de crecimiento.
- Método con el que menos plaquetas obtenemos.

Estos preparados se aplicarán solos, con hueso, con sustitutos óseos o con BMP recombinantes, según los autores, en las diversas situaciones: sobre tejidos blandos (ya que está demostrada la mejora en la epitelización de la piel, injertos palatinos y colgajos gingivales) (Tischler 2002), como membrana biológica sobre un injerto, en extracciones de pacientes anticoagulados (Della Valle y cols. 2003), en implantología, regeneración periodontal, elevaciones del suelo de senos maxilares (Olmedo y cols. 2003), etc...

3.5.2 CENTRIFUGADORAS (Ballester y cols. 2003)

Cualquier procedimiento hecho con una centrifugadora se puede reproducir en otra con radio máximo diferente. Para alcanzar el mismo resultado compensaremos la diferencia en radio con cambios de velocidad o en el tiempo de centrifugación.

La “g” con la que los autores describen las características del centrifugado no es una medida de velocidad, sino el valor que representa la **Fuerza Centrífuga Relativa** de una centrifugadora. La “g” para un radio dado (radio máximo: distancia radial desde el centro de rotación al punto más alejado del rotor durante la centrifugación) como vemos en la fórmula, depende de la velocidad.

$$g = 1.12 \text{ radio máximo} \frac{\text{Rpm}^2}{1000}$$

El rotor de las centrifugadoras puede ser horizontal o de ángulo fijo (Fig. 6). En las de rotor horizontal los tubos están sujetos de tal manera que durante la centrifugación pivotan en una posición horizontal a consecuencia de la fuerza centrífuga. En las de ángulo fijo el tubo se mantiene en ángulo respecto al eje de rotación. Cuando se necesita una sedimentación rápida de partículas, los rotores de ángulo fijo son los adecuados.

Todas las centrifugadoras que se usan en odontología presentan un rotor a ángulo fijo menos la 3i cuyo rotor es horizontal y su “g” máxima es muy superior a 280 x g, propugnada como óptima para la separación de la fase rica en plaquetas.

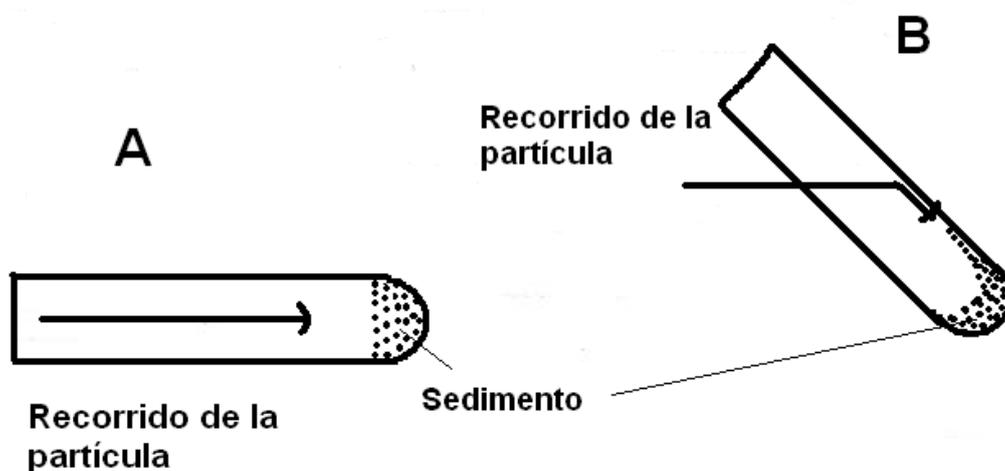


Figura 6. A: Sedimentación en centrifugadora con rotor horizontal y B: Sedimentación con rotor de ángulo fijo

A la hora de reproducir las condiciones de centrifugación de un estudio, hay que tener cuidado con las instrucciones incompletas como “centrifugar a 4000 rpm 10 minutos”, sin especificar el radio máximo del rotor, ya que sin este dato es imposible conocer la “g” que se necesita para alcanzar esa separación, como ya hemos visto, y por ende clonar el procedimiento en otra centrifugadora. La “g” propugnada por los distintos autores dista mucho de ser homogénea; varía entre las 1.038,24 de 3i y las 112 de NAHITA. La discusión debería centrarse en el estudio de que “g” es la apropiada para obtener la mejor decantación de las plaquetas sin alterar la membrana y no en qué máquina lograrlo, ya que todas son capaces de programarse a la “g” deseada (Ballester y cols. 2003).

3.5.3 ANTICOAGULANTES Y COAGULANTES

a) Los **anticoagulantes** que podemos utilizar para poder realizar el centrifugado y separar los elementos celulares son:

- **Fosfato de dextrosa citratado (CPD):** Contiene citrato sódico, fosfato y dextrosa. Lo usan Whitman y cols. (1997), Marx y cols (1998), y Weibrich y cols. (2002a, b, c) y 2003. También podemos usar CPDA como Lozada y cols (2001), Kim y cols. (2002a), Roldán y cols. (2004), Monov (2005) y Jung y cols. (2005), que añade adenina a su composición. Según Marx (2001) es bueno, aunque es un 10% menos efectivo en mantener la viabilidad plaquetaria que la mezcla de ácido cítrico, citrato de sodio y dextrosa (ACD-A), que describiremos más adelante.
- **Citrato sódico:** Esta sal capta los iones calcio que se encuentran en la sangre y los neutraliza formando un compuesto químico llamado quelato, impidiendo de esta forma la coagulación de la sangre. Además no altera los receptores de membrana de las plaquetas y nos permitirá la reversibilidad del proceso al añadir calcio en forma de cloruro cálcico. Lo usan Anitua (2001b), Sonnleitner y cols. (2000), Landesberg y cols. (2000), Kim y cols. (2002a), Robiony y cols. (2002), Fontana y cols. (2004), Camargo y cols. (2005), Sammartino y cols. (2005), Miranda y cols. (2006).
- **Ácido cítrico, citrato de sodio y dextrosa (ACD):** Es la solución utilizada en las extracciones de sangre más antigua. El citrato lleva calcio que favorecerá la coagulación y la dextrosa se encarga de mantener el metabolismo plaquetario. Para Marx (2001) es el anticoagulante ideal, ya que es el que mejor mantiene la

viabilidad de las plaquetas, pero según Anitua (2002) disminuye el pH del plasma retardando e interfiriendo en el proceso de agregación y secreción. Lo usan Petrunaro (2001), Weibrich y cols. (2002a), Aghaloo y cols. (2002), Zimmermann y cols. (2003), Soffer y cols (2004), Graziani y cols. (2005), Tsay y cols. (2005). Kim y cols. (2001), junto al ACD introducen FICOLL-PAQUE®, que es una solución acuosa con 5,7 g de Ficoll 400 y 9 g de diatrizoato de sodio con EDTA x 100ml y una densidad de 1.077 g/ml. Dicen que gracias a su densidad y osmolaridad hacen que los linfocitos se aíslen de la sangre completa obteniendo así plaquetas puras.

- **Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA):** No es un buen anticoagulante, ya que daña las plaquetas. Hace que éstas se hinchen adquiriendo una forma esférica como consecuencia de los cambios que aparecen en su membrana (Anitua 2002) y además las fragmenta (Landesberg y Moses 1998). En el proceso natural de exocitosis de los factores de crecimiento desde las plaquetas, las proteínas obtienen su estructura terciaria. Si las plaquetas están fragmentadas podemos tener más factores de crecimiento, pero al estar alterada su estructura terciaria perderán su actividad (Marx y Meltzer 2000). Lo usan Shen y cols. (2006), Pryor y cols. (2005a y b) junto a ACD, Efeoglu y cols. (2004) o Jensen y cols. (2004) consiguiendo un incremento plaquetario del 670% pero sin obtener beneficios clínicos. Comentan que tal vez se deba al uso de este anticoagulante.
- **Ácido cítrico, teofilina, adenosina y dipiridamol (CTAD):** Es el anticoagulante que se está usando con mayor frecuencia en los centros hospitalarios porque inhibe la liberación del factor plaquetario 4 y previene su

acoplamiento a la heparina, evitando el riesgo de resultados de pruebas falsamente bajos, pero no está indicado para tratar la sangre de la que obtendremos los preparados plaquetarios, porque luego se ha de reintroducir en el organismo.

b) Los **coagulantes** que podemos utilizar son los siguientes:

- **Trombina bovina:** Hace que el plasma rico en plaquetas coagule en 5-30 segundos, pero el que pueda producir anticuerpos que reaccionen con el factor de la coagulación humano V y coagulopatías, hace que no haya sido ampliamente aceptado en todos los países. Además, Anitua (2000) afirma que con este coagulante las plaquetas van a liberar el contenido de sus gránulos demasiado rápido. Tsay y cols (2005) comparan la liberación de factores de crecimiento del PRP cuando ha sido activado por trombina y por TRAP (péptido sintético agonista de los receptores de la trombina), y ve que con la trombina, los gránulos de las plaquetas en un día ya han liberado un 36% del PDGF y el 81.4% de TGF- β , mientras que con el TRAP la liberación es más lenta. La trombina, por tanto, es la que produce el coágulo de forma más rápida pero también es la que antes sufre retracción del mismo. Marx lo lleva usando desde 1996 sin tener ningún caso de coagulopatías. Refiere que actualmente se usan concentraciones mínimas y que su aplicación es tópica y que mientras no haya contacto directo con la circulación sistémica, cosa que no sucede en la cirugía maxilofacial porque ya está coagulado cuando contacta con los tejidos, no ha de haber ningún problema. (Marx 2004). Junto a la trombina bovina se puede usar

cloruro cálcico (Kim y cols. 2002a y b, Jensen y cols. 2004, Sánchez y cols. 2005, Monov 2005, Ohya y cols. 2005, Camargo y cols. 2005). Las proporciones serían: **Trombina bovina (10.000 U) y 10 ml de cloruro cálcico al 10%**.

- **Trombin receptor agonist peptide (TRAP):** Es un péptido sintético agonista de los receptores de la trombina. Hace que los factores de crecimiento no se liberen tan rápidamente como con la trombina ya que la retracción del coágulo es más lenta. Si se une a sustitutos óseos como el BioGlass o el BioOss la retracción es mínima. Además, al ser sintético, no tiene contaminación por los factores de la coagulación, así se evitan riesgos. Hace que el PRP coagule en 9 minutos (Tsay y cols. 2005, Landesberg y cols. 2005).
- **Landesberg y cols. (2000)** utilizan el **agente ITA**, del que tan sólo dicen que hace que el coágulo se retraiga más lentamente que con la trombina bovina, sin aportar su composición química.
- En algunos países usan pequeñas cantidades de **hueso esponjoso** o 1 ml de **sangre autóloga completa** para promover la coagulación, ya que ambas opciones contienen trombina humana (Peñarrocha y cols. 2001, Ballester y cols. 2003).
- **Cloruro cálcico al 10%:** El calcio interviene en la trombinogénesis, es decir en la transformación de la protrombina en trombina, en la agregación y en la adhesión, a través de los receptores de membrana de las plaquetas (Anitua 2000). En cuanto al tiempo que tarda en hacer que el PRP coagule, obtenemos distintos resultados en los diversos artículos de Anitua. En 1999 habla de 15 a 20 minutos y en el resto de 5 a 8 minutos. A 37°C se obtendría el coágulo en 2 ó 3.

- **Cloruro cálcico 10% y trombina humana** (Kim y cols. 2001, Fontana y cols. 2004, Miranda y cols.2006). Robiony y cols. (2002), obtienen la trombina humana añadiendo suero del paciente al cloruro cálcico y les coagulaba en 120-180 segundos, aunque también se puede usar trombina humana liofilizada (Tissucol®) (Roldán y cols. 2004).
- Otros autores afirman que no es necesario obtener el coágulo del concentrado de plaquetas, ya que mezclado con otros materiales obtiene suficiente viscosidad (Anitua y Andía 2001b, Dugrillon y cols. 2002).
- Graziani y cols. (2005) usan 1 ml de **batroxobina** y 1 ml de **cloruro cálcico** para 5 ml de PRP y Sanmartino y cols. (2005) **batroxobina con gluconato de calcio al 10%.**
- **Chitosán:** Es un polisacárido que se encuentra en el exoesqueleto de diversos crustáceos. Shen y cols. (2006) lo usan junto a una solución de vitamina C con el fin de buscar un sustituto para la trombina. Estudian la activación plaquetaria del PRP determinando la agregación y la adhesión, obteniendo mejores resultados con este biomaterial que en los controles.

Una vez se coagula el plasma rico en plaquetas, se empezarán a liberar factores de crecimiento inmediatamente. En 10 minutos se habrán liberado el 70% y en la primera hora el 100%. A continuación sintetizarán GFs adicionales los siguientes 8 días. Esto nos indica que hemos de activar el PRP justo antes de usarlo y no antes (Marx 2001). Wiltfang y cols. (2003), afirman que el PRP se puede usar como máximo hasta 2 horas después, lo que no indican si coagulado o sin coagular.

3.5.4. CARACTERÍSTICAS DEL PREPARADO OBTENIDO. RESULTADOS SEGÚN AUTORES

a) Enriquecimiento plaquetario

En el preparado obtenido observaremos un enriquecimiento plaquetario que dependerá del método utilizado, de la velocidad, del tiempo, y del número de centrifugados realizados. Lo calcularemos dividiendo el recuento plaquetario final por el recuento inicial. Según Marx y Meltzer (2000), un buen PRP es aquél cuyo concentrado de plaquetas sea 4 veces mayor que el recuento inicial, unas 10^6 plaq/ μ l. Si no se obtiene esta cantidad se debe a que se encuentra diluido en el plasma. Según ellos, concentraciones menores no van a mejorar la regeneración y las mayores no se ha demostrado que funcionen. Como se ve en las Tablas III y IV no todos los autores consiguen este incremento, ni siquiera Marx y cols. en 1998, donde obtuvieron un aumento del 338%. Wiltfang y cols. (2003), por otro lado utilizan los preparados donde habían conseguido al menos triplicar el número de plaquetas, reduciendo el número descrito por Marx. Weibrich y cols. (2002b y 2003) son los únicos que mencionan que en un 10% de los preparados que obtuvieron, también mediante el sistema Curasan, el número final de plaquetas fue menor que el inicial.

El enriquecimiento plaquetario obtenido en estudios en los que se realizó el proceso de plasmaféresis lo podemos ver en la Tabla III.

Autor/año/muestra	N° p/μl en muestra	N° P/μl en PRP	Enriquecimiento plaquetario
Marx y cols. (1998), N=88	232.000	785.000	338%
Zimmerman y cols. (2001), N=15			
- homólogo	228.360	1.240.000	543%
- concentrado	230.900	10.760.000	4678%
Weibrich y cols. (2001), N=158	255.000	1.413.000	554%
Shanaman y cols. (2001), N=3		3.000.000	
Dugrillon y cols. (2002), N=34	239.000	341.000	142%
		(PRPc)3.990.000	1669%
Weibrich y cols. (2003), N=115	260.370	1.434.300	551%
Choi y cols. (2004), N=8 perros	176.000	1.120.000	636%
Fuerst y cols. (2004), N=8 cerdos		2.000.000	
Graziani y cols. (2005), N=6			320,5%
Christgau y cols. (2006) N=25	276.000	2.163.000	790%

Tabla III. Recuento plaquetario en los preparados obtenidos por plasmaféresis

Los recuentos plaquetarios (P) en los preparados obtenidos a partir de cantidades de sangre pequeñas y los diversos protocolos, los vemos en la Tabla IV.

Autor,año Máquina	Muestra, ml N° P inicio	1° centrifugado Porción seleccionada 2° centrifugado	N° P en PRP N° P en PC	Incremento plaquetario	N° P en el PPP
Zimmermann y cols. (2001) Centrifugadora estándar	n=15 50 ml 238.400 p/μl	1650 x g 10' plasma sobrenadante 730 x g 15' PC: 0,3 ml	980.000 p/μl	411%	
Weibrich y cols. (2001) Sistema Curasan	n=158 8,5 ml 255.000 p/μl	2400 rpm 10' Plasma sobrenadante 3600 rpm 15' PC: 0,4 ml	918.090 p/μl	360%	
Kim y cols. (2001)	n=20 conejos 502.000 p/μl	400 x g 40' Plasma sobrenadante 5000 x g 15' PC:1-2ml	1.490.000 p/μl	296%	
Appel y cols. (2002) Sistema Curasan	n=12 8,5 ml 212.000 p/ μl	2400 rpm 10' Plasma sobrenadante 3600 rpm 15'	2.519.000 p/μl	1170%	
Appel y cols. (2002) Sistema PCCS	n=12 60 ml 212.000 p/ μl	Se realiza doble centrifugado mediante bolsas unidas y un sistema de válvulas	1.073.000 p/μl	500%	
Weibrich y cols. (2002) Sistema PCCS	n=47 60 ml 290.000 p/μl	Se realiza doble centrifugado mediante bolsas unidas y un sistema de válvulas	2.209.000 p/μl	761%	
Weibrich y cols. (2002) Sistema Curasan	n=47 60 ml 290.000 p/μl	2400 rpm 10' Plasma sobrenadante 3600 rpm 15' PC: 0,4 ml	1.075.000 p/μl	370%	

Gonshor (2002) Centrifugadora estándar	60 ml 157-263.000 p/μl	160 x g 10' plasma 400 x g cPRP: 1,5 ml	1.604.500 p/μl	781%	
Aghaloo y cols. (2002)	n=15 conejos 10 ml 144.000 p/μl	215 x g 10' plasma sobrenadante 863 x g 10' PC + BC: 1 ml	1.050.000 p/μl	729%	45.000 p/μl
Kim y cols. (2002)	n=10 perros 10 ml 443.000 p/μl	1000 rpm 10' el resto menos 1ml de PPGF se centrifugarán 1500 rpm 10'	1.735.000 p/μl	392%	
Lekovic y cols. (2002)	n=21 10 ml	5600 rpm 6' PRP: plasma – 2ml de PPP y hasta 1-2 ml de GR			
Yawazay cols. (2003)	n=10 40 ml 197.000 p/μl	80 x g 15' Plasma sobrenadante 1000 x g 7'	471.000 p/μl	414%	
Rodríguez y cols. (2003) Smart Prep	n=15 50 ml		960.000 p/μl		
Mancuso (2003) Samrt Prep	n=117			338%	
Okuda y cols. (2003) Labofugue 300	n=20 70 ml 250.000 p/μl	2400 rpm 10' plasma sobrenadante 3600 rpm 15'	709.000 p/μl	283%	257.000 p/μl
Weibrich y cols. (2003) Curasan con centrifuga Labofuge 300	n=115 8,5 ml 260.370 p/μl	2400 rpm 10' Plasma sobrenadante 3600 rpm 15' PC: 0,4ml	908.500 p/μl	349%	
Fontana y cols. (2004) Centrifugadora estándar	n=15 ratas 1 ml 493.000 p/μl	1500 rpm 15'	1.188.000 p/μl	240%	
Wiltfang y cols. (2004) Sistema Curasan	n=24 minicerdos 118.000 p/μl	2400 rpm 10' Plasma sobrenadante 3600 rpm 15'	483.800 p/μl	410%	

Wiltfang y cols. (2004) Sistema PCCS	n=24 minicerdos 118.000 p/μl	Se realiza doble centrifugado mediante bolsas unidas y un sistema de válvulas	767.800 p/μl	650%	
Roldán y cols. (2004)	n=14 ratas 3 ml 406.790 p/μl	1700 rpm 7' plasma 3000 rpm 10' PRP: sedimento plaq + 0,5 ml plasma	2.035.710 p/μl	505%	
Eppley y cols (2004)	n=10 60 ml 197.000 p/μl	3200 rpm 12' BC (Plaq + GB) + 6 ml plasma	1.603.000 p/μl	813%	
Aghaloo y cols. (2004)	n=15 conejos 10 ml 118.000 p/μl	215 x g 10' plasma sobrenadante 863 x g 10' PRP + BC= 1 ml	960.000 p/μl	813%	22.330 p/μl
Mazor y cols. (2004)	n=105 50 ml 216.000 p/μl	Doble centrifugado PRP: 10ml	874.000 p/μl	400%	
Jensen y cols. (2004) Centrifugadora Hettich Universal 30 RF	n=8 perros 9 ml 246.000 p/μl	4000 rpm 20' PRP: 1 ml de PPP + BC + 1ml GR	1.884.000 p/μl	670%	
Pryor y cols. (2005a)	n=30 ratas 10 ml	450 x g 30' 1400 x g 15'	1.760.000 p/μl		
Fréchette y cols. (2005) PCCS	n=5 60 ml 220.000 p/μl	Se realiza doble centrifugado mediante bolsas unidas y un sistema de válvulas	1.200.000 p/μl	550%	
Ohya y cols. (2005) Centrifugadora Himac CT	n=18 conejos 30 ml 227.000 p/μl	203 x g 5' plasma sobrenadante con BC 1050 x g 5' PRP: plaq en 3 ml plasma	864.000 p/μl	383%	
Monov (2005) Sistema Curasan	n=10 51 ml 142.120 p/μl	2400 rpm 10' Plasma sobrenadante 3600 rpm 15'	489.999 p/μl	350%	

Jensen y cols. (2005) PCCS	n=12 cerdos 45 ml 421.000 p/μl	Se realiza doble centrifugado mediante bolsas unidas y un sistema de válvulas	1.870.000 p/μl	440%	
Weibrich y cols. (2005) PCCS	n=51 60 ml 274.000 p/μl	Se realiza doble centrifugado mediante bolsas unidas y un sistema de válvulas	1.641.800 p/μl	766%	
Weibrich y cols. (2005) Estándar	n=51 274.000 p/μl	1600 rpm 7'	513.630 p/μl	484%	
Aghaloo y cols. (2005)	n=15 conejos 10 ml 112.333 p/μl	215 x g 10' plasma sobrenadante 863 x g 10' PC + BC: 1 ml	1.137.667 p/μl	1012%	
Mannai (2006) Smart Prep	n=97			700%	
Miranda y cols. (2006)	n=16 conejos 10 ml	540 x g 10' plasma sobrenadante 540 x g 10'	1.200.000 p/μl		
Zhu y cols. (2006)	n=5 ratas 10 ml	2400 rpm 10' Plasma sobrenadante 3600 rpm 15'	1.490.000 p/μl		
Thorwarth y cols. (2006) Curasan	n=24 cerdos 118.000 p/μl	2400 rpm 10' Plasma sobrenadante 3600 rpm 15'	483.800 p/μl	410%	
Thorwarth y cols. (2006) PCCS	n=24 cerdos 118.000 p/μl	Se realiza doble centrifugado mediante bolsas unidas y un sistema de válvulas	767.000 p/μl	650%	

Tabla IV. Recuentos plaquetarios en los preparados obtenidos a partir de cantidades de sangre pequeñas y los diversos protocolos.

Se comprueba que el número final de plaquetas depende del sistema usado para recogerlas y del volumen de plasma final sobre el que están suspendidas (Froum y cols. 2002). Appel y cols. (2002), lo explican con mayor claridad. Hemos de tener en cuenta que una cosa es el número de plaquetas que se obtienen en el concentrado de plaquetas de la sangre del paciente y otra cosa es el número absoluto de plaquetas. Según el método utilizado tendremos más o menos plasma en el preparado plaquetario y por tanto el número de plaquetas no es comparable; hay que tener en cuenta el número absoluto, ya que es el que realmente nos dice la capacidad que tiene el sistema para obtener plaquetas. Se debe relacionar el número absoluto de plaquetas en el volumen sanguíneo, con el número absoluto de plaquetas en el PC. Según la cantidad de plasma del PC las plaquetas estarán más o menos diluidas. En su estudio, comparando el sistema Curasan con el PCCS y con técnicas de laboratorio, obtienen que el sistema Curasan deja la menor cantidad de plasma de los tres en el concentrado y aunque el número de plaquetas es menor, el número absoluto es mayor ya que las plaquetas estarán más concentradas (Tabla V).

	Sangre completa	Curasan (n=12)	PCCS (n=12)	Laboratorio (n=12)
% Plaquetas	100	41,9	49,6	19,0
% Volumen	100	3,6	10,3	14,4
Plaquetas 10 ³ /μl	212,4	2519,6	1073,0	270,9
Concentración	1	11,7	5,0	1,4

Tabla V. Porcentaje de plaquetas en el concentrado plaquetario (PC) referido al número de plaquetas en el volumen inicial de sangre, porcentaje de volumen del PC referido al volumen inicial sanguíneo, recuento plaquetario y concentración del PC (Appel y cols. 2002).

Como vemos en la Tabla V, nos encontramos ante incrementos plaquetarios distintos a los obtenidos por Weibrich (2002a), que observa 7 veces más plaquetas con el PCCS y sólo 3,7 veces más con el Curasan, o Thorwarth y cols. (2006) que obtienen 6,5 veces más plaquetas con el PCCS y sólo 4,1 más con el sistema Curasan, mientras que Appel consigue con el Curasan 11,7 veces más plaquetas que en la sangre periférica y con el PCCS sólo 5 veces más. Aún con esta discrepancia, todos cumplen el requisito de Marx para que su preparado sea considerado PRP, es decir, el aumento plaquetario al menos ha sido 4 veces mayor.

Marx en el 2004 hace un estudio en el que obtiene el PRP a partir de diversos protocolos y compara el incremento plaquetario final de cada uno. Como vemos, aún con las mismas técnicas que otros autores descritos en la tabla anterior, los resultados no coinciden (Tabla VI).

Sistema	Media vol PRP (ml)	Media [plaq]x10³	Producción plaquetas%	Incremento plaquetario
Centrifugadora de laboratorio (protocolo Anitua)	9,5	433	35	190
Centrifugadora de laboratorio (Protocolo Landesberg)	10,6	336	30	150
Centrifugadora Clinaseal Sealed Technology	7,6	401	39	164
ACE Surgical	7,8	493	33	180
AG Curasan	7,6	344	29	139
3i PCCS	7,0	939	61	324
SmartPrep	7,4	1.086	62	404

Tabla VI. Producción de plaquetas según distintos sistemas (Marx 2004).

b) Concentrado de factores de crecimiento

Junto al aumento del número de plaquetas también encontraremos un mayor concentrado de factores de crecimiento. Lo que no sabemos es si estarán disponibles en los momentos críticos o si se habrán perdido durante la manipulación del preparado (Tsay y cols.2005). Lacaste cols. (2003), estudiaron la concentración de factores de crecimiento en sangre completa y en el preparado obtenido mediante el PCCS, antes y después de coagularlo. Vieron que los niveles en sangre y antes de coagularlo eran muy similares, lo que indica que por este método no se liberan factores de crecimiento hasta que se induce la coagulación, donde se producirá un incremento del 280 al 800%.

Zimmermann y cols. (2001), señalan varios factores que influyen en la medición de los factores de crecimiento finales: la expresión del CD62 que nos indica si ha habido activación plaquetaria, ya que si las plaquetas se activan antes del final de la centrifugación los factores de crecimiento pueden perderse en el plasma sobrenadante, la producción de lactosa y la contaminación por glóbulos blancos, puesto que los leucocitos contienen y producen factores de crecimiento. Hay que tener en cuenta que los factores de crecimiento totales son la suma de los obtenidos a partir de las plaquetas y los leucocitos (Weibrich y cols. 2002b, 2003). Arpornmaeklong y cols. (2004), añaden al plasma como otra fuente de GFs.

Appel y cols. (2002) y Anitua (2002) dudan sobre si añadir glóbulos blancos o no al preparado, al plantear un posible efecto negativo de ellos en la regeneración ósea.

En la Tabla VII podemos ver el recuento de plaquetas, leucocitos y factores de crecimiento mediante Técnica ELISA de los estudios que lo valoran. Marx (2001) critica estos estudios que hacen recuento de factores de crecimiento, ya que dice que en realidad están estudiando un coágulo reducido mientras que el PRP es un coágulo reciente. Además, esta técnica se usa para cuantificar el contenido de factores de

crecimiento sin probar su actividad biológica, por lo que no sirve para predecir su eficacia clínica (Schmidmaier y cols. 2006)

Autor/Año Muestra/ método	N° P/μl	GB/μl PRP	N° P/μl PRP	PDGF-AB ng/ml	PDGF- BB ng/ml	TGF-β1 ng/ml	TGF-β2 ng/ml	IGF-I ng/ml
Zimmermann y cols. (2001) Plasmaféresis		2,73	1.240.000	229,1	37,1	183,4		
Zimmermann y cols. (2001) cPRP Plasmaféresis		6,6	10.760.000	8673,4 804,9	289,0	614,5		
Zimmermann y cols. (2001) Centrifugadora		21,2	980.000	17,,5	23,0	85,4		
Weibrich y cols. (2002a) n=115 Plasmaféresis	266.000		1.408.000	117,5	9,9	169,4	0,4	84,2
Dugrillon y cols. (2002) n=34 Plasmaféresis	239.000		341.000 3.990.000			87,7		
Weibrich y cols (2002a) n=46 PCCS	>150.00 0	15,3	2.232.500	251		467		91
Appel y cols. (2002) n=12 PCCS	212.000	5,5	1.073.000	157,2		14,,7		
Weibrich y cols. (2002a) n=46 Curasan	>150.00 0	33,1	1.140.500	314		79		69
Appel y cols. (2002) n=12 Curasan	212.000	14,8	2.519.600	295,2		499,8		

Lacaste y cols. (2003) n=3 PCCS	240.000		1.000.000		6,2	3,3		
Okuda y cols. (2003) n=20 Curasan	257.000		709.000	182,0		140,9		
Yawaza y cols. (2003) n=10 Centrifugadora	197.000		1° 471.000 2° 817.000	SC 3,58 1° 25,88 2° 152,4		SC 19,6 1° 128 2° 359		
Weibrich y cols. (2003) n=115 Curasan	260.360	30,1	908.500	233,70		95,02		25,58
Weibrich y cols. (2003) n=115 plasmaféresis	260.360	0,16	1.434.300	133,59		268,65		85,37
Eppley y cols. (2004)	197.000	31,1	1.603.000		17	120		72
Jensen y cols. (2005) n=12 PCCS	421.000		1.870.000	56,5		69		
Weibrich y cols. (2005) n=51 PCCS	274.000	14,15	1.641.800	157		290		
Weibrich y cols. (2005) n=51 (método Anitua)	274.000	0,65	513.630	47		73,3		
Fréchette y cols. (2005) n=5 PCCS	220.000	9,2	1.200.000					
Thorwarth y cols. (2006) n= 24 PCCS	118.000	14,7	767.000	251,8		467,1		91,0
Thorwarth y cols. (2006) n= 24 Curasan	118.000	24,8	483.800	314,1		79,7		69,5

Tabla VII. Recuento de plaquetas, leucocitos y factores de crecimiento mediante Técnica ELISA. (SC: Sangre completa)

Como vemos, según el método utilizado el contenido de factores de crecimiento puede variar considerablemente. Lo importante será ver si estas diferencias tienen repercusiones clínicas. Weibrich y cols. (2005) que estudian distintos métodos de obtención del PRP, obtienen las siguientes diferencias en cuanto a la concentración de factores de crecimiento. La cantidad de TGF- β 1 en el PRP varía de 73,3 ng/ml (Anitua PRGF), y 95,02 ng/ml (Curasan) a 268,65 (bancos de sangre) y 289,5 (PCCS). También encuentra variaciones muy diversas en cuanto al PDGF-AB del PRP, 47,0 ng/ml (Anitua), 133,59 (banco sangre), 156,7 (PCCS) y 233,70 (Curasan).

Marx, en el 2004 también hace un estudio comparativo de los diversos métodos de obtención del PRP. El resumen se encuentra en la Tabla VIII:

Sistema	Media vol PRP (ml)	PDGF-AB ng/ml	TGF-β ng/ml
Centrifugadora de laboratorio (protocolo Anitua)	9,5	35	52
Centrifugadora de laboratorio (Protocolo Landesberg)	10,6	26	50
Centrifugadora Clinaseal Sealed Technology	7,6	46	55
ACE Surgical	7,8	35	43
AG Curasan	7,6	39	39
3i PCCS	7,0	103	144
SmartPrep	7,4	133	170

Tabla VIII. Producción de factores de crecimiento según distintos sistemas (Marx 2004)

La eficacia de los factores de crecimiento dependerá de la dosis, de la distribución espacial y de la secuencia temporal de los GFs disponibles.

Según Tsay y cols. (2005), los factores de crecimiento activados en el momento adecuado y con una distribución espacial correcta tienen un gran efecto en la regeneración ósea.

c) **Agregación plaquetaria**

Es muy importante estudiar la agregación plaquetaria tras la obtención del plasma rico en plaquetas o del concentrado de plaquetas. Zimmermann y cols. (2001) son los únicos autores que comprueban el estado de las plaquetas tras su obtención mediante trombocitoféresis y plasmaféresis a partir de sangre de donantes. Para ello, ajustaron la concentración plaquetaria a 250.000 plaquetas/ μ l con plasma autólogo y lo midieron con un agregómetro de plaquetas con agentes activadores como: 20 μ M ADP, 10 μ M ADP + 2 μ M epinefrina, 1,2 mg x ml de ristocetina. Mediante transmisión de luz, midieron la respuesta a los 2 minutos de añadir los agentes agregantes. La del PRP tenía un valor del 0% y la del PPP del 100%. Comprobaron que la agregabilidad plaquetaria fue mejor en las plaquetas obtenidas mediante plasmaféresis.

d) **Activación de las plaquetas tras el centrifugado**

Gonshor (2002), estudia la activación plaquetaria del PRP obtenido, midiendo la expresión de la P-selectina (antígeno CD62). Este antígeno también se conoce como la proteína de membrana GMP-140 y media la adhesión de plaquetas activadas a neutrófilos y monocitos en la homeostasis. El CD62 es una proteína integral expresada sobre la membrana de los gránulos alfa internos en las plaquetas en reposo. Cuando se

activan las plaquetas, la membrana de los gránulos alfa se unirá con la membrana externa plasmática y permitirá la expresión del antígeno CD62 en la superficie de las plaquetas activadas. Un valor de CD62 por debajo del 12% indica la no activación y entre el 5 y 6 % baja activación. Según el estudio de Gonshor (2002), en sangre completa el valor es del 0,36% por lo que no hay activación. Tras realizar un primer centrifugado con una centrifugadora convencional a 160 x g 10 minutos, obtuvo un valor del 1,31% y tras un segundo centrifugado a 400 x g 10 minutos, del 1,94%, pero mirándolo a las 2 horas era del 5,68% y a las 24 horas del 22,27%.

Para ver si además eran plaquetas viables y activables, se activaron con el péptido activador del receptor de la trombina (TRAP) de las plaquetas. Vieron que en todos los casos se liberaron gránulos alfa, por lo que las plaquetas no estaban agregadas y que no habían sufrido ningún cambio en su morfología. Esto es importante porque las plaquetas fragmentadas pueden liberar muchos factores de crecimiento, su estructura estará alterada y su efectividad será menor. La integridad de la membrana de las plaquetas las proporcionan anticoagulantes como el ACD y las bajas fuerzas de centrifugado, ya que “g” excesivas pueden fragmentarlas. Los niveles tan bajos en su estudio de la expresión de la P-selectina tras la centrifugación, muestran que el centrifugado bajo estas condiciones, no afecta a la viabilidad de las plaquetas y no las activa.

Man y cols. (2004) recomiendan hacer la extracción sangre antes de comenzar la cirugía porque la cirugía en sí misma ya podría provocar la activación de las plaquetas. Además, se recomienda usar los concentrados de plaquetas inmediatamente tras su centrifugación. Zimmermann y cols. en el 2001, estudiaron la activación de las plaquetas obtenidas mediante tres protocolos, trombocitoaféresis, a partir de 450 ml de

sangre por plasmaféresis y a partir de una centrifugadora convencional. Las plaquetas activas también se midieron por la expresión espontánea de la P-selectina y vieron que la mayor activación plaquetaria se producía en las plaquetas obtenidas mediante una centrifugadora convencional. El 33% de las plaquetas obtenidas por este método se activaron tras la centrifugación y por tanto ya estaban perdiendo factores de crecimiento. Además también midieron la capacidad de responder de las plaquetas ante los agentes activadores. Para ello se midió la expresión del CD62 después de activarlas con ADP y la mejor activación inducida la tuvieron las plaquetas obtenidas mediante plasmaféresis.

e) **Tiempo y velocidad del centrifugado**

Un centrifugado demasiado rápido o demasiado largo, puede provocar un cambio de forma en las plaquetas y el vaciamiento parcial de los gránulos alfa, perdiéndose parte de su contenido, ya que, como hemos visto, las plaquetas, ante una perturbación física o bioquímica, responden rápidamente activándose. Al activarse entendemos que pueden aparecer cambios en la forma, que pueden liberar gránulos, expresar neoantígenos, cambiar el estado de los receptores plaquetarios o pueden expresar la actividad procoagulante y de agregación (Marx y Meltzer 2000, Kim y cols. 2001, Anitua 2002, Yawaza y cols. 2003). *In vivo*, la activación de las plaquetas hace que pasen de ser una partícula inerte a ser un trombo hemostático (Hoffman y cols. 1992).

Dugrillon y cols. (2002) comparan distintas “g” y la obtención de plaquetas y factores de crecimiento. Observa que no siempre que obtenemos más plaquetas obtenemos más factores de crecimiento, ya que “g” mayores de 800 pueden activar las plaquetas perdiendo este contenido proteico. Anitua en su primer artículo internacional en 1999, habla de centrifugar a 160 x g 6 minutos pero luego lo modifica y pasa a centrifugar a 280 x g 7 minutos, concentrando las plaquetas en el plasma más próximo a los hematíes, obteniendo así un plasma rico en plaquetas. Su técnica avala plaquetas intactas pero con un aumento del 293% (n=30) y hemos de recordar que para Marx y Meltzer (2000) un buen PRP es aquél cuyo concentrado sea 4 veces mayor, si no, es que está diluido en plasma. Robioni y cols. (2002), obtienen el PRP a partir de dos centrifugados. En su protocolo, la velocidad del primero puede ser de dos formas según el valor del hematocrito. Si este es menor del 405 centrifugará a 180 x g 15 minutos y si es mayor, a 200 x g.

En la Tabla IV podemos ver las características del centrifugado de los distintos autores.

f) Número de centrifugados y denominación del preparado:

Aunque la centrifugación es el método más común para aislar plaquetas, hemos de saber que éstas pueden dañarse y por tanto activarse, sobre todo si se centrifuga varias veces la misma muestra. Existen otros métodos como la electroforesis, pero precisan más tiempo y un equipo adecuado (Hoffman y cols. 1992).

Los autores revisados en la literatura no se ponen de acuerdo sobre como denominar a estos preparados obtenidos tras la centrifugación. Sonnleitner y cols. (2000) y Kim y cols. (2001), dicen que si centrifugamos una sola vez, conseguiremos un **plasma rico en plaquetas**, y que si realizamos un doble centrifugado a mayor velocidad obtendremos un **concentrado de plaquetas (PC)**. Según esto, el plasma rico en plaquetas que obtenían Marx y cols. en 1998, sería en realidad un concentrado plaquetario. Según Lozada y cols. (2001), en hematología se usa el término PC o concentrado de plaquetas, para denominar una concentración de plaquetas mayor de 1 ml/ μ l y es sinónimo de PRP o plasma rico en plaquetas. Además añade que para obtenerlo se ha de centrifugar dos veces, la primera vez suavemente para separar el plasma de los hematíes y a continuación a mayor “g” y tiempo para separar las fracciones del plasma. Zimmermann y cols. (2001), sin embargo, invierten las características del centrifugado, realizándolo primero a mayor velocidad.

Anitua (2000), que tan sólo hace un centrifugado, habla de **PRGF (plasma rico en factores de crecimiento)**, **PPGF (plasma pobre en factores de crecimiento)** y **PGF (plasma con factores de crecimiento)**. En el 2001 añade una cuarta fracción muy rica en GF. Landesberg y cols. (2000), por otro lado, hablan de mitad superior y mitad inferior, separación duramente criticada por Marx, quien dice que el PRP es mucho menos de la mitad, sólo el 20% del plasma total.

En el 2001, Marx publica un artículo en el que critica duramente las distintas terminologías que se le han asignado al PRP. Para él, el “concentrado de plaquetas” sería la agrupación de plaquetas sin plasma que no formará ningún coágulo y el “gel de plaquetas”, también sería incorrecto ya que el PRP sólo es un coágulo con el número de

plaquetas aumentado y con una serie de actividades biológicas que un gel no posee. Además critica duramente la denominación de “plasma rico y muy rico en plaquetas”.

Marx (2001), también nos recuerda que ante todo hemos de tener claro el número de plaquetas que queremos conseguir, al menos 1.000.000 plaq/ μ l en 5 ml de plasma, y que además no han de estar dañadas y se han de obtener bajo condiciones estériles. Según él el PRP verdadero será el que se obtenga mediante un doble centrifugado. Un primer centrifugado más intenso para separar los glóbulos rojos del plasma y el segundo, más suave, para separar las plaquetas, los glóbulos blancos y unos pocos hematíes del plasma. Este segundo centrifugado nos proporcionará el PRP y el PPP. Hacer un solo centrifugado no sería adecuado porque los glóbulos rojos interferirían en la delicada separación de las plaquetas. Además, según Marx, con una centrifugadora de laboratorio sólo se pueden hacer diagnósticos y no se puede obtener un PRP correcto, ya que puede dañar las plaquetas y no se obtiene cantidad suficiente de las mismas.

g) Composición del preparado

Según Peñarrocha y cols. (2001), el coágulo de PRP tendrá un 4% de células rojas, un 95% de plaquetas y un 1% de leucocitos, pero los autores no se ponen de acuerdo en cuanto si es conveniente o no incluir elementos celulares que no sean plaquetas. Marx y cols. (1998), por su experiencia y por el estudio de Reeder dice que las plaquetas que más recientemente se han sintetizado, y que por tanto son más grandes y tienen la mayor actividad, están mezcladas con el milímetro más superior de células rojas, por eso en sus preparados lo incluye, obteniendo su PRP un color rojizo. También Lekovic y cols. (2002). Sammartino y cols. (2005) y Camargo y cols. (2005)

incluyen estos 1-2 mm de hematíes. Anitua comenzó sus estudios en 1999 cogiendo también glóbulos rojos, pero actualmente habla de obtener un coágulo blanco, sin leucocitos ni hematíes, ya que según él, los glóbulos blancos pueden interferir en la agregación plaquetaria. Otros autores, en cambio, están a favor de incluir leucocitos, afirmando que el PRP será el concentrado de plaquetas que está en el Buffy Coat, que es la capa leuco-plaquetaria que se observa después de la centrifugación o de la sedimentación de la sangre total entre el plasma y los glóbulos rojos y es de color blanquecino. Según Dugrillon y cols. (2002) y Soffer y cols. (2003), la contaminación por leucocitos del PRP va a influir en el número final de factores de crecimiento, (ya que los contienen y producen) y que obtendremos una mayor contaminación en los preparados obtenidos mediante centrifugadoras convencionales. Lo cierto es que el recoger el PRP con una pipeta hace que sea una técnica muy imprecisa en la que casi sin querer se incluyen glóbulos rojos y leucocitos, lo que dependerá de la habilidad del manipulador (Ballester y cols. 2003).

Fernández-Barbero y cols. (2006) estudian la estructura y composición de 20 muestras de gel de plasma rico en plaquetas obtenido mediante la técnica de Anitua (1999) y coagulado con cloruro cálcico. Los someten al microscopio electrónico de barrido y de transmisión y descubren dos componentes, un material fibrilar similar a los filamentos de fibrina y un componente celular compuesto sobre todo por plaquetas.

h) Relación entre distintos factores

Weibrich y cols. (2001) estudiaron la relación entre el recuento plaquetario, el sexo y edad de 158 donantes, sin obtener resultados estadísticamente significativos. Tampoco

encontraron relación entre la concentración de plaquetas en la sangre periférica, el número de plaquetas en el PRP y la cantidad de factores de crecimiento (Weibrich y cols. 2002). Fue en el 2003 con una muestra de 115 personas voluntarias, cuando vieron que a mayor número de plaquetas en el PRP más TGF- β 1, y que a mayor número de leucocitos más PDGF-AB, ya que como hemos visto, los glóbulos blancos son una segunda fuente de factores de crecimiento. Por tanto, según él, ni el número de plaquetas inicial ni el del PRP pueden predecir el número de factores de crecimiento, ya que existen más fuentes además de las plaquetas, como glóbulos blancos y plasma. En este último estudio siguen sin ver diferencias con la edad de la muestra.

Por otro lado, Eppley y cols. (2004), tampoco encuentran relación entre el número de plaquetas y la concentración de factores de crecimiento, ni Soffer y cols. (2004) entre los factores de crecimiento iniciales y los obtenidos en su preparado plasmático rico en plaquetas.

Tampoco la encuentran Jensen y cols. (2005), en minicerdos, entre el número de plaquetas inicial y el del preparado plaquetario, ni en el número de plaquetas del mismo y la concentración de PDGF y TGF- β .

Por otro lado, Dugrillon y cols. (2002), sí encuentran relación entre la concentración de plaquetas en el concentrado de plaquetas y las plaquetas que hay en la sangre completa, y la concentración de TGF- β 1 y las plaquetas del PRP y del concentrado de plaquetas. Estos autores obtienen el PRP mediante plasmaféresis, con una muestra de 34 personas. Okuda y cols. (2003) también encuentra una relación estadísticamente significativa entre el recuento plaquetario inicial y los factores de crecimiento PDGF-AB y TGF-B1 del plasma rico en plaquetas.

3.6 ESTUDIOS CLÍNICOS QUE VALORAN LA REGENERACIÓN ÓSEA

El primer estudio clínico publicado que hablaba del PRP aplicado a la cirugía oral y maxilofacial en humanos fue el de Robert Marx y cols. en 1998. Desde entonces, los estudios experimentales han ido apareciendo muy lentamente y la mayoría tenían como objetivo buscar protocolos de obtención más sencillos para poder aplicar esta técnica en un medio no hospitalario. Ha sido a partir de 2002 cuando el volumen de estudios clínicos ha sido mayor y lo más importante, han sido realizados en animales, ya que un tema que conlleva tanta controversia, primero se ha de resolver con la experimentación animal.

Los datos de los artículos (Tabla IX) se han obtenido a partir de distintos protocolos y por tanto su concentrado plaquetario y de factores de crecimiento también será distinto. Además, las formas de estudio también difieren, unos analizan las radiografías mediante la observación directa de investigadores y otros primeros las digitalizan y a continuación las analizan mediante una escala de grises. En los estudios en animales y algunos en humanos, previa biopsia, también se han podido realizar análisis histológicos e histomorfométricos. En el histológico, la biopsia de hueso se deshidrata con alcohol y se coloca en resina polimerizable para poder hacer pequeñas secciones, se tiñe y se estudia al microscopio. En el análisis histomorfométrico, se hacen fotos a los especímenes con una cámara digital conectada a un microscopio, se digitalizan las imágenes y mediante un programa de ordenador se obtiene el porcentaje de contacto entre el hueso o el implante o el porcentaje de hueso formado.

Existe mucha controversia sobre si el PRP es capaz de acelerar la regeneración ósea o si por el contrario la inhibe, y por todo ello, a la hora de sacar conclusiones tendremos en cuenta el método utilizado y la forma de estudio.

Existen publicaciones que hablan de efectos positivos del plasma rico en plaquetas como Marx y cols. en 1998 con injertos de hueso autógeno en mandíbulas, Man y cols. (2004) en cirugías estéticas, Kassolis y cols. (2000) en elevaciones de seno, Kim y cols. (2002b) en defectos periimplantarios o Camargo y cols. (2005) en defectos intráseos periodontales. Observan mejoría tanto en la regeneración ósea como en los tejidos blandos, pero también existen publicaciones que no encuentran beneficio con su uso, como Shanaman y cols. (2001) en aumentos de cresta alveolar, Froum y cols. (2002) en elevaciones de seno o Aghaloo y cols. (2004) en defectos de cráneo en conejos.

Marx (2004), gran defensor de estos preparados, dice que si se analizan los estudios donde no se obtienen beneficios veremos como en realidad no se está aplicando el verdadero plasma rico en plaquetas y por tanto puede que se estén usando plaquetas dañadas. En ocasiones, además, los autores proporcionan datos insuficientes sobre la técnica utilizada.

Para mostrar de la forma más sencilla el estado actual clínico de estos preparados, vamos a agrupar los estudios en función de cómo se han utilizado, es decir, si se aplicaron solos, con hueso bovino, autólogo... separando los estudios clínicos experimentales con casos control de los que sólo nos informan de una serie de casos. Además trataremos de aportar todos los datos necesarios para saber cómo se ha obtenido ese preparado plasmático y qué incremento plaquetario tiene, aunque hemos de tener en cuenta que no más plaquetas implican más factores de crecimiento.

3.6.1 PRP + hueso autógeno

- **Marx y cols. (1998):** En 88 pacientes con defectos en la mandíbula, hicieron reconstrucciones con injerto de hueso autógeno y PRP en 44 casos y sin PRP en los restantes. Realizaron un análisis subjetivo radiográfico a los 2, 4 y 6 meses, donde vieron que el lado donde se había utilizado el plasma rico en plaquetas había madurado de 1,6 a 2,2 veces más rápido que el otro. En el análisis histomorfométrico a los 6 meses se vio mayor porcentaje de hueso trabeculado donde se colocó PRP e injerto de hueso (74%) que donde sólo se puso hueso (55%). En este caso el PRP se obtuvo mediante plasmaféresis y el incremento plaquetario fue del 338%.
- **Aghaloo y cols. (2002):** Tras hacer en 15 conejos 4 defectos óseos, éstos se rellenaron con hueso, hueso con PRP, PRP solo o sin nada. Posteriormente, se realizaron radiografías que fueron digitalizadas y evaluadas al mes, 2 y 4 meses sin encontrarse mejores resultados donde se añadió PRP al hueso, comparado con los defectos donde sólo se colocó éste. En el análisis histomorfométrico parecía que tendía a ser mejor la regeneración allí donde se usó PRP con hueso a partir del cuarto mes, pero no era estadísticamente significativo. El plasma rico en plaquetas se obtuvo mediante un doble centrifugado con una centrifugadora de laboratorio y su incremento plaquetario fue del 729%.
- **Galliani y Arrascue (2002):** Crean en 5 conejos defectos mandibulares. En el defecto situado en el lado derecho colocan un injerto autógeno y en el izquierdo además añaden PRP. Hacen un análisis histológico a las 2 semanas en 2 conejos y a las 4 semanas en 3 y encuentran hueso en casi todos los grupos, siendo el del

lado del PRP más maduro. Concluyen diciendo que el plasma rico en plaquetas no ayuda a acelerar la regeneración ósea, pero hace más maduro el hueso.

- **Jakse y cols. (2003):** Comparan en elevaciones bilaterales de seno de 12 cabras el uso de un injerto de hueso autólogo con o sin PRP, uno en cada lado. Hacen un análisis histomorfométrico a las 4 y 12 semanas y no ven diferencias significativas entre el control y donde además se usó PRP, ya que en este último la mejora fue sólo de un 3 a un 4%. A las 12 semanas en casi todas las biopsias se encontró signos de reabsorción, ya se usara PRP o sólo hueso, lo que es una desventaja del uso de los injertos, y como observaron, el PRP no tiene la habilidad tampoco de disminuir esta reabsorción. La ventaja de añadir el plasma rico en plaquetas al injerto podría ser que facilita su manipulación. Este estudio como vemos se hace con cabras, tal vez en humanos sería diferente. Para obtener el PRP utilizó un método de aféresis distinto al de Marx y el incremento plaquetario fue del 3810%.
- **Wiltfang y cols. (2004):** Estudian en defectos en cráneos de cerdos dos tipos de PRP, el obtenido por el sistema Curasan y por el PCCS, junto a hueso autólogo. Tendrán además un defecto control. A las 2, 4 y 12 semanas realizaron un análisis radiográfico e histológico y vieron que sólo el PRP obtenido mediante el sistema PCCS favoreció la regeneración junto al hueso autólogo a las 2 semanas, pero a las 4 ya no había diferencias. El incremento plaquetario obtenido mediante el sistema Curasan fue del 410% y el del PCCS fue del 650%.
- **Fennis y cols. (2004):** Realizaron una resección de la mandíbula de 28 cabras. Catorce de ellas se repararon con hueso de la cresta ilíaca con PRP obtenido mediante aféresis y las otras sin él. Se hicieron radiografías y un análisis

histológico e histomorfométrico a las 3, 6 y 12 semanas, y tanto radiográfica (2002) como histológicamente (2004) el grupo con PRP obtuvo resultados mejores de forma estadísticamente significativos, sobre todo entre las 6 y las 12 semanas. En 10 de las 14 cabras del grupo sin PRP apareció un encapsulamiento fibroso total del injerto, lo que comprometía la vascularización. En el grupo con PRP sólo se encontró esta cápsula parcialmente en 3 casos. Las radiografías fueron estudiadas por dos investigadores que no sabían nada de la aplicación del PRP, y puntuaron los defectos y la existencia de reabsorciones según los valores de una tabla previamente proporcionada.

- **Choi y cols. (2004):** Realizaron defectos óseos en 8 perros colocando posteriormente hueso con o sin PRP en ellos para estudiar la regeneración ósea. En las zonas donde usaron un injerto de hueso en solitario la regeneración a las 6 semanas fue del 56,7% y donde además se añadió el plasma rico en plaquetas, del 36,8%. No sólo fue menor la regeneración sino que además, en este segundo grupo, aparecieron grandes islas de tejido necrótico óseo y tejido fibroso. Tal vez hubo una invasión del tejido epitelial en la zona a regenerar, formándose tejido fibroso sin dar tiempo a que se regenerase hueso. El PRP se obtuvo mediante plasmaféresis y el incremento plaquetario fue del 636%.
- **Oyama y cols. (2004):** Colocan un injerto autólogo junto a PRP en 7 defectos alveolares. Evalúan la regeneración ósea comparándola con controles mediante tomografía computarizada a los 5-6 meses y obtienen mayor volumen óseo donde añadieron el PRP.
- **Butterfield y cols. (2005):** Practicaron elevaciones de seno bilaterales en 21 conejos con hueso de la cresta ilíaca con o sin PRP y se evaluaron a las 2, 4 y 8

semanas. El añadir PRP no mejoró la formación de hueso significativamente en el análisis histomorfométrico por lo que no estimuló la regeneración ósea. Su incremento plaquetario fue del 440%.

- **Raghoobar y cols. (2005):** Tras hacer elevaciones de seno en 5 pacientes, en un lado elegido al azar colocaron injertos de cresta ilíaca y en el otro además añadieron plasma rico en plaquetas obtenido por el sistema PCCS. A los 3 meses realizaron una biopsia y tras hacer el análisis microrradiográfico con una escala de grises y el análisis histomorfométrico, no encontraron diferencias entre ambos lados. Tal vez porque las diferencias en la regeneración se ven en un estadio inicial (primer mes). No vio que añadir el PRP aportara ningún beneficio extra, además un implante del lado del PRP se perdió. La muestra era pequeña pero tampoco existía tendencia.
- **Jensen y cols. (2005):** Colocan en defectos del ángulo de la mandíbula de 12 minicerdos hueso autógeno, y en los contralaterales, hueso con PRP obtenido mediante el sistema PCCS. Hacen el análisis histológico a la semana y a las 2, 4 y 8 semanas sin encontrar diferencias entre ambos lados, por lo que concluyen diciendo que el preparado plasmático no ayudaría en la regeneración ósea. Su incremento plaquetario fue del 440%.
- **Gerard y cols. (2006):** Crean defectos bilaterales en las mandíbulas de 12 perros. En un lado colocan un injerto de hueso autólogo y en el otro además añaden PRP. Tras el análisis histomorfométrico y de radiografías digitalizadas al mes, 2, 3 y 6 meses, concluyen diciendo que el PRP favorece la regeneración al inicio, pero que a los 2 meses ya no hay diferencias.

- **Klongnoi y cols. (2006a):** Extraen los premolares maxilares de 8 cerdos. A los dos meses realizan la elevación bilateral de los senos colocando hueso autólogo con o sin PRP obtenido mediante el sistema Curasan y con un incremento plaquetario del 410%. Además simultáneamente colocarán implantes. El análisis microrradiográfico y el histológico al mes, 2, 8 y 12 meses no muestran diferencias estadísticamente significativas, por lo que el PRP no aporta ningún beneficio adicional a la regeneración.
- **Klongnoi y cols. (2006b):** Repiten el estudio anteriormente descrito pero con 12 cerdos, con la misma técnica y métodos de análisis. Vuelven a obtener los mismos resultados. El PRP no aporta ningún beneficio.
- **Miranda y cols. (2006):** Colocan un injerto óseo en el cráneo de 16 conejos de tres formas distintas: dejándolo en íntimo contacto con el lecho receptor o colocando pequeñas partículas de hueso o PRP. Se hizo un análisis histológico y morfométrico a los 7, 15, 30 y 60 días y vieron como en todos los grupos el injerto estaba integrado a los 30 días, sin encontrar beneficio con el uso del PRP.
- **Thorwarth y cols. (2006):** Compararon en cerdos el uso de hueso autógeno con o sin PRP (obtenido mediante el Sistema Curasan y el PCCS) a las 2, 4, 12 y 26 semanas. El incremento plaquetario con el Sistema Curasan fue del 410% y con el PCCS del 650%. A las 2 semanas con el análisis microrradiográfico la formación ósea fue mayor donde se colocó hueso con el PRP obtenido mediante el sistema PCCS, seguido por el del sistema Curasan, pero a las 4 semanas los valores se invirtieron siendo mayor la mineralización donde sólo se colocó hueso autólogo.

Otros artículos no presentan controles que pudiesen servir de comparación:

- **Olea y Olea (2002):** En 3 pacientes en los que querían regenerar el hueso maxilar y colocar implantes, colocaron hueso autógeno junto a hueso bovino y PRP. A los 6 meses hicieron una radiografía y una biopsia y observaron regeneración ósea.
- **Mazor y cols. (2004):** Colocaron hueso autógeno junto al PRP al hacer unos aumentos de seno simultáneamente a la colocación de implantes en 105 pacientes. A los 6 meses ya los pudieron exponer (3 meses antes de lo habitual) previa comprobación clínica y radiográfica de la buena regeneración ósea. Para ellos, el PRP hizo que disminuyera el tiempo de curación, además dicen que ayuda a manejar el injerto y que hace que cicatricen mejor los tejidos blandos.
- **Philippart y cols. (2005):** Combinan hueso autólogo corticoparietal con factor humano de tejidos recombinante (rhTC), con PRP obtenido por el método Smart Prep y xenoinjerto de hueso bovino, para hacer elevaciones de seno maxilares en 3 personas. A los 6-10 meses de la intervención, antes de colocar los implantes, realizaron las biopsias donde vieron que el xenoinjerto estaba totalmente integrado y que había regeneración ósea normal, con osteocitos rodeados por osteoblastos. Nos ofrecen esta opción como una buena combinación para evitar poner sólo un injerto de hueso autólogo.
- **Graziani y cols. (2005):** En 6 pacientes hicieron elevaciones de seno colocando PRP con hueso autólogo y fibrinógeno. A los 3 y 6 meses les realizaron ortopantomografías y a los 6 meses una tomografía computarizada. En la TC

vieron un aumento de hueso de 6,27 mm y en la radiografía observaron mineralización.

- **Mannai (2006):** Colocó 314 implantes junto a hueso autógeno, un xenoinjerto y PRP en 97 pacientes con atrofia maxilar. A los 3 meses el 97.8% tuvieron una excelente reparación tanto de los tejidos duros como de los blandos, analizados mediante tomografías computarizadas y ortopantomografías, en vez de a los 6 y 9 meses, que es lo normal.

3.6.2 PRP + hueso inorgánico mineral animal

Marx (2001) afirma que el PRP es efectivo sobre células vivas y que no puede actuar sobre sustitutos óseos y otros materiales no celulares, pero de nuevo vuelve a haber contradicción.

- **Kim y cols. (2001):** Estudian defectos craneales en 20 conejos, unos rellenos con Bio-Oss solo y otros además con PRP. La radiografía y la tomografía computarizada mostraron más densidad ósea con el PRP y Bio-Oss juntos, tanto al mes como a los 2 meses. El incremento plaquetario fue del 296% y el PRP se obtuvo mediante un doble centrifugado.
- **Aghaloo y cols. (2002 suppl, 2004):** Crean 4 defectos en 15 conejos que rellenan con Bio-Oss, Bio-Oss y PRP, hueso autógeno o nada. Los resultados con el hueso autógeno fueron significativamente mejor que el Bio-Oss con o sin PRP, pero cuando se añadió PRP al Bio-Oss, el análisis histomorfométrico

mostró mayor porcentaje de hueso que sólo con Bio-Oss al mes, 2 y 4 meses. El PRP se obtuvo mediante un doble centrifugado y su incremento plaquetario fue del 813%.

- **Froum y cols. (2002):** Hicieron elevaciones de seno bilaterales en tres pacientes. En un lado se puso Bio-Oss sólo y en el otro con PRP y todos además con membranas. Obtuvieron un 23% de hueso con Bio-Oss y PRP y un 21% con Bio-Oss solo, por lo que concluyen que no encontraron diferencias entre ambos lados. Marx (2004) le critica la baja muestra, sólo 3 pacientes, y además dice que incluye múltiples variables que confunden el resultado. Un paciente recibió Bio-Oss con una membrana BioGide y PRP, otro Bio-Oss con hueso autógeno, membrana y PRP, y el tercero Bio-Oss con membrana Gore-Tex y PRP. Además en un caso a la vez se puso además un implante. También le critica que no hace recuento plaquetario.
- **Lekovic y cols. (2002):** Comparan en defectos periodontales contralaterales el uso de PRP con hueso bovino con o sin regeneración tisular guiada. La valoración fue clínica y mediante la profundidad de sondaje, y observaron que ambos métodos daban buenos resultados, por lo que la RTG no aportó ningún beneficio.
- **Fürst y cols. (2003):** Comparan el uso de hidroxiapatita sola (Bio-Oss) o con PRP, obtenido mediante aféresis, en elevaciones de seno de 12 minicerdos, con colocación inmediata de un implante. Concluyen diciendo que el PRP tenía un efecto diferencial en la osteointegración del hueso injertado, ya que a las 3 semanas los contactos hueso-implante eran extensos, aunque disminuyeron a las 6 semanas para volver a aumentar a la semana 12. En cuanto al efecto en el

hueso del huésped local, a las 3 y 6 semanas era menor donde se usó PRP, y a las 12 semanas se equipararon. Podemos decir que el PRP combinado con HAP no es mejor que usarla sola. *In vitro* se ve que funcionan los factores de crecimiento del PRP pero en realidad influyen muchos factores como la dosis de los mismos, los transportadores...

- **Roldán y cols. (2004):** Compararon en defectos mandibulares de 28 ratas la aplicación de hueso autólogo con PRP, hueso autólogo con BMP-7, hueso bovino con PRP y éste con BMP-7. Además tenían un control. Sus resultados fueron los siguientes. Añadir PRP a hueso bovino o autólogo, no mejora la regeneración ósea. La regeneración del PRP junto a hueso bovino no se diferenció de la del lado control, en cambio el hueso bovino junto a BMP-7 sí mejoró la regeneración ósea, por lo que vemos como la BMP-7 no necesita ningún injerto autólogo para favorecer la formación de hueso. El incremento plaquetario fue del 505% y el PRP lo obtuvieron mediante un doble centrifugado.
- **Wiltfang y cols. (2004):** Estudian en defectos de cráneos de minicerdos la aplicación de dos tipos de PRP, uno obtenido por el sistema PCCS y otro por el Curasan, junto a Bio-Oss. Había además un defecto control. En el análisis radiográfico e histológico a las 2, 4 y 12 semanas, vieron que ninguno de los dos PRP aportaba ningún beneficio adicional.
- **Camargo y cols. (2005):** En 28 defectos intraróseos en humanos, comparan la combinación de PRP, hueso bovino y RTG con el simple desbridamiento quirúrgico (control). Obtuvieron mejoras estadísticamente significativas en el lado donde usó la triple combinación, aunque el lado control también mejoró.

Comentan que al tener el PRP características hemostáticas hace que el injerto no se mueva y esto es indispensable para que se produzca la regeneración.

- **Okuda y cols. (2005):** Comparan en defectos periodontales intraóseos en humanos el uso de HA con suero o HA con PRP. A los 12 meses tras hacer una inspección clínica y mediante radiografías ven que no hay diferencias pero que el sondaje había mejorado más donde se colocó el PRP.
- **Jensen y cols. (2005):** Crean defectos en el ángulo de la mandíbula de 12 minicerdos. En un lado ponen hueso bovino y en el otro a éste le añaden PRP obtenido por el sistema PCCS, obteniendo un incremento plaquetario del 440%. En el análisis histológico a las 2, 4, 8 semanas no encontraron ninguna diferencia, por lo que concluyen diciendo que el PRP no ayuda en la regeneración junto a hueso bovino.
- **Thorwarth y cols. (2006):** Compararon en cerdos el uso de Bio-Oss con o sin PRP (obtenido mediante el Sistema Curasan y el PCCS) a las 2, 4, 12 y 26 semanas. El incremento plaquetario con el Sistema Curasan fue del 410% y con el PCCS del 650%. A las 2 semanas con el análisis microrradiográfico la formación ósea fue mayor donde se colocó sólo Bio-Oss, sin encontrar diferencias a partir de la cuarta semana.

Rodríguez y cols. (2003) también realizan elevaciones de seno con Bio-Oss y PRP. Afirman que según su experiencia clínica esta combinación es efectiva si además queremos colocar implantes de forma inmediata, pero no tienen controles donde comparar los resultados de la regeneración.

3.6.3 PRP + adhesivo de fibrina

- **Fuerst y cols. (2004b):** Comparan el uso del adhesivo de fibrina con y sin PRGF obtenido mediante aféresis y no ven diferencias entre ningún grupo comparado con el control. Lo hacen en defectos en cerdos porque son similares a los humanos en cuanto al número de células, el patrón de coagulación y en su estructura ósea y dicen que tal vez no obtienen diferencias, porque intentan regenerar hueso cortical y no medular, que tiene un menor componente de células y está menos vascularizado.

Graziani y cols. (2005) dicen que el hueso tiene excelentes propiedades como injerto (osteogénico, osteoinductivo y osteoconductor) pero que aún así tarda 6 meses en madurar clínicamente, por lo que añade PRP y crioprecipitado de fibrinógeno (adhesivo fibrina), para darle consistencia de gel al injerto transportándolo y mejorando el tiempo de maduración, pero aunque se supone que esto ayuda al hueso, aún no está demostrado.

3.6.4 PRP + sustitutos óseos

- **Kim y cols. (2002b):** Realizaron 3 defectos óseos en la cresta ilíaca de 10 perros y colocaron implantes. En un defecto no añadieron nada (control), en otro colocaron un injerto formado por yeso paris, sustituto óseo cuya composición es sulfato cálcico, con partículas de diente que tienen hidroxiapatita, y en otro, este

mismo injerto más PRP. Sacrificaron a los animales a las 6 y 12 semanas y observaron que habían conseguido más hueso con este injerto si lo comparaban con el control, y que además la regeneración era mayor si junto a este injerto se añadía el PRP. La mayor parte de las partículas de hueso se incorporaron en el hueso nuevo en íntimo contacto con el implante. Realizaron un doble centrifugado y obtuvieron un incremento plaquetario del 392%.

- **Wiltfang y cols. (2003):** Colocan β -TCP (fosfato tricálcico β), sólo o junto a PRP obtenido por el método Curasan, para hacer elevaciones del suelo de 45 senos. Quieren ver si con el PRP la regeneración ósea es mayor y si el injerto alogénico se reabsorbe antes, ya que en condiciones normales puede tardar hasta 12 meses en desaparecer. Los resultados fueron que el PRP sólo favorecía un poco más la regeneración ósea (había un 8-10% más de formación ósea), pero no se vio que el β -TCP se degradara antes. Además donde se usó el PRP aparecieron mayor número de células gigantes a cuerpo extraño rodeando los gránulos del β -TCP. A esto hay que añadir que no todos los gránulos de cerámica tenían contacto directo con el hueso, estando parcialmente en tejido blando. Tal vez esto se explique porque el TGF, que también está en el PRP, favorece la quimiotaxis de fibroblastos. En su estudio concluyen diciendo que el PRP funciona para acelerar la formación de hueso sólo si están presentes osteoblastos y osteocitos, y que el PRP no es capaz de hacer que se degraden los sustitutos óseos. El enriquecimiento plaquetario fue del 410%.
- **Wiltfang y cols. (2004):** Estudian en defectos de cráneo de minicerdos la aplicación de β -TCP solo o junto a dos tipos de PRP, uno obtenido mediante el sistema PCCS y otro mediante el Curasan. Concluyeron diciendo que el PRP no

añadía ningún beneficio a los sustitutos óseos y además no ayudaba en la degradación de la cerámica.

- **Jensen y cols. (2005):** Colocan β -TCP con o sin PRP obtenido por el sistema PCCS, en defectos del ángulo de la mandíbula de 12 minicerdos y no ven diferencias en los análisis histológicos. Observan además que el PRP tampoco ayudaba en la degradación del injerto. El incremento plaquetario obtenido fue del 440%.
- **Christgau y cols. (2006):** En 25 pacientes con dos defectos intraóseos contralaterales colocan en uno de ellos β -TCP junto a una membrana reabsorbible, (actuará como lado control), y en el contralateral, además añaden concentrado de plaquetas autólogas. Tras realizar análisis clínicos y radiológicos no parece que el concentrado plaquetario mejore la regeneración, aunque sí reduce las exposiciones de las membranas.
- **Klongnoi y cols. (2006a):** Extraen los premolares maxilares de 8 cerdos. A los dos meses realizan la elevación bilateral de los senos colocando fluorhidroxiapatita con o sin PRP obtenido mediante el sistema Curasan y con un incremento plaquetario del 410%. Además simultáneamente colocarán implantes. El análisis microrradiográfico y el histológico al mes, 2, 8 y 12 meses no muestran diferencias estadísticamente significativas, por lo que el PRP no aporta ningún beneficio adicional a la regeneración.
- **Klongnoi y cols. (2006b):** Realizan el mismo estudio anteriormente descrito pero con 12 cerdos a los que colocan Biogran® (cristal biocompatible) con o sin PRP. Según sus resultados no obtienen mayor regeneración tras colocar el PRP.

- **Planchokova y cols. (2006):** Evalúan el efecto del PRP en ratas. Crean defectos craneales donde colocan HA/ β -TCP solo, con PRP líquido o en gel. Dejan otro defecto como control. Triplican el número de plaquetas mediante el sistema PCCS y tras 4 semanas realizan el análisis histológico, histomorfométrico y con micro-TC. Aunque no vieron efectos negativos tampoco los hallaron positivos tras el uso del PRP, ya sea en gel o líquido.

Demiralp y cols. (2004) publican un caso de cirugía periapical donde colocaron TCP junto a plasma rico en plaquetas obtenido mediante el sistema Curasan. Realizaron una exploración clínica y radiográfica a las 2 y 3 semanas y a los 3, 6, 9 y 12 meses. Clínicamente todo fue muy bien y a los 12 meses ya había hueso nuevo en la zona de estudio.

3.6.5 PRP + matriz ósea orgánica de cadáver: DFDBG (hueso desmineralizado congelado y deshidratado) y FDBG (injerto de hueso congelado y deshidratado)

- **Kim y cols. (2002a):** Realizaron tres defectos en la cresta ilíaca de perros y en ellos colocaron: hueso desmineralizado, deshidratado y congelado solo, en otro éste junto a PRP y en el último no introdujeron nada, dejándolo como control. Además colocaron implantes y a las 6 y 12 semanas cuando valoraron la regeneración ósea, vieron menos tejido conectivo fibroso y mayor formación de hueso en el grupo del PRP, siendo además un hueso más maduro. Aunque en el grupo sin PRP y con hueso congelado también obtuvieron mejores resultados

que en el control, los resultados con el PRP fueron mejores. Se les critica que realizan su estudio en la cresta ilíaca donde la contaminación es escasa. El PRP lo obtuvieron mediante un doble centrifugado y el incremento plaquetario fue del 392%.

- **Palmisano (2002):** Estudiaron en perros la combinación del PRP junto a hueso mineralizado. El análisis por ordenador de las radiografías que determina el porcentaje de mineralización, mostró un relleno del 90,5% con el hueso mineralizado y del 74,7% si se le añadía PRP, por lo que no encuentran beneficio por el que añadir este preparado plasmático.
- **Harris (2003):** Realizaron osteotomías en el arco cigomático de 6 perros, éstas se desplazaron y se rellenaron los defectos con hueso mineralizado con o sin PRP, sin encontrar beneficio radiográfico ni histoquímico al hacerlo a las 12 semanas.
- **Dudziak (2003):** Extrajeron dientes y realizaron una alveolectomía a 6 perros. Doce semanas después hicieron un aumento de cresta con hueso mineralizado y PRP o PPP. En el análisis histológico a las 12 semanas ningún grupo tuvo muestras de osteoconductividad.
- **Jensen y cols. (2004):** Compararon con controles la formación ósea en 8 perros al colocarles un implante junto un injerto congelado de hueso de otro perro con o sin PRP. A las 3 semanas realizaron el análisis histomorfométrico y vieron que el PRP no aportaba ningún beneficio a la regeneración ósea. Los mejores grupos fueron aquellos donde había injertos, pero porque le daban estabilidad al implante. El PRP se obtuvo mediante un centrifugado y el enriquecimiento plaquetario fue del 670%.

- **Sánchez y cols. (2005):** Crean defectos de tres paredes alrededor de implantes en 9 perros. Hacen tres grupos, en uno colocan hueso desmineralizado congelado y deshidratado solo, en otro junto a PRP (obtenido mediante el sistema SmartPrep) y otro lo dejan como control. Sacrifican a los animales al mes, 2 y 3 meses y con un densiómetro hace un análisis de la densidad ósea y contenido mineral. Ven que los defectos tratados con el injerto con o sin PRP son mejores que el control a los 3 meses, pero no existen diferencias entre el resto, por lo que el añadir PRP no mejora la densidad ósea mineral.
- **Aghaloo y cols. (2005):** Crearon 4 defectos en el cráneo de 15 conejos. En ellos colocaron: hueso mineralizado crio-desechado (FMB) solo y con PRP, y hueso desmineralizado crio-desechado (FDDB) solo y con PRP. Se evaluaron al mes, 2 y 4 meses histomorfométricamente y mediante radiografías sin hallar diferencias entre aplicar o no PRP en los defectos tanto con hueso mineralizado como desmineralizado.

Shanaman y cols. (2001) publicaron tres casos donde habían realizado elevaciones de seno usando hueso deshidratado congelado combinado con un poco de hueso autógeno mezclado con PRP y protegido con una barrera. Posteriormente, al colocarles los implantes obtuvieron una muestra de hueso que analizaron. Los autores concluyen que no parece que mejore la calidad y cantidad de hueso comparado con técnicas de regeneración guiada sin PRP. Marx (2004) le critica que sólo presentan 3 casos y que además no tienen controles.

3.6.6 PRP usado solo

Según Marx (2001), el PRP no es osteoinductivo, ya que por si solo no es capaz de generar hueso y tan sólo favorece la división de las células implicadas en ello. Este es el motivo por el que afirma que no se pueden sustituir los injertos ni los sustitutos óseos por el plasma rico en plaquetas, aunque sí apoya el mezclarlos.

Graziani y cols. (2005) también comparten la idea de Marx. Dicen que el PRP se debe colocar junto a un injerto óseo que le proporcionará un buen soporte osteoconductor y una posible fuente de células, pero como vamos a ver, no todos los autores opinan igual, y hay quienes lo utilizan en solitario.

- **Anitua (1999):** Estudió la aplicación del PRP solo en alvéolos tras realizar una extracción. A los 4 meses observó mejor epitelización y regeneración ósea donde colocó el plasma rico en plaquetas comparado con los controles. El preparado plasmático lo obtuvo mediante un solo centrifugado.
- **Anitua (2001):** En 12 defectos de 3 cabras puso PRP dejando 12 más como control. Al mes realizó una biopsia y vio que donde no colocó PRP sólo había tejido conjuntivo mientras que donde sí lo aplicó ya había un 50% de hueso.
- **Aghaloo y cols. (2002):** Tampoco encuentran beneficio tras usar el PRP comparado con zonas control en defectos craneales de conejos con un incremento plaquetario del 729%.
- **Fuerst y cols. (2003):** Comparan el contacto hueso e implante en 8 minicerdos. En un lado colocan el implante junto a PRGF y en el otro sólo el implante. A las 8 semanas obtienen un contacto del 70,36% donde usaron factores de

crecimiento mientras que donde no los utilizaron fue del 48,20%, por lo que concluyen diciendo que los factores de crecimiento y otras sustancias liberadas de la activación del PRP pueden mejorar el contacto hueso e implante. Comentan que los cerdos son similares a los humanos en cuanto al número de plaquetas, parámetros de coagulación y estructura ósea. Además, la mandíbula del hueso es similar a la humana porque tiene mucho hueso cortical.

- **Zechner y cols. (2003):** Estudian el efecto en la regeneración ósea del PRP coagulado y aplicado antes de colocar un implante comparado con el lado contralateral que será el control. Lo hacen en cerdos y ven que en el estadio inicial de la restauración, a las 6 semanas, se forma más hueso comparado con el control, pero a las 12 semanas ya no encuentran diferencias.
- **Jensen y cols. (2004):** Compararon en perros la formación ósea al colocar implantes con o sin PRP y vieron que el PRP no aportaba ningún beneficio. Dicen que tal vez obtienen resultados distintos a Marx porque utilizan EDTA como anticoagulante, y como ya hemos dicho, éste puede fragmentar las plaquetas y disminuir el efecto de los factores de crecimiento, aunque en el estudio de Kim y cols. (2001), también utilizan EDTA y los resultados de la aplicación del PRP fueron satisfactorios.
- **Fontana y cols. (2004):** En un estudio experimental con 15 ratas observan que obtienen mayor volumen de hueso si colocan PRP junto al implante que si lo coloca solo. Al mes realiza biopsias y obtiene 30 cm² donde colocaron PRP frente a 16 donde no colocaron nada. El incremento plaquetario fue del 240% y el PRP se obtuvo mediante un centrifugado.

- **Weibrich y cols. (2004):** Analizan los efectos del PRP, obtenido por el sistema PCCS, sobre la regeneración ósea peri-implantaria en conejos. Mojan el implante en el PRP y éste luego lo introducen en estado líquido mediante una jeringa. A los 28 días no encontraron diferencias entre ambos grupos y tal vez estos resultados se deban al método de aplicación del PRP ya que al ponerlo con jeringa se podría producir un trauma. No recomienda usarlo de esta manera ya que influyen demasiados factores en esta técnica.
- **Sammartino y cols. (2005):** Aplican plasma rico en plaquetas tras la extracción de terceros molares inferiores mesioangulados impactados en 18 pacientes en un lado, siendo el contralateral donde no se aplica el control. Hacen radiografías panorámicas a las 12 semanas y sondajes periodontales con posicionador. Los mejores resultados los obtuvieron en el lado donde colocaron el plasma rico en plaquetas. El sondaje en el lado del PRP a las 12 semanas era de 4,13 mm y en los controles de 7,35 mm. Ambos partían de defectos mayores o igual a 7,5 mm. La clínica también fue mejor en el lado de estudio aunque no hubo diferencias en cuanto a la recesión. También realizaron biopsias de las zonas con PRP y en 17 casos vieron hueso nuevo formado con muchos osteoblastos mientras que en el otro observaron tejido conjuntivo fibroso junto a una mala clínica. Concluyen diciendo que el PRP es efectivo en los defectos periodontales distales de 2° molares mandibulares tras la extracción del 3° molar.
- **Pryor y cols. (2005a):** Quieren ver el efecto genuino del PRP solo en la osteogénesis y para ello crean defectos en ratas. En un lado colocan esponjas de colágeno reabsorbibles con PRP líquido, en otro sólo colágeno y otros los deja como zonas control. Según sus resultados, obtenidos de la comparación que

realizaron 3 investigadores de las radiografías de las biopsias mediante la escala de grises, el PRP solo no tiene un efecto significativo en la regeneración ósea. El 75% de los defectos ya sea con o sin PRP y colágeno tuvieron cierre parcial a las 4 semanas.

- **Pryor y cols. (2005b):** Aportan los resultados histológicos e histomorfométricos del estudio anterior. No encuentran diferencias estadísticamente significativas dentro de cada grupo. Además aún aprecia restos de colágeno a las 8 semanas.
- **Jung y cols. (2005):** Crean defectos en 16 conejos y en ellos colocan PRP, obtenido mediante plasmaféresis, o los dejan sin nada como controles. A las 4 semanas realizan las biopsias sin obtener diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos. Según los autores, el PRP autólogo no mejora la regeneración ósea, a no ser que se le añada rh-BMP-2.
- **Monov (2005):** Valoró el uso del PRP en la colocación de 34 implantes de una fase en la región anterior de mandíbulas inferiores. En un mismo paciente había una zona control y otra donde se colocaba el PRP obtenido por el método Curasan con un incremento plaquetario del 350%. Éste se hacía coagular, pero el implante antes también se mojaba en el plasma rico en plaquetas. La evolución se siguió realizando un análisis de frecuencia de resonancia con el que se valoraba la densidad ósea en la superficie implante-hueso, en diferentes intervalos de tiempo cada 4 días hasta el día 44. No se observaron diferencias entre ambos grupos, por lo que concluyeron diciendo que el PRP no añadía ningún beneficio.

Otros autores que usan el PRP pero si tener controles con los que comparar son:

- **Mancuso y cols. (2003):** Obtienen menos osteítis, menos dolor y radiografías de mayor densidad cuando añaden PRP al alvéolo tras la extracción de un tercer molar inferior, pero no tiene controles.
- **Tözüm y cols. (2006):** Extraen un incisivo inferior endodonciado con patología periodontal y lo reimplantan añadiéndole PRP. A los 18 meses demostraron que había hueso en la porción apical y la movilidad regresó a límites normales.

3.6.7 PRP + osteodistracción

- **Swennen y cols. (2005):** Realizan distracción ósea en 16 ovejas con o sin PRP. A las 6 semanas realizan radiografías y tomografías computarizadas y observan que el plasma rico en plaquetas tiene efecto si la distracción se hace nada más aplicarlo, pero en cuanto a la densidad y al volumen óseo total, no encuentra diferencias.

Robiony y cols. (2002), en 5 personas con atrofia mandibular, realizan un proceso de osteodistracción añadiendo en el defecto un injerto autólogo y PRP. No tienen controles. A los 2 meses vieron con ortopantomografías que la regeneración se estaba produciendo y además pudieron colocar implantes.

3.6.8 PRP + células madre pluripotenciales

- **Ohya y cols. (2005):** Mezclan el plasma rico en plaquetas con células madre pluripotenciales de la médula de la cresta ilíaca de conejos y con hueso esponjoso y médula. Obtienen una formación de hueso muy rápida en dos semanas, siendo además éste, un hueso más vascularizado que el obtenido en el grupo donde sólo usaron células madre. Whada, en 2001, consiguió el pico a las 4 semanas, pero usando sólo hueso esponjoso y médula sin PRP, por lo que nos hace pensar que el PRP proporciona las condiciones óptimas para una mejor y más rápida regeneración ósea, siempre con injertos de hueso o con células madre. Lo que se ve también en el estudio de Ohya y cols., es que después de este crecimiento inicial a las 2-4 semanas, encontramos una gran cantidad de médula grasa a las 8 semanas, lo que hace que no se puedan colocar implantes porque no tendrían el soporte óseo adecuado.
- **Zhu y cols. (2006):** Comparan el uso de la unión de células madre y BMP-2 con PRP o con adhesivo de fibrina. A los 3 meses de usarlo en ratones, el análisis histomorfométrico y el histológico, demostraron que las características osteogénicas del adhesivo de fibrina eran superiores a las del PRP con estas combinaciones.

3.6.9 PRP + colágeno tipo I

- **Fuerst y cols. (2004a):** Crean defectos artificiales en 8 cerdos que rellenarán con colágeno tipo I, que es capaz de promover la formación de hueso, estimular la proliferación de osteoblastos y la diferenciación osteogénica, con y sin PRGF, dejando también grupos control. Encuentran diferencias significativas en la formación de hueso desde las 4 semanas entre el grupo del colágeno y el control, pero no entre el grupo del colágeno con PRGF y el control. Además, en los defectos donde usaron PRGF observaron una reacción inflamatoria y la formación del hueso cerca del colágeno fue escasa, por lo que el colágeno tipo I pero no su combinación con factores de crecimiento, ayuda a la reparación ósea en la primera fase ya que a las 8 semanas no era tan evidente.

Tabla IX (leyenda al final)

Autor/Año	Muestra	Forma y tiempo de evaluación	Resultados regeneración
Marx y cols. 1998 Plasmaféresis	n=88 defectos mandíbula humana a) 44 injerto óseo b) 44 con injerto + PRP	- Análisis de ortopantomografías por investigadores: 2, 4 y 6 meses - Biopsia: 6 meses	- mejor con PRP desde el 2º mes - Área trabecular en a) 55% y en b) 74%
Anitua 1999 Centrifugadora convencional	n=20 alvéolos humanos a) 10 sin nada b) 10 con PRP	Fotos, biopsia y radiografía a los 4 meses	Mejor cicatrización y regeneración con PRP
Anitua 1999 Centrifugadora convencional	n=3 alvéolos humanos En un lado no se puso nada y en el otro PRP	Fotos, biopsia y radiografía a los 4 meses	Mejor cicatrización y regeneración con PRP
Anitua 2001 Centrifugadora convencional	3 cabras n=24 alvéolos artificiales a) 12 sin nada b) 12 con PRP	Biopsia al mes	En a) sólo había TC y en b) 50% hueso y 50% TC
Shanaman y cols. 2001 Plasmaféresis	n=3 aumento cresta, sin controles hueso cadáver + PRP + membrana	Análisis histológico a las 6 semanas	No parece que el PRP añada ningún beneficio
Aghaloo y cols. 2002 Centrifugadora	n=15 conejos cada uno con 4 defectos a) 1 sin nada b) 1 con PRP c) 1 con hueso d) 1 con hueso y PRP	- Radiografía: 5 al mes, 2 y 4 meses - Biopsia: 5 al mes, 2 y 4 meses	- Mejor en c) y d) sin diferencias entre ellos - Mejor en c) y d) sin diferencias hasta el 4º mes que es mejor en d)
Olea y Olea 2002 Centrifugadora	n=3 humanos. Implantes y regeneración maxilar con hueso humano, bovino y PRP	- Radiografía: 6 meses - Biopsia y microscopía óptica y electrónica: 6 meses	Se ve regeneración ósea
Kim y cols. 2001 Centrifugadora	n=20 conejos. Defectos craneales a) Hueso bovino b) Hueso bovino + PRP	- Radiografía y análisis: mediante escala grises - Biopsia: 1- 2 meses - TAC	- Al mes: a) 38,3% mineralización y b) 54.7% - 2 meses: a) 51.0% y b) 77.4%

Kim y cols. 2002b	n=10 perros con 3 defectos en cresta ilíaca + implante a) control b) yeso parís + partíc dte c) yeso parís + partíc dte con PRP	Biopsia a las 6 y 12 semanas Análisis histológico e histomorfométrico	Mayor formación ósea con el injerto y mejor aún si se le añade PRP
Froum y cols. 2002 Plasmaféresis	n=3 elevaciones seno bilaterales Bio-Oss + membrana (en uno ads h. autógeno) y PRP en los lados experimentales sólo.	Análisis histomorfométrico de 7 a 11 meses.	No se vio diferencia significativa al aplicar PRP en la formación de hueso ni en el contacto hueso-implante.
Robiony y cols. 2002 Centrifugadora CWS	n=5 distracción + injerto autólogo + PRP	Ortopantomografía, cefalometría, ecografía en las distintas acciones a los 2 meses	Se estaba formando hueso nuevo y se pudieron colocar implantes
Wiltfang y cols. 2003 Sistema Curasan	n=45 elevaciones de seno a) 22: β -TCP b) 23: β -TCP + PRP	Biopsia a los 6 meses y análisis microscopio al poner implantes	- Sin PRP: regeneración 29% - Con PRP: 38%. Con + cél gigantes a cuerpo extraño y + penetración tejido blando.
Zechner y cols. 2003 Centrifugadora	n=12 minicerdos, 72 lechos implantes Izqdo: PRP coagulado + implante Dcho: implante	Biopsias a las 3, 6 y 12 semanas Análisis histológico e histomorfométrico	A las 6 semanas se vio más hueso con PRP pero a las 12 la osteogénesis era similar
Fürst y cols. 2003 Plasmaféresis	n=12 minicerdos Elevaciones seno a) Hidroxiapatita b) HAP + PRP	Análisis histológico e histomorfométrico a las 3, 6 y 12 semanas	No es mejor usar HAP + PRP que HAP sola
Fuerst y cols. 2003 Plasmaféresis	n=8 minicerdos a) implante + PRGF b) implante	Biopsia 4 y 8 semanas. Análisis histomorfométrico e histológico	El contacto hueso implante con PRGF: 55,30% y sin él 38,91%
Rodríguez y cols. 2003 Smart Prep	n=15 personas 24 elevaciones de senos + Bio-Oss + PRP + implante	A los 4 meses en 3 pacientes se realizó una tomografía computarizada	Parece que esta combinación acorta el tratamiento en 3-4 veces

Jakse y cols. 2003 Plasmaféresis	n=12 ovejas Elevación seno bilateral a) hueso autólogo b) hueso + PRP	Biopsia a las 4 y 12 semanas. Análisis histomorfométrico	No existe diferencias entre colocar PRP o no
Choi y cols. 2004 Plasmaféresis	n=8 perros a) hueso autólogo + PRP b) hueso autólogo	Biopsia: 6 semanas	En a) 36.8% de mineralización con islotes de hueso y tejido necrótico y en b) 56.7%
Demiralp y cols. 2004 Sistema Curasan	Un caso de cirugía periapical + TCP + PRP	Exploración clínica y radiográfica 2 y 3 semanas y 3-6-9 y 12 meses	Clínicamente todo bien sin dolor y con hueso nuevo, a los 12 meses
Fennis y cols. 2004 Plasmaféresis	n=28 cabras, reconstrucción mandíbula a)14: injerto autógeno b)14: injerto + PRP	Análisis histológico e histomorfométrico 3, 6 y 12 semanas	El uso de PRP mejora la regeneración ósea sobre todo entre las 6 y 12 semanas
Aghaloo y cols. 2004 Centrifugadora	n=15 conejos con 4 defectos a)hueso autógeno b)Bio-Oss c)Bio-Oss + PRP d)control	Estudio con radiografía digital, histología e histomorfometría 5 conejos al mes, 5 a los 2 meses y 5 a los 4 meses	Radiografía: más densidad ósea a), b) y c) que d) A. histomorfométrico: el mejor el a). Entre poner PRP al Bio-Oss o no, mejor si se pone.
Fontana y cols. 2004 Centrifugadora	n=15 ratas a) PRP + implante b) Implante	A los 30 días: - Biopsia - Radiografía	Mayor volumen de hueso con el PRP (30 cm ² frente a 16)
Mazor 2004 Centrifugadora	n=105 humanos PRP + hueso autógeno en elevación de seno	Evaluación clínica y radiográfica (orto y TC) a los 6 meses	Aceleró la regeneración en 3 meses
Weibrich y cols. 2004 PCCS	n=20 conejos a)PRP + implante en fémur b)implante	In vivo tinción con fluorocromo y análisis los días 1, 7, 14 y 21. Biopsia día 21 y análisis histomorfométrico	No se ven diferencias
Jensen y cols. 2004	n=8 perros cada uno 4 implantes + defecto con: a)Nada b)PRP	A las 3 semanas: - Prueba de empuje - Análisis histomorfométrico	No vieron diferencias entre el PRP con o sin hueso. El injerto si hizo que

	c)Hueso fresco congelado de otro perro d)hueso de otro perro + PRP		aumentara la fijación del implante
Fuerst y cols. 2004 Plasmaféresis	n=8 cerdos, defectos mandíbula a) 4 con adhesivo fibrina (FSPC) b) 4: FSPC + PRGF c) 8 control	Se sacrificaron a las 4 y 8 semanas. Análisis histológico e histomorfométrico	No hubo diferencias entre los grupos
Fuerst y cols. 2004 Plasmaféresis	n=8 cerdos, 3 defectos a) colágeno b) colágeno + PRGF c) control	Se sacrificaron a las 4 y 8 semanas. Análisis histológico e histomorfométrico	En el grupo con PRGF hubo menos hueso que donde sólo se colocó colágeno, además en aquél se encontró reacción inflamatoria a las 4 semanas
Roldán y cols. 2004 Centrifugadora	n=28 ratas, 4 defectos en mandíbula a) hueso bovino + PRP b) h. bovino +BMP-7 c) h. autólogo + PRP d) h. autólogo + BMP-7 e)control	Se sacrificaron el día 50. Análisis histológico, histomorfométrico y fluorescencia al microscopio	-no hay diferencias entre c) y d) -no hay diferencias entre a) y e) -sí hay + hueso en b) que en e)
Oyama y cols. (2004)	n=7 defectos alveolares a) injerto autólogo b) injerto + PRP	Se realizan tomografías computarizadas inicialmente y a los 5-6 meses	Obtuvieron más volumen de hueso donde colocaron además del injerto, PRP.
Wiltfang y cols. 2004 PCCS y Curasan	n=24 minicerdos defectos en cráneos a) hueso autógeno b) Cerasorb® (β-TCP) c) BioOss®(h. bovino) d) Collos® (esponjas colágenas bovinas osteoinductoras) e) Control Todos solos o con el PRP obtenido x 2 métodos	Biopsias a las 2, 4 y 12 semanas y análisis microrradiográfico, histológico e inmunohistológico	Los mejores fueron a) (38%) y c) (52%) a las 2 semanas. El PRP no influyó con los sustitutos óseos pero sí inicialmente con el hueso autógeno (62%) y con el PCCS. A las 12 semanas todos eran similares

Gaziani y cols. 2005	n=6 humanos PRP + hueso autólogo + crioprecipitado de fibrinógeno	- ortopantomografías: a los 3 y 6 meses - tomografías computarizadas en espiral: 6 meses	a) Orto: mineralización a los 3 meses b) TC: aumento de hueso de 6,27 mm
Raghoobar y cols. 2005 PCCS	n=5 personas elevaciones seno bilateral a) injerto cresta b) injerto + PRP	A los 3 meses biopsia y análisis microrradiográfico e histomorfométrico antes de colocar implantes	No diferencias
Ohya y cols. 2005	n=18 conejos elevaciones de senos bilaterales - Dcha: PRP+ hueso esponjoso + médula - Izqdo: cél madre + PRP	Biopsias a las 2, 4 y 8 semanas. Análisis histológicos e histomorfométricos.	Ambos lados tuvieron hueso nuevo vascularizado a las 2 y 4 semanas, pero a las 8 se rellenó de médula grasa
Pryor y cols. 2005a	n=18 ratas PRP + colágeno/colágeno N=12, Colágeno/control	Biopsia a las 4 y 8 semanas y radiografías evaluadas por 3 investigadores	El PRP solo no tiene efecto significativo en la osteogénesis
Pryor y cols. 2005b	n=18 ratas PRP + colágeno/colágeno N=12 Colágeno/control	Biopsias a los 4 y 8 semanas y análisis histológico e histomorfométrico	No hubo diferencias
Jung y cols. 2005 Plasmaféresis	n=16 conejos, 4 defectos a) control b) fibrina c) PRP d) fibrina+rhBMP-2 e) PRP+ rhBMP-2	Biopsia a las 4 semanas y análisis histológico e histomorfométrico	- No hubo diferencias entre a), b) y c) (23, 28 y 34%), pero sí hubo más hueso en los grupos con rh-BMP-2 (60, 63%)
Monov 2005 Curasan	34 implantes inmediatos a) lado control b) lado con PRP	Control mediante resonancia de análisis de frecuencia y ortopantomografías	No hubo diferencias. No aportó ningún beneficio el PRP
Okuda y cols. 2005	70 defectos intraóseos por enfermedad periodontal a) 35: PRP + HA b) 35: HA + suero (control)	Controles clínicos (índices gingivales) y radiografías al inicio y a los 12 meses	En radiografías no se ve diferencias pero el sondaje en a) fue menor
Camargo y cols. 2005 Centrifugadora	28 defectos intraóseos a) 28: hueso bovino + PRP + RTG b) sólo cirugía (control)	Controles clínicos (índices gingivales) y radiográficos al inicio y a los 6 meses	Aunque mejoraron los dos lados, fue mejor a)

Swennen y cols. 2005	16 ovejas, distracción a) 4: no PRP latencia 5 días b) 4: no PRP, no latencia c) 4:PRP, latencia 5 días d) 4:PRP sin latencia	A las 6 semanas radiografías convencionales y TAC	El PRP tiene efecto cuando la distracción comienza inmediatamente tras aplicar PRP, pero en cuanto a la densidad y el volumen óseo no hubo diferencias
Sánchez y cols. 2005 SmartPreP	9 perros, 90 implantes con defectos en 3 paredes a) DFDBG b) DFDBG + PRP c) control	Se sacrifican al mes, 2 y 3 meses y estudiaron la densidad ósea mineral con desiómetro	Más densidad con injerto que control, pero no diferencias entre a) y b)
Sammartino y cols. 2005 Centrifugadora convencional	18 pacientes con defectos en distal 2° M inferior con 3° M mesioangulado impactado a) 18 con PRP tras exo b) 18 sin nada: control	- Sondaje con posicionador en distal: 12 y 18 semanas - Ortopantomografía y radiografía periapical con posicionador: 12 y 18 semanas - Biopsia de los lados con PRP: 12 semanas	- Mejor a) excepto 1 caso de 18 que tuvo TC fibroso - En a) sondaje 4.13 mm y en b) hasta 7.37 - Clínica mejor en a)
Jensen y cols. 2005 PCCS	12 minicerdos con 3 defectos en cada ángulo de la mandíbula a) hueso autógeno b) hueso bovino c) β -TCP Se añadió PC a uno de los lados	Se sacrificaron 4 a 1, 2, 4, 8 semanas. Análisis histológico e histomorfométrico	No hubo diferencias entre los dos lados. El PC no mejoró la regeneración ósea en ningún grupo.
Butterfield y cols. 2005	n= 12 conejos Elevaciones de seno bilaterales. - Izqdo: PRP + hueso autógeno - Dcho: hueso autógeno	Se sacrificaron a las 2, 4 y 8 semanas. Análisis histomorfométrico.	No hubo diferencias. El PRP no aportó ningún beneficio.
Aghaloo y cols. (2005)	n=15 conejos 4 defectos en el cráneo a) FMB b) FMB + PRP c) FDDB d) FDDB + PRP	Estudio radiográfico e histomorfométrico al mes, dos y 4 meses.	No se encuentran diferencias entre aplicar PRP o sólo el hueso ya sea mineralizado o desmineralizado.

Christgau y cols. 2006	n= 25 personas con defectos intraóseos contralaterales a) β -TCP + membrana b) β -TCP + membrana + concentrado plaquetas	Exploración clínica y radiológica a los 3, 6 y 12 meses	No encuentran diferencias en la regeneración hasta el 6 ^o mes, pero se expusieron menos membranas (48%) donde se colocaron las plaquetas que en el lado control (80%)
Mannai 2006 SmartPreP	n= 97 personas con atrofia maxilar. 314 implantes junto a hueso autógeno, xenoinjerto y PRP	Tomografías computarizadas y ortopantomografías a los 3 meses	Mejóro la regeneración en 3-6 meses
Gerard y cols. 2006 SmartPreP	n=12 perros con defectos en la mandíbula -Dcho: hueso autólogo + PRP - Izqdo: hueso autólogo	Análisis histomorfométrico y de radiografías digitalizadas al mes, 2, 3 y 6 meses.	Favorece la regeneración inicial, pero a los 2 meses ya no hay diferencias.
Klongnoi y cols. (2006a) Sistema Curasan	n=16 cerdos Elevación de senos y colocación implantes +: - Hueso autólogo con y sin PRP - Fluorhidroxiapatita con y sin PRP	Análisis del contacto hueso implante a través de microrradiografías y examen histológico al mes, 2, 8 y 12 meses.	No se encuentran diferencias estadísticamente significativas en ningún grupo.
Klongnoi y cols. (2006b) Sistema Curasan	n=24 cerdos Elevación de senos y colocación implantes +: - Hueso autólogo con y sin PRP - Biogran® con y sin PRP	Análisis del contacto hueso implante a través de microrradiografías y examen histológico al mes, 2, 8 y 12 meses.	Donde se colocó Biogran® hubo más tejido conectivo y macrófagos con una peor regeneración. El PRP no aportó ningún beneficio a ningún grupo.
Miranda y cols. (2006)	n=16 conejos - injerto en cráneo -injerto + partículas de hueso - injerto + PRP	Análisis histológico y morfométrico a los 7, 15, 30 y 60 días.	No aportó ningún beneficio el PRP

Plachokova y cols. (2006) PCCS	n=38 ratas Defectos craneales - HA/ β -TCP - HA/ β -TCP + PRP líquido - HA/ β -TCP + PRP gel - Control	Análisis histológico, histomorfométrico y con micro-TC	El PRP no mejoró la formación ósea ni líquido ni en gel.
Zhu y cols. (2006)	n= 5 ratas Se inyectó en el espacio subcutáneo dorsal bilateralmente - PRP/BMP-2/cél. Madre -Adhesivo fibrina/BMP-2/cél. madre	Análisis histológico e histomorfométrico	Las características osteogénicas del adhesivo de fibrina son superiores al PRP.
Tözüm y cols. (2006) Curasan	Un incisivo inferior con problemas periodontales se extrajo y se reimplantó con PRP	18 meses, exploración clínica y radiológica	Se forma hueso apical y desaparece la movilidad
Thorwarth y cols. (2006)	n=24 cerdos, 6 defectos a) hueso autógeno b) hueso + PRP (curasan) c) hueso + PRP (PCCS) d) Bio-Oss e) Bio-Oss+ PRP (curasan) f) Bio-Oss+ PRP (PCCS)	Análisis microrradiográfico y fluorescencia al microscopio a las 2, 4 12 y 26 semanas	Hay mayor formación ósea con PRP (PCCS) y hueso sólo a las 2 semanas. No hay beneficios a largo plazo. Con Bio-Oss no mejora la mineralización demostrando su falta de capacidad osteoinductiva.

Tabla IX. Resumen de los estudios clínicos publicados con respecto al uso del plasma rico en plaquetas

3.7 EFECTOS SECUNDARIOS DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO

No se han publicado referencias ni sobre el riesgo de infección ni de transmisión de enfermedades, aunque se les ha intentado relacionar con el proceso de carcinogénesis (Martínez y cols. 2002). Marx (2004), dice que como los preparados son autógenos y por tanto, seguros, no pueden transmitir enfermedades como el VIH o la hepatitis.

La formación de tumores humanos es muy compleja y requiere la acumulación de múltiples alteraciones moleculares oncogénicas que superen los controles fisiológicos de proliferación celular. Actualmente se reconoce la teoría epigenética de la carcinogénesis, por la cual se establece una primera fase de **iniciación**, que incluye las alteraciones que se producen a nivel del ADN que son irreversibles, seguida de la **promoción**, que aumenta la probabilidad de que aparezcan nuevas alteraciones genéticas celulares y la **progresión**.

Los concentrados terapéuticos 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. Al aumentar las divisiones de las células mutadas, aumenta el riesgo de que aparezcan nuevas alteraciones moleculares que inducirían a la transformación maligna. Algo parecido podría suceder con las células normales que sólo son capaces de proliferar un número determinado de veces. Se ha calculado que un fibroblasto de una persona de edad media se puede dividir de 20 a 40 veces y los mecanismos de control celular hacen que la célula no sobrepase este límite. Si las células adquieren la capacidad de proliferar un número ilimitado de

veces pueden llegar a transformarse en células malignas. Sin embargo, este fenómeno podría necesitar de dosis más continuadas en el tiempo que las que se aplican en la terapéutica del PRP, ya que los factores de crecimiento extracelulares se degradan en 7-10 días (Martínez y cols. 2002).

Los factores de crecimiento no actuarán en la fase de iniciación ya que su acción se realiza sobre las membranas celulares y no sobre el núcleo. Los GFs secretados se unirán a la superficie externa de las membranas celulares a través de unos receptores transmembrana que inducirán la activación de una señal proteica interna y que producirá la expresión de una secuencia genética normal, como puede ser la proliferación celular. Los factores de crecimiento del PRP, como ya hemos dicho, nunca entran en el núcleo, por lo que no son mutagénicos, tan solo actúan sobre la reparación normal, haciéndola más rápida. Por todo esto, el PRP no puede formar tumores y además no hay ningún caso descrito que afirme lo contrario (Marx 2004).

Marx pone como ejemplo los osteosarcomas que producen BMP, pero desde su descubrimiento en 1965 no se han descubierto osteosarcomas en animales ni humanos producidos por ellos. Dice que el cáncer produce factores de crecimiento pero que éstos no pueden producir cáncer, y que sugerir que un coágulo de PRP es cancerígeno, es como sugerir que un coágulo de sangre normal también lo es. Además, su vida media es tan corta, que no es posible que induzcan un episodio oncológico.

Hollinger y Wong (1996), han estudiado las aplicaciones clínicas de las BMPs (factor que no ha sido encontrado en el PRP) y afirman que hasta hoy, no existen evidencias en estudios clínicos o experimentales acerca de que su aplicación exógena produzca una respuesta oncogénica, pero dicen que no puede predecir los resultados a largo plazo.

Schmidmaier y cols. (2004) estudian efecto a largo plazo que pueden tener los factores de crecimiento aplicados localmente, ya que se ha visto que altas dosis de TGF- β 1 pueden estar asociadas con inflamaciones que no se resuelven. Para ello aplican IGF-I Y TGF- β 1 en un sistema de reparto bien establecido sobre fracturas en la tibia de 191 ratas. Observan una estimulación inicial de la reparación de la fractura comparado con el control los días 28 y 42, pero a los 84 días después de la fractura, no ven diferencias medibles en el test biomecánico ni en el callo entre los dos grupos. Si se hubiera estimulado mucho tiempo el hueso, éste tendría una estructura anormal, y el que el callo al final sea normal, nos indica que es seguro. Concluyen diciendo que los factores de crecimiento aplicados localmente mejoran la cicatrización ósea en una fase inicial sin alterar el proceso normal de reparación. Lucarelli y cols. (2003), en un estudio *in vitro* también observan que una vez se elimina el PRP el crecimiento celular vuelve a ser normal.

Todos los agentes cancerígenos tienen un elemento común, necesitan de una acción continuada y prolongada en el tiempo sobre la célula diana para ejercer su acción patógena. Con las técnicas del PRP y PRF, menos del 4% de los PDGF están presentes a los 4 días de la intervención y el 0% a los 14 días, por lo que si a esto se añade su acción estrictamente local podemos descartar cualquier riesgo de inducir un tumor con estos aportes puntuales de PDGF. Los factores de crecimiento sólo tienen actividad local y no se encuentran en forma libre en la sangre y una vez liberados su vida media no excede de 4,2 horas. Su utilización no implica ningún riesgo oncogénico cuando se hace de manera puntual en el tiempo y localizada (Ballester y cols. 2004).

Por todo esto, no existen evidencias científicas que relacionen la aplicación terapéutica de PRP o GFs recombinantes con la transformación carcinomatosa de

tejidos normales o displásicos y no se ha encontrado ningún efecto indeseable en los numerosos casos clínicos publicados, pero Martínez y cols. (2002), recomiendan como precaución, no usar el plasma rico en plaquetas en pacientes con lesiones precancerosas orales.

4. MATERIAL Y MÉTODO

El presente trabajo se ha basado en el estudio de la regeneración ósea mandibular tras la exodoncia de una pieza dentaria, comparando (de forma individual en cada caso) el proceso fisiológico habitual, con el modificado por la adición de un preparado plasmático rico en plaquetas.

Los resultados del proceso comparativo se obtienen a partir de exploraciones radiográficas.

Para ello se ha dispuesto de una muestra clínica que describimos a continuación.

4.1 MUESTRA CLÍNICA

Obtenida de pacientes portadores de cordales incluidos mandibulares, con indicación de exodoncia quirúrgica.

a) Requisitos de la muestra

Pacientes con inclusión total de ambas muelas del juicio (cordales) mandibulares, anatómicamente simétricos en forma, tamaño y posición. (Entendemos por “inclusión total”, tanto la inclusión ósea como la submucosa. Se excluye, por tanto, la semiinclusión).

De este grupo son causa de exclusión:

- Pacientes con antecedentes patológicos que puedan interferir en el
- fisiologismo de la reparación ósea (reumatismos, afecciones de colágeno, etc...).
- Pacientes con alteraciones hematológicas y de coagulación.

- Pacientes con antecedentes de carcinogénesis en el área bucal.
- Pacientes sometidos con anterioridad a terapéuticas antimicóticos, inmunosupresoras o ionizantes.

b) Tamaño de la muestra

Inicialmente fueron seleccionados 54 pacientes que reunían los requisitos enunciados; posteriormente, 12 de ellos tuvieron que ser descartados por falta de idoneidad de los estudios radiográficos. En conclusión, la muestra final ha sido de 42 pacientes.

c) Obtención de la muestra

Los pacientes que la integran han sido seleccionados en el Servicio de Cirugía Maxilofacial del Hospital Clínico Universitario de Valencia, durante el período de abril de 2003 a abril de 2006. Todos ellos fueron debidamente informados del procedimiento y firmaron el consentimiento pertinente.

A efecto de selección de la muestra, se realizó la historia clínica habitual en el referido Servicio de Cirugía Maxilofacial con referencia expresa de los antecedentes patológicos enunciados y, a nivel específico, de la posición de los cordales, según la clasificación de Winter.

A la historia clínica se adjuntaron el estudio preoperatorio estándar, con mención expresa del número de plaquetas/mm³ obtenido en la analítica y un estudio radiográfico consistente en una ortopantomografía (Fig. 7). (Orthopantomograph 10-S, Siemens).

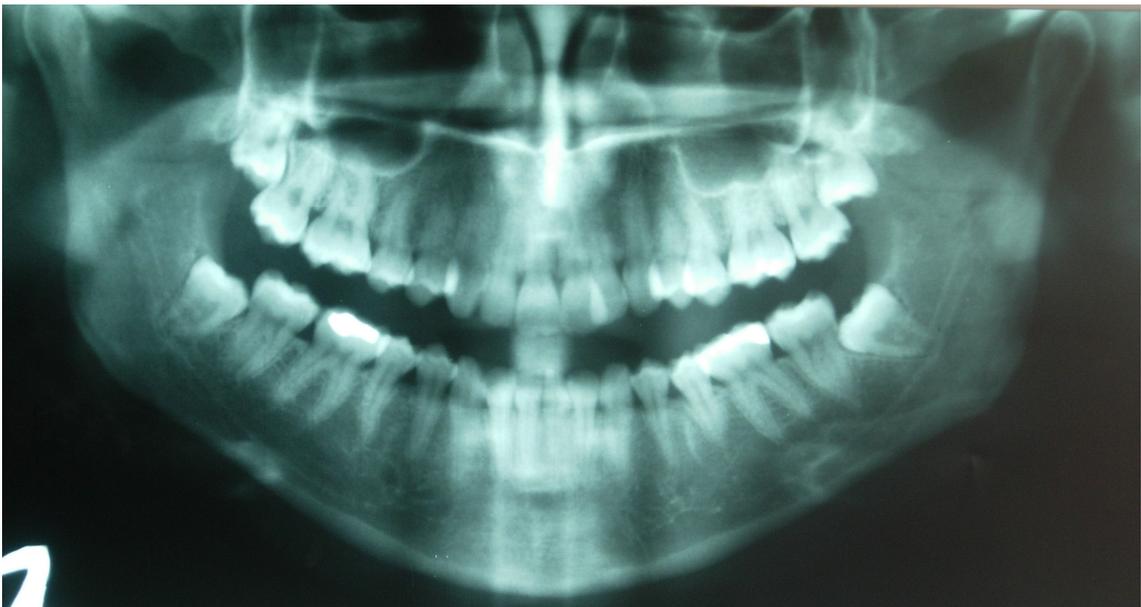
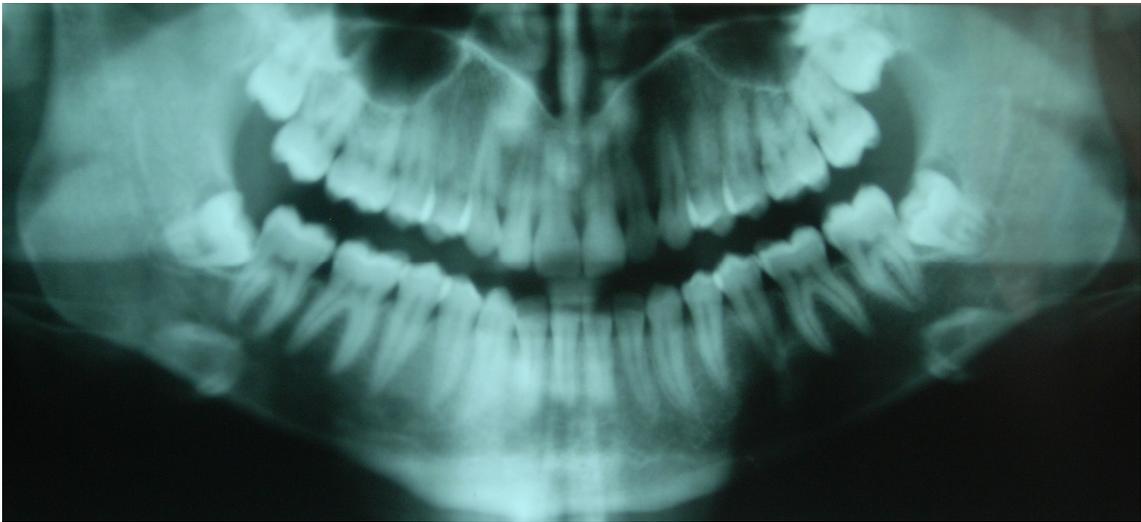
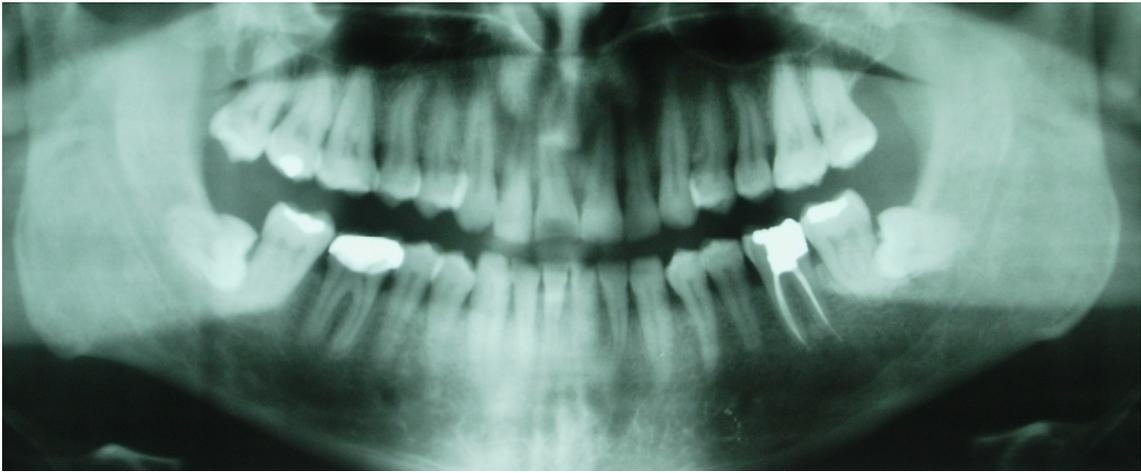


Figura 7. Ortopantomografías de la muestra.

d) Características generales de la muestra

Del total de 42 pacientes:

- Sexo: 18 sexo masculino y 24 sexo femenino
- Edad media: 29 años. Rango de 18-55 años
- Fumadores (+ de 20 cigarrillos día): 26%
- Cifra media de recuento plaquetario inicial: 220.000/mm³. Rango 143.000-319.000.
- Posición cordal: 52% mesioangular

4.2 METODOLOGÍA

4.2.1 Protocolo de actuación

- a) Cada uno de los pacientes de la muestra es operado con anestesia general, en un mismo tiempo quirúrgico, y por el mismo cirujano para ambos cordales. (En el total de la muestra han intervenido 4 cirujanos).
- b) Durante el tiempo quirúrgico se extrae sangre al paciente y se procede a la obtención del coágulo de plasma rico en plaquetas. (Ver protocolo de obtención del coágulo).
- c) Dicho coágulo es colocado, aleatoriamente, en uno de los alvéolos post-exodoncia (Fig.8 y 9).



Fig. 8 Colocación del PRGF coagulado en uno de los alvéolos remanentes tras la extracción del cordal.

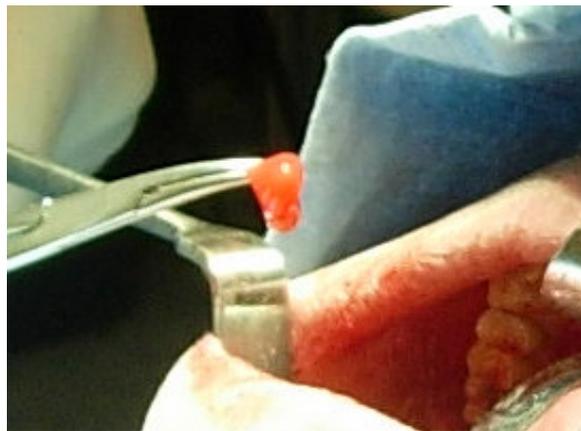


Fig. 9 Detalle de la fotografía anterior. Podemos apreciar la consistencia del coágulo de PRGF y su color rojizo, ya que posee glóbulos rojos.

- d) Se practica un control radiográfico postoperatorio (ortopantomografía) a los 30 días (con un margen de ± 3 días) con el mismo aparato y mismas características de la exposición radiográfica diagnóstica.
- e) Se realiza el estudio comparativo de imagen entre el lado con coágulo de plasma rico en plaquetas y el lado no influenciado.

La técnica radiográfica constituye el método tradicional para evaluar la destrucción o la regeneración de hueso (Villarreal-Renedo y cols. 1998) y, aunque no podemos comparar densidades en el tiempo porque dependemos de radiografías distintas, sí podemos comparar dos zonas de la misma placa (nuestro caso: la zona control y la zona de estudio).

El que se encuentren las dos zonas de estudio en una misma radiografía, elimina variables que pudieran interferir en los resultados, a saber: todos los derivados de la propia técnica radiográfica.

De cada paciente tenemos pues dos ortopantomografías: la inicial y la realizada aproximadamente al mes. Estas imágenes van a ser estudiadas mediante dos procedimientos:

1. **Método subjetivo personal:** tres especialistas en Radiología observan las radiografías en un mismo negatoscopio e informan sobre posibles diferencias en la densidad radiográfica de ambos lados operados. Los especialistas desconocen los objetivos y la metodología del estudio.
2. **Sistema de análisis de imagen informatizado:** permite detectar de forma objetiva y cuantitativa cambios mínimos en el contenido mineral de hueso (Villarreal-Renedo y cols. 1998, Oyama y cols. 2004).

Se digitalizan las radiografías, se delimitan las lesiones con un trazador morfométrico de áreas, y con el programa Image J 1.36b (National Institutes of Health, USA) se obtiene un tono de gris para cada uno de los lados de estudio. La escala de grises va desde un valor 0 (negro) al 256 (blanco).

Para apreciar el rango que puede indicar diferencias significativas, analizamos los alvéolos residuales de cirugía de cordales incluidos a 10 pacientes a los que no se les aplicó PRP.

4.2.2 Protocolo de obtención del coágulo rico en plaquetas

El protocolo escogido para la obtención del PRP es el propuesto por el Dr. Anitua (1999). Es un método fácil de reproducir tanto en la clínica dental como en un centro hospitalario; no conlleva un coste elevado y el tiempo del procedimiento es predecible (alrededor de 15 minutos).

El material e instrumental necesario para la obtención del coágulo es el siguiente (Fig. 10):

- Tubos estériles con citrato sódico al 3,8% como anticoagulante, tipo Vacutainer®, que son autoaspirantes por vacío interno.
- Micropipeta y puntas estériles
- Tubos de ensayo estériles
- Gradilla para tubos
- Centrifugadora
- Cloruro cálcico al 10%
- Pinzas

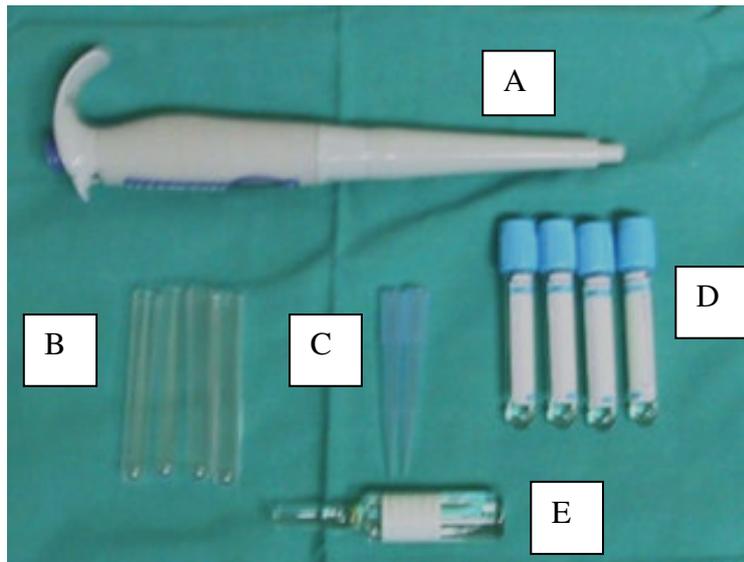


Figura 10. Material necesario para la realización del plasma rico en plaquetas. A: micropipeta, B: tubos de ensayo, C: puntas estériles, D: tubos con citrato sódico, E: cloruro cálcico al 10%.

Mediante 4 tubos Vacutainer® de 5 cc con citrato sódico al 3,8%, se extrae al paciente un total de 20 cc de sangre (Fig.11).

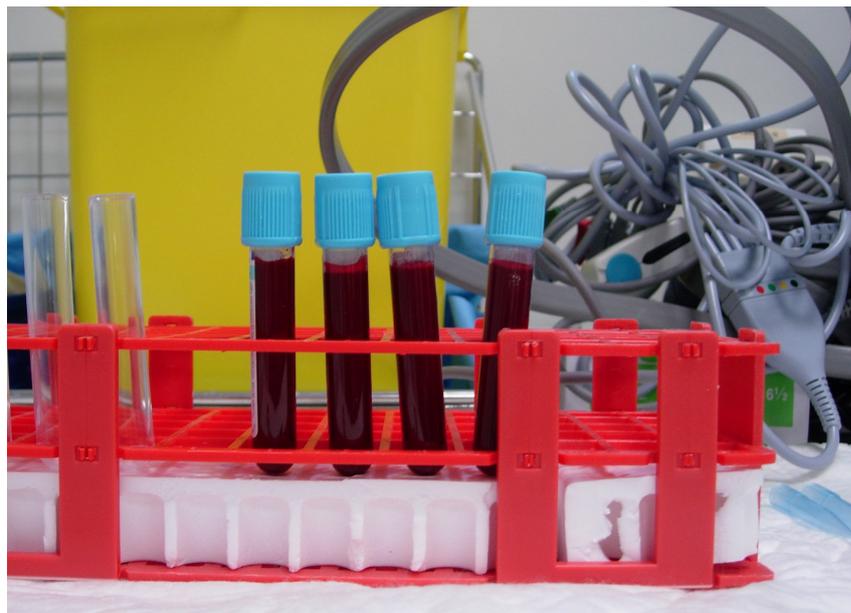


Figura 11. Tubos con la sangre del paciente y citrato sódico al 3,8%

Se colocan los tubos, desprovistos del tapón de vacío, en la centrifugadora, en posición simétrica para que exista equilibrio rotacional. Usamos la centrifugadora Labofuge 200 (Heraeus) a 280 x g un tiempo de 7 minutos, o lo que es lo mismo a 1600 rpm 7 minutos. El procedimiento de obtención de sangre y manipulación de la centrifugación es realizado siempre por la misma persona (autora de este trabajo) (Fig. 12).



Figura 12. Centrifugadora Labofuge 200

Finalizados los 7 minutos de centrifugado, colocamos los tubos en la gradilla y, mediante micropipeteado, aspiramos el plasma que cubre el sedimento de elementos formes sanguíneos (hematíes y leucocitos); pero dicho aspirado lo realizamos de forma progresiva, en cantidades de unos 0,05 cc, que viene a ser el tercio del total de plasma de cada tubo.

Obtenemos así, tres fracciones por cada tubo:

- Los 0,05 cc más superiores serán plasma escaso en plaquetas
- Los 0,05 intermedios tendrán una concentración regular
- Los 0,05 inferiores (en contacto con los elementos formes) serán ricos en plaquetas y factores de crecimiento

El resultado de estas aspiraciones es agrupado por separado en tubos distintos, de los cuales, el que nos sirve para obtener el coágulo es el que lleva incorporadas las últimas 4 aspiraciones de 0,05 cc (Fig. 13, 14 y 15).

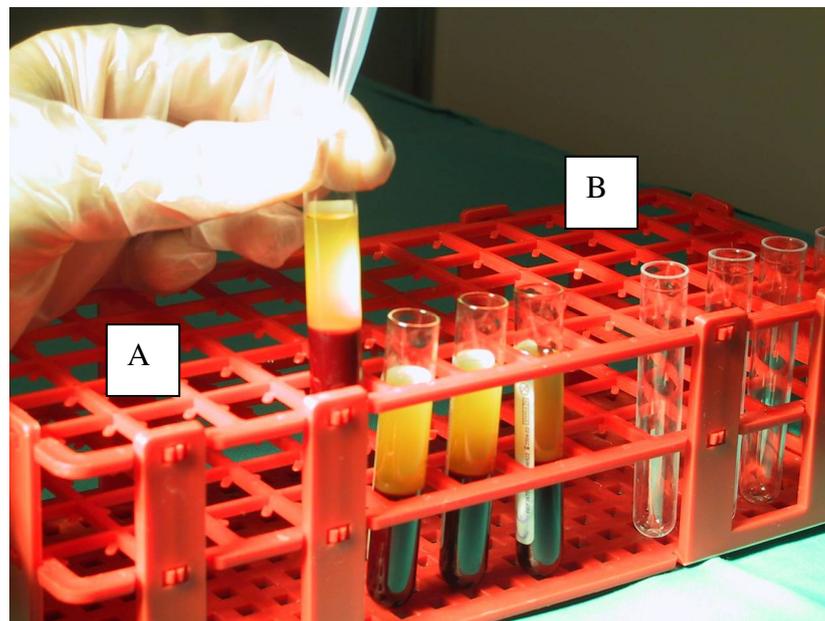


Figura 13. Pipetado de las distintas fracciones del plasma. A: tubos con la sangre centrifugada y anticoagulada y B: tubos de ensayo estériles donde se depositarán las fracciones plasmáticas.

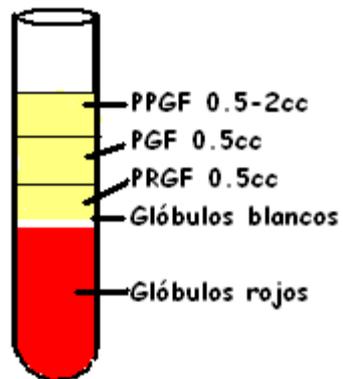


Figura 14. Esquema de la distribución de las diferentes fracciones obtenidas tras el centrifugado (PPGF: fracción de plasma más pobre en factores de crecimiento; PGF: plasma con factores de crecimiento; PRGF: fracción rica en factores de crecimiento).



Figura 15. Tubos de ensayo con las distintas fracciones plasmáticas. A: PRGF (0,5 cc), B: PGF (0,5 cc) y C: PPGF (1 cc)

A continuación provocamos la formación del coágulo añadiendo 0,05 cc de cloruro cálcico al 10% por cada cc de plasma rico en factores de crecimiento obtenido.

Conviene aclarar al respecto una circunstancia que no hemos encontrado referida en la literatura.

En efecto, no todos los cloruros cálcicos son iguales. Existen diferencias en lo referente a su hidratación, a saber: cloruro cálcico decahidratado y sextahidratado (Braun®). Con el decahidratado, la técnica se enlentece y el efecto de la coagulación puede producirse entre 30 minutos y 2 horas, o incluso no producirse.

Con el sextahidratado, el efecto se produce en sólo 15 minutos.

La explicación es la siguiente: el cloruro cálcico ejerce una atracción sobre los electrones de cada molécula de agua, y esto hace que el complejo formado por las 6 moléculas de agua (sextahidratado), tenga una densidad de carga lo bastante elevada como para participar en el proceso de coagulación. En el caso del decahidratado (cuatro moléculas de agua más que en el caso anterior), el cloruro cálcico sigue atrayendo a los electrones de las moléculas de agua de forma más repartida, con lo que la densidad de carga generada es menor, siendo en este caso insuficiente para permitir la reacción (Fig. 16 y 17).

Vale decir por tanto, y hemos podido comprobar que es un dato decisivo, que el cloruro cálcico que debemos usar es, exclusivamente, el “sextahidratado”.

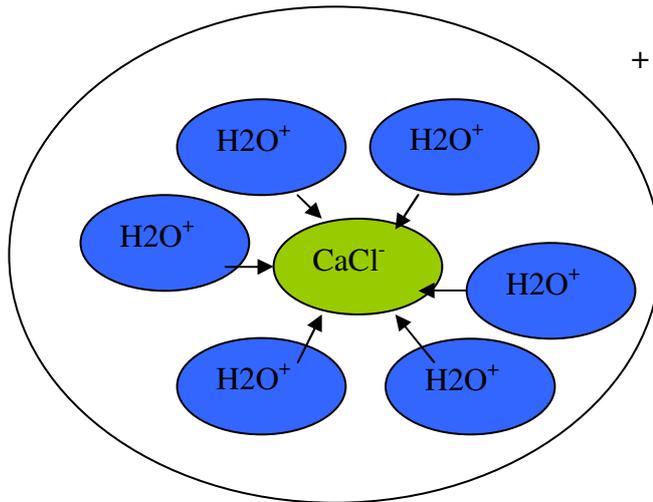


Figura 16. El complejo formado por 6 moléculas de agua y el cloruro cálcico tiene una densidad de carga lo bastante elevada como para participar en el proceso de coagulación.

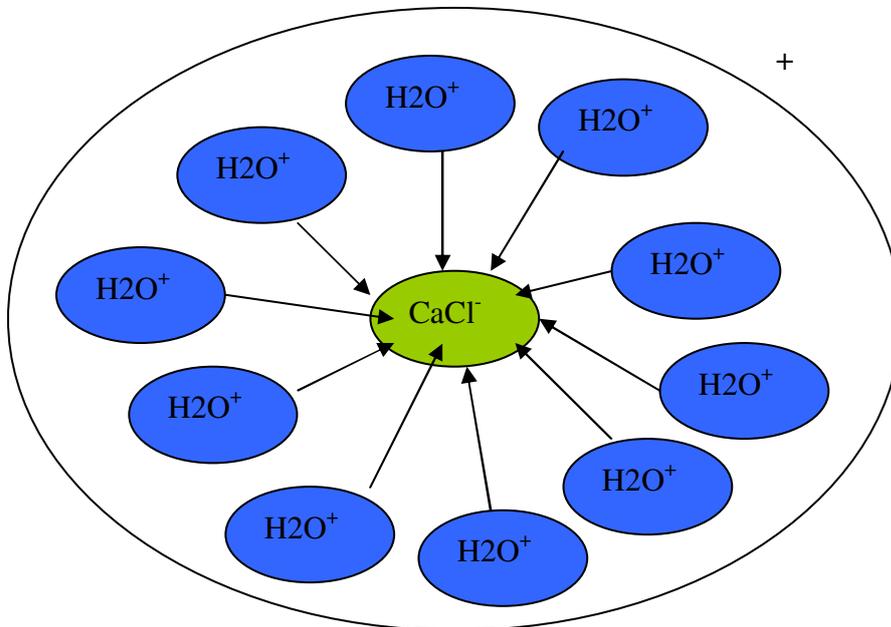


Figura 17. Con 10 moléculas de agua la densidad de carga generada es menor, no siendo suficiente para permitir que reaccione.

5. RESULTADOS

Del cómputo de datos registrados en cada paciente (Tabla X) se han obtenido los resultados del análisis radiográfico subjetivo personal y del sistema informatizado.

En esta Tabla X, las abreviaturas de cada columna corresponden al siguiente significado:

N: Número asignado al paciente

S: Sexo

E: Edad

F: Hábito tabáquico

Antecedentes patológicos: si los hay

N°Plaq/ μ l: Número de plaquetas inicial

P: Posición del cordal (Winter)

C: Cirujano (1, 2, 3, 4)

O: Odontosección (Si, corresponde a bilateral; Izado o Dcha, a unilateral)

Extracción sangre: según haya sido sencilla o compliada

Lado PRP: lado en el que se coloca el coágulo

N	S	E	F	Antecedentes patológicos	NºPlaq/µl	P	C	O	Extracción sangre	Lado PRP
1	V	25	no	antihistamínicos	188.000	A	3	si	complicada	D
2	V	18	no	-----	281.000	C	2	no	sencilla	I
3	V	18	no	-----	143.000	A	2	si	complicada	I
4	V	34	no	-----	293.000	B	3	si	sencilla	I
5	M	31	no	-----	174.000	C	1	Izqdo	sencilla	I
6	M	55	no	-----	228.000	D	4	si	sencilla	I
7	V	44	si	-----	151.000	B	4	si	sencilla	I
8	V	50	no	diabetes arritmias	233.000	B	1	si	sencilla	I
9	M	37	si	HTA	166.000	C	4	si	complicada	D
10	M	23	no	-----	188.000	A	2	si	sencilla	I
11	V	24	no	-----	263.000	A	3	Dcha	sencilla	D
12	V	32	si	migrañas	220.000	A	2	si	sencilla	D
13	V	20	no	-----	194.000	A	2	si	complicada	D
14	M	24	no	-----	224.000	C	1	si	sencilla	I
15	V	38	no	-----	288.000	B	2	si	sencilla	D
16	M	54	no	depresión	184.000	B	3	si	sencilla	D
17	M	21	no	anticonceptivos	282.000	A	2	Izqdo	sencilla	D
18	M	27	no	-----	298.000	D	1	si	sencilla	I
19	M	23	si	asma	170.000	A	2	si	sencilla	I
20	M	19	no	-----	232.000	A	3	Dcho	sencilla	D
21	M	27	no	anticonceptivos gastritis	226.000	B	3	si	sencilla	D
22	M	23	si	-----	221.000	A	2	si	sencilla	D
23	M	24	si	asma	263.000	A	3	si	sencilla	I
24	M	30	no	anticonceptivos	216.000	C	1	si	sencilla	I
25	V	38	si	hepatitis curada	319.000	A	2	si	sencilla	I
26	V	19	no	-----	157.000	B	2	si	sencilla	D
27	V	27	no	-----	172.000	C	1	si	sencilla	D
28	M	23	no	-----	209.000	A	1	si	sencilla	I
29	M	26	no	Anemia	179.000	B	1	si	sencilla	I
30	M	22	si	anorexia bulimia VHB curado	215.000	A	1	si	sencilla	I
31	V	21	no	-----	198.000	A	4	no	sencilla	I
32	M	18	no	-----	227.000	A	3	no	sencilla	I
33	M	20	no	-----	205.000	B	3	si	sencilla	D
34	V	21	no	-----	190.000	A	2	Izqdo	complicada	I
35	V	34	no	-----	275.000	B	1 1	si	sencilla	D
36	M	22	no	-----	236.000	A	4	no	sencilla	I
37	V	22	si	-----	255.000	A	1	si	sencilla	I
38	M	41	no	-----	166.000	C	2	si	sencilla	I
39	V	20	no	Enf Gilbert	228.000	A	1	si	complicada	D
40	M	38	no	rinitis alérgica	221.000	B	4	si	sencilla	I
41	M	21	si	-----	252.000	A	2	Izqdo	sencilla	D
42	M	51	si	-----	237.000	A	1	si	sencilla	D

Tabla X

5.1 RESULTADOS DEL ANÁLISIS RADIOGRÁFICO

SUBJETIVO PERSONAL

La Tabla XI reúne estos resultados.

La leyenda de la columna de cada uno de los tres observadores significa:

- NO DIF: no se aprecian diferencias significativas entre ambos lados
- D: se encuentra mayor densidad radiográfica en el lado derecho
- I: se encuentra mayor densidad radiográfica en el lado izquierdo
- La cuarta columna (Realidad): indica el lado donde se colocó el coágulo (D: derecho, I: izquierdo)

	1° observador	2° observador	3° observador	Realidad
1	D	D	NO DIF	D
2	NO DIF	NO DIF	NO DIF	I
3	NO DIF	NO DIF	NO DIF	I
4	D	D	D	I
5	D	D	NO DIF	I
6	D	D	D	I
7	NO DIF	NO DIF	NO DIF	I
8	D	I	NO DIF	I
9	NO DIF	NO DIF	NO DIF	D
10	NO DIF	NO DIF	NO DIF	I
11	D	D	D	D
12	I	I	I	D
13	D	D	D	D
14	NO DIF	NO DIF	NO DIF	I
15	I	I	I	D
16	D	D	D	D
17	D	D	I	I
18	NO DIF	NO DIF	NO DIF	I
19	NO DIF	NO DIF	NO DIF	I
20	NO DIF	D	I	D
21	NO DIF	NO DIF	I	D
22	I	I	I	D
23	NO DIF	NO DIF	NO DIF	I
24	NO DIF	NO DIF	NO DIF	I
25	NO DIF	NO DIF	D	I
26	NO DIF	NO DIF	NO DIF	D

27	D	D	D	D
28	NO DIF	NO DIF	NO DIF	I
29	NO DIF	I	I	I
30	NO DIF	NO DIF	NO DIF	I
31	I	I	I	I
32	I	I	I	I
33	D	D	D	I
34	NO DIF	NO DIF	NO DIF	I
35	NO DIF	NO DIF	I	D
36	NO DIF	D	I	I
37	D	D	D	I
38	NO DIF	NO DIF	NO DIF	I
39	NO DIF	NO DIF	NO DIF	D
40	NO DIF	NO DIF	I	I
41	D	NO DIF	I	D
42	NO DIF	NO DIF	NO DIF	D

Tabla XI

Esta metodología es cuestionable por su carácter subjetivo.

Se ha utilizado el **Índice de Corcondancia de Kappa** para cuantificar el grado de acuerdo subjetivo y la realidad. Este índice es una medida que oscila entre la concordancia absoluta y la concordancia esperada por el puro azar. Su valor máximo es 1 (concordancia absoluta). Estudia los siguientes aspectos:

- a) **Grado de concordancia entre observadores:** la Tabla XII muestra los índices de Kappa obtenidos en la comparación de las evaluaciones de los 3 observadores (A, B y C). Como vemos los valores oscilan entre 0,5 (concordancia media) y 0,8 (concordancia aceptable). En concreto, el observador denominado “C” se diferencia en sus valoraciones de los observadores “A” y “B”. Conclusión: la concordancia entre observadores es aceptable.

	A	B	C
A	----	0.797	0.543
B	0.797	----	0.586
C	0.543	0.586	-----

Tabla XII. Índices kappa obtenidos en la comparación de las evaluaciones de los tres observadores

- b) **Análisis de la moda:** Para cada pieza analizada se determina el máximo número de observadores que coinciden en la evaluación (por ejemplo, si dos especialistas anotan derecha y uno izquierda, este valor será derecha).

Los resultados son:

- En 4 casos cada observador da una opción diferente (9,5%)
- En 8 casos sólo dos observadores coinciden en su valoración (19%)
- En los restantes 30 casos los tres observadores coinciden (71,5%)

Ello es indicativo de que hay un grado de concordancia al menos aceptable.

- c) **Grado de concordancia entre la evaluación de la moda y la real:** Aunque el grado de reproductibilidad no es pleno, podemos analizar la efectividad de la aplicación del PRP en la regeneración ósea, considerando sólo los 30 casos en los que los tres especialistas observaron lo mismo. Según esto: en 17 ocasiones (56,7%) han indicado que no observan diferencias, en 5 ocasiones consideran que

va más adelantado en la regeneración el lado izquierdo (16,7%) y en 8 ocasiones el derecho (26,7%).

La distribución de la moda respecto de la realidad muestra que en la mayoría de los casos en que se aplicó el PRP en el lado izquierdo, los especialistas coinciden en no detectar diferencias (72%), mientras que en los casos en que se aplicó a la derecha los observadores citaron cualquiera de las tres opciones con similar probabilidad, aunque mayoritariamente la derecha (42%).

Finalmente, sólo en 7 de los 30 casos, los especialistas vieron una mejoría mayor en el mismo lado que se aplicó el tratamiento.

En resumen: se evidencia un grado de concordancia adecuado entre los observadores, pero es sólo aceptable. Además, considerando sólo los casos en los que los tres especialistas coinciden, vemos como sus observaciones son independientes de la posición donde se aplicó el plasma rico en plaquetas, dándose sólo la coincidencia en 7 casos de los 30 considerados.

Por tanto, el análisis radiográfico subjetivo personal no demuestra diferencias en la regeneración ósea a favor del lado donde se colocó el PRP en comparación con el lado testigo.

5.2 RESULTADOS DEL ANÁLISIS RADIOGRÁFICO MEDIANTE SISTEMA INFORMATIZADO

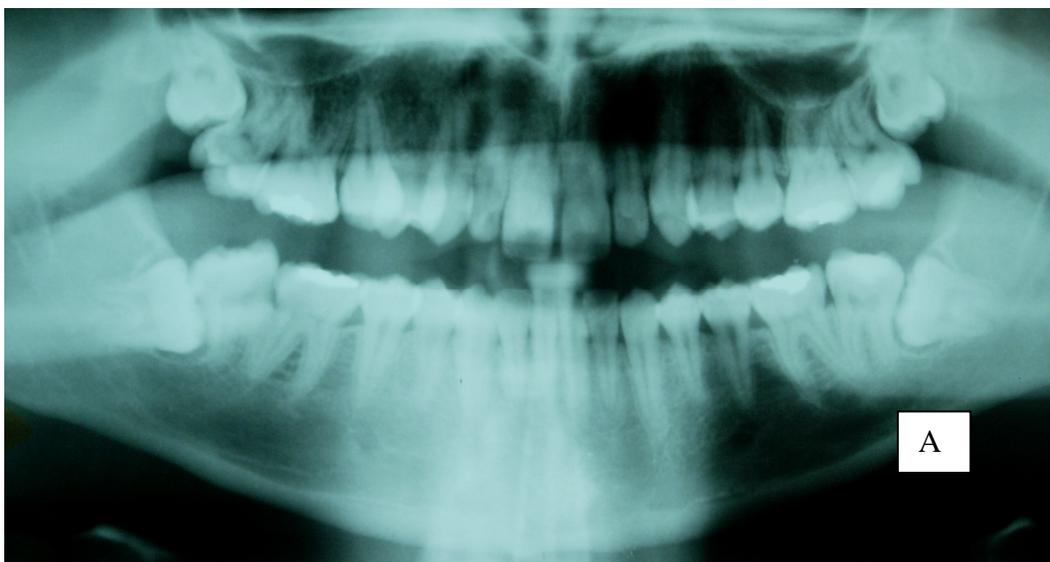
Tras digitalizar las radiografías, delimitamos los alvéolos con el programa Image J 1.36b (Nacional Institutes of Health, USA).

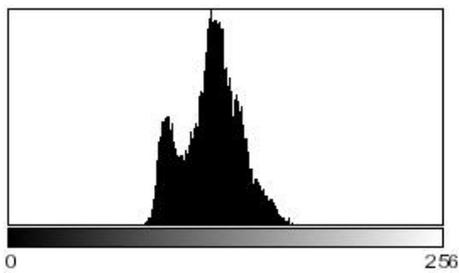
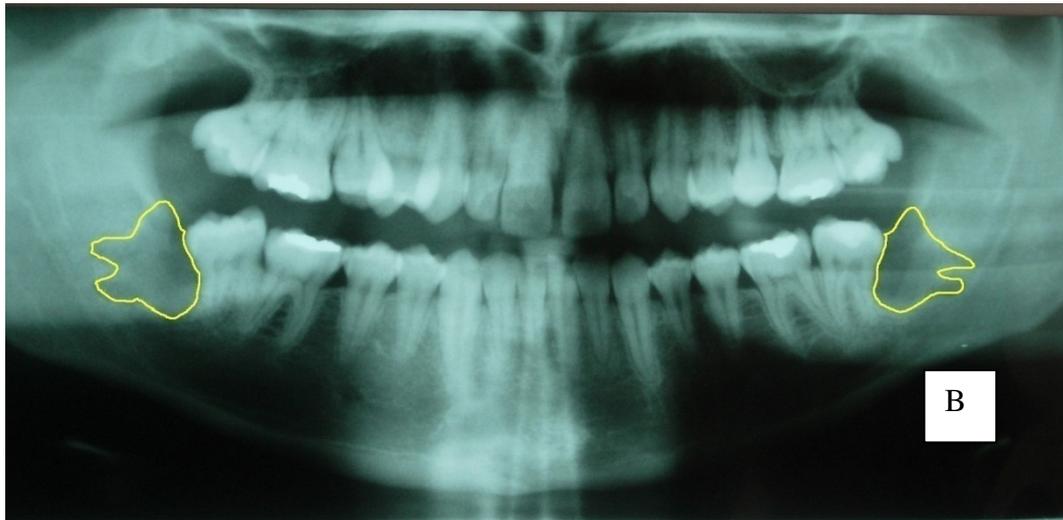
De esta área seleccionada obtenemos un color de gris de media para cada uno de los lados donde se aplicó el PRP y la moda o color que más se repite.

La escala de grises va desde 0 que es el negro al 256 que es el blanco (Tabla XIII).

Para saber a partir de cuantos puntos existe realmente una diferencia en la regeneración, analizamos los alvéolos de 10 pacientes con extracción simultánea de ambos cordales incluidos, sin colocar PRP, analizando la diferencia entre los grises de ambos lados en cada paciente. Obtuvimos un valor a partir del cual sí podíamos obtener diferencias significativas en los pacientes de nuestro estudio.

La Figura 18 reproduce la secuencia de análisis de las radiografías.

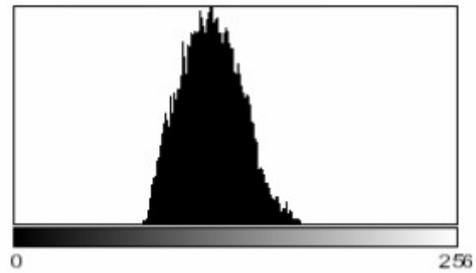




Count: 25270 Min: 79
 Mean: 118.939 Max: 169
 StdDev: 17.142 Mode: 119 (729)

Histograma lado derecho

C

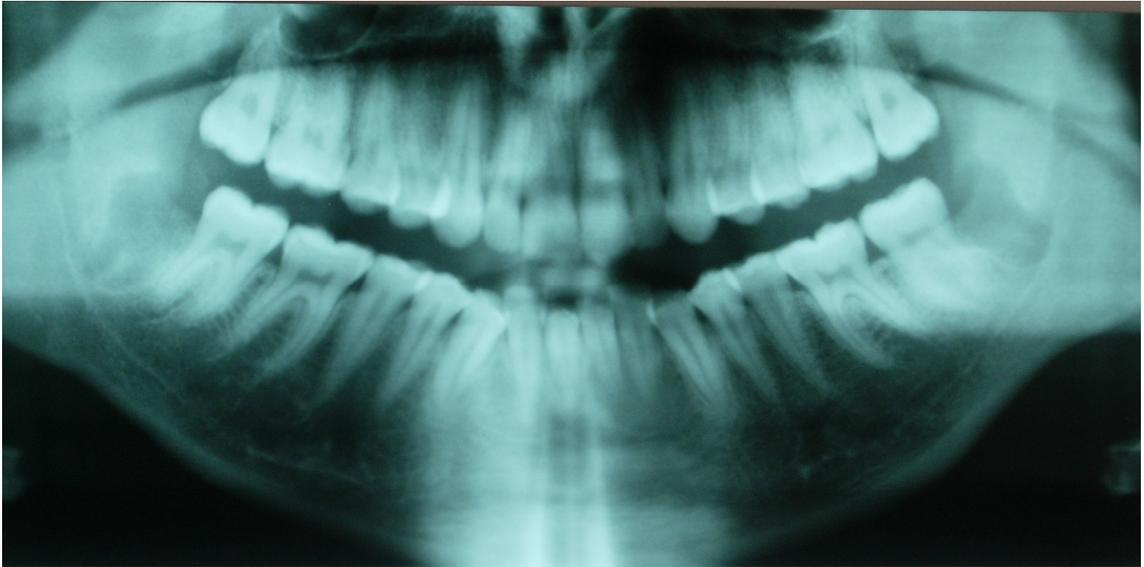


Count: 17159 Min: 69
 Mean: 113.509 Max: 167
 StdDev: 17.524 Mode: 114 (374)

Histograma lado izquierdo

Figura 18. Secuencia de análisis por ordenador de las ortopantomografías. A: radiografía inicial en la que nos basamos a la hora de contornear el alvéolo. B: radiografía del mes (los alvéolos se encuentran delimitados). C: histogramas de ambos lados con su gris de media.

Otros ejemplos de las radiografías obtenidas aproximadamente al mes las podemos ver en la Figura 19.



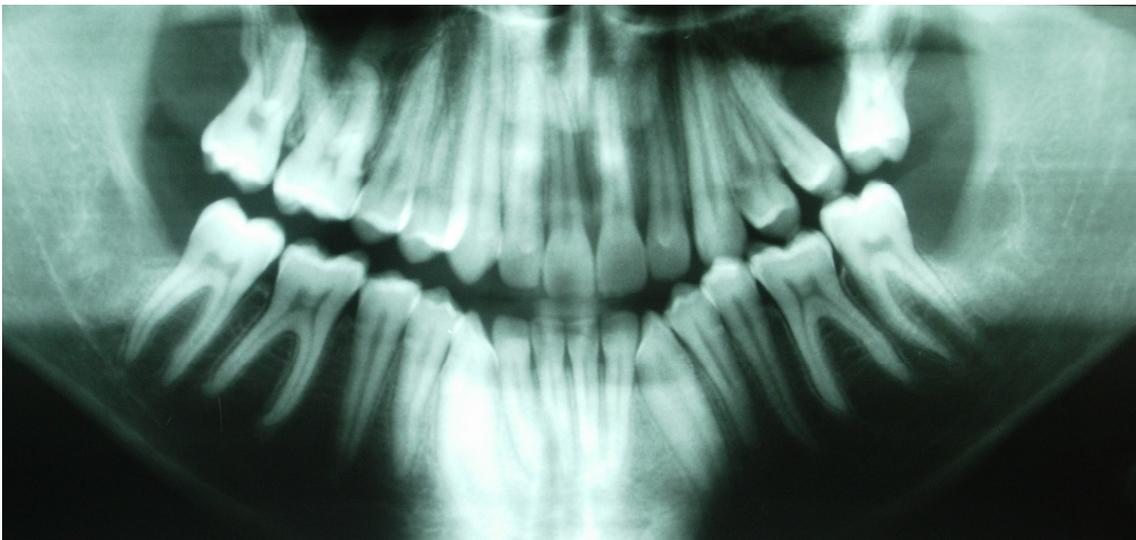


Figura 19. Ortopantomografías realizadas al mes que se utilizaron para valorar la regeneración en los alvéolos post-extracción de los cordales mandibulares.

En la Tabla XIII podemos ver el color de gris de media obtenido para cada uno de los lados donde se aplicó el PRP y la moda o color que más se repite.

Muestra	Lado	Media	Desviación estándar	Moda
1	D	159.251 (109-208)	14.170	155
	I	148.709 (98-207)	20.917	149
2	D	158.501 (78-209)	18.065	154
	I	153.673 (53-212)	26.518	166
3	D	108.350 (34-185)	26.714	85
	I	97.122 (52-170)	18.830	86
4	D	153.491 (85-187)	12.607	157
	I	99.809 (43-175)	24.696	86
5	D	137.408 (92-199)	20.635	149
	I	123.923 (52-207)	26.669	142
6	D	170.905 (86-228)	34.803	189
	I	147.885 (58-223)	41.218	182
7	D	121.943 (80-174)	20.596	106
	I	134.467 (73-188)	20.194	127
8	D	179.502 (134-209)	13.008	170
	I	179.043 (150-211)	14.269	163
9	D	152.501 (102-200)	17.840	147
	I	154.036 (101-193)	16.849	170
10	D	149.238 (88-206)	25.997	159
	I	137.921 (83-192)	22.935	150
11	D	183.256 (114-223)	19.896	178
	I	166.492 (109-211)	17.468	169
12	D	142.182 (112-162)	6.342	143
	I	142.577 (112-165)	6.640	144
13	D	123.636 (54-185)	30.687	118
	I	107.598 (35-170)	23.840	112
14	D	116.767 (58-186)	19.294	116
	I	108.314 (43-183)	20.976	113
15	D	58.530 (22-119)	15.864	54
	I	75.497 (36-135)	18.269	72
16	D	146.991 (95-181)	15.026	157
	I	154.425 (114-187)	11.810	151
17	D	127.726 (59-201)	34.041	166
	I	158.157 (117-199)	12.487	166
18	D	219.490 (200-238)	5.688	217
	I	197.777 (133-232)	21.644	212
19	D	180.488(148-203)	9405	181
	I	168.599 (132-193)	10.469	167
20	D	199.474 (168-227)	12.012	207
	I	198.077 (163-223)	11.429	205
21	D	185.446 (150-213)	10.397	179
	I	179.444 (148-213)	8.446	176
22	D	156.240 (111-184)	12.515	159
	I	172.243 (139-189)	6.683	171
23	D	167.758 (159-204)	12.223	173

	I	163.125 (133-196)	9.956	160
24	D	209.297 (165-230)	9.585	213
	I	209.046 (172-226)	9.973	213
25	D	152.929 (38-198)	26.717	169
	I	141.424 (101-195)	19.963	120
26	D	118.939 (79-169)	17.142	119
	I	113.509 (69-167)	17.524	114
27	D	167.364 (112-199)	17.357	165
	I	158.397 (124-184)	11.908	165
28	D	168.012 (125-196)	10.818	170
	I	153.577 (109-188)	12.099	156
29	D	177.649 (147-194)	6.686	177
	I	142.846 (105-180)	9.624	145
30	D	140.923 (76-179)	17.537	152
	I	128.004 (84-169)	14.025	129
31	D	103.434 (69-138)	10.731	104
	I	100.409 (54-134)	15.219	110
32	D	146.173 (87-183)	16.484	163
	I	166.920 (123-189)	12.272	174
33	D	149.074 (86-194)	19.131	159
	I	125.240 (77-171)	15.319	131
34	D	11.078 (41-207)	39.932	80
	I	102.824 (35-209)	42.182	78
35	D	53.659 (16-99)	15.837	67
	I	59.709 (24-87)	10.834	63
36	D	53.563 (22-99)	10.557	54
	I	53.985 (22-105)	11.471	49
37	D	156.684 (100-187)	12.900	159
	I	153.225 (106-192)	16.475	149
38	D	108.018 (58-179)	23.459	90
	I	99.652 (39-214)	42.826	75
39	D	146.938 (102-184)	14.554	147
	I	153.195 (101-199)	19.499	136
40	D	126.740 (86-178)	14.403	126
	I	122.943 (93-168)	14.701	122
41	D	99.457 (48-153)	16.346	85
	I	88.926 (52-140)	13.700	87
42	D	155.097 (89-188)	13.509	154
	I	154.659 (69-202)	21.978	166

Tabla XIII. Muestra los valores de gris de cada uno de los lados estudiados (0: negro-256: blanco), dentro de una misma radiografía.

Para saber a partir de qué valor hay realmente una diferencia en la tabla anterior al evaluar el tono de gris de cada uno de los lados de un mismo paciente, realizamos las mismas mediciones en 10 pacientes control a los que se extrajo simultáneamente los cordales mandibulares incluidos y a los que también se realizó al mes una ortopantomografía (Fig. 20). En ellos no se colocó plasma rico en plaquetas en ninguno de los alvéolos remanentes (Tabla XIV).

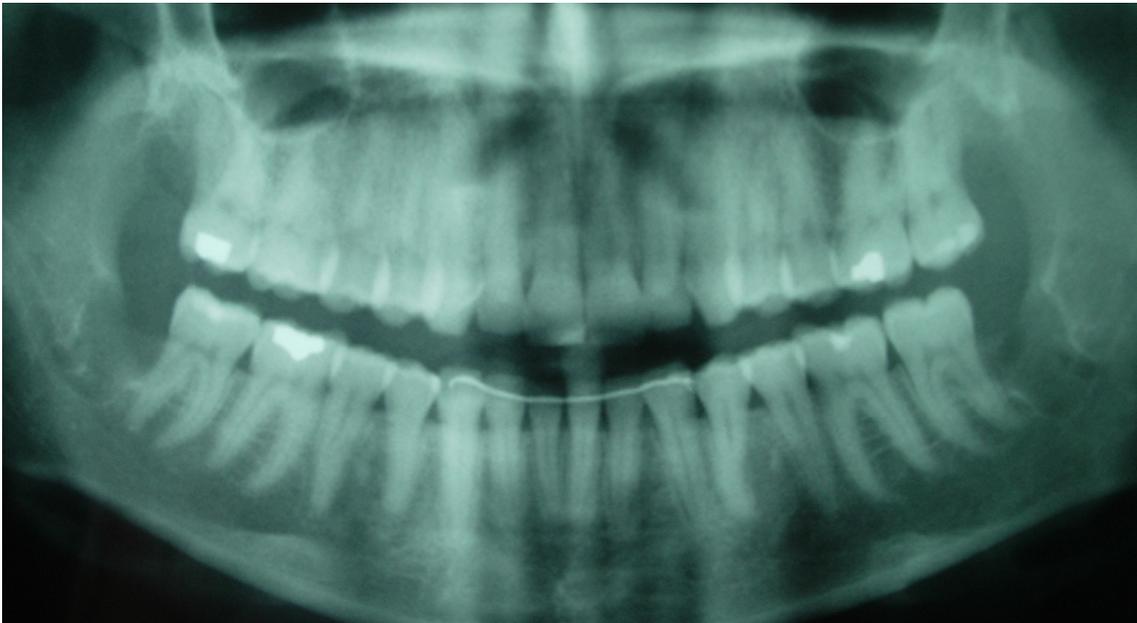


Figura 20. Ortopantomografía realizada al mes en un paciente control en el que no se colocó plasma rico en plaquetas.

Muestra	Lado	Media	Desviación estándar	Moda
1	D	120.582 (90-157)	9.028	122
	I	86.251 (52-138)	14.424	74
2	D	152.894 (142-173)	4.684	153
	I	152.129 (135-165)	4.471	151
3	D	164.285 (152-178)	4.052	164
	I	141.867 (123-167)	6.516	141
4	D	174.296 (148-201)	7.979	177
	I	155.421 (131-184)	9.125	157
5	D	171.202 (156-195)	7.546	166
	I	163.063 (150-173)	4.760	159
6	D	116.793 (77-150)	14.640	123
	I	137.778 (79-180)	23.474	150
7	D	119.840 (91-140)	7.069	123
	I	111.150 (78-139)	12.061	122
8	D	103.890 (66-143)	14.698	97
	I	126.118 (77-183)	23.625	125
9	D	140.868 (91-183)	17.674	133
	I	143.736 (91-180)	17.578	150
10	D	94.405 (58-150)	16.334	87
	I	122.382 (40-219)	52.363	79

Tabla XIV. Valores obtenidos de los 10 pacientes control a los que no se aplicó PRP.

Como hemos visto con anterioridad, la escala de grises se mide a partir de dos variables: la media y la moda. La primera es el valor medio de la escala de gris identificada en los píxeles analizados; la segunda, se refiere al valor de gris que más se repite en la zona marcada (Tabla XV).

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. Típ.
DIFERENCIA MEDIAS	10	- 34,33	27,98	-1,9160	20,73236
DIFERENCIA MODAS	10	- 48,00	28	-3,7000	23,60814

Tabla XV. Tabla que muestra que en media la diferencia entre el valor de gris estimado en el lado izquierdo y en el derecho está cercano a cero.

Podríamos esperar que en los pacientes control el valor de gris en ambos lados fuera el mismo, pero hay que recordar que no somos totalmente simétricos. Estas diferencias por tanto pueden deberse tanto a la variabilidad individual como a posibles errores en la metodología como imprecisiones en la obtención de la radiografía o fallos relacionados con el programa informático.

En concreto y para un nivel de confianza del 95% podemos estimar que la metodología de análisis no permite distinguir con seguridad entre dos zonas con una diferencia en la escala de grises de 40 puntos (para la media) y 46 (para la moda). Estos valores se obtienen de multiplicar por 1,96 (percentil 0.975 de la normal estándar) la desviación típica.

Por tanto, cualquier diferencia en la escala de grises que se obtenga entre dos zonas de una radiografía superior a 40-46 puntos puede considerarse como una diferencia en la regeneración.

Para analizar la efectividad del PRP en la regeneración ósea vamos a considerar ahora los 42 casos donde se aplicó. Sus correspondientes radiografías fueron estudiadas de igual forma que los controles mediante el mismo proceso de medición de la escala de grises tanto para el lado derecho como el izquierdo.

Sólo consideraremos que existen diferencias en la escala de grises en aquellas radiografías en las que ésta sea superior a 40 puntos para la media o 46 para la moda.

La diferencia de los valores medios de la escala de grises sólo supera los 40 puntos en dos casos (el 4 y el 34). En ambos casos el coágulo se aplicó en el lado izquierdo, sin embargo para un caso el valor medio de la escala de gris del lado derecho era superior que para el lado izquierdo (153,5 y 99,8 respectivamente), mientras que

para el otro caso el valor medio del lado derecho era inferior que para el izquierdo (11,1 y 102,8 respectivamente).

De la misma forma, la diferencia de la moda de la escala de grises sólo supera los 46 puntos en dos casos (el 4 y el 25). En ambos casos, el PRP se aplicó en el lado izquierdo sin embargo para ambos casos la moda de la escala de gris del lado derecho era superior que para la del lado izquierdo.

Estos resultados muestran dos hechos:

- O bien no existen diferencias en la regeneración entre los dos lados o si existen el método de medición por radiografía no permite detectarlas.
- En los casos donde el método identifica diferencias, el valor de la escala de gris es más alto (más blanco) allí donde no se ha aplicado el preparado plasmático.

En conclusión el análisis radiográfico mediante un sistema informatizado no demuestra diferencias en la regeneración ósea a favor del lado donde se colocó el PRP en comparación con el lado testigo.

6. DISCUSIÓN

Antes de centrarnos en la discusión del trabajo, es conveniente (a modo de resumen), realizar una discusión general del estado actual del PRP y sus contradicciones, desde los siguientes aspectos:

1. Definición y terminología de los preparados.

Según Lozada y cols. (2001) y Jensen y cols. (2005), en hematología da igual hablar de **PRP (plasma rico en plaquetas)** o **PC (concentrado de plaquetas)** para denominar al preparado obtenido tras realizar un doble centrifugado de la sangre, pero otros autores como Kim y cols. (2001) o Hoffman y cols. (1992) sí distinguen ambos términos. Hablan de PRP cuando la sangre se centrifuga una sola vez y de PC si se realiza dos veces.

Según esto, algunos de los preparados obtenidos por autores como Marx y cols. (1998) o Whitman y cols. (1997), serían en realidad concentrados plaquetarios puesto que realizan dos centrifugados y no un plasma rico en plaquetas como ellos les denominan. Marx (2001, 2004) critica duramente el término “concentrado de plaquetas”, porque para él, éste equivale a una agrupación de plaquetas sin plasma que no formarían ningún coágulo, mientras que para Appel y cols. (2002) en cambio es el término correcto.

Anitua (1999) propone otro nombre, **plasma rico en factores de crecimiento (PRGF)**, obtenido mediante un solo centrifugado. Fuerst y cols. (2003,2004a y 2004b), también hablan de PRGF pero como **platelet released growth factors**, es decir factores de crecimiento liberados de las plaquetas. Para obtenerlos realizan tres centrifugados. Primero mediante aféresis a través de dos centrifugados obtienen un concentrado

plaquetario, que luego centrifugarán de nuevo para conseguir el PRGF. Marx de nuevo critica duramente estos términos.

También encontramos en la literatura el término **gel de plaquetas**, lo que según Marx también es incorrecto ya que el PRP sólo es un coágulo con el número de plaquetas aumentado, y este coágulo tendrá una serie de actividades biológicas que un gel no posee.

Dada la confusión que nos encontramos sobre cómo denominar a estos preparados, tal vez sea más conveniente hablar en general de preparados plasmáticos ricos en plaquetas, diferenciando a su vez entre PRP y PC, ya que no podemos llamar igual a dos preparados obtenidos de forma distinta. Esto hará que mediante el nombre sepamos a cuantos centrifugados ha estado sometida la sangre. Anitua (1999) aporta el término PRGF, tal vez para diferenciar su preparado (obtenido mediante un centrifugado) del de Marx que como ya hemos referido realiza dos y lo llama PRP. Puesto que nuestra opinión sería llamarlo PC, no habría ningún problema en llamar al preparado de Anitua, PRP.

2. Formas de obtención del PRP.

Marx (2004), gran impulsador y defensor de estos preparados a nivel hospitalario, acepta métodos simplificados para obtener el PRP en la consulta, pero como condición dice que, ante todo, el proceso de centrifugado debe ser estéril y preciso en la separación de glóbulos rojos y plaquetas, para que éstas no resulten dañadas y no pierdan factores de crecimiento. Además, según Marx, hemos de tener en cuenta que con una centrifugadora de laboratorio sólo se pueden hacer diagnósticos y no se puede

obtener un PRP correcto, ya que puede dañar las plaquetas y no se obtiene cantidad suficiente de las mismas.

No todos los sistemas que hay en el mercado son iguales: ya que algunos no concentran plaquetas activas en suficiente cantidad para promover la regeneración ósea; otros hacen estudios en animales con un volumen de sangre demasiado pequeño como para producir PRP y otros usan muestras de donantes, no autólogas, por lo que según Marx el preparado homólogo que obtienen tampoco sería en realidad un plasma rico en plaquetas. Esto explicaría muchas de las críticas que se le han hecho al PRP.

El utilizar preparados homólogos, que como hemos dicho según Marx en realidad no son PRP, hace que podamos tener falsos negativos por reacciones inmunes.

Otro ejemplo de esta confusión, sería el uso de plaquetas liofilizadas de donantes. Las plaquetas homólogas no son viables y no pueden liberar factores de crecimiento activos. Además, son antigénicas ya que tienen muchas membranas celulares y podrían producirse anticuerpos antiplaquetas y a continuación reacciones secundarias. Estos preparados no se pueden comparar con el verdadero plasma rico en plaquetas (Marx 2004).

En este momento sólo hay dos sistemas admitidos por la FDA (Food and Drug Administration) para obtener PRP: el **Smart PRep** (Harvest Technologies Inc, Plymouth, MA) y el **PCCS** (Platelet Concentration Collection System; 3i Implant Innovation, Inc, West Palm Beach, FL). Marx (2004) que compara diversos protocolos usados en la actualidad, ve como el PRP obtenido por estos dos sistemas mencionados anteriormente, produce las concentraciones plaquetarias mayores y, lo más importante, liberan cantidades terapéuticas de factores de crecimiento activos. Según Marx, los estudios que indican que el PRP no aporta ningún beneficio están usando en realidad un

PRP mal obtenido, de pobre calidad. El clínico debe comprobar si en los estudios que hablan mal del PRP realmente se ha utilizado plasma rico en plaquetas.

Weibrich y cols. (2002c) también observan estas variaciones en los resultados según los protocolos utilizados y mencionan que la Organización de Certificación Europea aún no lo ha aclarado.

En la literatura vemos que hay casi tantos protocolos como autores a la hora de conseguir el preparado rico en plaquetas. Según Marx (2001) el PRP verdadero será el que se obtenga mediante un doble centrifugado como Zimmermann y cols. (2003) y Choi y cols. (2005). Un primer centrifugado más intenso para separar los glóbulos rojos del plasma y el segundo, más suave, para separar las plaquetas, los glóbulos blancos y unos pocos hematíes del plasma. Este segundo centrifugado nos proporciona el PRP y el PPP. Hacer un solo centrifugado, como Anitua, según él no sería adecuado porque los glóbulos rojos interferirían en la delicada separación de las plaquetas.

Otros autores como Sonnleitner y cols. (2000), Weibrich y cols (2001), Aghaloo y cols. (2002), Kim y cols. (2002), Yawaza y cols. (2003) u Okuda y cols. (2005), optan por realizar en primer lugar un centrifugado suave para separar el plasma de los hematíes y a continuación aumentar las “g” y en la mayoría de los casos también el tiempo, para separar las fracciones del plasma.

Por todo esto, al leer la literatura hemos de valorar si el PRP se ha obtenido por métodos adecuados y si se documentan las concentraciones de plaquetas y factores de crecimiento obtenidos ya que según el método utilizado el contenido de factores de crecimiento puede variar considerablemente. Además, con el tiempo habrá que ver si estas diferencias tienen repercusiones clínicas, ya que esto podría explicar los distintos

resultados en los estudios en humanos y animales. Como vemos los preparados plaquetarios no son productos estandarizados (Weibrich y cols. 2005).

3. Respecto al número de plaquetas.

En un principio podríamos pensar que nuestro objetivo es encontrar el método que nos proporcione el mayor número de plaquetas (Marx y Meltzer (2000) nos dicen que al menos hemos de cuatriplicarlo) pero no hemos de olvidar que lo que queremos obtener, en realidad, son factores de crecimiento.

Dugrillon y cols. (2002) estudian la obtención de factores de crecimiento relacionándola con las plaquetas. Su conclusión es que a más de 800 x g, aunque podemos obtener más plaquetas, no por ello obtendremos más factores de crecimiento, ya que las plaquetas se activarán, perdiéndolos. Si tenemos en cuenta esto, habrá protocolos que deberíamos descartar por sus “g” excesivas como el de Kim y cols. (2001) que llega a las 5000 x g, pero la duda vuelve a surgir cuando valoramos el estudio de Yawaza y cols. (2003) y vemos que con 1000 x g obtiene más factores de crecimiento que otros autores con “g” menores.

También hemos de tener en cuenta que aún no sabemos la concentración de cada factor de crecimiento adecuado para favorecer la regeneración ósea o para inhibirla (Roldány cols. 2004).

Weibrich y cols. (2004) estudian la posible influencia de la concentración de plaquetas en el PRP. Obtienen preparados que clasifican en tres grupos según la concentración plaquetaria: baja (164.000-373.000), media (503.000-1.729.000) y alta (1.845.000-3.200.000). Aplican preparados de cada grupo en conejos para valorar la

regeneración ósea y ven que los preparados de baja concentración no aumentan el hueso sustancialmente y que el grupo de concentraciones mayores tiene una acción citotóxica sobre los osteoblastos, tal vez por el efecto citotóxico de los factores de crecimiento a altas concentraciones (se ha visto que el TGF- β a altas concentraciones es antimitogénico). El mejor efecto lo obtienen los preparados de concentración media, cuyo rango es muy limitado, alrededor de 1.000.000 p/ μ l.

Marx (2001) coincide con Weibrich y cols. al decir que el PRP es al menos 10^6 plaq/ μ l en 5 ml de plasma. Dice que concentraciones menores no van a mejorar la regeneración y mucho mayores no se ha demostrado que funcionen. Como muchos individuos tienen una concentración de plaquetas de 200.000 p/ μ l, un PRP con 1.000.000 p/ μ l sería un PRP terapéutico.

Choi y cols. (2005), también afirman que la concentración de plaquetas en el PRP influye en la formación ósea. Cultivan células óseas con distintas concentraciones de plaquetas. Las menores, del 1%, tenía 11.000 p/ μ l, y las mayores, del 100%, poseían 1.100.000 p/ μ l. A los 7 días, que es lo que viven las plaquetas, vieron que con concentraciones muy altas la viabilidad y la proliferación de las células óseas disminuían, mientras que se estimulaban con concentraciones del 1 al 5%. En el PPP de su estudio, la respuesta era aún más citotóxica. Tal vez el plasma tenga algo que ver, ya que también tiene factores de crecimiento.

Jensen y cols. (2005) coinciden en que concentraciones plaquetarias altas, de 1.750.000 p/ μ l y de TGF- β , junto a acciones antagonistas de combinaciones de factores de crecimiento, pueden hacer que disminuya la regeneración ósea.

Graziani y cols. (2006) de nuevo obtienen resultados similares. Comparando los efectos de diferentes concentraciones de PRP (2.5x, 3.5x y 4.2-5.5x) sobre osteoblastos

y fibroblastos, concluyen que incrementos plaquetarios del 250% son los mejores para promover la diferenciación celular, lo que supone la mitad de los valores que se suelen obtener.

Como vemos, las variaciones en la concentración de plaquetas en el PRP, pueden influir de manera distinta en la formación de hueso, ya que parece ser que concentraciones plaquetarias altas inhibirían su regeneración. Tal vez éste sea el motivo de la gran variabilidad de resultados de los distintos artículos publicados.

4. Anticoagulación de la muestra, presencia de células y coagulación del producto final.

Teniendo en cuenta que nuestro interés consiste en reintroducir la sangre en forma de coágulo de plaquetas de nuevo en el organismo, cuantas menos sustancias extrañas introduzcamos, mejor. Por ello el citrato sódico es un buen anticoagulante. Captará los iones calcio que se encuentran en la sangre y los neutralizará sin alterar los receptores de membrana de las plaquetas. Además, este proceso es fácilmente reversible. Junto a este anticoagulante hay otros como el CPD usado por Marx y cols en 1998 o el ACD por Aghaloo y cols. en el 2002, que también se usan con buenos resultados aunque Anitua (2002) dice que en concreto el ACD disminuye el pH del plasma interviniendo en el proceso de agregación y secreción plaquetaria. Los que nunca usaremos será el EDTA (que fragmenta las plaquetas) y el CTAD (que contiene sustancias como la teofilina).

En cuanto a la fracción que hemos de separar tras el centrifugado, hemos visto que autores como Marx y cols. (1998), Lekovic y cols. (2002), Choi y cols. (2004) o

Sanmartino y cols. (2005), cogen 1-2 mililitros de volumen de hematíes porque ahí están las mejores plaquetas, cogiendo además leucocitos, que contienen y producen factores de crecimiento (Zimmermann y cols. 2003, Dugrillon y cols 2002, Sonnleitner y cols. 2000), pero Anitua nos hace plantearnos si esto es correcto, ya que él empieza cogiendo también 1-2 ml de hematíes en el año 1999 y actualmente los desecha junto a los leucocitos porque dice que contienen unas proteínas que interfieren en la agregación plaquetaria. No hemos encontrado a nadie más que hable sobre esto, al revés, en general los autores ven el coger leucocitos como una ventaja.

En el servicio de cirugía maxilofacial del Hospital Clínico Universitario de Valencia, hemos intentado coagular PRP con leucocitos y hematíes, y sí que conseguíamos que se agregaran las plaquetas y que coagularan, por lo que los incluimos en nuestro preparado.

Con respecto a la coagulación del producto final obtenido, diremos que aunque la trombina bovina se ha venido usando desde hace años y hace que el PRP coagule muy rápido, de 5 a 30 segundos, hemos de evitar todo posible riesgo para el paciente como son las coagulopatías. Además, Anitua (2002) afirma que la trombina bovina hace que se liberen los gránulos de las plaquetas demasiado rápido.

Puesto que el cloruro cálcico al 10% funciona bien, aunque tarde aproximadamente 15 minutos en hacer que coagule, podemos decir que es una buena opción por la que podemos optar.

Hay autores como Weibrich y cols. (2004) o Pryor y cols. (2005a) que no coagulan el PRP sino que lo inyectan en el defecto en estado líquido. Hemos de tener en cuenta que el PRP funciona a partir de la degranulación de los gránulos alfa de las plaquetas que contienen los factores de crecimiento y que la secreción de los mismos se

inicia con la coagulación de la sangre, por lo que los estudios que no la coagulan no son verdaderos estudios de PRP.

5. Influencia del sexo, la edad y cifra plaquetaria circulante, en la concentración plaquetaria final.

Weibrich y cols. (2001) no encontraron relación entre el recuento plaquetario y la edad, sexo o número de plaquetas iniciales. Dugrillon y cols. (2002) y Okuda y cols. (2002), sí la encuentran entre el número de plaquetas inicial, el final y la concentración del TGF- β 1.

En el 2003, Weibrich y cols., con una muestra de 115 personas voluntarias, aprecian que a mayor número de plaquetas en el PRP más TGF- β 1, y que a mayor número de leucocitos más PDGF-AB. Se plantean que tal vez los glóbulos blancos sean una segunda fuente de factores de crecimiento, por lo que ni el número de plaquetas inicial ni el del PRP, pueden predecir el número de factores de crecimiento que se obtendrán, ya que existen más fuentes de obtención como los glóbulos blancos y el plasma. En este estudio siguen sin ver diferencias entre el recuento plaquetario y la edad de la muestra.

6. Posibles contraindicaciones.

No hay ningún caso publicado que demuestre algún efecto adverso sobre el organismo del paciente sobre el que se aplique.

Aún así, no hay que olvidar que los factores de crecimiento participan en los procesos de mitosis, diferenciación y proliferación celular por lo que como dicen Martínez y cols. (2002), es conveniente no usar el PRP en paciente con lesiones precancerosas orales, porque aunque no puedan actuar como iniciadores del proceso de carcinogénesis si pueden favorecer la división y promoción de células previamente mutadas o iniciadas.

*

*

*

Consecuencia de lo anterior:

Elegimos el procedimiento de Anitua (1999) porque ha demostrado que un incremento del 340% en el número plaquetario es adecuado y además está muy próximo al 400% que recomienda Marx (2001). Weibrich y cols. en 2004 reproducen el protocolo de Anitua y obtienen un incremento plaquetario del 484%. Además, es la técnica que actualmente se está realizando con mayor frecuencia en las clínicas dentales de nuestro país.

Nuestro estudio radiográfico es doble.

La valoración visual de la imagen radiológica es el método generalmente empleado para evaluar los procesos patológicos que cursan con destrucción y regeneración ósea. La radiología simple convencional y la ortopantomografía siguen

siendo las técnicas de elección debido a su accesibilidad y bajo coste, pero esta valoración está condicionada por la calidad de la imagen radiográfica, las limitaciones del sistema visual humano y por la interpretación subjetiva del analizador; estando expuesta por tanto a una serie de posibles errores.

Nuestro sistema visual es tan imperfecto que propicia errores de análisis. Por un efecto de ilusión óptica, la densidad que ven nuestros ojos no es la densidad óptica absoluta sino un valor relativo influido por la densidad de las regiones adyacentes (*Efecto de Mach*).

No debemos olvidar tampoco que la interpretación de un resultado radiológico va a estar condicionada por la experiencia del observador y por la escuela de conocimiento a la que pertenezca.

Todo lo anteriormente reseñado convierte la evaluación radiológica en una interpretación subjetiva, justificando con ello el desarrollo durante las últimas décadas de los distintos sistemas de análisis de imagen informatizado, cuyo objetivo final es el de evaluar objetiva y cuantitativamente los cambios que se producen en la mineralización ósea (Villarreal-Renedo y cols. 1998).

La técnica de utilizar imágenes digitalizadas por ordenador es un método rápido, objetivo y reproducible. Mediante la digitalización, una imagen se descompone en una matriz de $M \times M$ puntos, cada uno con un valor proporcional a su intensidad luminosa (nivel de gris). Los modernos sistemas de digitalización de imágenes son capaces de discriminar entre 256 niveles de gris.

Los sistemas de análisis de imagen por ordenador facilitan la visualización de aspectos particulares al ojo del observador, permitiendo además cuantificar numéricamente una serie de parámetros morfométricos o densitométricos. Con ello se

puede conocer de forma más objetiva la respuesta del hueso a diversos condicionantes (Albertos y cols. 1995).

Existe, no obstante, diversos inconvenientes:

a) Al capturar la imagen con una cámara y un negatoscopio, el nivel de gris se puede ver influenciado por las condiciones de luz ambiental. En nuestro caso no es importante porque estamos analizando dos zonas de una misma radiografía, captadas por la misma luz en el mismo instante. No sería así si comparásemos radiografías sucesivas en el tiempo.

b) Otros inconvenientes serían la superposición de estructuras (como podría ser el conducto del dentario inferior sobre el alvéolo del cordal) o realizar un trazado del contorno subjetivo (ya que es una persona quien lo delimita basándose en radiografía inicial).

Hicimos varias mediciones en caso de duda y la media de gris era siempre constante; lo que variaba eran los mínimos y los máximos.

Al comparar los resultados de la observación directa con los obtenidos mediante el ordenador vemos que ambos coinciden en que el PRP parece tener un bajo valor regenerativo.

Bernabé y cols. (2003) en el III Congreso Nacional de la Sociedad Española de Cirugía Bucal, presentaron una comunicación en la que realizaban un estudio similar al nuestro. Evaluaron clínica y radiográficamente al paciente sin encontrar diferencias significativas entre ambos lados.

Otros autores que obtienen resultados similares a los nuestros son Aghaloo y cols. (2002), Jensen y cols. (2004), Jung y cols. (2005) y Monov (2005).

Este bajo valor regenerativo puede deberse (como hemos comentado anteriormente) a una falta de células con capacidad de dividirse o tal vez a una invasión de tejidos mesenquimales blandos en el alvéolo.

Según Ballester y cols. (2004), los factores de crecimiento se deberían usar siempre que en el lecho receptor hubiese una buena vascularización, ausencia de infección, esté garantizada la estabilidad mecánica y el espacio a regenerar esté conservado y no invadido por los tejidos blandos. En estos casos, los fibroblastos atraídos por el PDGF se metamorfosarán a osteoblastos. Por lo contrario, su uso en lechos infectados, carentes de vascularización o con injertos inestables, está contraindicada al favorecer la fibrosis densa por transformación en fibrocitos de los fibroblastos.

7. CONCLUSIONES

1. No se ha podido comprobar, mediante análisis radiográfico subjetivo e informatizado, que el PRP aporte beneficios en el proceso de regeneración ósea en alvéolos post-extracción de terceros molares mandibulares incluidos.
2. El cloruro cálcico usado para conseguir el PRP según el protocolo preconizado por Anitua (1999), debe ser sextahidratado.
3. Los resultados sobre la eficacia de preparados plasmáticos ricos en plaquetas que ofrece la literatura al efecto, son contradictorios. Se recomienda realizar estudios con aislamiento de la cavidad ósea residual.
4. Los resultados del análisis radiográfico subjetivo personal y del informatizado coinciden y son equiparables.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Aghaloo T, Moy PK, Freymiller EG. Investigation of platelet-rich plasma in rabbit cranial defects: a pilot study. *J Oral Maxillofac Surg* 2002; 60: 1176-81.
2. Aghaloo T, 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.
3. Aghaloo TL, Moy PK, Freymiller EG. Evaluation of platelet-rich plasma (PRP) in combination with freeze-dried bone in the rabbit cranium: a pilot study. *Clin Oral Impl Res* 2005; 16: 250-7.
4. Alberston S, Hummel RP, Breeden M, Greenhalgh D. PDGF and FGF reverse the healing impairment in protein-malnourished diabetic mice. *Surgery* 1993; 114(2):368-72; discussion 372-3.
5. Albertos JM, Junquera LM, Martínez-Nistal A et al. Estudio mediante densitometría cuantitativa de las lesiones quísticas de los maxilares. *Rev Act Odontostomat Esp* 1995; 55(7): 23-32.
6. American Academy of Periodontology. The potential role of growth and differentiation factors in periodontal regeneration. *J Periodontol* 1996; 67: 545-553.
7. 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; 14: 529-535.
8. Anitua E. Un Nuevo enfoque en la regeneración ósea. Plasma rico en factores de crecimiento (PRGF). Puesta al día publicaciones SL; 2000.
9. Anitua E. The use of platelet-rich growth factors (PRGF) in oral surgery. *Pract Proced Aesthet Dent* 2001; 13(6):487-493.

10. Anitua E. La utilización de los factores de crecimiento plasmáticos en cirugía oral, maxilofacial y periodoncia (PRGF). RCOE 2001; 6(3): 305-15.
11. Anitua E, Andía I. Valoración de la regeneración ósea en un modelo animal: utilización de plasma rico en factores de crecimiento (PRGF). Gaceta Dental 2001; 123: 50-54.
12. Anitua E. Protocolo de obtención y evaluación clínica e histológica de plasma rico en factores de crecimiento para la preparación de áreas futuras en implantología. Estudio con SEM y evaluación clínica e histológica. Tesis doctoral, Valencia 2002.
13. Appel TR, Pötzsch B, Müller J, von Lindern J, Bergé ST, Reich RH. Comparison of three different preparations of platelet concentrates for growth factor enrichment. Clin Oral Impl Res 2002; 13: 522-528.
14. Arnás M, Ballester JF, Molinos JR, Álvarez A. Factores de crecimiento: estado del conocimiento actual. Rev. Esp. Odontoestomat de implantes 2002; 10(4):202-208.
15. Arpornmaeklong P, Kochel M, Depprich R, Kübler NR, Würzler KK. Influence of platelet-rich plasma (PRP) on osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells. An in vitro study. Int J Oral Maxillofac Surg 2004; 33: 60-70.
16. Assoian R, Komoriya A, Meyers CA, Miller D, Sporn M. Transforming growth factor- β in human platelets. J Biol Chem 1983; 258(11): 7155-60.
17. Ballester JF, Álvarez A, López I, Molinos JR, Arnás M, Vera JM. Protocolo para la obtención de PDGF a partir de PRF. Rev Esp Odontoestomatológica de implantes 2004; 12(1):14-29.

18. Ballester JF, Solá J, Borrás J, Ferreira J, Morales D, Arnás MM, Molinos JR, Alvarez A. Estudio comparativo de cuatro procedimientos para la obtención del
19. coágulo concentrado de plaquetas. *Rev Esp Odontoestomatológica de implantes* 2003; 11(1): 6-13.
20. Barnes GL, Kostenuik PJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Growth factor regulation of fracture repair. *J Bone Miner Res* 1999; 14(11):1805-15.
21. Baum BJ, Mooney DJ. The impact of tissue engineering on dentistry. *JADA* 2000; 131: 309-318.
22. Bennet NT, Schultz GS. Growth factors and wound healing: Biochemical properties of growth factors and their receptors. *Am J Surg* 1993; 165: 728-37.
23. Bennet NT, Schultz GS. Growth factors and wound healing: Part II. Role in normal and chronic wound healing. *Am J Surg* 1993; 166: 74-81.
24. Bowen-Pope DF, van Koppen A, Schatteman G. Is PDGF really important? Testing the hypotheses. *Trends Genet* 1991; 7:413-8.
25. Boyne PJ. Studies of the surgical application of osteoconductive and osteoinductive materials. En: Ed. Lynch SE. *Tissue Engineering. Applications in maxillofacial surgery and periodontics*. Chicago: Quintessence 1999: 125-30.
26. Broadley KN, Aquino AM, Hicks B, Ditesheim JA, Mc Gee GS, Demetriou AA, Woodward SC. The diabetic rat as an impaired wound healing model: stimulatory effects of transforming growth-beta and basic fibroblast growth factor. *Biotechnol Ther* 1989-90; 1(1):55-68.
27. Burgess AW. Epidermal growth factor and transforming growth factor- α . *Br Med Bul* 1989; 45(2):401-24.

28. Butterfield KJ, Bennett J, Gronowicz G, Adams D. Effect of platelet-rich plasma with autogenous bone grafts for sinus augmentation in a rabbit model. *J Oral Maxillofac Surg* 2005; 63(3): 370-6.
29. Camargo PM, Lekovic V, Weinlaender M, Vasilic N, Madzarevic M, Kenney EB. A reentry study on the use of bovine porous bone mineral, GTR, and platelet-rich plasma in the regenerative treatment of intrabony defects in humans. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2005; 25: 49-59.
30. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1991; 9(5):641-50.
31. Carlson N, Roach R. Platelet-rich plasma. Clinical applications in dentistry. *JADA* 2002; 133:1383-6.
32. Cho MI, Lin WL, Genco RJ. Platelet-derived growth factor modulated guided tissue regenerative therapy. *J Periodontol* 1995; 66: 522-30.
33. Choi BH, Im CJ, Huh JY, Suh J, Lee SH. Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in autogenous bone graft. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004; 33: 56-9
34. Choi BH, Zhu SJ, Kim BY, Huh JY, Lee SH, Jung JH. 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: 420-24.
35. Christgau M, Moder D, Wagner J, Glaßl M, Hiller K, Wenzel A, Schmalz G. Influence of autologous platelet concentrate on healing in intra-bony defects following guided tissue regeneration therapy: a randomized prospective clinical split-mouth study. *J Clin Periodontol* 2006; 33: 908-21.
36. Cochran DL, Rouse CA, Lynch SE, Graves DT. Effects of platelet-derived growth factor isoforms on calcium release from neonatal mouse calvariae. *Bone* 1993; 14(1):53-8.

37. Della Valle A, Sammartino G, Marenzi G, Tia M, Espedito di Lauro A, Ferrari F, Lo Muzio L. Prevention of postoperative bleeding in anticoagulated patients undergoing oral surgery: use of platelet-rich plasma gel. *J Oral Maxillofac Surg* 2003; 61-. 1275-8.
38. Demiralp B, Keçeli H, Muhtarogullari M, Serper A, Demiralp B, Eratalay K. Treatment of periapical inflammatory lesion with the combination of platelet-rich plasma and tricalcium phosphate: a case report. *JOE* 2004; 30(11): 796-800.
39. Deuel TF, Huang J, Proffitt R, Baenziger U, Chang D, Kennedy B. Human platelet-derived growth factor. Purification and resolution into two active protein fractions. *J Biol Chem* 1981; 256(7): 8896-8899.
40. Dudziak ME. Ridge augmentation with PRP/PPP and mineralized bone in dogs. *J Oral Maxillofac Surg* 2003; 61: 41 (suppl).
41. Dugrillon A, Eichler H, Kern S, Klüter H. Autologous concentrated platelet-rich plasma (cPRP) for local application in bone regeneration. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2002; 31:615-9.
42. Efeoglu C, Akçay YD, Ertürk S. A modified method for preparing platelet-rich plasma: an experimental study. *J Oral Maxillofac Surg* 2004; 62: 1403- 7.
43. Eppley BL, Woodell JE, Higgings J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plast Reconstr Surg* 2004; 114: 1502-1508.
44. Feinberg SE, Aghaloo TL, Cunningham LL. Role of tissue engineering in oral and maxillofacial reconstruction: findings of the 2005 AAOMS research summit. *J Oral Maxillofac Surg* 2005; 63: 1418-1425.

45. Fennis JPM, Stoelinga PJW, Jansen JA. Mandibular reconstruction: a clinical and radiographic animal study on the use of autogenous scaffolds and platelet-rich plasma. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2002; 31: 281-286.
46. Fennis JPM, Stoelinga PJW, Jansen JA. Mandibular reconstruction: a histological and histomorphometric study on the use of autogenous scaffolds, particulate cortico-cancellous bone grafts and platelet-rich plasma in goats. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004; 33: 48-55.
47. Fernández-Barbero JE, Galindo-Moreno P, Ávila-Ortiz G, Caba O, Sánchez-Fernández E, Wang HL. Flow cytometric and morphological characterization of platelet-rich plasma gel. *Clin Oral Impl Res* 2006; 17: 687-93.
48. Fernández-Tresgueres I, Alobera MA, del Canto M, Blanco L. Bases fisiológicas de la regeneración ósea I. *Histología y fisiología del tejido óseo. Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2006; 11: 32-6.
49. Fikret T, Demiralp B. Platelet-rich plasma: a promising innovation in dentistry. *J Can Dent Assoc* 2003; 69(10): 664
50. Fontana S, Olmedo D, Linares J, Guglielmotti M, Crosa M. Effect of platelet-rich plasma on the peri-implant bone response: an experimental study. *Impl Dent* 2004; 13(1): 73-8.
51. Fortes C, Carriel MC, Scarso J, Granjeiro JM, Oliveira CM, Magini RS. Platelet-rich plasma influence on human osteoblasts growth. *Clin Oral Impl Res* 2005; 16: 456-460.
52. Fréchette JP, Martineau I, Gagnon G. Platelet-rich plasmas: growth factor content and roles in wound healing. *J Dent Res* 2005; 84(5): 434-439.

53. Freymiller EG, Aghaloo TL. Platelet-rich plasma: ready or not? *J Oral Maxillofac Surg* 2004; 62: 484-488.
54. Froum SJ, Wallace SS, Tarnow DP, Cho SC. Effect of platelet-rich plasma on bone growth and osseointegration in human maxillary sinus grafts: three bilateral case reports. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2002; 22: 45-53.
55. Fuerst G, Gruber R, Tangl S, Mittlböck M, Sanroman F, Watzek G. Effect of platelet-released growth factors and collagen type I on osseous regeneration of mandibular defects. A pilot study in minipigs. *J Clin Periodontol* 2004; 31: 784-790.
56. Fuerst G, Gruber R, Tangl S, Sanroman F, Watzek G. Effects of fibrin sealant protein concentrate with and without platelet released growth factors on bony healing of cortical mandibular defects. An experimental study in minipigs. *Clin Oral Impl Res* 2004; 15: 301-7.
57. Fuerst G, gruber R, Tangl S, Sanroman F, Watzek G. Enhanced bone-to-implant contact by platelet-released growth factors in mandibular cortical bone: a histomorphometric study in minipigs. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2003; 18: 685-690.
58. Fürst G, Gruber R, Tangl S, Zechner W, Haas R, Mailath G, Sanroman F, Watzek G. Sinus grafting with autogenous platelet-rich plasma and bovine hidroxiapatite. A histomorphometric study in minipigs. *Clin Oral Impl Res* 2003; 14: 500-508.
59. Galliani M. Histological study to compare bone healing between experimental mandibular bone defects folled with and without platelet rich plasma, an experimental study in rabbits. *J Dent Res* 2002; 81 (Spec Iss A): 288A.

60. Gerard D, Carlson ER, Gotcher JE, Jacobs M. Effects of platelet-rich plasma on the healing of autologous bone grafted mandibular defects in dogs. *J Oral Maxillofac Surg* 2006; 64: 443-51.
61. Gehring S, Hoerauf H, laqua H, Kirchner H, Klüter H. Preparation of autologous platelets for the ophthalmomologic treatment of macular holes. *Transfusion* 1999; 39:144-8.
62. Giannobile WV, Whitson SW, Lynch SE. Non-coordinate control of bone formation displayed by growth factor combinations with IGF-I. *J Dent Res* 1997; 76(9): 1569-78.
63. Gomez de Ferraris ME, Campos A. Periodoncio de inserción. En *Histología y embriología bucodental*. Madrid: E. M. Panamericana 1999: 314-24.
64. Gonshor A. Technique for producing platelet-rich plasma and platelet concentrate: background and process. *Int J Periodontics Restorative dent* 2002; 22: 547-557.
65. Grageda E. Platelet rich plasma and bone graft materials: a review and a standardized research protocol. *Impl Dent* 2004; 13(4): 301-9.
66. Graziani F, Ducci F, Tonelli M, El Askari A, Monier M, Gabriele M. Maxillary sinus augmentation with platelet-rich plasma and fibrinogen cryoprecipitate: a tomographic pilot study. *Impl Dent* 2005; 14(1): 63-9.
67. Graziani F, Ivanovski S, Cei S, Ducci F, Tonetti M, Gabriele M. The in vitro effect of different PRP concentrations on osteoblasts and fibroblasts. *Clin Oral Impl Res* 2006; 17(2): 212
68. Greenhalgh DG. The role of growth factors in wound healing. *J Trauma* 1996, 41(1):159-67.

69. Grotendorst GR, Martin GR, Pencev D, Sodek J, Harvey AK. Stimulation of granulation tissue formation by platelet-derived growth factor in normal diabetic rats. *J Clin Invest* 1985; 76(6):2323-9.
70. Harris D. Zygomatic arch defects grafted with mineralized bone with PRP or PPP in dogs. *J Oral maxillofac Surg* 2003; 61: 42 (suppl)
71. Hart CE, Forstrom J, Kelly J, Seifert R, Smith R. Two classes of PDGF receptor recognize different isoforms of PDGF. *Science* 1988; 240: 1529-1531.
72. Hart CE, Bailey M, Curtis D, Osborn S, Raines E, Ross R et al. Purification of PDGF-AB and PDGF-BB from human platelet extracts and identification of all three dimmers in humans platelets. *Biochemistry* 1990; 29:166-172.
73. Heldin CH. Simultaneous induction of stimulatory and inhibitory signals by PDGF. *FEBS* 1997; 410:17-21.
74. Hennessey PJ, Black CT, Andrassy RJ. Epidermal growth factor and insulin act synergistically during diabetic healing. *Arch Surg* 1990; 125(7):926-9.
75. Hillmann G, Geurtsen W. Tissue engineering - an exciting future. *Clin Oral invest* 2001; 5:1
76. Hino M, Ishiko O, Honda K, Yamane T, Otha K, Takubo T et al. Transmission of symptomatic parvovirus B19 infection by fibrin sealant used during surgery. *BrJHematol*2000;108:194-5.
77. Hoffman M, Monroe D, Roberts H. A rapid method to isolate platelets from human blood by density gradient centrifugation. *Am J Clin Pathol* 1992; 98:531-3.
78. Hollinger J, Brekkle J, Gruskin E. Role of bone substitutes. *Clin Orthop* 1996; 324: 55-65.

79. Hollinger J, Wong M. The integrated processes of hard tissue regeneration with special emphasis on fracture healing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1996; 82: 594-606.
80. Hollinger J, Back DC, Bruder SP. Biology of bone healing: its impact on clinical therapy. En Ed. Lynch SE. *Tissue Engineering. Applications in maxillofacial surgery and periodontics*. Chicago: Quintessence 1999: 17-53.
81. Hollinger J, Schmith JM, Hwang K, Soleymani P, Buck D. Impact of nicotine on bone healing. *J Biomed Mat Res* 1999; 45(4):294-301.
82. Jackson MR. Fibrin sealants in surgical practice: an overview. *Am J Surg* 2001;182:1S-7S.
83. 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 Impl Res* 2003; 14: 578-583.
84. Jensen SS, Brogini N, Weibrich G et al. Bone regeneration in standardized bone defects with autografts or bone substitutes in combination with platelet concentrate: a histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2005; 20: 703-712.
85. Jensen TB, Rahbek O, Overgaard S, Soballe K. Platelet rich plasma and fresh frozen bone allograft as enhancement of implant fixation. An experimental study in dogs. *J Orth Res* 2004; 22: 653-8.
86. Jung RE, Schmoekel HG, Zwahlen R, Kokovic V, Hammerle CHF, Webwer FE. Platelet-rich plasma and fibrin as delivery systems for rhBMP-2. *Clin Oral Impl Res* 2005; 16: 676-82.

87. Kark LR, Karp JM, Davies JE. Platelet releasate increases the proliferation and migration of bone marrow-derived cells cultured under osteogenic conditions. *Clin Oral Impl Res* 2006; 17: 321-7.
88. Kassolis JD, Rosen PS, Reynolds MA. Alveolar ridge and sinus augmentation utilizing platelet-rich plasma in combination with freeze-dried bone allograft: case series. *J Periodontol* 2000; 71:1654-61.
89. Kawase T, Okuda K, Saito Y, Yoshie H. In vitro evidence that the biological effect of platelet-rich plasma on preiodontal ligament cells is not mediated solely by constituent transforming-growth factor- β or platelet-derived growth factor. *J Periodontol* 2005; 76: 760-767.
90. Kim E, Park E, Choung P. Platelet concentration and its effect on bone formation in calvarian defects: an experimental study in rabbits. *J Prosthet Dent* 2001; 86: 428-33.
91. Kim S, Kim W, Park J, Kim H. A comparative study of osseointegration of Avana Implants in demineralised freeze-dried bone alone or with platelet-rich plasma. *J Oral Maxillofac Surg* 2002; 60: 1018-1025.
92. Kim SG, Chung CH, Kim YK, Park JC, Lim SC. Use of particulate dentin-plaster of Paris combination with/without platelet-rich plasma in the treatment of bone defects around implants. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2002; 17: 86-94.
93. Klinger M, Jelkmann W. Role of blood platelets in infection and inflammation. *J Interferon Citokine Res* 2002; 22: 913-922.
94. Klongnoi B, Rupprecht S, Kessler P, Zimmermann R, Thorwarth M, Pongsiri S, Neukam FW, Wiltfang J, Schlegel KA. Lack of beneficial effects of platelet-rich

- plasma on sinus augmentation using a fluorhydroxyapatite or autogenous bone: an explorative study. *J Clin Periodontol* 2006; 33: 500-9.
95. Klongnoi B, Rupprecht S, Kessler P, Thorwarth M, Wiltfang J, Schlegel KA. Influence of platelet-rich plasma on bioglass and autogenous bone in sinus augmentation. *Clin Oral Impl Res* 2006; 17: 312-20.
96. Knighton DR, Silver IA, Hunt TK. Regulation of wound-healing angiogenesis-effect of gradients and inspired oxygen concentration. *Surgery* 1981; 90(2):262-70.
97. Lacoste E, Martineau I, Gagnon G. Platelet concentrates: effects of calcium and thrombin on endothelial cell proliferation and growth factor release. *J Periodontol* 2003; 74: 1498-1507.
98. Landesberg R, Burke A, Pinsky D, Katz R, Vo J, Eisig S, Lu H. Activation of platelet-rich plasma using thrombin receptor agonist peptide. *J Oral Maxillofac Surg* 2005; 63: 529-35.
99. Landesberg R, Moses M. Risks of using platelet-rich plasma gel. *J Oral Maxillofac Surg* 1998; 56: 1116-7.
100. Landesberg R, Roy M, Glickman RS. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. *J Oral Maxillofac Surg* 2000; 58: 297-300.
101. Lawrence WT, Norton JA, Sporn MB, Gorschboth C, Grotendorst GR. The reversal of an Adrimycin induced healing impairment with chemoattractants and growth factors. *Ann Surg* 1986; 203(2):142-7.
102. Lekovic V, Camargo PM, Weinlaender M, Vasilic N, Kenney EB. Comparison of platelet-rich plasma, bovine porous bone mineral, and guided

- tissue regeneration versus platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral in the treatment of intrabony defects: a reentry study. *J Periodontol* 2002; 73: 198-205.
103. Lozada J, Caplanis N, Proussaefs P, Willardsen J, Kammeyer G. Platelet-rich plasma application in sinus graft surgery: part I- background and processing techniques. *J Oral Implantol* 2001; 27(1):39-42.
104. Lucarelli E, Beccheroni A, Donati D, Sangiorgi L, Cenacchi A, Del Vento A, Meotti C, Zambon A, Giardino R, Fornasari P, Mercuri M, Picci P. Platelet-derived growth factors enhance proliferation of human stromal stem cells. *Biomaterials* 2003; 24: 3095-3100.
105. Lynch Se, Buser D, Hernández RA, Weber HP, Stich H, Fox CH, Williams RC. Effects of the platelet-derived growth factor/insulin-like growth factor-1 combination on bone regeneration around titanium dental implants. Results of a pilot study in beagle dogs. *J Periodontol* 1991; 62: 710-6.
106. Lynch SE, Nixon JC, Colvin R, Antoniades HN. Role of platelet-derived growth factor in wound healing: synergistic effects with other growth factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 7696-7700.
107. Lynch SE, Colvin RB, Antoniades HN. Growth factors in wound healing. Single and synergistic effects on partial thickness porcine skin wounds. *J Clin invest* 1989; 84: 640-6.
108. Lynch SE, Williams RC, Polson AM, Howell TH, Reddy MS, Zappa UE, Antoniades HN. A combination of platelet-derived and insulin-like growth factors enhances periodontal regeneration. *J Clin Periodontol* 1989; 16: 545-548.

109. Lynch SE, Ruiz de Castilla G, Williams RC, Kiristry CP, Howell TH, Reddy MS, Antoniades HN. The effects of short-term application of a combination of platelet-derived and insulin-like growth factors on periodontal wound healing. *J Periodontol* 1991; 62: 458-467.
110. Man D, Plosker H, Winland-Brown JE. The use of autologous platelet-rich plasma (platelet gel) and autologous platelet-poor plasma (fibrin glue) in cosmetic Surgery. *Plast Reconstr surg* 2004; 107: 229-37.
111. Mannai C. Early implant loading in severely resorbed maxilla using xenograft, autograft and platelet-rich plasma in 97 patients. *J Oral Maxillofac Surg* 2006; 64: 1420-6.
112. Martínez JM, Cano J, Gonzalo JC, Campo J, Esparza G, Seoane JM. ¿Existen riesgos al utilizar los concentrados de plasma rico en plaquetas (PRP) de uso ambulatorio? *Medicina Oral* 2002; 7: 375-90.
113. Marukawa E, Asahina I, Oda M, Seto I, Alam Md, Enomoto S. Functional reconstruction of the non-human primate mandible using recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2002; 31: 287-295.
114. Marx RE, Ehler WJ, Peleg M. Mandibular and facial reconstruction. Rehabilitation of the head and neck cancer patient. *Bone* 1996; 19(1 Suppl):59S-82S.
115. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998; 85:638-46.

116. Marx RE. Platelet rich plasma: a source of multiple autologous growth factors for bone grafts. En: Ed. Lynch SE. Tissue Engineering. Applications in maxillofacial surgery and periodontics. Chicago: Quintessence 1999: 71-82
117. Marx RE. Bone graft physiology with use of platelet rich plasma and hyperbaric oxygen. En: Jensen OT. The sinus bone graft. Chicago: Quintessence 1999: 183-9.
118. Marx R, Meltzer A. Donde no hay hueso no hay implantes. Rev Esp Odontostomat de implantes 2000; 8(1):32-3.
119. Marx RE. Platelet rich plasma (PRP): What is PRP and What is not PRP? Impl Dent 2001; 10(4): 225-8.
120. Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. J Oral Maxillofac Surg 2004; 62: 489-496.
121. Matras H. Fibrin seal: the state of the art. J Oral Maxillofac Surg. 1985; 43:605-611.
122. Matras H. The use of fibrin sealant in oral and maxillofacial surgery. 1982
123. Mazor Z, Peleg M, Garg A, Luboshitz J. Platelet-rich plasma for bone graft enhancement in sinus floor augmentation with simultaneous implant placement: patient series study. Impl Dent 2004; 13(1): 65-72.
124. Miranda SR, Filho HN, Padovan LEM, Ribeiro DA, Nicolielo D, Matsumoto MA. Use of platelet-rich plasma under autogenous onlay bone grafts. Clin Oral Impl Res 2006; 17: 694-9.
125. Miyazono K, Heldin CH. The mechanism of action of transforming growth factor-beta. Gastroenterol Jpn 1993; 28 (Suppl 4):81-5.

126. Monov G, The effect of platelet-rich plasma upon implant stability measured by resonance frequency analysis in the lower anterior mandibles. A pilot study. *Clin Oral Impl Res* 2005; 16: 461-465.
127. Nagao H, Tachikawa an, Oda M, Mori M, Takahashi K, Enomoto S. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on bone formation in alveolar ridge defects in dogs. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2002; 31: 66-72.
128. Ogino Y, Ayukawa Y, Tsukiyama Y, Koyano K. The effect of platelet-rich plasma on the cellular response of rat bone marrow cells in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005; 100: 302-307.
129. Ohya M, Yamada Y, Ozawa R, Ito K, takahashi M, Ueda M. Sinus floor elevation applied tissue-engineered bone. Comparative study between mesenchymal stem cells/platelet-rich plasma (PRP) and autogenous bone with PRP complexes in rabbits. *Clin Oral Impl Res* 2005; 16(5): 622
130. Okuda K, Kawase T, Mornose M, Murata M, Saito Y, Suzuki H et al. Platelet-rich plasma contains high levels of platelet-derived growth factor and transforming growth factor- β and modulates the proliferation of periodontally related cells in vitro. *J Periodontol* 2003; 74: 849-57.
131. Okuda K, Tai H, Tanabe K, Suzuki H, sato T, kawase T, Saito Y, Wolff LF, Yoshie H. Platelet-rich plasma combined with a porous hidroxiapatite graft for the treatment of intrabony periodontal defects in humans: a comparative controlled clinical study. *J Periodontol* 2005; 76(5): 890-898.
132. Oyama T, Nishimoto S, Tsugawa T, Shimizu F. Efficacy of platelet-rich plasma in alveolar bone grafting. *J Oral Maxillofac Surg* 2004; 62: 555-8.

133. Olea J, Olea N. Plasma enriquecido de plaquetas en regeneración ósea maxilar con implantes osteointegrados y estudio de microscopía óptica y electrónica. *Rev Esp odontoestomat de Implantes* 2002; 10(3): 146-50.
134. Olmedo N, Murature DA, Villarreal N. Preparación y usos clínicos del PRP en cirugía odontológica. *Rev Esp Odontomatológica de Implantes* 2003; 11(3): 6-13.
135. Palmisano W. Craniotomy bone defect healing with PRP combined with mineralized bone. *J Oral Maxillofac Surg* 2002; 60: 39 (suppl)
136. Peñarrocha M, Sanchis JM, Martínez JM. Factores de crecimiento y proteínas que influyen en el crecimiento óseo: aplicaciones en implantología oral. *Periodoncia* 2001; 11(3):205-16.
137. Petrúngaro PS. Using platelet-rich plasma to accelerate soft tissue maturation in esthetic periodontal surgery. *Compendium* 2001; 22(9): 729-46.
138. Philippart P, Daubie V, Pochet R. Sinus grafting using recombinant human tissue factor, platelet rich plasma gel, autologous bone and anorganic bovine bone mineral xenograft: histologic analysis and case reports. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2005; 20: 274-281.
139. Pierce GF, Mustoe T, Ligebach J, Masakowski G. Platelet-derived growth factor and transforming growth factor- β enhance tissue repair activities by unique mechanisms. *J Cell Biol* 1989; 109: 429-40.
140. Pinheiro ML, Feres E, Graves D, Takiya C, Elsas M, Elsas P, Luz R. Quantification and localization of platelet-derived growth factor in gingival of periodontitis patients. *J Periodontol* 2003; 74: 323-8.

141. Plachokova AS, van der Dolder J, Stoelinga PJ, Jansen JA. The bone regenerative effect on platelet-rich plasma in combination with an osteoconductive material in rat cranial defects. *Clin Oral Impl Res* 2006; 305-11.
142. Pryor ME. Analysis of rat calvaria defects implanted with a platelet-rich plasma preparation: histologic and histometric observations. *J Clin Periodontol* 2005; 32(9): 966
143. Pryor ME, Yang J, Polimeni G, Koo KT, Hartman MJ, Gross H, Agelan A, Manns JM, Wikesjö U. Analysis of rat calvaria defects implanted with a platelet-rich plasma preparation: radiographic observations. *J Periodontol* 2005; 76: 1287-1292.
144. Raghoobar GM, Achoringhuis J, Liem R, Ruben JL, van de Wal JE, Vissink A. Does platelet-rich plasma promote remodeling of autologous bone grafts used for augmentation of the maxillary sinus floor? *Clin Oral Impl Res* 2005; 16: 349-356.
145. Robiony M, Polini F, Costa F, Politi M. Osteogenesis distraction and platelet-rich plasma for bone restoration of the severely atrophic mandible: preliminary results. *J Oral Maxillofac Surg* 2002; 60: 630-635.
146. Rodríguez A, Anastassov GE, Lee H, Buchbinder D, Wettan H. Maxillary sinus augmentation with deproteinated bovine bone and platelet rich plasma with simultaneous insertion of endosseous implants. *J Oral Maxillofac Surg* 2003; 61: 157-63.
147. Roldán JC, Jepsen S, Miller J, Freitag S, Rueger DC, Açil Y. Bone formation in the presence of platelet-rich plasma vs. bone morphogenetic protein-7. *Bone* 2004; 34: 80-90.

148. Sammartino G, Tia M, Marenzi G. Use of autologous platelet-rich plasma (PRP) in periodontal defect treatment after extraction of impacted mandibular third molars. *J Oral Maxillofac Surg* 2005; 63: 766-770.
149. Sánchez AR, Eckert SE, Sheridan PJ, Weaver AL. Influence of platelet-rich plasma added to xenogenic bone grafts on bone mineral density associated with dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2005; 20: 526-532.
150. Sánchez 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.
151. Schliephake H. Bone growth factors in maxillofacial skeletal reconstruction. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2002; 31: 469-484.
152. Schmidmaier G, Wildemann B, Ostapowicz D, Kandziora F, Stange R, Haas NP, Raschke M. Long-term effects of local growth factors (IGF-I and TGF- β 1) treatment on fracture healing. A safety study for using growth factors. *J Orthop Res* 2004; 22: 514-9.
153. Schmitz JP, Hollinger JO. The biology of platelet-rich plasma. *J Oral Maxillofac Surg* 2001; 59: 1119-21.
154. Serrano V, Casas A. Factores de crecimiento: ¿Un nuevo enfoque terapéutico? *Periodoncia* 1997; 7(2): 99-115.
155. Shanaman R, Filstein MR, Danesh-Meyer MJ. Localized ridge augmentation using GBR and platelet-rich plasma: case reports. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2001; 21: 345-355.
156. Shen EC, Chou TC, Gau CH, Tu HP, Chen YT, Fu E. Releasing growth factors from activated human platelets after chitosan stimulation: a possible bio-

- material for platelet-rich plasma preparation. *Clin Oral Impl Res* 2006; 17: 572-8.
157. Slater M, Patava J, Kingham K, Mason RS. Involvement of platelets in stimulating osteogenic activity. *J Orthop Res* 1995; 13(5):655-63.
158. Schmidmaier G, Herrmann S, Green J, Weber T, Scharfenberger A, Haas NP, Wildemann B. Quantitative assessment of growth factors in reaming aspirate, iliac crest, and platelet preparation. *Bone* 2006; 39: 1156-63.
159. Soffer E, Ouhayoun JP, Anagnostou F. Fibrin sealants and platelet preparations in bone and periodontal healing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003; 95:521-8.
160. Soffer E, Ouhayoun JP, Dosquet C, Meunier A, Anagnostou F. Effects of platelet lysates on select bone cell functions. *Clin Oral Impl Res* 2004; 15: 581-588.
161. Sonnleitner D, Huemer P, Sullivan D. A simplified technique for producing platelet-rich plasma and platelet concentrate for intraoral bone grafting techniques: a technical note. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2000;15:879-82.
162. Spotnitz WD. Commercial fibrin sealants in surgical care. *Am J Surg* 2001; 182(2 Suppl):8S-14S.
163. Stephan EB, Renten R, Lynch SE, Dziak R. Platelet derived growth factor enhancement of a mineral collagen bone substitute. *J Periodontol* 2000; 71: 1887-1892.
164. Strayhorn CL, Garret JS, Dunn RL, Benedict JJ, Somerman MJ. Growth factors regulate expression of osteoblast-associated genes. *J Periodontol* 1999; 70: 1345-1354.

165. Swennen GRJ, Schutyser F, Mueller MC, Kramer FJ, Eulzer C, Schiliefhake H. Effect of platelet-rich plasma on cranial distraction osteogenesis in sheep: preliminary clinical and radiographic results. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2005; 34: 294-304.
166. Tayapongsak P, O'brien DA, Monteiro CB, Arceo-Diaz LY. Autologous fibrin adhesive in mandibular reconstruction with particulate cancellous bone and Marrow. *J Oral Maxillofac Surg*. 1994; 52:161-5.
167. Ten Cate AR. *Histología Oral. Desarrollo, estructura y función*. E.M. Panamericana, 1991
168. Thorn JJ, Sorensen H, Weis-Fogh U, Andersen A. Autologous fibrin glue with growth factors in reconstructive maxillofacial surgery. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004; 33: 95-100.
169. Thorwarth M, Wehrhan F, Schultze-Mosgau S, Wiltfang J, Schlegel KA. PRP modulates expression of bone matrix proteins in vivo without long-term effects on bone formation. *Bone* 2006; 38: 30-40.
170. Tischler M. Platelet rich plasma. Utilizing autologous growth factors for dental surgery to enhance bone and soft tissue grafts. *N Y State Dent J* 2002; 68: 22-24.
171. Tözüm TF, Keçeli HG, Serper A, Tuncel B. Intentional replantation for a periodontally involved hopeless incisor by using autologous platelet-rich plasma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006; 101: e119-e124.

172. Tsay R, Vo J, Burke A, Eisig S, Lu H, Landesberg R. Differential growth factor retention by platelet-rich plasma composites. *J Oral Maxillofac Surg* 2005; 63: 521-8.
173. Urist MR, Lietze A, Dawson E. Beta-tricalcium phosphate delivery system for bone morphogenetic protein. *Clin Orthop* 1984; 187:277-80.
174. Villarreal-Renedo PM, Junquera-Gutiérrez LM, Martínez-Nista A et al. Actualización del sistema de análisis de imagen mediante radiodensitometría cuantitativa asistida por ordenador. *RCOE* 1998; 3(8): 739-49.
175. Wadha M, Seghatchian MJ, Lubenko A, Contreras M, Dilger P, Bird C et al. Cytokine levels in platelet concentrates: quantitation by bioassays and immunoassays. *Br J Hematol* 1996; 93: 225-34.
176. Wang HL, Pappert TD, Castelli WA, Chiego DJ, Shyr Y, Smith BA. The effect of platelet-derived growth factor on the cellular response of the periodontum: an autoradiographic study on dogs. *J Periodontol* 1994; 65: 429-436.
177. Weibrich G, Kleis W, Kunz-Kostomanolakis M, Loos A, Wagner W. Correlation of platelet concentration in platelet-rich plasma to the extraction method, age, sex and platelet count of the donor. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2001; 16: 693-9.
178. Weibrich G, Kleis W, Hafner G, Hitzler W. Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex and platelet count. *J Cranio-Maxillofac Surg* 2002; 30: 97-102.

179. Weibrich G, Kleis W, Hafner G. Growth factor levels in the platelet-rich plasma produced by two different methods: Curasan-type PRP Kit versus PCCS PRP System. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002; 17: 184-90.
180. Weibrich G, Kleis W. Curasan PRP Kit vs. PCCS PRP system. Collection efficiency and platelet counts of two different methods for the preparation of platelet-rich plasma. *Clin Oral Impl Res* 2002; 13: 437-43.
181. Weibrich G, Kleis W, Hafner G, Hitzler WE, Wagner W. Comparison of platelet, leukocyte and growth factor levels in point-of-care platelet-enriched plasma, prepared using a modified Curasan kit, with preparations received from a local blood bank. *Clin Oral Impl Res* 2003, 14: 357-62.
182. Weibrich G, Hansen T, Kleis W, Buch R, Hitzler WE. Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone* 2004; 34: 665-671.
183. Weibrich G, Kleis W, Hitzler WE, Hafner G. Comparison of the platelet concentrate collection system with the plasma-rich-in-growth-factors kit to produce platelet-rich plasma: a technical report. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2005; 20: 118-123.
184. Whitman DH, Berry RL, Green D. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg* 1997; 55:1294-99.
185. Wilson SM, Pell P, Donegan EA. HIV-1 Transmission following the use of cryoprecipitated fibrinogen as gel adhesive. *Transfusion* 1991;31Suppl.S186
186. Wiltfang J, Schlegel KA, Schultze-Mosgau S, Nkenke E, Zimmermann R, Kessler P. Sinus floor augmentation with β -tricalciumphosphate (β -TCP):

- does platelet-rich plasma promote its osseous integration and degradation? *Clin Oral Impl Res* 2003; 14: 213-8.
187. Wiltfang J, Kloss FR, Kessler P, Nkenker E, Schultze S, Zimmermann R, Schlegel KA. Effects of platelet-rich plasma on bone healing in combination with autogenous bone and bone substitutes in critical-size defects. An animal experiment. *Clin Oral Impl Res* 2004; 15: 187-193.
188. Wu L, Mustoe TA. Effect of ischemia on growth factor enhancement of incisional wound healing. *Surgery* 1995; 117(5): 570-6.
189. Yawaza M, Ogata H, Nakajima T, Mori T, Watanabe N, Handa M. Basic studies on the clinical applications of platelet-rich plasma. *Cell Transplantation* 2003; 12:509-518.
190. Yu X, Hsieh S, Bao W, Graves DT. Temporal expression of PDGF receptors and PDGF regulatory effects on osteoblastic cells in mineralizing cultures. *Am J Physiol* 1997; 272(5Pt1):c1709-16.
191. Zechner W, Tangl S, Tepper G, Fürst G, Bernhart T, Haas R, Mailath G, Watzek G. 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.
192. Zhu SJ, Choi BH, Jung JH, Lee SH, Huh JY, You TM, Lee HJ, Li Jingxu. A comparative histologic analysis of tissue-engineered bone using platelet-rich plasma and platelet-enriched fibrin glue. *Oral Sur Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006; 102: 175-9.

193. Zimmermann R, Jakubietz R, Jakubietz M, Strasser E, Schlegel A, Wiltfang J et al. Different preparation methods to obtain platelet components as a source of growth factors for local application. *Transfusion* 2001; 41: 1217-24.
194. Zimmermann R, Arnold D, Strasser E, Ringwald A, Schlegel A, Wiltfang J, Ecksyein R. Sample preparation technique and white cell content influence the detectable levels of growth factors in platelet concentrates. *Vox sanguinis* 2003; 85: 283-289.