

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA



TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DE MICROSCOPIA
ELECTRÓNICA Y CUANTIFICACIÓN DE
LOS FACTORES DE CRECIMIENTO
MEDIANTE UN NUEVO PROCEDIMIENTO
DE OBTENCIÓN DE PLASMA RICO EN
PLAQUETAS**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

ANTONIO LORENTE PEREZ-SIERRA

Directores:

DR. JOSÉ A. DE DIEGO CARMONA
DR. JOSÉ MARÍA MARTÍNEZ GONZÁLEZ

Madrid, 2010

TESIS DOCTORAL
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID



FACULTAD DE MEDICINA

**ESTUDIO DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA Y
CUANTIFICACIÓN DE LOS FACTORES DE
CRECIMIENTO MEDIANTE UN NUEVO
PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DE PLASMA
RICO EN PLAQUETAS.**

DIRECTORES:

DR. JOSÉ A. DE DIEGO CARMONA

DR. JOSÉ MARÍA MARTÍNEZ GONZÁLEZ

ANTONIO LORENTE PEREZ-SIERRA

MADRID, 2010

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

Al Prof. Dr. José María Martínez González por la eficaz dirección y coordinación de este trabajo, gracias al cual por fin he hecho realidad un sueño de tantos años.

Al Prof. Dr. José Angel de Diego Carmona que ha hecho posible la lectura de la tesis en esta mi primera casa.

Al Dr. Ricardo Ortega Aranegui sin el cual este trabajo seguiría dando vueltas y no habría terminado a tiempo. Gracias a él ha tomado forma y ha finalizado bien.

A Ignacio y al Dr. Ciancas del laboratorio Labiphath que pusieron a mi disposición el material necesario para realizar el trabajo.

A mis padres José y Paloma a los que hubiese gustado estar en este momento y disfrutar de mi alegría por el trabajo bien hecho.

Por último, y no por eso menos importante, a mi mujer Eva y a mis hijos Eva, Daniel, Isabel, Alejandro y Mateo a los que les he robado tantas horas de compañía y aguantan mi cansancio cada día. Ellos han sido el motor con el que he podido realizar este trabajo.

ÍNDICE

1. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN	1
2. HIPÓTESIS DE TRABAJO	9
3. INTRODUCCIÓN.....	19
3.1. Fisiología de las plaquetas.....	23
3.2. Sistemas de obtención de PRP.....	34
3.3. Usos clínicos del plasma rico en plaquetas.....	46
4. MATERIALES Y METODOLOGÍA	57
4.1. Material.....	59
4.1.1. Recursos.....	59
4.1.2. Material fungible.....	59
4.1.3. Material físico o aparatología	60
4.2. Metodología	64
4.2.1. Selección de pacientes.....	65
4.2.2. Extracción de sangre y centrifugado.....	65
4.2.3. Contaje y determinación.....	68
4.2.4. Inclusión en Resina	69
4.2.5. Visionado en microscopía electrónica	70
4.2.6. Análisis estadístico.....	70
5. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	73
5.1. Recuento de plaquetas..	75
5.1.1. Recuento de plaquetas basales	75
5.1.2. Recuento de plaquetas concentradas.....	78
5.2. Recuento de factores de crecimiento.	80
5.2.1. Recuento de factores de crecimiento basales	80
5.2.2. Recuento de factores de crecimiento en concentrados.	84
5.3. Análisis estadístico de los datos.	88
5.4. Observación al microscopio electrónico	96
5.4.1. Observación de las plaquetas.	96
5.4.1.1. Integridad celular.....	97
5.4.1.2. Morfología plaquetaria.....	97
5.4.1.3. Número de pseudópodos plaquetarios	99
5.4.1.4. Degranulación.	100
5.4.1.5. Grado de activación plaquetaria.	102
6. DISCUSIÓN.....	105
7. CONCLUSIONES	115
8. BIBLIOGRAFIA.....	119
8.1. Bibliografía por orden alfabético	121
8.2. Bibliografía por referencias en el texto	138

1. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

La agresión a los tejidos tiene como resultado su alteración, respondiendo el organismo con un proceso de restauración del tejido afectado. Dicho proceso siempre comienza con la aparición de un coágulo sanguíneo que rellena el defecto y aporta las proteínas necesarias para generar un tejido fibroso que termina en cicatricial, que no respeta la arquitectura ni funciones originales ni preexistentes. Este proceso se conoce como reparación¹.

En ocasiones el proceso no lleva a una reparación sino a la creación de un tejido similar al original con una arquitectura y función exactamente iguales. En este caso se habla de regeneración¹.

El premio Nobel de medicina en 1990 Joseph Murray habla de las cuatro “R”; retirar, reparar, reemplazar y regenerar².

Desde el principio de los tiempos éste ha sido el objetivo, buscándose la forma de cumplir con esta misión. Aportar de forma natural los factores que intervienen en la cicatrización no es algo novedoso, existiendo en la historia diferentes formas, algunas pintorescas incluso en su momento, como son las que describen los trabajos de Thomas³; utilizaba gusanos para la curación de las heridas. Ya en las batallas napoleónicas los utilizaban para evitar la sobreinfección al remover el tejido necrótico y promover la cicatrización de las heridas provocadas en la batalla.

Más recientemente y en referencia con el tema que se va a tratar aparece como antecedente la utilización de una malla de fibrina por parte de los traumatólogos⁴.

En el coágulo sanguíneo formado en las heridas existen los componentes estratégicos, como ya se ha comentado, que desencadenan cualquiera de los dos procesos que se pueden producir, reparación o regeneración. En la cascada de la coagulación se desencadenan reacciones en las que las células sanguíneas quedan atrapadas en dicha malla. Entre estas células se encuentran las plaquetas, que no sólo tienen como función el taponamiento de los vasos sanguíneos ya que en su interior se almacenan proteínas que catalizan los procesos de la cicatrización. Éstas proteínas son los factores de crecimiento que producen señales peptídicas moleculares que cambian el comportamiento de las diferentes células que intervienen en la reparación y desarrollo de los tejidos, mediando en el proceso biológico de la migración, proliferación, diferenciación y metabolismo celular⁵.

Entre las más estudiadas están el factor de crecimiento derivado de las plaquetas, el factor de crecimiento parecido a la insulina, el factor de crecimiento beta transformador de la familia de la proteína morfogenética, con una gran intervención en la formación de hueso, el factor de crecimiento vascular que interviene en la neovascularización, el factor de crecimiento epidérmico, el factor de crecimiento de los fibroblastos, etc. De todos estos, el factor de crecimiento beta transformador, el factor de crecimiento derivado de las plaquetas, además del factor de crecimiento vascular, son los que mayor concentración tienen en las plaquetas.

Con esta idea fue Tayapongsak⁶ quien descubrió en cirugía maxilofacial la fibrina autóloga. El primer término, acuñado en la literatura científica como fibrina autóloga adhesiva (AFA), describía la adaptación de la fibrina que forma parte del suero para vehiculizar al injerto en cirugía. Tras la extracción de sangre al paciente añadiendo anticoagulantes, ésta se centrifugaba depositándose elementos formes en el fondo del recipiente, formándose así el suero con la fibrina. Al ser las plaquetas el elemento menos pesado de todas las células sanguíneas se depositaban por encima del resto y por tanto quedaba embebido en dicha fibrina. La combinación de fibrina más plaquetas conseguía unos resultados óptimos en cirugía.

Posteriormente Robert Marx⁷ aportó otro término a la bibliografía científica, plasma rico en plaquetas (PRP). El procedimiento para su obtención consiste en la adaptación del mismo compuesto de fibrina autóloga en la que se engloban el mayor número posible de plaquetas pensando en el aporte de las proteínas que en su interior existían. Estas proteínas, como ya se ha comentado aportan señales importantes en el proceso de la cicatrización. Conociendo el comportamiento de los elementos formes y de los fluidos, como es la sangre, se pueden acotar unos parámetros en la centrifugación para decantar las células sanguíneas con mayor peso en el fondo y las de menor peso justo por encima. De esta forma, se consigue que los hematíes que son los de mayor peso se depositen en el fondo del recipiente, a continuación la serie blanca, e inmediatamente por encima, las plaquetas, justo antes del suero con la fibrina.

Hasta este momento todos los métodos utilizados para la obtención de este concentrado precisaron gran cantidad de sangre, fundamentalmente el método de plasmaféresis, que necesitaba de una aparatología complicada y de uso exclusivamente hospitalario, haciendo que este fuera poco operativo y solo útil en la cirugía reconstructiva. Otros

métodos más al alcance del clínico precisaban de cetrífugas específicas y de un volumen de sangre que, aunque menor que el necesario para la plasmaféresis, sigue considerándose un volumen excesivo.

La última aportación científica con respecto al plasma fue hecha por Anitua⁸, que describió el plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) como un método ambulatorio que no necesitaba de una complicada instalación ni una gran cantidad de sangre para tener un coágulo rico en plaquetas y por tanto rico en factores de crecimiento. De forma ambulatoria y con una centrifugadora de laboratorio convencional obtenía resultados clínicos muy llamativos.

Este método, por su simplicidad, se hizo muy popular. Consiste en la extracción de sangre mediante venopunción en la flexura del brazo; dicha sangre, que se mezcla en un tubo de ensayo con citrato sódico para evitar su coagulación, se centrifuga a una velocidad y tiempos determinados, de forma que se separan, como en los procedimientos anteriores, los elementos formes más pesados de los más ligeros, para su posterior decantación. Una vez conseguida la decantación de los elementos formes, con la ayuda de unas pipetas de laboratorio, se extraen del tubo original las fracciones de plasma con menor concentración en plaquetas, aspirando desde la superficie, hasta llegar a la zona del plasma con mayor concentración de plaquetas, inmediatamente por encima de la serie roja⁹.

Los usos del plasma con plaquetas son muchos y variados, aunque para algunos autores claramente discutidos¹⁰.

Existen varios trabajos que hablan de la utilidad del plasma en regeneración ósea^{11, 12, 13}, cicatrización de heridas cutáneas¹⁴ y en traumatología¹⁵, tanto en aceleración de la curación de lesiones musculares¹⁶, tendinosas y articulares¹⁷. También se utilizan en cirugía oftalmológica en las intervenciones del limbo o de la córnea^{18, 19, 20}, en cirugía cardiopulmonar para evitar el sangrado y la pérdida de aire en lobotomías pulmonares²¹, en Cirugía maxilofacial^{22, 23, 24} y en Odontología^{25, 26}.

Una de las últimas formas de aprovechar las cualidades del concentrado en plaquetas, es su aplicación al campo de las células madre, una de las líneas de la regeneración con más futuro. Se está utilizando como vehículo y alimento de las mismas, de forma que aumente la supervivencia a la hora de utilizar las colonias celulares²⁷.

También existen trabajos que vislumbran los posibles efectos secundarios que podrían aparecer por el uso indiscriminado del plasma con plaquetas y que aportan un punto de vista diferente a la mayoría de los artículos publicados al respecto^{28, 29}.

Una de las posibles causas de la controversia sobre la eficacia del plasma con plaquetas es la existencia de las proteínas activas resultantes en el coágulo, que depende de la fiabilidad del operador, sobre todo en las técnicas ambulatorias que precisan una gran intervención humana y, por tanto, una manipulación dependiente del operador³⁰.

Por estos motivos, creemos que está justificada la descripción de una técnica de obtención de plasma rico en plaquetas que pueda aclarar algo más en el campo de la regeneración, ya que, al parecer, en los últimos años han decaído los trabajos que justifican su utilización en la regeneración tisular y en la cirugía reconstructiva.

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Las plaquetas son pequeños fragmentos celulares adaptados o cualificados para adherirse a los vasos sanguíneos lesionados, agregándose entre sí con gran facilidad lo que favorece el taponamiento de los defectos de los vasos. Son capaces de formar ese tapón y de cambiar su citoesqueleto incluso en condiciones adversas.

También actúan como almacén de una gran variedad de moléculas, que, como se ha explicado anteriormente, intervienen en la cicatrización. Estas moléculas que se encuentran en los gránulos alfa y en el citoplasma son liberados en el momento en el que las plaquetas se activan y cambian su morfología; pierden su morfología discoide y sus organelos se redistribuyen. Los microtúbulos forman un disco en la periferia y se acompaña con una degranulación de los gránulos alfa al conectarse al sistema canalicular.

Las moléculas que se liberan son proteínas como el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), el beta transformador (BTGF), el factor de crecimiento vascular (VGF), el de los fibroblastos (FGF) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF).

De todos ellos, los que más intervienen en la cicatrización probablemente son BTGF, IGF, PDGF y VGF como describe Lynch en sus trabajos^{31, 32, 33, 34, 35}.

Se dispone de diferentes métodos para obtener plaquetas. Dentro de estos, podemos considerar que existen tres grandes grupos.

El primero requiere maquinaria sofisticada, es un método aceptado por la comunidad científica internacional ya que está automatizado y cerrado. Este es el de la aféresis plasmática que sólo se realiza en ambiente hospitalario ya que es inútil en clínica ambulatoria, pues no está permitido el transporte de hemoderivados³⁶. En el caso de aislar las plaquetas se denomina plaquetoféresis. Es un método en el que los hematólogos las aíslan para su posterior transfusión a pacientes con problemas sanguíneos importantes que precisan de plaquetas. Suelen utilizar sangre de donantes tras comprobar su factor RH y grupo sanguíneo en pacientes compatibles con dichos concentrados de plaquetas. El proceso dura en torno a 90 minutos en los que el separador celular procesa entre 400 y 500 ml. de sangre del donante, obteniendo unos 200 ml de volumen de concentrado con una concentración plaquetaria de $3,5 \times 10^{11}$ y menos de 0,5 ml. de hematíes. El principio físico que utilizan es el de gradiente de peso en una centrífuga. Según el peso de los elementos formes de la sangre, la fuerza

centrífuga desplaza hacia el exterior de la circunferencia los más pesados. Se puede ver dicho dispositivo en la figura 1.



Fig. 1. Aparato de plaquetoféresis

El segundo grupo de procedimientos existentes se basan en el mismo principio. Utilizan maquinaria cara y específica de centrifugación considerándose sistemas cerrados. Entre ellos se puede describir el sistema Platelet Concentrate Collection System® PCCS^{37, 38, 39}. Se puede ver dicha centrífuga en la figura 2.



Fig. 2. Collection System® PCCS.

Este sistema necesita un mínimo de 50 centímetros cúbicos de sangre que se extraen al paciente con una jeringa impregnada con anticoagulante (citrato sódico). Esta sangre se trasvasa a un recipiente especial bicameral flexible que se centrifugará durante 3,45 minutos a 3000 revoluciones por minuto (rpm). Previamente se habrá pesado el contenido de dicha bolsa para poner un inserto a modo de contrapeso de agua, que equilibre el rotor de la centrífuga de la casa comercial. Tras el primer centrifugado se separa el suero de la fase roja abriendo la comunicación entre ambas cámaras de la bolsa e insuflando aire en la cámara principal de forma que el suero se trasvase a la segunda cámara. Una vez hecho esto, se cerrará la comunicación entre dichas cámaras y se volverá a centrifugar esta vez a 3000 revoluciones por minuto durante 13 minutos. Pasados los 13 minutos se extrae plasma pobre en plaquetas inyectando de nuevo aire en la cámara que contiene el suero y dejando en su fondo el plasma rico en plaquetas que vendrá a ocupar aproximadamente entre 5 y 7 mililitros (ml). Este concentrado se extrae con una jeringa de 10 centímetros cúbicos (cc) y se puede mezclar o no con algún tipo de injerto y activarlo con trombina y cloruro cálcico.

El Haverst Smart Prep System®^{39, 40} se basa en el mismo principio de doble centrifugado con la misma cantidad de sangre y recipientes parecidos aunque de diseño distinto. La evolución de este sistema se llama Synphony II (figura 3).



Fig. 3. Synphony II.

La extracción de sangre se realiza también con jeringa, depositándose la sangre en el recipiente rígido bicameral de la casa comercial. Lo diferencia del anterior que tiene un solo programa, pero no necesita intervención por parte del operador. Dicho programa dura 14 minutos; durante este tiempo la máquina de forma automática realiza un primer centrifugado, para e inclina el recipiente de forma que el suero pasa a la segunda cámara tras lo cual comienza el segundo centrifugado para concentrar las plaquetas. Finalizado el tiempo se saca el recipiente y con la ayuda de una jeringa se extrae el concentrado en plaquetas que será aproximadamente de unos 7 ml.

Otro sistema, Vivostat PRF^{®39} (figura 4), utiliza 120 cc. de sangre e incorpora un sistema automático que por centrifugación también separa el concentrado en factores de crecimiento que además tienen la peculiaridad de poderse aplicar directamente en forma de espray.



Fig. 4. Vivostat PRF[®]

El tercer grupo de métodos son los que utilizan tubos de ensayo. No precisan alto volumen sanguíneo; se extraen tantos tubos de sangre como concentrado final se necesite. Por el contrario, tienen el inconveniente de que son sistemas en los que el operador necesita estar bien adiestrado para obtener unos resultados óptimos y, además, son sistemas abiertos expuestos a contaminación.

Existen varios trabajos comparando los resultados de diferentes métodos^{40, 41, 42, 43, 44}. En éstos se compara fundamentalmente el rendimiento a la hora de la obtención del número de plaquetas e incluso, en algunos, la determinación de factores de crecimiento, pero, en la mayoría no se habla de la funcionalidad de esas plaquetas o del momento de la activación de las mismas, lo que es un factor determinante para realizar su función. De todas formas, la mayoría de los artículos y estudios realizados han sido sobre su eficacia clínica en la regeneración ósea.

Fernández Barbero y col⁴⁵ en 2006, realizaron citometría de flujo y microscopía electrónica para ver las características morfológicas de las plaquetas en concentrados plaquetarios y para saber el estado de las mismas tras su manipulación y por tanto, su utilidad como transportadoras de factores de crecimiento.

Lo ideal sería disponer de un método que aunara las ventajas de unos y otros sistemas; obtener un plasma rico en plaquetas sin necesidad de un gran volumen de sangre si no fuese imprescindible para la técnica, y que el proceso se pudiera considerar un método cerrado en el que la intervención del operador no fuese definitiva para tener buenos resultados.

El primer paso para la evaluación de un método sería verificar la validez del sistema en concentración tanto en el número de plaquetas como en los principales factores de crecimiento, ya que esta puede ser la causa de que los resultados clínicos sean tan diversos dependiendo del autor, dado que no todos están de acuerdo en la utilidad del plasma rico en plaquetas. Everts^{46, 47} comenta la importancia, al comparar tres métodos diferentes, de que la obtención de mayor concentración de factores de crecimiento se consigue cuanto menos se activen las plaquetas en el proceso, conclusión a la que también se refieren Vassallo⁴⁸ y Skripchenko⁴⁹ en su estudio de comparación entre métodos de preparación de concentrado en plaquetas.

Otro factor que influye en las propiedades del PRP es el hematocrito inicial de la muestra, como describe Andrade⁵⁰.

De esta forma los objetivos planteados son los siguientes:

1. Obtener un nuevo sistema cerrado en que la sangre no se exponga al medio externo hasta el momento de su utilización.
2. Comprobar que éste proporcione la suficiente concentración de plaquetas y factores de crecimiento para su uso en la regeneración.
3. Verificar que no active o fragmente las plaquetas por su manipulación y las mantenga íntegras hasta el momento de su utilización.

3. INTRODUCCIÓN

Las plaquetas son pequeños fragmentos celulares del megacariocito adaptados para adherirse a los vasos sanguíneos lesionados, agregarse unas con otras y facilitar la generación de trombina. Estas acciones contribuyen a la hemostasia mediante la formación de un tapón de plaquetas y el afianzamiento posterior del mismo por la acción de la trombina que convierte el fibrinógeno en fibrina. Para llevar a cabo estas tareas las plaquetas tienen receptores de superficie que pueden unirse a glucoproteínas (GP) de adhesión; entre éstos receptores se encuentran el complejo GPIb/IX/V que ayuda a la adhesión plaquetaria al unirse al factor von Willebrand incluso bajo condiciones de gran turbulencia, y el receptor GPIIb/IIIa que es específico de las plaquetas y media en la agregación plaquetaria al unirse al fibrinógeno y/o al factor von Willebrand. Otros receptores de las glucoproteínas de adhesión (GPIa/IIa, GPVI y GP65 para el colágeno, GPIc*/IIa para la fibronectina y GPIc/IIa para la laminina) también intervienen en la adhesión plaquetaria, pero sus contribuciones exactas están menos definidas. Las plaquetas activadas muestran P-selectina en la superficie, que interviene en las interacciones con los leucocitos. La actividad coagulante plaquetaria resulta de la exposición de los fosfolípidos cargados negativamente en la superficie de las plaquetas y de las micropartículas plaquetarias junto con la liberación y activación del factor V plaquetario y, posiblemente, de la exposición de los receptores específicos para los factores de coagulación activados.

Las plaquetas cambian de forma con la activación debido a modificaciones complejas en el esqueleto y citoesqueleto de su membrana. Con la activación experimentan la liberación de los gránulos, cuerpos densos y del contenido de los lisosomas. El proceso de activación implica un número de receptores para agonistas como ADP, epinefrina, trombina, colágeno, tromboxano A₂ y factor activador de plaquetas, así como diferentes rutas de señales de tránsito, que incluyen el metabolismo del fosfoinositol, la liberación y conversión del ácido araquidónico en tromboxano A₂ y la fosforilación de una serie de diferentes proteínas. El aumento de calcio intracelular es el resultado de la activación plaquetaria y además contribuye a ella. La activación plaquetaria provoca un cambio en la conformación del receptor GPIIb/IIIa dando lugar a la unión de un ligando de alta afinidad y a la agregación plaquetaria.

Las plaquetas también actúan como almacenes de las moléculas que afectan a la función plaquetaria, inflamación, tono vascular, fibrinólisis y cicatrización de las

heridas; estos agentes son liberados con la activación plaquetaria. Otras sustancias vasoactivas de las plaquetas son sintetizadas cuando éstas son activadas. Mediante las interacciones bioquímicas cooperativas pueden comunicarse con otras células de la sangre y con células endoteliales y ser afectadas por ellas.

Empleando las tinciones adecuadas, mediante el microscopio óptico las plaquetas se ven como pequeños corpúsculos gris-azulados, ovalados o redondos con varios gránulos púrpura. El diámetro medio varía en los diferentes individuos, oscilando entre 1,5 y 3 micras aproximadamente, es decir, entre un tercio y un cuarto del tamaño de los glóbulos rojos. También hay una variabilidad considerable en el tamaño de las plaquetas de un mismo individuo.

Estudiadas mediante el microscopio electrónico de barrido presentan una superficie borrosa (glicocalix). Las plaquetas son modelo en el campo eléctrico, como si tuviesen una carga negativa. Parece ser que esta propiedad les sirve para evitar que se unan unas a otras. La superficie presenta una serie de indentaciones que se cree que corresponden a las aperturas del sistema canalicular.

Al microscopio electrónico de transmisión presentan numerosos gránulos en su interior. El contenido de estos se puede liberar al exterior por canaliculos cuando se unen entre ellos.

ESTRUCTURA.

La membrana plasmática es una unidad trilaminar compuesta por una bicapa de fosfolípidos en la que están embebidos el colesterol, los glucolípidos y las glucoproteínas.

Elementos del citoesqueleto: está compuesto por el citoesqueleto de la membrana, microtúbulos y microfilamentos.

Organelos.

Peroxisomas: se piensa que contribuyen al metabolismo lipídico.

Mitocondrias: implicadas en el metabolismo de la energía oxidativa.

Lisosomas: contienen hidrolasas típicas de las plaquetas. Su detección en la membrana plasmática sirve como marcador de la reacción de la secreción plaquetaria.

Cuerpos densos: contienen elevadas concentraciones de serotonina. La membrana de estos cuerpos densos es igual que la membrana plaquetaria y la de los gránulos alfa.

Gránulos alfa: aproximadamente entre 50-80 por plaqueta, son los gránulos más abundantes en estas. Tienen entre 200 y 400 nanómetros de diámetro en la sección transversal y muestran una variación interna en la densidad electrónica, con un área excéntrica de densidad electrónica acentuada denominada nucleoide. Contienen unas proteínas que intervienen en la adhesión plaquetaria y ayudan al factor von Willebrand. También contienen otras proteínas con diferentes funciones como son fundamentalmente el factor de crecimiento derivado de las plaquetas, el factor de crecimiento de las células endoteliales, el factor de crecimiento del endotelio vascular, el factor de crecimiento epidérmico y el factor beta transformador del crecimiento. Los gránulos alfa se forman durante la maduración del megacariocito. La síntesis de sus elementos tiene lugar en la red del retículo endoplásmico y el aparato de Golgi del megacariocito⁵¹.

3.1. FISIOLÓGÍA DE LAS PLAQUETAS.

El sistema hemostático está sometido a mecanismos complicados de control para que la respuesta no sea inadecuada, bien por una respuesta hemorrágica o bien por la producción de un trombo por un estímulo insignificante.

La función principal de las plaquetas es sellar las aperturas en el árbol vascular. Por tanto, es adecuado que la señal de inicio para que se produzca el depósito y la activación plaquetaria sea la exposición de las partes subyacentes de la pared del vaso sanguíneo, manteniéndose separadas las plaquetas circulantes mientras exista un revestimiento endotelial intacto. Otros parámetros que probablemente controlan la respuesta plaquetaria son:

- 1) Profundidad de la lesión.

- 2) Lecho vascular.
- 3) Edad del individuo.
- 4) Número de glóbulos rojos; si es elevado desplazan a las plaquetas y favorecen su interacción.
- 5) Velocidad del flujo sanguíneo y tamaño del vaso.

La respuesta vasoespástica que acompaña a una lesión vascular probablemente contribuye a que las plaquetas, mediante la liberación de tromboxano A₂ y serotonina, tengan un papel clave en la disminución de la hemorragia. Además, facilita el depósito plaquetario a través de su efecto en el flujo sanguíneo.

La velocidad del flujo afecta directamente a la adhesión en su superficie; esta respuesta, dependiente del factor von Willebrand, es más importante con velocidades de flujo mayores, probablemente debido a que estas producen cambios de conformación en el factor von Willebrand y/o en el GPIIb. Una velocidad de flujo muy alta puede determinar que las plaquetas se agreguen a través de un mecanismo que implica una unión de factor von Willebrand a la GPIIb/IX seguido de la activación de la GPIIb/IIIa.

Varios factores inhibidores sirven para equilibrar la activación plaquetaria y prevenir el depósito excesivo de plaquetas. Entre estos inhibidores están la prostaciclina y el óxido nítrico que son sintetizados por las células endoteliales.

Activación plaquetaria.

En el momento en que las plaquetas detectan cualquiera de los anteriores factores (adhesión, trombina, tromboxano A₂, ADP, epinefrina, serotonina, vasopresina, trombospodina, factor von Willebrand, fibrinógeno, factor de agregación plaquetario, complejos inmunes o el flujo sanguíneo) se produce su activación en diferente medida. Dependiendo de qué factor actúe y en qué concentración lo haga, primero se produce un cambio morfológico en la plaqueta y luego una liberación de citoquinas o solamente una activación incompleta. Este mecanismo está estudiado y comprobado tanto mediante técnicas inmunohistoquímicas como por microscopía electrónica. Se puede demostrar mediante marcadores por el método ELISA de antígenos como el CD61+ CD41a+ CD42b+⁵². Estos fenómenos tienen una correlación morfológica que se aprecia en microscopía electrónica en la superficie de la membrana plasmática. Estos cambios

se analizan mediante el llamado factor de forma (FF form factor) que calcula la relación entre el perímetro de la plaqueta antes y el perímetro de la plaqueta después de la activación al formarse proyecciones (pseudópodos). Para ello se emplea la fórmula $FF=4\pi \times \text{área}/\text{perimetro}^2$ (fórmula de Crofton⁴⁹); los valores varían entre 0 y 1, siendo 1 la forma discoide ideal.

Secreción plaquetaria.

Se considera probable que el mecanismo contráctil que afecta a la actina y a la miosina intervenga en la secreción granular y la retracción del coágulo. Los detalles de este mecanismo continúan siendo desconocidos. Después del cambio de forma inicial de las plaquetas la actina se organiza centralmente en gruesas masas filamentosas donde probablemente se asocia con filamentos de miosina⁵³. Parece que la respuesta contráctil se inicia por un aumento en el calcio-calmodulina que a continuación activa la quinasa de la cadena ligera de la miosina, la fosfatasa y la quinasa A, dependiente de AMPc, que pueden modular la respuesta. La centralización de los organelos en un anillo central se correlaciona con la secreción. Sin embargo, existe controversia sobre si las plaquetas secretan el contenido de sus gránulos por la fusión con el sistema canalicular abierto en su centro o por la fusión directa con la membrana plasmática⁵⁰.

Se ha propuesto un modelo de dos pasos para la secreción granular en el que el primero es la aproximación de los gránulos a la cara interna de la membrana plasmática y el segundo la fusión de las bicapas lipídicas. Se piensa que este proceso de aproximación implica a pequeñas GTPasas como el r3 que es fosforilada al activarse la plaqueta. Existe la hipótesis de que el r3 forma complejos con el receptor proteico, factor soluble sensitivo n-ethylamida (SNARE) presente en el gránulo y en la membrana plasmática, incluyendo las syntaxinas 2 y 4, lo que da lugar al complejo de aproximación 7s.

Actualmente también se baraja la posibilidad de que la secreción de las plaquetas sea igual que la de las neuronas en relación a lo que se llama el mecanismo SNARE. Esto contradice lo postulado anteriormente⁵⁴. Esta hipótesis se basa en la composición de tres componentes: t-SNARE, v-SNARE y el componente soluble SNAP/NSF. Se ha demostrado mediante marcadores que tanto el SNARE como la syntaxina 2 intervienen en la secreción de los gránulos plaquetarios⁵⁵. Posteriormente también se ha visto que la syntaxina 4⁵⁶ interviene liberando el contenido, primero de los gránulos alfa y

gránulos densos y posteriormente el contenido de los lisosomas. Esta fusión consta de tres periodos: acoplamiento, unión y fusión. El acoplamiento consiste en la aposición de los gránulos a la cara interna de la membrana plasmática, donde son reconocidos por receptores complementarios. Este proceso requiere de una cierta energía y es catalizado por una proteína, la proteína sensitiva de fusión N-etilamida (NSF) con actividad ATP-asa. Como ya se ha comentado, también intervienen las proteínas solubles asociadas a NSF (SNAP) caracterizando a los receptores de membrana denominados SNARE. Estos SNARE pueden ser el blanco de membrana (t-SNARE) o de las vesículas (v-SNARE). Además, con la ayuda de las proteínas asociadas a las vesículas (VAMP), realizan la fusión y la exocitosis del complejo de los gránulos⁴⁸ (figura 5).

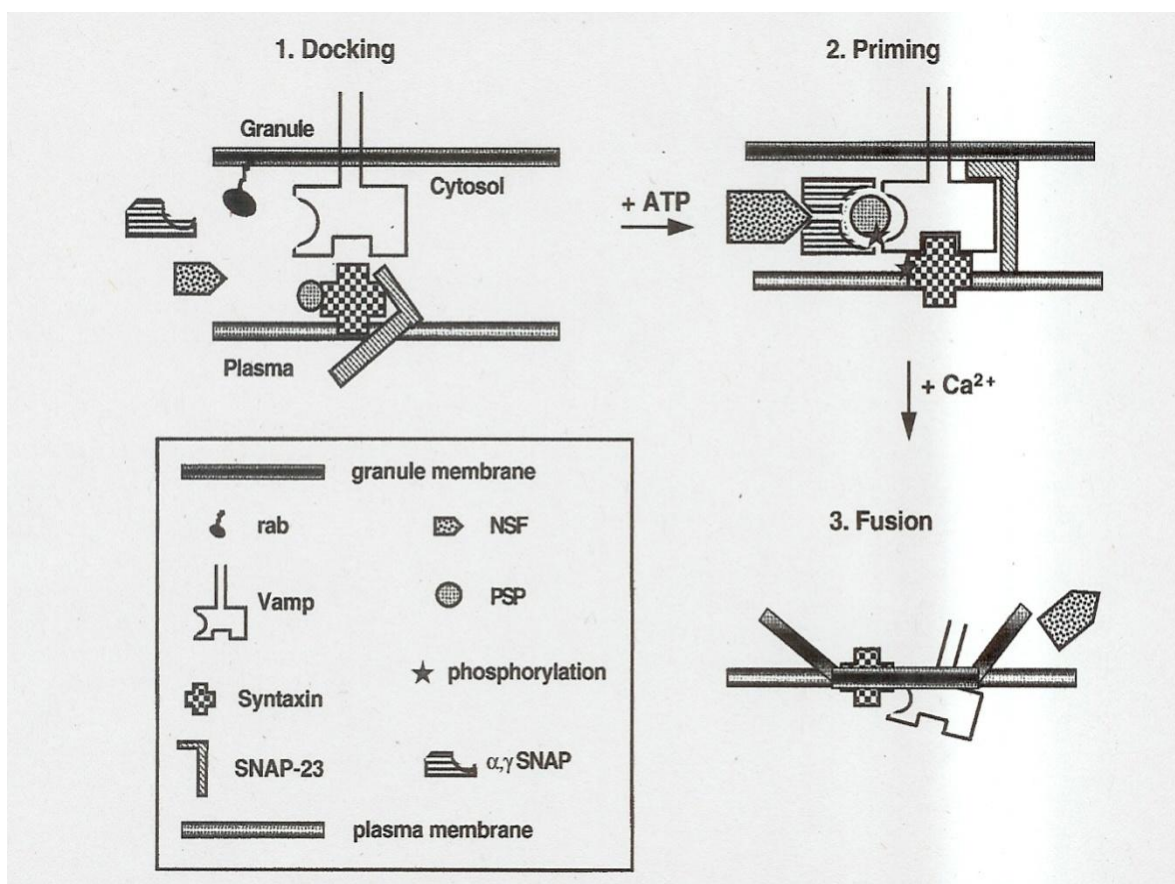


Fig. 5. Tomado de Rendu y col. Mecanismo de acción por el cual los gránulos se unen a la membrana plaquetaria para liberar su contenido. Platelets (2001) 26.

Una vez explicado cual es el mecanismo de activación y liberación de las plaquetas se describirá la función de los factores de crecimiento liberados por los gránulos alfa revisados en este estudio.

Factor de crecimiento derivado de las plaquetas.

Es una proteína que ha sido estudiada ampliamente. Existen dos diferentes polipéptidos que son homólogos en un 56%. Se han encontrado al menos tres formas de este factor de crecimiento derivado de las plaquetas, el AA, BB y AB. También hay dos receptores distintos para el factor de crecimiento derivado de las plaquetas: el receptor alfa para el AA, BB y AB y el receptor Beta para BB y AB.

La diferente capacidad de las células para unirse a un tipo de factor de crecimiento derivado de las plaquetas depende de la presencia de uno de estos tipos de receptores^{57, 58}. Además de encontrarse en los gránulos alfa de las plaquetas se pueden encontrar en macrófagos, células endoteliales, monocitos, fibroblastos y en la matriz ósea⁵⁴.

Entre sus acciones biológicas se encuentran:

- Participación en la glucogenogénesis.
- Regulación del crecimiento y diferenciación celular en el sistema nervioso central durante su desarrollo.
- Favorece la cicatrización interviniendo en la reparación tisular al inducir la litogénesis y estimula la angiogénesis al aumentar la mitosis endotelial.
- Favorece la producción de matriz extracelular y la quimiotaxis de fibroblastos, monocitos, células musculares y macrófagos. También estimula la fagocitosis en los neutrófilos y monocitos⁵⁹.
- Estimula la producción de fibronectina utilizada durante la proliferación y migración celular en la cicatrización.

Tras su liberación actúa como una cerradura de doble llave⁶⁰; no basta con que el factor de crecimiento se una al receptor para desencadenar su cometido, sino que es necesario además que este se una a un sustrato de adhesión molecular que a su vez tiene un receptor simétrico para que intervenga el segundo mensajero. Este actúa sobre el ADN mitocondrial o nucleicoide que induce la manifestación de los genes específicos.

Estos genes desencadenarán los procesos de adhesión intercelular, migración, proliferación y diferenciación y estimularán la síntesis y secreción de proteínas.

Para que esto ocurra se tiene que inducir la activación de la quinasa. La quinasa activada es visualizada por una tirosina fosforilada del receptor molecular; es lo que se conoce como autofosforilación. Este proceso tiene como propósitos el control de la actividad de la quinasa y la creación de uniones para la transducción de la señal molecular. Una vez realizado el mismo se activan numerosos factores desencadenantes de la interacción con el ADN y, como se ha mencionado, se genera el proceso para la cicatrización⁶¹.

Se ha comprobado en estudios con animales de experimentación que el PDGF aplicado a la superficie radicular de perros tras un buen desbridamiento favorece la proliferación de fibroblastos en la cicatrización temprana del ligamento sin la necesidad de usar membranas como barrera. Esta afirmación se basa en el análisis mediante autorradiografía⁶².

Otros animales estudiados fueron los monos *macca fascicularis* a los que también se les aplicó PDGF-BB e insuinelike en regeneración periodontal. Esta regeneración se midió con histomorfometría⁶³.

Factor de crecimiento beta transformador.

Pertenece a la familia de las proteínas morfogenéticas. Es un dímero formado por dos subdímeros de 112 aminoácidos que provienen de un precursor de 391 aminoácidos. Se han descrito tres tipos diferentes: el beta 1 que se encuentra en las plaquetas, el beta 2 que se puede encontrar en extractos óseos y, por último, el beta 3 o 1.2 que son heterodímeros^{56, 64}.

Sus funciones conocidas son:

- Inhibición de la síntesis de esteroides adrenales.
- Transformación fenotípica de fibroblastos.
- Regulación de la embriogénesis y de la diferenciación.
- Inhibición de la proliferación de células mesenquimales, epiteliales y endoteliales.
- Estimulación de la proliferación de células mesenquimales y endoteliales.

- Control de las interacciones de la matriz extracelular.
- Inmunosupresión.
- Control de la acción y biosíntesis de la hormona folículo estimulante.

Factor de crecimiento semejante a la insulina.

Se llama así por su gran similitud en composición con la insulina. Está formada por dos tipos fundamentales de 70 y 67 aminoácidos que se llaman I y II respectivamente. Existen dos receptores celulares correspondientes a cada uno de estos dos tipos de proteína.

Entre sus funciones se pueden destacar:

- Estimular la síntesis de la matriz ósea, diferenciando a los osteoblastos y replicando células osteoprogenitoras.
- Es mitogénica y quimiotáctica de células. Es estimuladora del glucógeno hepático.
- Presenta una gran sinergia con el factor de crecimiento derivado de las plaquetas.

Factor de crecimiento vascular.

Proteína hemodimérica en un 24% igual al factor de crecimiento derivado de las plaquetas, aunque utiliza diferentes receptores celulares.

Sus funciones son la mitogénesis de células endoteliales y, por tanto, una acción angiogénica.

Estas proteínas intervienen en la cicatrización como se describirá a continuación.

CICATRIZACIÓN.

La cicatrización consiste básicamente en eliminar los tejidos dañados y restablecer la normalidad del órgano tanto anatómica como funcional. Consta de tres etapas:

- Controlar la vasodilatación y el aumento de la permeabilidad vascular.

- Eliminar completamente el exudado inflamatorio y las células muertas.
- Regenerar las células del tejido lesionado.

Existe otra clasificación en tres fases que serían fase catabólica, anabólica y contracción de la herida.

1. Fase catabólica.

Desde el momento del traumatismo hasta el sexto día. En esta fase se intenta limpiar la herida eliminando los cuerpos extraños, restos necróticos, derrames, exudados y bacterias que hayan podido contaminar la herida. Esta función detergente se realiza por el poder enzimático local. Se podrían diferenciar dentro de esta fase dos distintas:

1.1. Periodo inflamatorio postraumático: en toda herida se pueden diferenciar dos zonas claras, una central o intraincisional, donde se encuentran todos los residuos, y otra excéntrica o periincisional⁶⁵. En la zona central se produce un coágulo de fibrina formado por la sangre extravasada que dará estabilidad y estanqueidad a la herida además de retener un gran número de plaquetas.

En la zona periférica, en la que los vasos no se han dañado, empieza el proceso inflamatorio. De la zona central llegan señales de las quininas liberadas de los factores de complemento y del factor XII de Hageman que interviene en la coagulación favoreciendo la hemostasia. También existen otros factores derivados de la destrucción celular como las prostaglandinas del grupo E, histamina y productos lisosómicos. Esto provoca la producción de productos flogógenos que como resultado final generan los clásicos fenómenos de la inflamación, vasodilatación arteriolar, aumento de la permeabilidad capilar, exudación y plasmaféresis. Se establecen así cambios bioquímicos en la herida con aumento de la albúmina, y alfa-globulinas, incrementando el porcentaje hídrico electrolítico así como del fibrinógeno y glucoproteínas. La degradación de las macromoléculas de conectivo provoca un acúmulo de hexosaminas, polipéptidos, aminoácidos, albumosas y peptonas, muchos de los cuales poseen grupos sulfatados que posteriormente se utilizarán para la síntesis de glucosaminoglicanos.

El éstasis produce una hipoxia relativa con un pH en torno a 6,22 que se traduce en un metabolismo anaerobio con la subsiguiente producción de ácido láctico e hidrogeniones libres.

1.2. Periodo destructivo. Corresponde a los fenómenos celulares de una reacción inflamatoria y llega hasta el sexto día. Los responsables son los fagocitos (leucocitos, polimorfonucleares y monocitos), que se desplazan por el quimiotactismo, estimulados por las citoquinas y el factor 2 del complemento fundamentalmente. De esta forma, se limpia la zona de residuos. Son fases que se relacionan en el tiempo y la actuación y no son situaciones aisladas la una de la otra.

2. Fase anabólica.

Los fibroblastos aparecen antes de que acabe la fase catabólica por lo que se superponen ambas fases. Esta fase es fundamental para la cicatrización llegando hasta el decimocuarto día desde la aparición de la lesión. Se pueden diferenciar varios periodos:

2.1. Periodo proliferativo. Se extiende desde el tercero al decimocuarto día y consume gran cantidad de energía. En él ocurren dos hechos muy relevantes, la neovascularización e infiltración de fibroblastos.

2.2. Neovascularización. La hipoxia relativa, la despolimerización del tejido conectivo y el aumento de la presión hidrostática capilar secundaria a la vasodilatación son circunstancias desarrolladas en el área central de la herida durante el período de inflamación. En este momento tienen la virtud de estimular la actividad mitótica de las células endoteliales capilares con lo que se configuran cordones celulares que avanzan a una velocidad media de 0,1 a 0,6 milímetros al día y se introducen de manera progresiva en la zona lesionada. Así se originan los capilares que como auténticos ejes tróficos van a aportar el oxígeno y la energía necesaria para toda la actividad de síntesis de las células. Este crecimiento se hace siguiendo la dirección de las fibras de la red de fibrina presente en la herida. Además, se sabe que las células endoteliales poseen en su citoplasma un activador del plasminógeno capaz de poner en marcha localmente el mecanismo fibrinolítico de la palsmina, con lo que serían lisadas aquellas fibras que representan un obstáculo al avance del capilar.

2.3. Desarrollo de los fibroblastos. La proliferación de fibroblastos se encuentra muy relacionada con el desarrollo vascular ya que como cualquier célula

necesitan aporte sanguíneo. Los fibroblastos se localizan en zonas con tensiones de oxígeno superiores a 15 milímetros de Hg que son las que no se alejan más de 50 a 80 micras de los capilares. En esta fase los fibroblastos se caracterizan por su alta actividad mitótica y su capacidad de desplazamiento a una velocidad de 0,2 milímetros diarios. Este fenómeno se mantiene hasta el momento en el que los fibroblastos contactan con otras células y se conoce como inhibición por contacto. Es el responsable de frenar el desplazamiento hacia territorios con alta celularidad. Llegado a este punto las células frenan su división y desplazamiento para iniciar otro período.

2.4. Producción de colágeno y sustancia fundamental. En este período comienza la síntesis de colágeno en el interior de los fibroblastos en forma de tropocolágeno. También comienza la síntesis de glucosaminoglicanos en forma de precursor al que se incorporan las bases sulfatadas que posiblemente provengan de detritus generados en la fase inflamatoria, como se mencionó anteriormente.

3. Contracción de la herida.

El tejido conectivo formado avanza desde los márgenes hacia el centro de la herida y una vez la rellena comienza una contracción centrípeta que suele comenzar a las 48-72 horas y terminar a los 21 días. Se piensa que de esta forma se intenta disminuir la cantidad de tejido a reparar^{62, 66, 67}.

ACCIÓN DEL PLASMA RICO EN PLAQUETAS.

El plasma rico en plaquetas (PRP) acelera la cicatrización de los tejidos blandos y el proceso de formación de hueso en el caso en el que lo apliquemos sobre un punto. Como se ha visto, en la primera fase de la cicatrización existe un entramado de fibrina que engloba plaquetas y otras células, como neutrófilos y monocitos, encargadas de proporcionar quimiotaxis, estimulación de la división celular y síntesis de matriz. Si se aporta un mayor número de plaquetas y, por tanto, de estos estímulos, se acelera el proceso de la cicatrización^{64, 68}. La acción de los factores de crecimiento que se liberan

es complicada de explicar ya que pueden provocar diferentes respuestas en un mismo tejido dependiendo a veces de la concentración de dichos factores⁶⁹.

Existen diferentes trabajos que estudian el efecto de los factores de crecimiento liberados por los concentrados de plaquetas a nivel celular tanto in vivo como in vitro.

Uno de ellos intentaba determinar en una primera parte la concentración del factor de crecimiento derivado de las plaquetas BB, del factor de crecimiento beta-1 transformador, del factor de crecimiento vascular y del factor de crecimiento fibroblástico, dependiendo de la concentración de calcio y trombina y, en una segunda parte, la importancia fisiológica de los factores de crecimiento en la nueva formación de vasos. La influencia del calcio la estudiaban aportando diferentes concentraciones al concentrado de plaquetas que luego añadían a un cultivo de células de cordón umbilical humano. El resultado sugería que algunos factores de crecimiento podrían tener acciones sinérgicas y que el aumento de la concentración de calcio o trombina iniciaba inmediatamente la liberación de los factores de crecimiento en el concentrado plaquetario, pero no observaron una correlación entre la concentración específica de factores de crecimiento y el rango de proliferación de células de cordón umbilical.

También se estudió el efecto del concentrado de plaquetas sobre la función de las células óseas. En dicho trabajo se veía la influencia del concentrado de plaquetas sobre las células óseas de hueso de calota de rata. Como resultado del estudio se pudo concretar que el concentrado de plaquetas influía sobre dichas células aumentando la proliferación, la adhesión y su posterior maduración con respecto a los grupos control. También se comprobó que su acción era dependiente de la dosis y que la exposición a corto plazo (24 horas) promueve las funciones de proliferación y quimiotaxis de las células óseas, mientras que la exposición a largo plazo (11 días consecutivos) tiene como resultado un descenso tanto de la actividad de la fosfatasa alcalina como de la formación mineral⁷⁰.

Annunziata⁷¹ presentó el efecto del concentrado de plaquetas sobre las células del ligamento periodontal in vitro. En un cultivo celular con células del ligamento periodontal, fibroblastos gingivales y queratinocitos, se añadía un concentrado de plaquetas; observó un aumento de la división celular y de su función secretora durante las primeras 72 horas, comprobada por la determinación de fosfatasa alcalina y

secreción de colágeno. También se pudo observar que ese efecto era mayor en las células del ligamento periodontal que en los fibroblastos gingivales y marcadamente inferior en los queratinocitos, llegándose a la conclusión de que sería interesante en la cirugía regenerativa.

In vitro se estudió el efecto de diferentes concentraciones de concentrado de plaquetas sobre osteoblastos y fibroblastos⁷². Se cultivaron osteoblastos y fibroblastos humanos sobre los que se aplicaron concentrados de plaquetas en concentraciones de 2.5, 3.5, 4.2 y 5.5. La proliferación celular se cuantificó a las 24 y a las 72 horas. Los resultados más llamativos se obtuvieron a las 72 horas. El máximo efecto lo conseguía la concentración de 2.5; concentraciones mayores podrían causar problemas a la hora de la diferenciación celular, no consiguiendo resultados tan óptimos como con las concentraciones de 2,5.

Kark⁷³ utilizó cultivos de células óseas a las que aplicaba diferentes concentraciones de plasma rico en plaquetas (1:2, 1:4, 1:40, 1:200 y 1:400), obteniendo como resultado que tanto la proliferación como la migración celular se manifestaba más en el grupo de mayor concentración (200%).

En uno de los últimos trabajos, Lindeboom⁷⁴ aplica el concentrado de plaquetas en la cicatrización de la mucosa oral. En dicho estudio se comprobó, mediante luz polarizada lineal, el número de vasos formados en la mucosa oral en pacientes operados de elevación de seno maxilar. El resultado es que en el lado en el que se usaba el concentrado de plaquetas con respecto al otro lado de control (estudio a boca partida) la densidad capilar observada en una semana era mucho mayor. El resultado a las cinco semanas era muy parecido en ambos lados pero demostraron la gran influencia del concentrado de plaquetas para conseguir en un menor tiempo el resultado final.

3.2. SISTEMAS DE OBTENCION DE PRP.

Dentro de los sistemas para la obtención de un concentrado en plaquetas se podría hacer una clasificación atendiendo a la cantidad de sangre necesaria para este fin.

Un primer grupo de métodos comprende aquellos que utilizan una gran cantidad de sangre, aproximadamente 500 ml. Estos métodos son de uso hospitalario, se denominan sistemas de aféresis y son sistemas de ámbito única y exclusivamente hospitalario. El

sistema consiste en la obtención de una vía venosa del paciente a través de la cual se hace pasar la sangre a una centrífuga que por gradiente separa los elementos celulares; posteriormente se reinfunde al paciente tanto el plasma como las células que no se van a utilizar, todo ello en un sistema cerrado y estéril que evita la contaminación. Con este sistema se puede obtener una gran concentración de plaquetas que, además, suele ir acompañada de la serie leucocitaria. La mayoría de los trabajos consultados sobre este sistema intentan buscar una forma de prevenir la acumulación de citoquinas y leucocitos en el concentrado plaquetario³⁸.

Un requisito importante en estos sistemas para obtener concentrado de plaquetas es la conservación de las mismas de forma íntegra pero sin que se activen. Para evitar que la sangre se coagule suelen utilizarse sustancias como el citrato sódico; el EDTA (ácido etilendiamida tetracético) no se recomienda debido a que tiende a fragmentar las plaquetas²⁷. También se han observado los cambios plaquetarios durante su almacenamiento; cuanto mayor es el tiempo de almacenamiento mayor es la probabilidad de que se produzca fragmentación. A las pocas horas de la extracción de sangre se libera el contenido de sus gránulos alfa, lo que hace aconsejable su rápida utilización.

En el segundo gran grupo de métodos de obtención de plasma con plaquetas se utilizan una cantidad de sangre menor y además el sobrante no es reinfundido al paciente. La cantidad que suelen manejar estos sistemas es de 50 a 200 ml, que se obtienen normalmente tras la venopunción de la flexura del codo; con la ayuda de anticoagulantes se colocan en un recipiente para su centrifugación. El anticoagulante que suele utilizarse suele ser citrato sódico o citrato dextrosa en una proporción de seis ml. por cada 60 ml. de sangre. De este tipo de sistemas se podrían señalar fundamentalmente tres modelos:

1. Vivostat PRF preparation Kit®.
2. PCCS platelet concentrate collection system®.
3. Haverst® Smartprep 2APC 60 Process.

1. Vivostat PRF preparation Kit®.

Es un sistema desarrollado por la compañía BIOSER.

Con 120 ml. de sangre del paciente se obtienen 6 ml. de fibrina autóloga más factores de crecimiento. Es un sistema completamente automático en el que se extrae la sangre al paciente anticoagulada con citrato sódico y se deposita en el contenedor específico de la máquina, que a su vez se pone en el interior de la unidad de procesamiento, donde se centrifuga para obtener el concentrado de factores de crecimiento y fibrina, que se pueden dispensar mediante un aplicador especialmente diseñado para su utilización en forma de espray⁷⁵.

2. PCCS platelet concentrate collection system®.

Desarrollado por Biomet 3i implant innovation.

La recogida de sangre se realiza mediante la venopunción con una jeringa de 60 ml. previamente tratada con ADO. Posteriormente se coloca en la bolsa colectora que proporciona el fabricante (figura 6).



Fig. 6. Bolsa colectora del concentrado final.

La muestra se introduce en la centrifugadora y se contrapesa con agua utilizando la misma cantidad de agua que de sangre. Se cierran las válvulas del contenedor y se realiza un primer centrifugado durante 3 minutos y 45 segundos a una velocidad de 3000 revoluciones por minuto. Una vez terminado se realiza la primera manipulación del centrifugado resultante (figura 7), primero mediante la infusión de aire en la cámara del contenedor que contiene la sangre se separan el plasma y los glóbulos rojos colocando una jeringa en una de las válvulas de la bolsa y abriendo la válvula que comunica con la cámara adyacente que conforma el recipiente colector.



Fig. 7. Cámara de la centrifuga.

Al insuflar el aire se separa el plasma en el otro recipiente, se cierran las válvulas y se vuelven a colocar en la centrifuga para realizar esta vez un centrifugado durante 13 minutos. Pasado ese tiempo se vuelve a hacer otra separación en las bolsas del recipiente. De nuevo se introducen mediante la ayuda de una jeringa 35 centímetros cúbicos de aire para separar el plasma pobre en plaquetas (figura 8). El resultado obtenido es de 5 a 7 ml. de concentrado en plaquetas que se podrán extraer con la ayuda de una jeringa para su posterior utilización (figura 6).

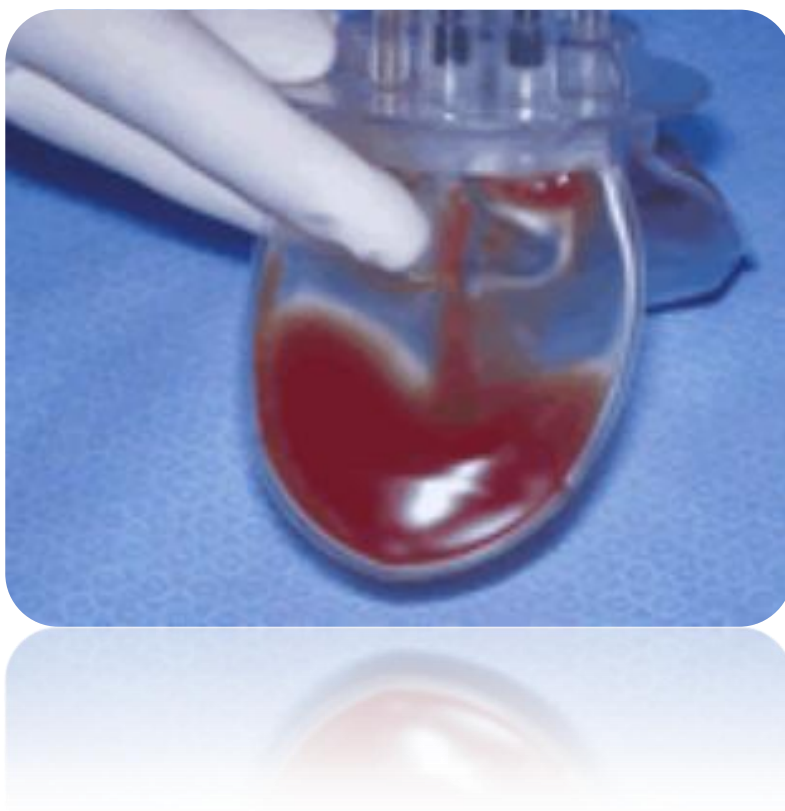


Fig. 8. Bolsa colectora con la resuspensión de plaquetas.

3. Haverst® Smartprep 2APC 60 Process (ahora Synphony-II).

Comercializado por la casa Johnson and Johnson.

En este sistema se utilizan también entre 50 y 60 ml. de sangre del paciente previamente anticoagulada con citrato sódico. El recipiente diseñado por la marca (figura 9) contiene dos departamentos, introduciendo la sangre en el más grande de ellos; colocaremos dicho recipiente en la centrífuga y se contrapesará con agua para realizar la centrifugación durante 14 minutos (figura 10).



Fig. 9. Desechables del sistema Synphony.



Fig. 10. Centrifuga de Synphony.

El tercer gran grupo de sistemas de obtención de plasma con plaquetas son aquéllos que utilizan una cantidad inferior a 50 centímetros cúbicos. Entre estos cabe describir los ss:

1. El sistema PRGF System II. BTI®.
2. Curasan system®.
3. Sistema descrito por Dr Sonnleitner.
4. Sistema del Dr. Gonsord.
5. Fibrinet® Autologus Fibrin et platelet System.
6. Plateltex®.
7. Friadent-Schützer®.
8. PDGF 90-1.
9. Plaquetar®.

1. PRGF System II. BTI®

La cantidad de sangre necesaria oscila entre 10 y 40 centímetros cúbicos (cc) dependiendo de las necesidades clínicas. Se realiza la extracción mediante venopunción en tubos estériles de 5 cc. con citrato sódico al 3,8% lo que hace necesarios entre 2 y 8 tubos, siempre pares para equilibrar la centrífuga, dependiendo de la cantidad de sangre que extraigamos. El centrifugado se realizará durante ocho minutos a 1800 revoluciones por minuto con la centrífuga de la propia marca. Del centrifugado resultante en los tubos aparecerán dos fases claramente diferenciadas, una con la fase roja y, otra por encima, con el suero. Con la ayuda de las pipetas se irán extrayendo de 500 µl. en 500 µl. hasta llegar a la última fracción que es la que mayor concentración de plaquetas obtiene. Para activar el coágulo se utiliza cloruro cálcico al 10% en una proporción de 50µl. por cada 1000 µl. de suero (manual del fabricante).

2. Curasan system®.

Consiste en una centrifuga convencional de laboratorio (Heraeus labofuge 300) en la que se utilizan tubos citratados de 8,5ml. que se centrifugan primero a 2400 revoluciones por minuto durante 10 minutos; posteriormente se separan los hematíes y se vuelve a centrifugar a 3600 revoluciones por minuto durante 15 minutos obteniendo un pellet de plaquetas en el fondo del tubo⁷⁶.

3. Fibrinet® Autologus Fibrin et platelet System.

El sistema dispone de una centrífuga propia y de tubos de 9 ml. citratados en los que se recolecta la sangre (figura 11). Esta se centrifuga una primera vez durante 6 minutos a 1100 g para separar la fase roja, que se mantiene separada del suero gracias a un gel que también porta el tubo y que separa los elementos más pesados (glóbulos rojos) del suero. El suero resultante se centrifuga de nuevo durante 15 minutos a 1450 g con cloruro cálcico para obtener unos 2 centímetros cúbicos de una malla rica en plaquetas (manual del fabricante).



Fig. 11. Desechables de Fibrinet.

4. Sistema descrito por Sonleitner.

Utiliza tubos con citrato sódico de 6 ml. La centrifugación se realiza durante 20 minutos a 160 g. Tras éste primer centrifugado que separa toda la fracción de plasma se realiza una segunda centrifugación durante 15 minutos a 400 g obteniéndose aproximadamente 0,5 ml de concentrado en plaquetas⁷⁷.

5. Sistema de Gonshor.

Utiliza tubos de 10 ml. anticoagulados con citrato. Se realiza una primera centrifugación a 1300 revoluciones por minuto (160g) durante 10 minutos. Del resultante se extrae todo el suero sobrenadante y, en otro tubo, se hace otro centrifugado a 2000 revoluciones por minuto (400g) durante 10 minutos obteniéndose de nuevo dos fases, un suero pobre en plaquetas y un depósito rico en plaquetas en el fondo del tubo. Este último se separa con la jeringa y una aguja larga pudiéndose mezclar con injertos o utilizar solo tras su activación⁴³.

6. Plateltex®.

Utiliza tubos de 8 centímetros cúbicos citratados que se centrifugan durante 10 minutos a 180g. El procesado del centrifugado se realiza igual que en los métodos anteriores. La característica del sistema es la coagulación de la muestra con Batroxobin añadido a gluconato cálcico⁷⁸.

7. Friadent-Schützer®.

Utiliza tubos de 8 centímetros cúbicos con citrato que se centrifugan en una Heraeus Labofuge 300 a 2400 revoluciones por minuto durante 10 minutos. El centrifugado obtenido se separa en dos; todo el suero sobrenadante se traspasa a otro tubo que se centrifuga durante 15 minutos a 3600 revoluciones por minuto para obtener aproximadamente 0,8 ml. de concentrado en plaquetas⁷⁹.

8. PDGF 90-1.

Utiliza tubos de 10 centímetros cúbicos 90-1. Se extrae sangre con una jeringa de 10 centímetros cúbicos y posteriormente se rellena el tubo 90-1 (sin anticoagulante). Se coloca dentro de la centrífuga (figura 12) contrapesado con otro relleno de agua y se centrifuga durante doce minutos a una velocidad de 12.500 revoluciones por minuto, obteniéndose el coágulo dentro del tubo que se extrae con unas pinzas. Con la ayuda de unas tijeras separamos la fase roja del resto del coágulo. El coágulo de fibrina se puede mezclar o utilizar directamente (manual del fabricante)⁴³.



Fig. 12. Centrífuga 90-1.

9. Plaquetar®.

Utiliza también tubos de cinco centímetros cúbicos citratados. Se utiliza la centrífuga de la propia casa comercial pero no se determina la velocidad. El posterior procesado de las muestras se realiza mediante pipetas estériles siguiendo criterios parecidos a los anteriores sistemas mencionados (manual del fabricante).

Existen diferentes trabajos, que se describen a continuación, que comparan el rendimiento de los sistemas descritos anteriormente.

Gemmel⁴⁰ compara los sistemas de Haverst y PCCS simplemente haciendo un recuento de la recolección de plaquetas que se obtienen con cada uno de estos sistemas. El estudio pone de manifiesto que el sistema PCCS es el que mayor número de plaquetas obtiene con un resultado del 78,34% frente a un 60,54% de Harvest.

Zimmermann⁸⁰ realiza un estudio comparativo entre métodos que utilizan tubos y otros que necesitan mayor cantidad de sangre en un colector específico. Para este trabajo se analizaron diferentes parámetros como la concentración de plaquetas, la concentración de glóbulos blancos, la determinación de factores de crecimiento, la expresión de anticuerpos monoclonales de membrana, PH, presión de oxígeno y presión de anhídrido carbónico; en definitiva, muchos parámetros para poder tener mayor número de elementos de juicio. Como resultado se observó que los métodos que usaban tubos tenían menos capacidad de concentración que los otros. Sin embargo, la concentración de factores de crecimiento fue comparable en los tres grupos que se analizaron. Como resultado de este trabajo se determinó la contaminación de estas muestras en glóbulos blancos y la activación de las plaquetas en la mayoría de los procesos utilizados, con la consecuente liberación del contenido de las plaquetas, en particular de sus gránulos Alfa.

Weibrich⁴³ comparó el resultado de tres sistemas de doble centrifugado frente a dos sistemas de un solo centrifugado. Analizó la concentración de plaquetas, la capacidad de la concentración de factor de crecimiento derivado de las plaquetas AB y el factor de crecimiento Beta 1 transformador. Obtuvo como resultado que las máquinas de doble centrifugado tenían un mejor rendimiento a la hora de concentrar plaquetas así como factores de crecimiento.

Otro estudio comparativo realizado por Appel⁷⁶, comparaba el método Curasan, PCCS y uno rutinario de laboratorio de doble centrifugación, separando primero los hematíes y tras el segundo centrifugado lento la fase inferior rica en células. El resultado indicó que con los dos primeros métodos se conseguía más concentración (2,4 veces la concentración en sangre entera frente a 1,4 del método de laboratorio en

transfusiones), pero que se podría utilizar como alternativa si no se disponía de otros métodos más sofisticados.

Ballester⁴¹ comparó cuatro procedimientos de obtención de coágulo concentrado en plaquetas utilizando tubos y centrífugas pequeñas. Estudia la física que aplican los métodos de obtención de plaquetas, demostrando que es la fuerza centrífuga expresada en “g” la que determina la eficacia de la concentración y no la velocidad en revoluciones por minuto ya que dependiendo del brazo de giro de la centrifuga que se utilice se puede cambiar la velocidad del retorno para conseguir la misma fuerza centrífuga. Como conclusión observa la distorsión de los diferentes sistemas desde el punto de vista económico y señala las ventajas y desventajas de cada uno de ellos a la hora de su ejecución.

Weibrich⁴⁶ analizó el sistema Harvest frente al Friadent-Schütze. Su objetivo era analizar el rendimiento de ambos sistemas buscando la mejora a la hora de utilizar clínicamente el plasma rico en plaquetas. Analizó el concentrado y el rendimiento así como la cantidad de factores de crecimiento. Observó que el sistema Harvest era mejor con respecto a su facilidad de manejo y tiempo de preparación, así como en el rendimiento en la recolección de plaquetas, mientras que el sistema Friadent-Schütze ofrecía una ligera ventaja en la concentración de factores de crecimiento resultantes.

Weibrich⁸¹ también comparó un sistema de aféresis de banco de sangre y un sistema análogo al Curasan PRP. El recuento más alto de plaquetas fue para el sistema de aféresis del banco de sangre lo que significaba también un mayor nivel de factor de crecimiento Beta1 transformado. El nivel de leucocitos era mayor en el sistema Curasan.

Zimmermann⁸² comparó técnicas de preparación de concentrado de plaquetas, no desde el punto de vista del sistema utilizado sino desde el punto de vista de la preparación del método, añadiendo diferentes sustancias para la conservación o la obtención de un mejor rendimiento de los factores de crecimiento, siendo la disolución con Triton-X-100 la que mejor resultado obtuvo al cuantificar la conservación de las plaquetas de los factores de crecimiento derivado de las plaquetas.

Leitener³⁹ compara Vivostat PRF preparation Kit®, PCCS plateler concentrate collection system®, Haverst® Smartprep 2APC 60 Process y Fibrinet® Autologous Fibrin y Platelet System. En este estudio no sólo se determinó la concentración de plaquetas o de factor

de crecimiento derivado de las plaquetas sino que se analizó la imagen al microscopio electrónico de los concentrados obtenidos. El resultado del trabajo concluye que el concentrado de factor de crecimiento derivado de las plaquetas depende de la cantidad de concentrado de plaquetas obtenido y que dependiendo del sistema utilizado la integridad de las plaquetas se mantiene o se pierde. En el sistema Vivostat las plaquetas estaban lisadas y su contenido había sido liberado al plasma. En los otros tres sistemas la imagen de las plaquetas era el de plaquetas activadas aunque se mantenía su integridad y por tanto su contenido.

3.3. USOS CLINICOS DEL PLASMA RICO EN PLAQUETAS.

En el campo de la Oftalmología existen diferentes trabajos; Ghering¹⁹ en 1999 mediante una aféresis conseguía un concentrado en plaquetas mediante dos centrifugados. Estos concentrados se usaban en pacientes con máculas retinianas en estadio II a IV. Durante la vitrectomía se instilaban 2 ó 3 ml. del concentrado de plaquetas seguidos del gas para taponar. Los pacientes fueron revisados durante 9 meses. El resultado fue que la cicatrización de la mácula se consiguió en 18 de los 19 pacientes tratados y que en 14 de ellos mejoró la agudeza visual, concluyendo que el concentrado de plaquetas era efectivo en el tratamiento de las máculas retinianas.

Hartwing⁸³ probó el concentrado en plaquetas en la epitelización de defectos de la cornea. Obtenía el concentrado en plaquetas mediante plaquetoféresis y lo usaba como colirio para acelerar la cicatrización de úlceras corneales. El resultado clínico se verificó haciendo un cultivo de células de epitelio humano a las que aplicó el concentrado en plaquetas observando migración y diferenciación celular. Como conclusión se confirmó que el concentrado en plaquetas tenía un efecto positivo sobre la estimulación de las células epiteliales de la córnea.

Un grupo español²⁰ ha publicado recientemente la eficacia del tratamiento subconjuntival y tópico de concentrado de plaquetas tras el autotrasplante y heterotrasplante compatible de células de limbo en el ojo con insuficiencia limbar total tras quemaduras por ácido en los que había sido insuficiente un injerto previo. El resultado puso de manifiesto el acortamiento del tiempo de adaptación de los injertos, estabilización corneal y mejora de la agudeza visual en el ojo tratado. Al mismo tiempo se aceleraba la cicatrización del ojo donante con la aplicación tópica.

En Cirugía general existen también aplicaciones del plasma rico en plaquetas con resultados alentadores.

Kjaergard⁸⁴ usando el método de Vivostat® presentó un trabajo en el que realizaba resecciones pulmonares en cerdos en las que aplicaba en forma de spray el concentrado en plaquetas para evitar las fugas de aire en el post-operatorio, con unos magníficos resultados.

Schips⁶⁶ mediante el mismo método de obtención de plasma rico en plaquetas aplicó dicho concentrado sobre el lecho cruento de una nefrectomía parcial para mejorar la hemostasia tras la intervención, comprobando que con el método de Vivostat® obtenía una hemostasia más rápida.

En Cirugía plástica se ha utilizado para mejorar la cicatrización, como describe Eppley^{85, 86}. Estos estudios se han realizado en modelos animales estudiando la mejora de la cicatrización. Demostraron que un adecuado nivel de concentración de factores de crecimiento favorece la cicatrización de procedimientos quirúrgicos.

Sidman⁸⁷ lo aplicó en la amigdaladenoidectomía disminuyendo el sangrado y acelerando la cicatrización.

En el campo de la Traumatología ha sido más utilizado.

Gil Albarova⁴ en una revisión bibliográfica aceptaba los beneficios que aportaban el plasma rico en plaquetas y los factores de crecimiento en los tratamientos ortopédicos y traumatológicos.

Sanchez¹⁶ utilizó plasma rico en factores de crecimiento según el método de Anitua para realizar 50 plastias del ligamento cruzado anterior, frente a otros 50 pacientes de control. El resultado es que en el grupo de estudio aparecieron menos complicaciones postoperatorias como hematomas, infecciones, drenajes de la articulación y síndrome de Cyclops. La cicatrización de las heridas y la integración de la plastia fueron más rápidas también en el grupo de estudio que en el control. Su conclusión fue que los beneficios que aporta el plasma rico en factores de crecimiento son alentadores para cirujanos y pacientes.

Guillén Salazar¹⁷ utiliza el plasma rico en plaquetas para la rediferenciación de condrocitos en la reparación del cartílago en condroplastias articulares. La expansión exvivo de condrocitos autólogos es la alternativa más aceptada. Para ello realizó un

estudio en el que se estudió el efecto del plasma rico en plaquetas en condrocitos humanos y de conejo, cultivados y transportados en plasma rico en plaquetas que luego se reimplantaron en el cóndilo femoral, con unos resultados que le permitían afirmar que era una aportación importante en la terapia de regeneración del cartílago hialino.

En Dermatología se ha usado para la curación de úlceras de la piel, bien por origen vascular o diabético, traumatismos y quemaduras. Anitua^{14, 88} presenta una serie de casos en los que consigue la curación de este tipo de úlceras en pacientes con estos problemas.

Uno de los primeros campos en los que se utilizó fue en Cirugía maxilofacial. Ya en 1997 Whitman²² habla de un gel de plaquetas como alternativa a la fibrina en la cirugía. Se utilizaba fundamentalmente en las cirugías de paladar hendido, reconstrucciones mandibulares, comunicaciones oro-antrales o sinusales, etc. Como resultado confirmó mayor predecibilidad y hemostasia en las intervenciones en las que usaba el gel de plaquetas frente a aquellas en las que no lo utilizaba.

El trabajo más conocido quizá sea el de Robert Marx en 1998⁷ en el que se describe el método de obtención de un concentrado en plaquetas mediante centrifugación de forma más ambulatoria de lo que se hacía hasta el momento y la repercusión de su uso en la Cirugía maxilofacial, observando la cicatrización y maduración del hueso mediante análisis radiológicos valorados con histomorfometría, determinando la densidad ósea en los operados. En su trabajo también describe la fisiología de la maduración ósea y la influencia de los factores de crecimiento derivados de las plaquetas y del beta transformador, abriendo un nuevo y muy polémico campo de estudio.

En el intento de hacer llegar los métodos de obtención de concentrado en plaquetas al ámbito extrahospitalario, Eduardo Anitua⁸ en 1999 describió su propio método así como los resultados preliminares para la preparación de lechos óseos para la posterior colocación de implantes. En dicho trabajo describe como con una pequeña cantidad de sangre, de unos 10 ml, pueden obtenerse entre 1 y 2 ml. de concentrado en factores de crecimiento (PRGF). Posteriormente ha realizado diferentes publicaciones en distintas revistas en la que cambia el protocolo inicial de 160 g por 280 g⁸⁹ o 460 g⁹⁰, realizando también experimentación animal y viendo la capacidad de regeneración en defectos creados artificialmente que luego biopsia, con unos resultados sorprendentes⁹¹. Presenta el estado de las plaquetas en microscopía electrónica para comprobar su

integridad y los cultivos de osteoblastos en presencia de PRGF y en grupos control sin PRGF, siendo los cultivos con PRGF más favorables.

Anitua⁹² estudia los alveolos postextracción realizando un trabajo con 11 pacientes a los que se les rellenaron los alveolos con PRGF, midiendo con densitometría en unidades Hounsfield la calidad de hueso formado para alojar implantes a las 8-12 semanas. Concluye que el límite inferior para poder realizar la cirugía de implantes es de 500 unidades Hounsfield.

Otros autores han publicado posteriormente ensayos clínicos con resultados similares en la aplicación del PRGF mezclándolo con materiales de aloinjertos⁹³.

Otros trabajos más recientes en experimentación animal llegaron a conclusiones no tan alentadoras; estudian defectos de más de 6 mm. en el cráneo de ratas viendo que el poder de estimular la formación de hueso era limitado dependiendo del defecto, ya que en las histologías realizadas no observaban diferencias entre usar o no concentrado en plaquetas⁹⁴.

Sin embargo, Akca⁹⁵ refuerza la teoría de la utilidad del PRP en la cicatrización ósea en un trabajo realizado con cámaras de titanio de 4 mm. en tibias de conejos en la que se veía una mejor cicatrización en aquéllas en las que se utilizaba PRP que en las que no. Hatakeyama⁹⁶ llega a esta misma conclusión utilizando también conejos pero en defectos de cráneo.

A la misma conclusión llegaron Plachokova⁹⁷ y sus colaboradores con un estudio de similares características en el que además analizaban no solo la histología sino la histomorfometría y micro CT de las zonas regeneradas. Como resultado no encontraron beneficios claros a las 4 semanas entre utilizar el PRP en gel o líquido mezclado en ambos casos con hidroxapatita y fosfato tricálcico, pero tampoco encontraron efectos nocivos o perjudiciales.

Una de las técnicas de regeneración más utilizada y predecible en Odontología y Cirugía maxilofacial es la elevación de seno maxilar. Probablemente sea una de las técnicas de regeneración sobre la que existen un mayor número de trabajos realizados con diferentes técnicas de abordaje y en la que se utilizan diferentes materiales de relleno, desde hueso autólogo hasta materiales sintéticos.

Existen series de casos en los que además de la elevación de seno se realizaba aumento de la cresta con la ayuda de hueso desmineralizado mezclado con PRP en un total de 15 pacientes en los que además se colocaron 36 implantes; posteriormente se realizó una histología en el momento de la reentrada para la colocación de los implantes entre los 120 y 168 días de la colocación del injerto. Los resultados histológicos revelaron hueso vital neoformado sin signos de inflamación⁹⁸.

Por supuesto, el uso de PRP mezclado con diferentes materiales se ha estudiado con diferentes resultados.

En el año 2001 se publicaron trabajos clínicos en los que se estudiaron los resultados sobre la cicatrización de los tejidos blandos⁹⁹; en otro más completo se realizó una biopsia del relleno en la segunda cirugía para colocar los implantes con resultados muy buenos en cuanto a la maduración ósea¹⁰⁰. En otro estudio muy similar las conclusiones que obtuvieron indicaban que la diferencia entre usar PRP o no usarlo en la elevación de seno con BioOss® no era estadísticamente significativa aunque los resultados eran mejores con PRP. Analizaron tanto la maduración ósea como la unión hueso-implante en los casos experimentales que se incluyeron en el estudio. La única conclusión positiva que argumentaron fue la manejabilidad que aportaba al material de injerto a la hora de su colocación¹⁰¹.

El uso de fosfato tricálcico en combinación con PRP en una serie de 23 pacientes se comparó con un grupo control de 22 casos realizándose biopsias de la zona regenerada en la cirugía de implantes. El resultado fue que el PRP ayudó entre un 8% y un 10% más en los casos en los que se aplicó aunque no favorecía la reabsorción de las partículas de fosfato tricálcico¹⁰².

Para determinar de una forma más exhaustiva la influencia del PRP en la regeneración de los tejidos óseos se empezaron a realizar trabajos con animales para poder hacer un mayor número de determinaciones que aclarasen el papel del PRP en la regeneración del hueso. Uno de estos trabajos se realizó en ovejas a las que se les efectuaron elevaciones de senos con hueso autólogo de cresta ilíaca colocando PRP en uno de los senos. Tras 4-12 semanas se obtuvieron biopsias del hueso en los diferentes lugares. Se evaluaron, con análisis histomorfométricos, el porcentaje de hueso neoformado dentro del lugar de injerto y el porcentaje de área de contacto entre hueso injertado y hueso neoformado. En el grupo de las 4 semanas la proporción media de hueso neoformado en el lado control fue del 26% mientras que en el lado con PRP fue del 29,2%. Tras 12

semanas, en el lado control fue de 46,9% y en el del PRP del 51,1%. En cuanto al contacto óseo con el hueso injertado y el neoformado fue a las 4 semanas del 73% frente al 78,5% del lado problema y del 87,2% y 90,1% respectivamente a las 12 semanas. El análisis estadístico destacó que no había una diferencia significativa entre usar o no usar el PRP para obtener una mejor regeneración ósea¹⁰³.

Otro animal de experimentación sobre el que se realizó un estudio fue el cerdo minipig en el que se utilizó hidroxiapatita sola o con PRP en los dos senos. En total se evaluaron 12 cerdos. Al mismo tiempo se insertaron implantes de superficie pulida. Se sacrificaron los animales a los 3, 6 y 12 semanas y se preparó histológicamente en bloque la zona sinusal con el hueso neoformado. En las muestras se observó que había menos contacto óseo en la pared facial del seno en los lados sin PRP a las 3 y 6 semanas. En el hueso injertado, por el contrario, el contacto de hueso con el implante a las 3 semanas fue mayor en el lado del PRP que en el contrario; a las 6 semanas disminuía por debajo del grupo control pero volvía a ser superior a las 12 semanas. Como final se concluyó que el PRP era útil en la mejora de la cicatrización del hueso injertado en unión con hidroxiapatita frente a los grupos controles de hidroxiapatita sola¹⁰⁴.

En ese mismo año se efectuó otro trabajo clínico en el que se practicaron biopsias del hueso injertado en elevaciones de seno en pacientes con PRP mezclado con BioOss o sin PRP. En las muestras obtenidas se pudieron observar zonas de hueso con aspecto osteogénico así como lagunas de reabsorción osteoclástica junto a los gránulos de BioOss® lo que llevó a pensar a los investigadores que la malla de fibrina proporciona un almacén al biomaterial para la migración osteoblástica y que los factores de crecimiento de las plaquetas potencian la capacidad de regeneración¹⁰⁵.

Otro trabajo¹⁰⁶ ha estudiado elevaciones de seno con fosfato tricálcico con o sin PRP tomando injertos a los tres meses tras la reconstrucción, con resultados muy similares a los anteriormente realizados aunque los análisis se hicieron en este con microradiografías e histomorfología.

Otros materiales mezclados con PRP para la elevación de seno fueron los biocristales. Tras el injerto y la colocación de implantes en senos de cerdos minipig se realizaron biopsias al mes, 2 meses y 12 meses. Las muestras también se mezclaron o no con hueso autólogo. Se analizaron por microscopía óptica con tinción y microrradiografías para determinar el contacto del hueso con los implantes. Los resultados fueron mejores pero no estadísticamente significativos¹⁰⁷.

La utilización de PRP se ha extendido a la ingeniería tisular¹⁰⁸ al realizar las elevaciones de seno con células madre mezcladas con PRP en un seno y médula con PRP en el lado contrario del mismo animal (conejos blancos japoneses). Las biopsias se tomaron a las 2, 4 y 8 semanas evaluándose formación de hueso por histología e histomorfometría. Los resultados demostraron la presencia de hueso neoformado y neovascularización a las 2 semanas y un aumento de hueso vertical mayor en el lado del PRP con células madre, por lo que se llega a la conclusión de que es una mezcla útil en esta técnica quirúrgica.

Otro de los usos clínicos del PRP ha sido la cirugía periodontal¹⁰⁹. Se ha probado en defectos infraóseos en los que se mezclaba con hueso desmineralizado para regenerar los mismos. Los resultados obtenidos eran de una disminución clara de la medida de los sondajes, observándose cantidades radiológicamente significativas de hueso neoformado.

Camargo¹¹⁰ realizó un estudio de regeneración de defectos infraoseos con PRP en combinación con hueso bovino y membranas de ácido poliláctico obteniendo buenos resultados en la regeneración de los defectos, evaluando la profundidad de sondaje, el nivel de inserción y el relleno de los defectos controlados en reentradas a los meses¹¹¹.

Lekovic¹¹² continuó el trabajo anterior con el mismo grupo de investigadores haciendo un estudio comparativo entre hueso bovino mezclado con PRP y hueso bovino solo. La regeneración tisular guiada trató de mejorar defectos infraóseos realizando una reentrada en los defectos tratados a los 6 meses para evaluar la profundidad de sondaje, el nivel de inserción y el relleno de los defectos. Los resultados pusieron de manifiesto que en el grupo en el que se utilizaba la membrana se conseguían una ganancia de 4,82 mm., mientras que en el otro grupo una media de 4,72 mm., con lo que no existía diferencia estadísticamente significativa.

El siguiente trabajo¹¹³ continuó utilizando esta misma combinación de PRP mezclado con hueso bovino con membranas en defectos de furca grado II. Los resultados en la regeneración fueron significativos pues obtenían una media de 4,07 mm. de hueso frente a 2,49 mm. en los casos control en los que simplemente se realizaba un desbridamiento de los defectos. El estudio se realizó a boca partida en un total de 26 pacientes.

En un trabajo más¹¹⁴ la regeneración también se realizó mezclando el PRP con cristales bioactivos, comparando los resultados obtenidos con este solo con los resultados

obtenidos utilizando una combinación de biocristales y membrana. El estudio también se realizó a boca partida en un total de 15 pacientes en los que se evaluó la profundidad del sondaje, el nivel de inserción y el nivel óseo radiológico. Los resultados no fueron significativos estadísticamente entre ambos grupos pero la conclusión es que el PRP con biocristales tenía tan buenos resultados como los del grupo control.

Como en técnicas anteriormente mencionadas, en la regeneración periodontal también se ha utilizado la mezcla de PRP y células madre mesenquimales aspiradas de la cresta ilíaca del paciente. Esta mezcla se aplicaba sobre la superficie radicular y en el espacio del defecto adyacente y se valoraban la disminución de la profundidad de sondaje, el nivel de inserción y el relleno del defecto óseo. Los resultados mostraron una reducción de 4 mm. en la profundidad de sondaje y una ganancia de nivel de inserción de 4 mm., mientras desaparecían el sangrado y la movilidad dentaria. Como efecto añadido se estudió la regeneración de la papilas²⁷.

Uno de los campos en los que los autores muestran un mayor acuerdo es en la mejora de la cicatrización de tejidos blandos. Con esta intención se ha utilizado en la maduración de los tejidos en la cirugía estética periodontal. De esta forma se ha visto que disminuyen los problemas postoperatorios en la cirugía y aumenta el nivel de recubrimiento radicular. Además, la utilización de la parte pobre de plaquetas resultante de la centrifugación en la zona donante de tejido disminuye el sangrado del paladar por la actividad coagulante de la fibrina existente¹¹⁵. Este dato se ha demostrado en un estudio en el que se analizaba la influencia de los diferentes factores de crecimiento existentes en el PRP sobre los fibroblastos y la angiogénesis, mediante análisis del RNA e inmunohistoquímica¹¹⁶.

Lindeboom⁷⁸ demostró la influencia del PRP en la cicatrización de la mucosa oral. En 10 pacientes en los que se realizaron elevaciones de seno se realizó un estudio a boca partida en el que en un lado se aplicaba PRP y en el otro no. En los periodos tempranos de cicatrización se evaluó la densidad de microvascularización con un espectrómetro de polarización ortogonal entre el día de la cirugía y los 10 días posteriores. Los resultados fueron que la microcirculación aumentaba de forma significativa durante los primeros 10 días en el lado del PRP frente al lado control y que se igualaba a las 5 semanas de la cirugía.

El último trabajo al respecto¹¹⁷ compara injertos de conectivo embebidos en PRP o no, en recubrimientos radiculares; analiza la recesión, el nivel clínico de inserción, la

queratinización del tejido, la localización de la línea mucogingival y la distancia horizontal de los defectos. Los resultados demuestran una ligera mejoría de los resultados con el uso del PRP pero recomiendan un seguimiento a más largo plazo.

El aumento de la cresta alveolar es otra de las técnicas quirúrgicas que más problemas crea a los cirujanos debido a su complejidad para conseguir aumentos verticales de hueso en maxilares atróficos. El uso de PRP en combinación con regeneración tisular guiada permitió ganancias verticales y horizontales en defectos localizados con hueso autólogo particulado. El resultado es que se consigue una media de ganancia de hueso de 3-4 mm. El manejo de los injertos en todos los casos fue más cómodo y rápido, dándole estabilidad primaria a los injertos. Sin embargo, no se encontró una diferencia estadísticamente significativa en la calidad del hueso en las biopsias obtenidas con trefina en los lechos en los que se colocaron los implantes¹¹⁸.

En esta línea clínica también se ha combinado el PRP con la distracción alveolar para solucionar atrofas severas de mandíbula. Se interpuso hueso de cresta ilíaca mezclado con PRP en el gap creado en la cirugía de distracción, obteniendo en el total de los pacientes tratados, 2 hombres y 3 mujeres con atrofas clase V y VI de Cawood y Howell, una regeneración que permitió la colocación de implantes posteriormente¹¹⁹.

Experimentalmente se ha comparado en animales el uso de PRP con injertos en bloque. En calota de conejo se ha interpuesto PRP en los injertos en bloque y se ha comparado con un grupo control sin PRP para ver la diferencia. Los resultados demostraron que en el caso del PRP a los 7 y 15 días eran claramente mejores, pero a los 30 y 60 días se igualaban, de forma que no había una diferencia estadísticamente significativa entre los dos grupos¹²⁰.

Por supuesto el PRP también se ha incluido en la cirugía de implantes pudiendo encontrar diferentes publicaciones.

Primero se estudió la maduración del hueso alrededor de los implantes y su uso en las técnicas complementarias de injertos particulados en la colocación de implantes, con resultados clínicos excelentes pero sin datos histológicos^{121, 122}.

En esta misma línea, Garg¹²³ utiliza el PRP mezclado con hueso en casos en los que se necesitan pequeñas regeneraciones en torno a los implantes. Este mismo autor realizó estas pequeñas regeneraciones creando membranas autólogas con el plasma para utilizar en la cirugía como barrera y con sus propiedades biológicas¹²⁴.

Kim¹²⁵ realizó una comparativa mezclando en una muestra PRP con hueso desmineralizado y en otra no, en el tratamiento de defectos óseos en implantología. El estudio analiza la osteointegración de los implantes colocados en animales medida mediante histomorfometría a las 6 y 12 semanas de la cirugía. Los resultados que obtuvo manifestaron un mayor porcentaje de contacto entre hueso e implante en los implantes en los que se usó en el defecto hueso desmineralizado mezclado con PRP.

Como muestra histológica e histomorfometría también se comprobó el grado de cicatrización u osteointegración de los implantes. En cerdos minipig se colocaron implantes tras las extracciones de los premolares y se instiló en los alvéolos el PRP. Los animales se sacrificaban a las 3, 6 y 12 semanas para la extracción y análisis de los implantes. Las histologías y los estudios histomorfométricos revelaron un mayor porcentaje de unión hueso-implante en el grupo en el que se instiló el PRP que en los casos control, fundamentalmente en el periodo temprano, que posteriormente se pierde para no encontrar diferencias significativas estadísticamente.

4. MATERIALES Y METODOLOGÍA

4.1. MATERIAL

El diseño del estudio ha precisado de lo siguiente:

4.1.1. Recursos humanos.

4.1.2. Material fungible.

4.1.3. Material físico o aparatología.

4.1.1. Recursos humanos:

50 Alumnos voluntarios sanos de la Facultad de Odontología de la Universidad Europea de Madrid con edades comprendidas entre los 19 y 23 años.

4.1.2. Material fungible:

Material fungible para la toma y procesado de las muestras.

Palomillas Multyfly 21 G (casa Stardet®)

Jeringas Monovette de 3 ml9NC. (0,30ml de citrato sódico de Stardet®) (figura 13).

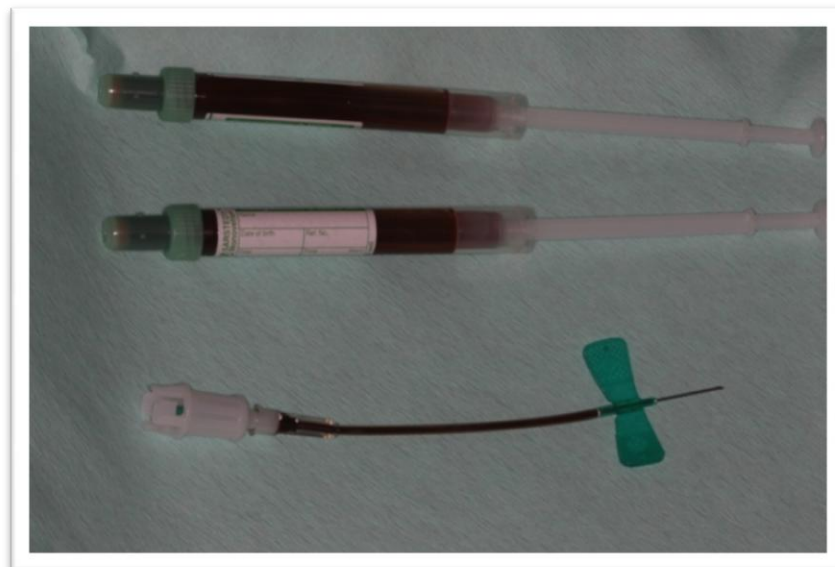


Fig. 13. Palomillas Multyfly y jeringas Monovette de Stardet.

Material complementario:

Gasas estériles.

Alcohol de 96°.

Fichas para recolectar datos.

Material fotográfico.

Material bibliográfico.

Material para la inclusión en resina.

Glutaraldehído al 2,5%.

Solución fosfato (Millunig).

Tetraóxido de osmio y ferrocianuro.

Acetona.

Resina.

Material para la determinación proteica.

ELISA del laboratorio Bender MedSystems®.

Inmunométrica quimioluminiscente del laboratorio Diagnostic Products Corporation® marcada enzimáticamente.

4.1.3. Material físico o aparatología:

Centrífuga de laboratorio convencional marca Bayer®. El rotor es oscilante y con una capacidad de 12 tubos con insertos intercambiables. Los mandos de control de

velocidad y tiempo son electrónicos pudiendo presentar en la pantalla la velocidad o sus equivalentes en "g" (figura 14).



Fig. 14. Centrifuga Bayer de laboratorio.

El analizador Cell Dyn 3500 (figura 15) tiene entre sus funciones ser un contador celular. El conteo se realiza mediante impedancia eléctrica y se utiliza para realizar el recuento de plaquetas en las muestras realizadas. El canal es conjunto con los glóbulos rojos y se basa en los cambios en la corriente eléctrica que produce una partícula suspendida en un líquido conductor al pasar por una abertura de dimensiones conocidas. A cada lado de la abertura hay un electrodo sumergido en el líquido, cuya finalidad es crear un trayecto eléctrico a través de él.



Fig. 15. Analizador Cell-Dyn 3500.

A medida que cada partícula pasa a través de la abertura desencadena un cambio transitorio en la resistencia eléctrica reinante entre los dos electrodos. Dicho cambio origina una pulsación eléctrica medible. El número de pulsaciones generadas indica el número de partículas que han pasado la abertura. La amplitud de cada pulsación es esencialmente proporcional al volumen de la partícula que la produjo.

Al ser posible que coincidan en el paso más de una partícula existe un sistema de corrección. Es lo que se denomina pérdida por pasada coincidente que es estadísticamente predecible porque guarda una relación directa con el volumen efectivo de la abertura y con la cantidad de la dilución.

La corrección se realiza por la volumetría de precisión. Solo es posible realizar el conteo conociendo la cantidad exacta de sangre diluida que pasa a través de la abertura.

El conjunto volumétrico del canal de plaquetas consiste en un tubo de vidrio calibrado provisto de dos detectores ópticos. La distancia entre ambos electrodos ha sido calculada para medir precisamente 100 microlitros. Se agrega detergente al diluyente en el tubo volumétrico para crear un menisco en el líquido. Cuando se inicia el ciclo de conteo de las plaquetas el líquido desciende por el tubo volumétrico. La fase de conteo del ciclo se inicia cuando el menisco llega al detector superior y se detiene cuando el menisco llega al detector inferior. El tiempo que necesita el menisco para recorrer la distancia que separan los dos detectores recibe el nombre de tiempo de conteo.

Campana de flujo laminar (figura 16).

Se utiliza para manipular las muestras sin riesgo de contaminación ya que mantiene un flujo de aire ascendente que impide que se depositen partículas o microorganismos en ninguna de las muestras.



Fig. 16. Campana de flujo laminar.

Microscopio electrónico de transmisión de 400 Kv (JEOL mod. JEM-4000 EX) del centro de microscopía electrónica “Luis Bru” de la Universidad Complutense de Madrid (figura 17).



Fig. 17. Microscopio.

Ultramicrotomo. Permite cortar las muestras incluidas en resina al espesor adecuado para las rejillas (figura 18).



Fig. 18. Microtomo.

Rejillero. Para colocar y ordenar las muestras del microscopio electrónico. Se muestra en la figura 19.



Fig. 19. Detalles del Rejillero.

Las rejillas son el soporte sobre el que se colocan las muestras. Son el equivalente al porta de cristal en microscopía óptica.

4.2. METODOLOGÍA

- 4.2.1. Selección de pacientes.
- 4.2.2. Extracción de sangre y centrifugado.
- 4.2.3. Contaje y determinación.
- 4.2.4. Inclusión en resina.
- 4.2.5. Visionado en microscopía electrónica
- 4.2.6. Análisis estadístico

4.2.1. Selección de pacientes.

50 pacientes voluntarios sanos; 18 hombres y 32 mujeres con una edad comprendida entre los 19 y 23 años.

Criterios de exclusión:

- Menores de 18 años.
- Mujeres embarazadas.
- Enfermedades sistémicas.
- Pacientes que hayan sufrido tratamiento inmunosupresor.

4.2.2. Extracción de sangre y centrifugado.

Se realizó la extracción de sangre de una vía periférica que por su sencillez fue de la vena cefálica de la flexura del codo (figura 20). Se desinfectó la zona con alcohol de 96 grados y se realizó la venopunción mediante el sistema Multyfly 21 G que se conectó a una jeringa Monovette de 3 ml9NC (0,30ml de citrato sódico de Stardet®). De esta forma se consiguió una muestra de sangre en ambiente estéril y sin manipulación.



Fig. 20. Venupunción.

Estas jeringas permiten realizar la extracción haciendo una aspiración gradual o aplicando previamente el vacío en la jeringa llevando el émbolo al final. Se debe realizar una aspiración gradual ya que es menos traumática, destruyéndose menos células y produciéndose menos turbulencias en la muestra. Tras las extracciones se rompe el vástago de plástico de las jeringas Monovette y estas se introducen con el tapón hacia abajo en los insertos de la centrífuga como se muestra en la figura 21.

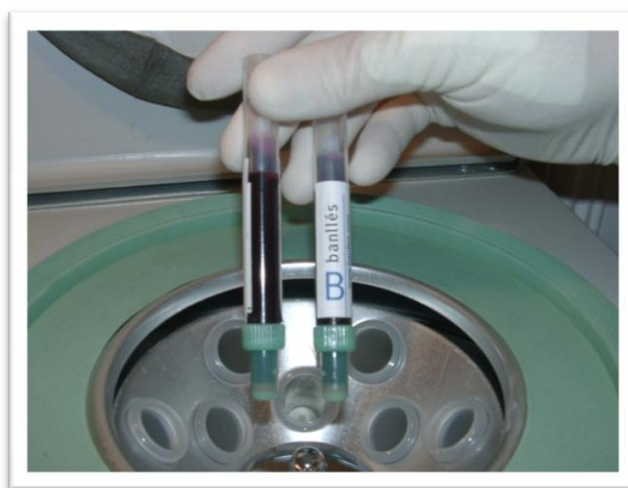


Fig. 21. Colocación de los tubos en la centrífuga.

Se usó una centrífuga de laboratorio convencional de la marca Bayer®, haciendo una primera centrifugación con 800g durante 2 minutos para eliminar los elementos más pesados (glóbulos rojos). Una vez transcurrido este tiempo se colocaron en la gradilla boca abajo, encontrándose, como en otros sistemas, dos fases claramente diferenciadas: una parte inferior del tubo con los glóbulos rojos y otra, por encima, con el plasma. Con la ayuda de la palomilla Multyfly® se conecta a la jeringa y se decanta la fase roja en un tubo de sucio para desecharla. Se desconecta la jeringa de la palomilla y se vuelve a introducir la jeringa en la centrífuga sometiéndolas a una nueva centrifugación, esta a 500g durante 8 minutos (resultante de un estudio previo realizado por nosotros, pendiente de publicación).

Del resultado de esta segunda centrifugación se obtuvo plasma en el que se pueden diferenciar tres grandes fases (figura 22); la primera y más cercana al tapón, con los glóbulos rojos residuales del tubo y leucocitos; una segunda fase que ocupa aproximadamente un tercio del volumen total del plasma muy concentrado en plaquetas y, la tercera, un plasma pobre en plaquetas.



Fig. 22. *Resultado de la centrifugación.*

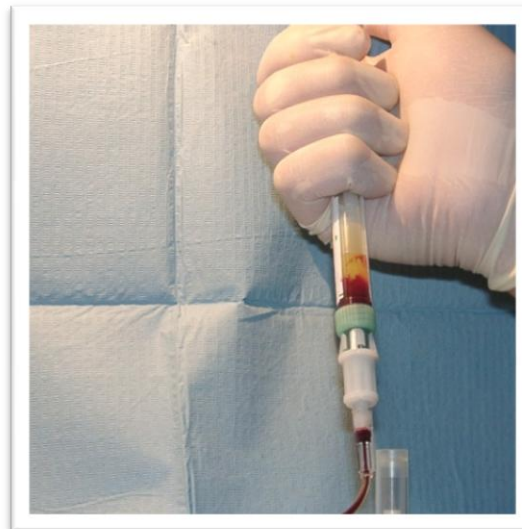


Fig. 23. *Decantación de los glóbulos rojos y leucocitos.*

De nuevo con la palomilla Multyfly®, se desecharon los hematíes residuales y leucocitos (figura 23).

Se decantó el tercio más cercano al tapón en un tubo para su análisis como muestra la figura 24.

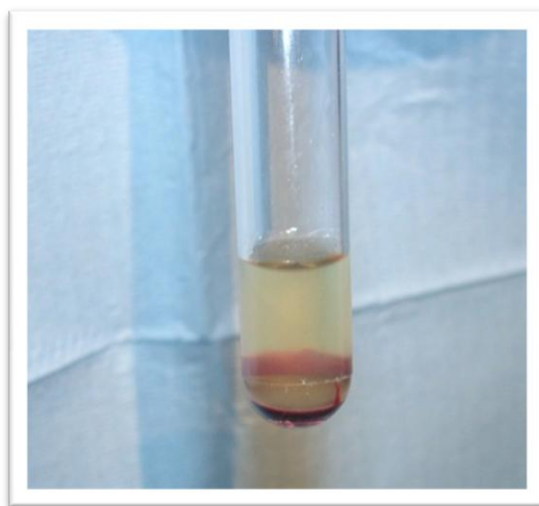


Fig. 24. Resultado de la decantación

4.2.3. Contaje y determinación

Por cada paciente se realizó el siguiente análisis: recuento de plaquetas basales en la sangre entera mediante el analizador Cell-Dyn 3500 y determinación de factores de crecimiento que fueron factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), factor de crecimiento beta transformador (TGF β), factor de crecimiento vascular (VGF) mediante ELISA del laboratorio Bender MedSystems® y la IGF mediante una prueba inmunométrica quimioluminiscente marcada enzimáticamente del laboratorio Diagnostic Products Corporation®. Tras el centrifugado, se analizó la fracción rica en plaquetas, con recuento de plaquetas y determinación de los mismos factores de crecimiento que los analizados en sangre entera.

A cada voluntario se le extrajeron 21 ml. de sangre en siete tubos de 3 ml cada uno. Al centrifugar se consiguió un tubo resultante que contenía entre 4 y 5 ml. de plasma concentrado en plaquetas. Se diluyó la muestra el doble, decantando más suero para conseguir un volumen mínimo con el fin de poder realizar los contajes, porque si no, tendríamos que haber extraído mucho más volumen de sangre, prácticamente el doble

a cada uno de los voluntarios. Hay que tener en cuenta, que en nuestro concentrado estarán diluidos los factores de crecimiento, lo que se tendrá que considerar a la hora de analizar los datos.

4.2.4. Inclusión en Resina

18 muestras de concentrados y 4 de sangre periférica se incluyeron en resina para su inspección mediante microscopía electrónica.

Primero se fijaron las muestras con glutaraldehído al 2,5% durante 4 horas^{126, 127}. De nuevo se centrifugó la muestra 4 minutos a 4 grados centígrados. Posteriormente se lavaron 3 veces con una solución fosfato (Millunig) con un pH de 7,3.

Se dejó la muestra resultante en tampón durante 12 horas. Se tiñeron las muestras con tetraóxido de osmio y ferrocianuro durante una hora. Esta maniobra y las siguientes se realizaron en una campana de flujo laminar continuo.

A continuación se lavaron con agua destilada 3 veces y pasaron a deshidratarse las muestras con acetona.

Se empezó con acetona al 30% durante 15 minutos cambiando la solución a la mitad de dicho tiempo. Este mismo proceso se repitió al 50, 70, 80, 90, 95% y por último en acetona al 100% durante 30 minutos.

Una vez deshidratadas las muestras se embebieron en una solución de resina-acetona en relación 1-3 durante una hora. A continuación se cambió la solución por una relación de la misma 1-1 también durante 1 hora y por último en una solución 3-1 de resina acetona durante 2 horas.

Pasado el tiempo se cambió por resina pura y se dejó hasta el día siguiente. La resina se sustituyó por otra también pura y se polimerizó en la estufa a 70 grados durante 72 horas. Posteriormente se realizaron cortes en el microtomo para inspeccionar las plaquetas en un microscopio electrónico de transmisión de 400 Kv (JEOL mod. JEM-4000 EX) del centro de microscopía electrónica “Luis Bru” de la Universidad Complutense de Madrid.

4.2.5. Visionado en microscopía electrónica

Se observaron las muestras por campos y cortes a diferentes aumentos para ver la integridad de la membrana de las plaquetas y el contenido en gránulos alfa en su interior.

4.2.6. Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó la T de Student como prueba paramétrica para una muestra y la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon como no paramétrica.

5. ANÁLISIS DE RESULTADOS

5.1. RECUENTO DE PLAQUETAS

Los resultados que se reflejan en este apartado corresponden a los recogidos en las 50 muestras de experimentación que tienen como objetivo averiguar el rendimiento en el nuevo método de obtención de plasma rico en plaquetas.

Para ello se realizaron mediciones del número de plaquetas de todas las muestras antes de procesarlas, que es lo que denominamos valores basales, y lo mismo después del procesado de las muestras.

Otras determinaciones que se realizaron consistieron en obtener los valores de los diferentes factores de crecimiento en sangre periférica, como ya se ha mencionado anteriormente, los valores basales y los valores de las mismas en los concentrados obtenidos después del procesado de las muestras. Los factores de crecimiento que se determinaron fueron: derivado de las plaquetas, vascular, beta transformador y el parecido a la insulina.

5.1.1 Recuento de las plaquetas basales

Los resultados obtenidos de esta determinación se muestran en la tabla 1.

Los valores obtenidos en este recuento están dentro de los valores normales para los individuos analizados. El rango de valores es bastante homogéneo con un valor mínimo de 94.000 y uno máximo de 293.000.

Como se puede ver en la figura 25 la mayoría de los datos se encuentran en un rango de 185.000 plaquetas y solo 2 valores por defecto y 4 por exceso se salen de dicho rango. La media de plaquetas (PLT1) obtenida en la muestra de sangre entera es de 185.000/mm³ con una desviación típica de 43, lo que indica que la muestra es muy homogénea, con un valor mínimo de 94.000/mm³ y un valor máximo de 293.000/mm³.

Para el análisis estadístico solo se validaron de todas formas 48 resultados; 2 de las muestras se desecharon por deterioro de las mismas.

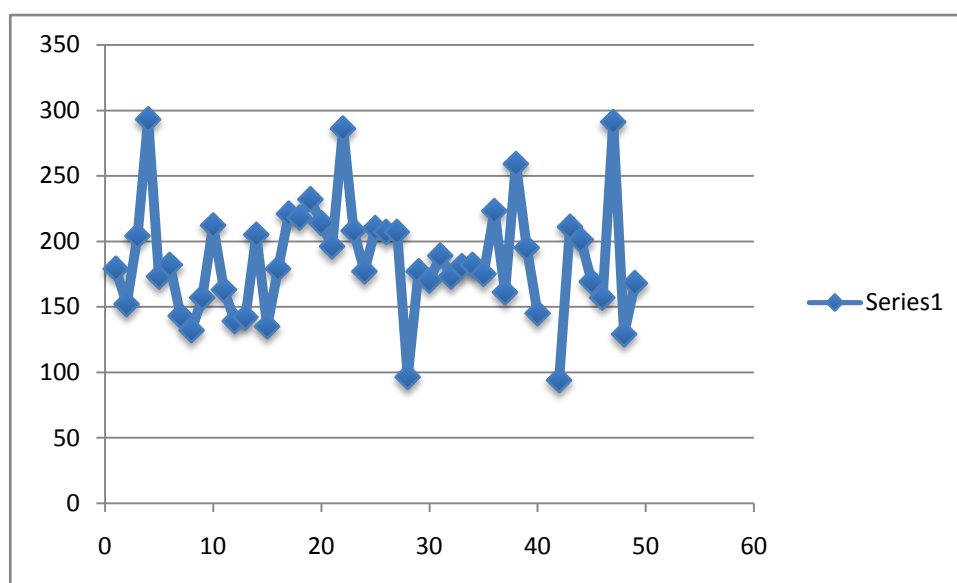


Fig. 25. Distribución de los valores en número de plaquetas.

PACIENTE	10X3/MM3 RECuento PLT
1	179
2	152
3	204
4	293
5	173
6	182
7	143
8	132
9	157
10	212
11	163
12	139
13	142
14	205
15	135
16	179
17	221
18	218
19	232
20	214
21	196
22	286
23	208
24	177
25	210

PACIENTE	10X3/MM3 RECuento PLT
26	207
27	207
28	96,4
29	177
30	170
31	189
32	173
33	181
34	182
35	175
36	223
37	161
38	259
39	195
40	145
41	
42	94
43	211
44	201
45	169
46	157
47	291
48	129
49	168
50	

Tabla 1. Valores en cada una de las muestras expresados en número de plaquetas por milímetro cúbico de sangre multiplicado por 1000.

5.1.2. Recuento de plaquetas concentradas

El recuento de las plaquetas que se han conseguido recolectar se muestran en la tabla 2.

Los resultados obtenidos en los concentrados son parecidos a los obtenidos por otros autores con métodos parecidos.

Las muestras analizadas que se dieron como válidas fueron 49. La media de concentrado fue de 354,71 con un error típico de la media de 18,40. La desviación típica es de 128,8 con un mínimo de 113 y un máximo de 683.

Al analizar los resultados hay que tener en cuenta que la muestra se ha diluido cogiendo una mayor cantidad de plasma ya que se necesita un mínimo de cantidad de concentrado para tener una muestra suficiente para realizar todas las determinaciones.

Como se puede ver en la figura 26 en todos los casos ha habido un incremento en la concentración de plaquetas a pesar de haber diluido al doble el concentrado.

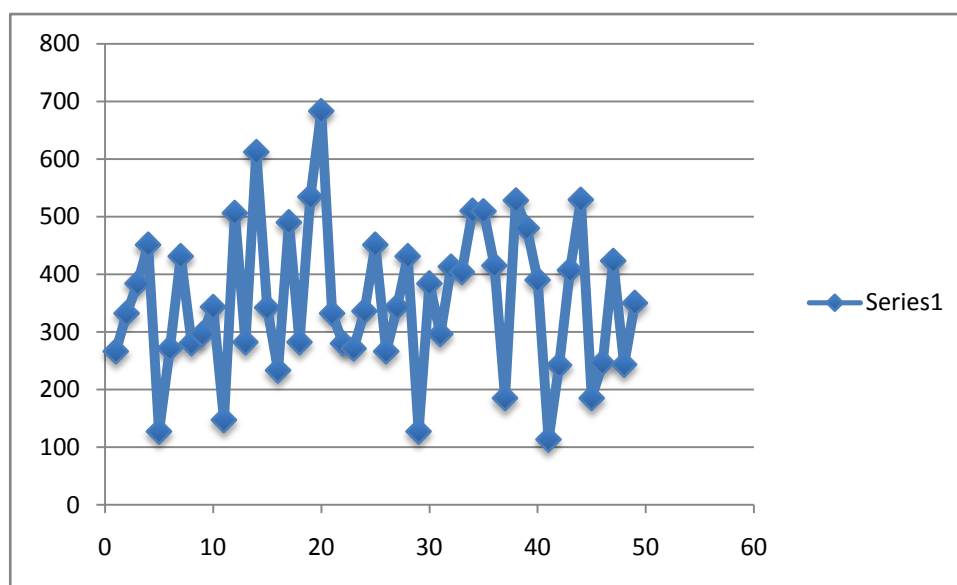


Fig. 26. Distribución de la cantidad de plaquetas en la sangre periférica de las muestras basales.

También se puede apreciar la concentración de los resultados y la homogeneidad de la muestra. Exceptuando dos datos por encima de la media y 4 por debajo las medias de los resultados se mantienen agrupadas en una concentración del doble al de los valores basales.

PACIENTE	10X3/MM3 CONCENTRADO PLT	PACIENTE	10X3/MM3 CONCENTRADO PLT
1	266	26	266
2	332	27	343
3	384	28	431
4	451	29	127
5	127	30	384
6	271	31	296
7	431	32	413
8	280	33	404
9	296	34	510
10	343	35	509
11	147	36	415
12	506	37	185
13	282	38	528
14	612	39	480
15	342	40	390
16	233	41	113
17	490	42	242
18	282	43	407
19	534	44	529
20	683	45	185
21	332	46	246
22	280	47	423
23	271	48	243
24	336	49	350
25	451	50	

Tabla 2. Resultado del concentrado de plaquetas para cada muestra.

5.2. RECuento DE FACTORES DE CRECIMIENTO

El recuento de factores de crecimiento también se realizó en sangre periférica en las mismas muestras en las que se realizaron las determinaciones de plaquetas.

5.2.1. Recuento de factores de crecimiento basales

Los valores obtenidos se analizaron en 46 muestras ya que en 4 de ellas no hubo cantidad suficiente de plasma para hacer la determinación (tabla 3).

La media de IGF basal es de 173,48 con un error típico de 6,94 y una desviación típica de 48,57 con un valor mínimo de 95,20 y un máximo de 309 ng/ml.

La media de TGF beta-1 es de 22,33 con un error típico de 4,31 y una desviación típica de 29,23, con un mínimo de 0,10 y un máximo de 151,20 sobre un total de 46 muestras ya que se tuvieron que descartar 3 por falta de cantidad suficiente de plasma.

La concentración media en sangre basal de PDGF-1 en 46 muestras es de 698,20 con un error típico de 71,84 y una desviación típica de 487,26 con un valor mínimo de 155 y un máximo de 2461.

La concentración media para la VGF-1 en el mismo número de muestras es de 164,12 con un error típico de 42,32 y una desviación típica de 287,04 con un mínimo de 3,20 y un máximo de 1409,10.

En las figuras 27 y 28 se puede ver la distribución de los valores de los 4 factores de crecimiento con una homogeneidad en sus valores excepto algunos picos en el VGF y PDGF que corresponden con los picos en la concentración de plaquetas.

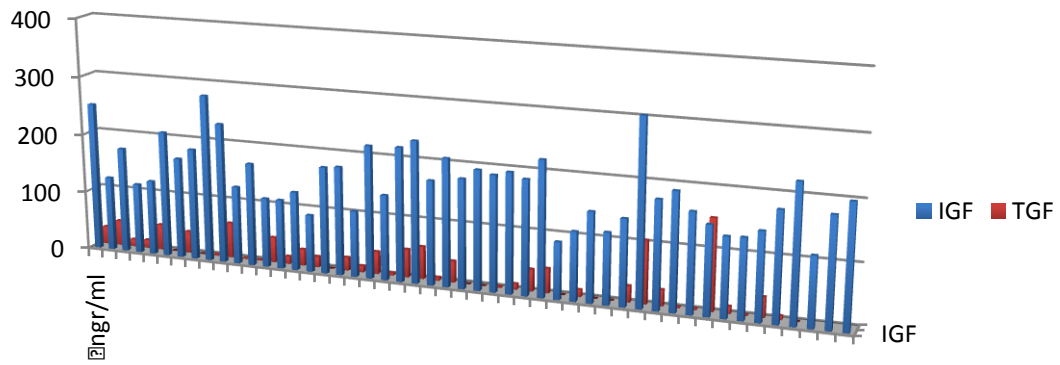


Fig. 27. Concentración de TGF (rojo) e IGF en sangre basal (azul) expresadas en nanogramos por mililitro.

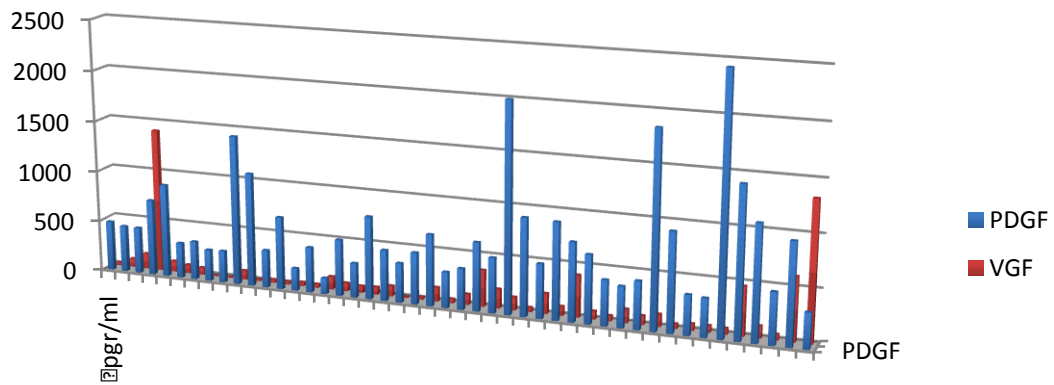


Fig. 28. Representación en picogramos por mililitro de la concentración de PDGF (azul) y VGF (rojo) en las muestras basales.

La media de los concentrados de factores de crecimiento encontrados en las muestras procesadas se encuentra entre los valores esperados.

PACIENTE	ng/ml IGF	Ng/ml tgf beta-1	pg/ml PDGF	pg/ml VGF
1	252	29,7	486	22,4
2	126	42,7	454	80,1
3	179	12	453	147,4
4	119	13,6	746	1409,1
5	127	43,5	913	102,6
6	214	0,1	344	80,1
7	171	36,8	374	67,3
8	189	0,1	307	3,2
9	283	1,6	311	3,2
10	237	59,9	1461	86,5
11	132	0,5	1109	16
12	174	0,5	366	28,8
13	117	42,7	709	25,6
14	117	12,5	219	35,3
15	133	27,6	442	32,1
16	96,4	18	155	125
17	180	0,1	548	76,9
18	183	22,2	334	64,1
19	111	10,4	805	70,5
20	223	37,7	494	99,4
21	143	3,8	383	6,4
22	225	47,3	502	22,4
23	238	54,8	693	134,6
24	175	5,5	346	38,5

Tabla 3. Recuento de factores de crecimiento basales.

	ng/ml	Ng/ml	pg/ml	pg/ml
PACIENTE	IGF	tgf beta-1	PDGF	VGF
25	214	36	397	102,6
26	183	0,1	665	353,9
27	200	0,1	533	185,9
28	194	1,6	2030	125
29	201	9,3	946	41,7
30	192	36,8	524	195,5
31	226	41	935	86,5
32	95,2	0,1	762	406,3
33	115	11,5	660	76,9
34	150	0,1	438	51,3
35	119	0,1	394	131,4
36	144	27,2	462	86,5
37	309	104,6	1883	118,6
38	180	26,8	955	44,9
39	196	1,6	384	64,1
40	166	2,7	369	64,1
41	148	151,2	2461	57,7
42	132	12	1445	468,8
43	133	1,1	1107	115,4
44	146	33,5	496	54,5
45	182	6	975	609,4
46	228	0,1	342	1331,2
47	116	perdida	perdida	perdida
48	182	perdida	perdida	perdida
49	205	perdida	perdida	perdida

Tabla 3 (cont). Recuento de factores de crecimiento basales.

5.2.2. Recuento de factores de crecimiento en concentrados

De los 4 factores de crecimiento analizados se concentraron todas excepto la IGF; esto es lo esperado ya que no son las plaquetas su lugar de almacenamiento y, por tanto, era predecible que no se concentrasen más con un mayor número de plaquetas en la muestra. Los valores que se obtuvieron fueron similares e incluso por debajo de los obtenidos en las determinaciones basales. El valor medio fue de 166,73, menor que en las basales con un error típico de la media de 7,14, una desviación típica de 49,97, con un valor mínimo de 100 y un máximo de 300 (figura 28).

En el caso de PDGF y VGF los valores medios son 6 veces mayores. La media de PDGF es de 3181,52 con un error típico de 83,33 y una desviación típica de 565,17, con un valor máximo de 4000 y un mínimo de 1909. Para la VGF es de 423,38 con un error típico de 49,12 y una desviación típica de 333,16, con un máximo de 1592,20 y un mínimo de 35,30 (figura 29).

En la determinación de TGF β la media es 512 veces mayor que en el basal pero esto es debido a los valores extremos, uno cercano al cero (0.10) y otro máximo de 1102 ngr/ml. La desviación típica por este motivo es de 201,33 (figura 30).

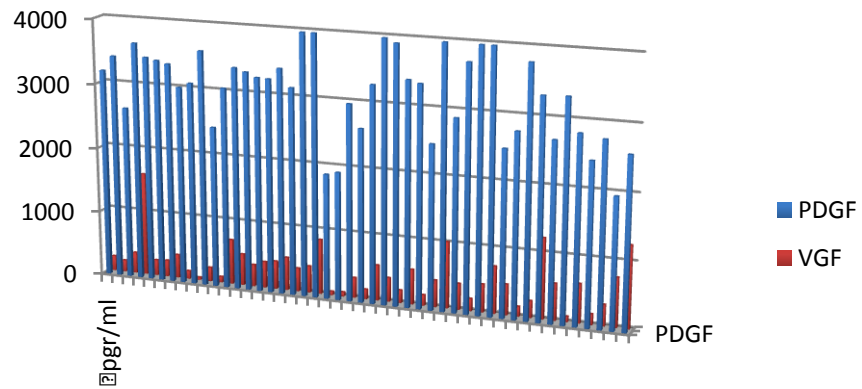


Fig. 29. Representación de la concentración en picogramos por mililitro de PDGF (azul) y VGF (rojo) en los concentrados de plaquetas.

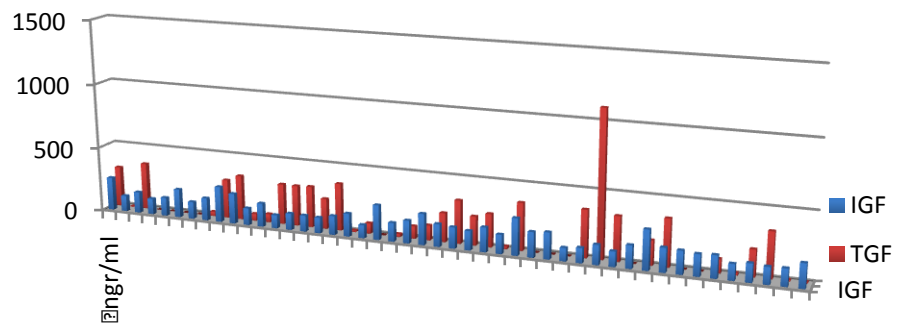


Fig. 30. Concentración de TGF (rojo) y de IGF (azul) en los concentrados de plaquetas expresado en nanogramos por mililitro.

PACIENTE	ng/ml IGF	ng/ml tgf beta-1	pg/ml PDGF	pg/ml VGF
1	256	310,7	3204	227,6
2	122	3,8	3435	176,3
3	162	360	2646	320,3
4	122	0,1	3657	1592,2
5	142	0,1	3452	237,2
6	220	0,1	3419	250
7	132	0,1	3378	359,4
8	174	32,7	3035	121,8
9	275	296,5	3110	35,3
10	233	341	3613	214,7
11	131	53,2	2466	86,5
12	181	63,6	3076	691,4
13	102	309,6	3400	484,4
14	127	308,8	3347	335,9
15	124	314,1	3277	402,3
16	120	231,5	3270	429,7
17	145	360	3439	507,8
18	176	10,4	3165	359,4
19	101	79,5	4000	410,2
20	265	1,1	4000	843,8
21	143	21,8	1909	54,5
22	173	95,2	1953	64,1
23	237	113,9	2995	308,6
24	172	220,7	2643	147,4

Tabla 4. Valores obtenidos en los que se perdieron 3 muestras en las determinaciones de TGF β , PDGF y VGF.

	ng/ml	ng/ml	pg/ml	pg/ml
PACIENTE	IGF	tgf beta-1	PDGF	VGF
25	161	328,3	3307	543
26	146	219,2	4000	367,2
27	186	251,3	3936	195,5
28	145	20,1	3419	535,2
29	280	360	3376	163,5
30	149	1102	4000	429,7
31	114	336,1	4000	722,7
32	173	0,1	2533	468,8
33	300	185,2	2800	150,6
34	182	356,6	3802	257,8
35	175	0,1	3343	1226
36	163	0,5	2720	562,5
37	169	104,2	3356	86,5
38	121	16,9	2848	597,7
39	139	199,8	2470	163,5
40	128	341,7	2791	328,1
41	131	11,5	1990	753,9
42	182	9,8	2604	1249,4

5.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Con los datos presentados anteriormente se pueden dar los siguientes resultados estadísticos en los que se presentan los valores medios de las determinaciones antes de ser procesadas y los resultados tras procesar las muestras para concentrarlas. En la tabla 5 se presentan los valores medios, desviaciones típicas y los valores máximos y mínimos de cada determinación.

La concentración media de IGF1 es de 173 ngr/ml. con una desviación típica de 48, con un valor mínimo de 95 ngr/ml. y un máximo de 309 ngr/ml. La TGFβ1 tiene un valor medio de 22 ngr/ml. con una desviación típica de 29,23, un valor mínimo de 0,1 ngr/ml. y un máximo de 151 ngr/ml. La PDGF1 tiene un valor medio de 698 pgr/ml. con una desviación típica de 487 y un valor mínimo de 155 pgr/ml. y uno máximo de 2461 pgr/ml. La VGF1 tiene un valor medio de 164 pgr/ml. con una desviación típica de 283, un valor mínimo de tres y un máximo de 1409 pgr/ml.

Con este análisis se puede obtener una tabla de los incrementos de cada determinación antes de hacer el estudio estadístico. En la tabla 6 se puede ver el número de veces que se han incrementado los valores de los resultados basales expresado numéricamente, así como gráficamente en la figura 31.

	N		Media	Error típ. de la media	Desv. Típ.	Mínimo	Máximo
	Válidos	Perdidos					
PLT1	48	1	185.68	6.22	43.08	94.00	293.00
IGF1	49	0	173.48	6.94	48.57	95.20	309.00
TGF_BETA1	46	3	22.33	4.31	29.23	.10	151.20
PDGF1	46	3	698.20	71.84	487.26	155.00	2461.00
VEGF1	46	3	164.12	42.32	287.04	3.20	1409.10
PLT2	49	0	354.71	18.40	128.80	113.00	683.00
IGF2	49	0	166.73	7.14	49.97	100.00	300.00
TGF_BETA2	46	3	168.07	29.68	201.33	.10	1102.00
PDGF2	46	3	3181.52	83.33	565.17	1909.00	4000.00
VEGF2	46	3	423.38	49.12	333.16	35.30	1592.20
I_PLT	48	1	2.00	.11	.75	.72	4.47
I_IGF	49	0	.97	.02	.13	.72	1.39
I_TGF_BETA	46	3	521.64	264.23	1792.07	.00	11020.00
I_PDGF	46	3	6.34	.54	3.68	1.36	21.10
I_VEGF	46	3	6.42	1.03	7.00	.94	38.06

Tabla 5. Resultados expresados en: las plaquetas (plt) por mm³ y factores de crecimiento en IGF y TGFbeta en ngr/ml y PDGF y VEGF en pgr/ml.

En la figura 31 se puede observar también que el 25% de las muestras tienen una concentración de plaquetas mayor a dos veces y media. La concentración de la TGF β es 54 veces mayor y la concentración de PDGF superiores 3,8 veces.

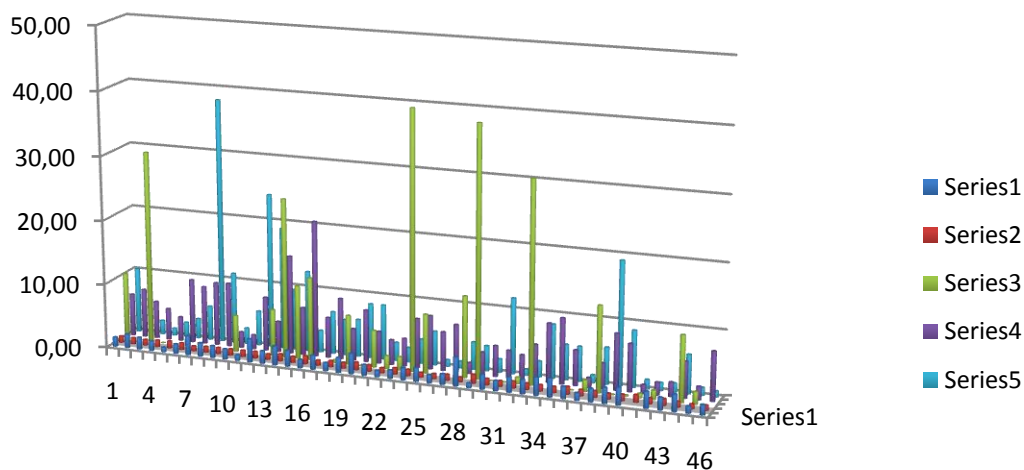


Fig. 31. Representación, en conjunto, del número de veces en que está concentrado cada uno de los parámetros analizados.

El 75% de las muestras tienen una concentración de plaquetas de más de una vez y media. La concentración de PDGF también es de 3,8 o superior y la concentración de VGF aumenta más de 2,15 veces. Sin embargo, la concentración de TGF β en un 25% de los casos disminuye.

	Percentiles		
	25	50	75
PLT1	158.00	180.00	209.50
IGF1	132.00	179.00	203.00
TGF_BETA1	.95	12.00	36.80
PDGF1	380.75	499.00	918.50
VGF1	40.90	78.50	126.60
PLT2	268.50	343.00	441.00
IGF2	127.50	162.00	184.00
TGF_BETA2	3.13	99.70	311.55
PDGF2	2773.25	3292.00	3492.25
VGF2	185.90	359.40	537.15
I_PLT	1.49	1.91	2.44
I_IGF	.89	.98	1.02
I_TGF_BETA	.63	8.38	54.60
I_PDGF	3.88	5.75	8.35
I_VGF	2.15	4.79	8.50

Tabla 7. Valores estadísticos de las variables antes y después del proceso y cociente.

Aplicando la T de Student (tabla 7) se puede afirmar que los cambios en la concentración son significativos $P < 0,001$ en todos los parámetros estudiados excepto en la TGF β , en la que no es claramente significativo debido a la alta desviación típica. Para estudiar la significatividad estadística de los cambios se realiza el contraste de los rangos con signo de Wilcoxon para datos pareados, obteniendo los resultados siguientes

	Aumentan	Disminuyen	Igual	p-valor
PLT	44	4	0	0.000
IGF	14	34	1	0.023
TGF_BETA	32	12	2	0.000
PDGF	46	0	0	0.000
VGF	44	2	0	0.000

Tabla 8. Distribución de los cambios en los valores de concentración. Se puede apreciar que los valores han aumentado con excepción de la IGF.

Se puede observar que de las 48 muestras en las que se midió la concentración de plaquetas en 44 de ellas aumenta y sólo en cuatro disminuye ($p < 0.001$) (tabla 8).

Con respecto a las concentraciones de IGF de las 48 muestras, sólo en 14 de ellas aumenta el valor mientras que en las otras 34 permanece igual o disminuye ($p < 0.05$).

La concentración de la TGF β sólo disminuyó en doce muestras mientras que en 32 aumentó ($p < 0.001$).

La concentración de PDGF aumentó en las 46 muestras ($p < 0.001$).

En VGF 44 muestras aumentaron su valor y sólo en dos de ellas disminuyó ($p < 0.001$).

Para corroborar la significación del estudio se realizaron transformaciones logarítmicas sobre las que se aplicaron las pruebas para datos pareados T de Student y Wilcoxon, obteniéndose diferencias claramente significativas ($P > 0,001$) excepto para la IGF (tabla 9).

La tabla 10 muestra los valores de plaquetas concentradas y factores de crecimiento de cada uno de los individuos, referidos al número de veces que ha aumentado su valor inicial.

p-valor	T Student	Wilcoxon
PLT	0.000	0.000
IGF	0.033	0.018
TGF_BETA	0.011	0.016
PDGF	0.000	0.000
VGF	0.000	0.000

Tabla 9. Representación de los valores “p-valor” de todos los elementos analizados tras aplicar la t-Student y el análisis de Wilcoxon. Se demuestra un aumento estadísticamente significativo en todos los valores menos en la IGF.

Tabla 10. Valores de plaquetas concentradas y factores de crecimiento de cada uno de los individuos, referidos al número de veces que ha aumentado su valor inicial.

PACIENTE	PLAQUETAS	IGF	TGFBETA1	PDGF	VEGF
1	1,49	1,02	10,46	6,59	10,16
2	2,18	0,97	0,09	7,57	2,20
3	1,88	0,91	30,00	5,84	2,17
4	1,54	1,03	0,01	4,90	1,13
5	0,73	1,12	0,00	3,78	2,31
6	1,49	1,03	1,00	9,94	3,12
7	3,01	0,77	0,00	9,03	5,34
8	2,12	0,92	327,00	9,89	38,06
9	1,89	0,97	185,31	10,00	11,03
10	1,62	0,98	5,69	2,47	2,48
11	0,90	0,99	106,40	2,22	5,41
12	3,64	1,04	127,20	8,40	24,01
13	1,99	0,87	7,25	4,80	18,92
14	2,99	1,09	24,70	15,28	9,52
15	2,53	0,93	11,38	7,41	12,53
16	1,30	1,24	12,86	21,10	3,44
17	2,22	0,81	3600,00	6,28	6,60
18	1,29	0,96	0,47	9,48	5,61
19	2,30	0,91	7,64	4,97	5,82
20	3,19	1,19	0,03	8,10	8,49
21	1,69	1,00	5,74	4,98	8,52
22	0,98	0,77	2,01	3,89	2,86
23	1,30	1,00	2,08	4,32	2,29
24	1,90	0,98	40,13	7,64	3,83

PACIENTE	PLAQUETAS	IGF	TGFBETA1	PDGF	VEGF
25	2,15	0,75	9,12	8,33	5,29
26	1,29	0,80	2192,00	6,02	1,04
27	1,66	0,93	2513,00	7,38	1,05
28	4,47	0,75	12,56	1,68	4,28
29	0,72	1,39	38,71	3,57	3,92
30	2,26	0,99	0,00	4,78	2,10
31	1,57	0,89	0,01	4,28	11,74
32	2,39	1,05	1,00	3,83	0,98
33	<u>2,23</u>	<u>0,98</u>	<u>31,17</u>	<u>5,67</u>	<u>2,46</u>
34	2,80	0,99	11020,00	9,13	8,38
35	2,91	0,96	3361,00	10,15	5,50
36	1,86	1,20	0,00	5,48	5,42
37	1,15	0,97	1,77	1,49	1,27
38	2,04	1,01	13,31	3,98	5,74
39	2,46	0,89	0,06	8,71	19,13
40	2,69	0,98	0,19	7,37	8,78
41	#DIV/0!	1,14	0,69	1,36	1,50
42	2,57	0,92	1,41	1,97	1,27
43	1,93	1,05	181,64	2,23	1,42
44	2,63	0,88	10,20	5,63	6,02
45	1,09	0,72	1,92	2,04	1,24
46	1,57	0,80	98,00	7,61	0,94
47	1,45	0,90	Perdida	perdida	Perdida
48	1,88	0,99	Perdida	perdida	Perdida
49	2,08	0,99	Perdida	perdida	Perdida

Tabla 10 (Cont). Valores de plaquetas concentradas y factores de crecimiento de cada uno de los individuos, referidos al número de veces que ha aumentado su valor inicial.

5.4. OBSERVACIÓN AL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO

5.4.1. Observación de las plaquetas

5.4.1.1. Integridad celular

5.4.1.2. Morfología

5.4.1.3. Número de pseudópodos

5.4.1.4. Degranulación

5.4.1.5. Activación plaquetaria

5.4.1. Observación de las plaquetas

Tras la inclusión de las muestras en resina se realizaron cortes de los mismos y se observaron al microscopio electrónico.

Como se sabe las plaquetas tienen una morfología esférica desde que se escinden del megacariocito. Esta morfología esférica la mantienen en el torrente sanguíneo siempre que no se provoque la activación de las mismas por un proceso intravascular o por la salida del torrente sanguíneo por una solución de continuidad de los vasos lo que provoca cambios en la morfología para facilitar la agregación plaquetaria.

Lo que se observó mediante la microscopía electrónica es la similitud en la forma de las plaquetas de la sangre periférica y las que se encuentran en los concentrados.

En las plaquetas de la sangre periférica se puede ver una activación basal debido a la manipulación que se produce por la venopunción y las plaquetas que están en los concentrados no deberían tener mucha más actividad ya que con ella pierden parte de su funcionalidad para la hemostasia y sus otras funciones como son la intervención en los procesos inflamatorios y procesos regenerativos¹²⁸.

5.4.1.1. Integridad celular.

La primera forma de detectar que las plaquetas están en buenas condiciones es comprobar que no se hayan fragmentado o roto en el proceso de la concentración ya que para ello se les somete a una centrifugación para separarlas por el gradiente de peso.

Tanto en sangre periférica como en el concentrado de todas las muestras analizadas se pueden ver las plaquetas enteras y con sus organelos en el interior.

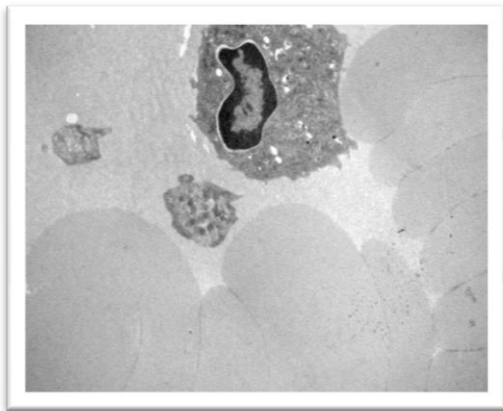


Fig. 32. Sangre periférica.

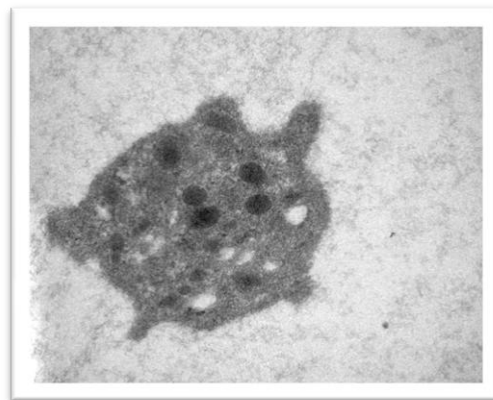


Fig. 33. Concentrado.

En la figura 32 de la sangre periférica así como en la figura 33 en la que se observa la plaqueta en el concentrado se puede apreciar que la integridad de las plaquetas es total y que el proceso de concentración de las mismas no ha provocado la rotura celular, lo que le haría perder sus propiedades.

5.4.1.2. Morfología.

La morfología de las plaquetas suele ser esférica como se ha descrito. El simple hecho de realizar una extracción de sangre provoca una pequeña activación que genera cambios en su morfología. Lo importante es que estos cambios no sean lo suficientemente importantes para que pierda sus propiedades. El primer cambio que se produce en la morfología es perder esa forma esférica perfecta y tomar formas menos regulares. El estadio máximo de cambio es la formación de numerosos pseudópodos que luego se analizará.

Wagner¹²⁸ describe el factor forma como grado de activación en el que el valor 1 es la esfera perfecta y el 0 la actividad máxima de las plaquetas. Este factor forma (FF) lo determina midiendo el perímetro, comparando el de una esfera que sería el valor 1 con el que resulta de la esfera dividido por el valor de la longitud de sus excrecencias.

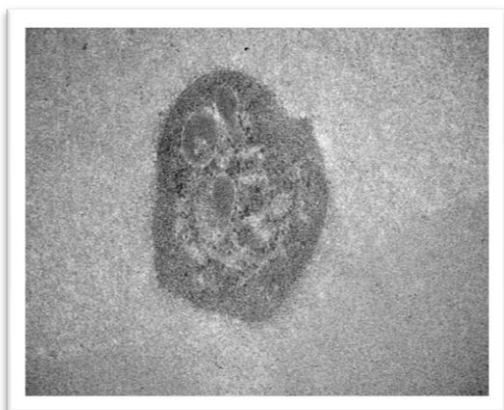


Fig. 34. Sangre periférica.

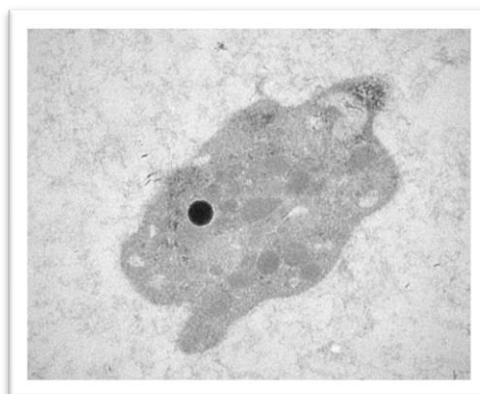


Fig. 35. Concentrados.

Tanto en las figuras 34, 36 y 38 como en las figuras 35, 37 y 39 se puede observar que aunque la forma no es esférica perfecta, la similitud entre las dos es grande y no se encuentran grandes diferencias.

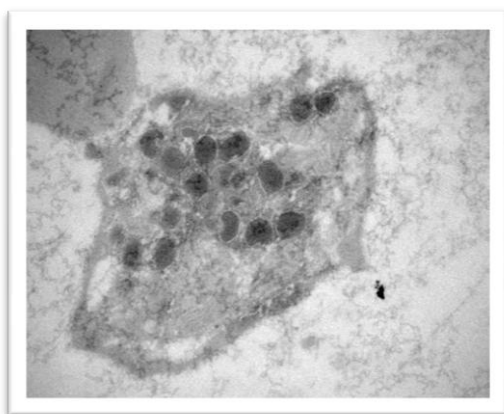


Fig. 36. Sangre Periférica.

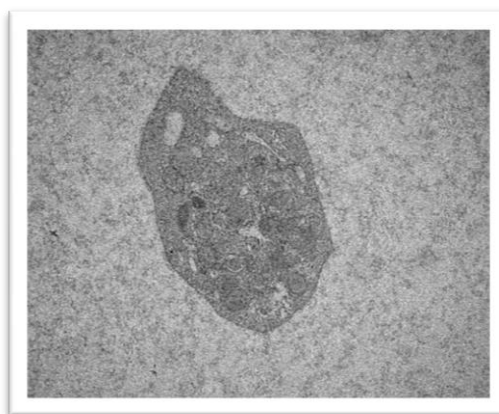


Fig. 37. Concentrados.

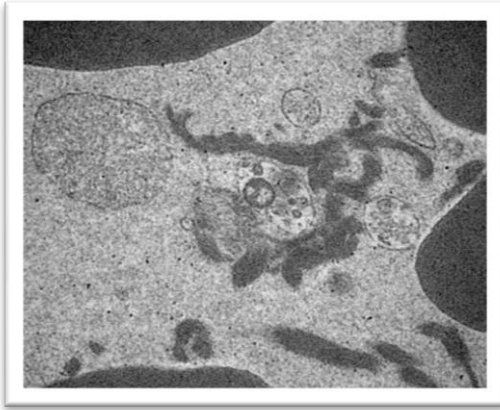


Fig. 38. Sangre periférica.

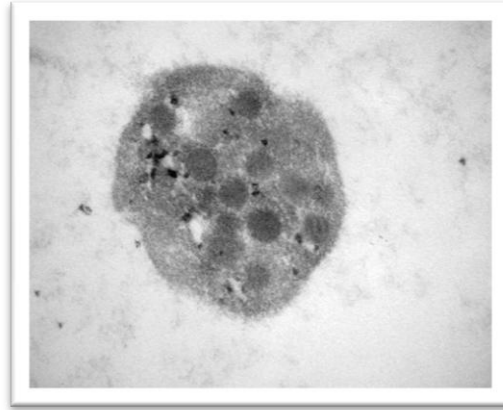


Fig. 39. Concentrados.

5.4.1.3. Número de pseudópodos.

Wagner¹²⁸ y Berecin¹²⁹ describen como determinar la forma de la célula en microscopía electrónica mediante el FF que determina el perímetro celular que ocupan las prolongaciones o pseudópodos que pueden formar ciertas células como las plaquetas.

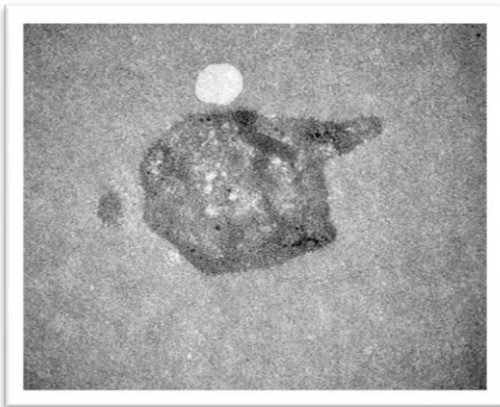


Fig. 40. Sangre periférica.

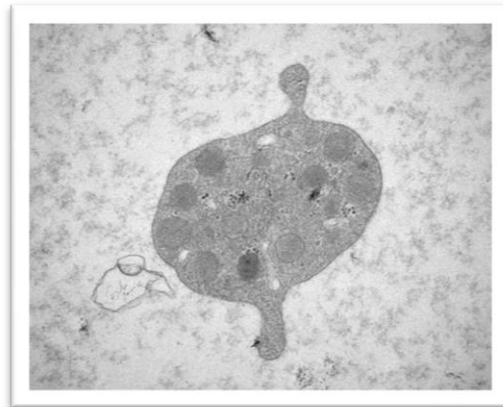


Fig. 41. Concentrados.

En las figuras 40, 42 y 44 y en las figuras 41, 43 y 45 se pueden apreciar pequeños pseudópodos en la forma de las plaquetas; tanto en la sangre periférica como en las plaquetas de los concentrados dichos pseudópodos no superan ni el 10% del perímetro de la célula.

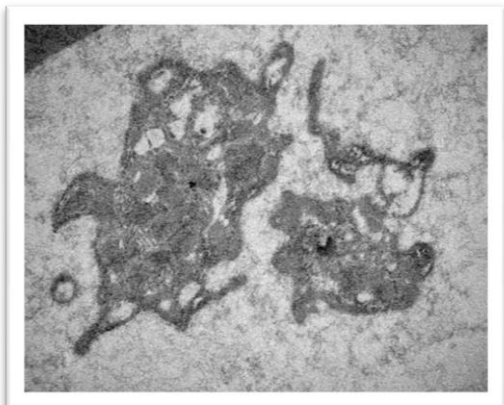


Fig. 42. Sangre periférica.

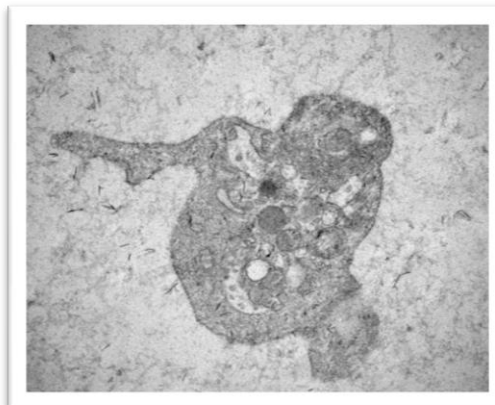


Fig. 43. Concentrados.

El que la plaqueta muestre un número tan pequeño de pseudópodos es significativo de su bajo grado de activación y de la conservación de su contenido que no ha empezado a liberarse.

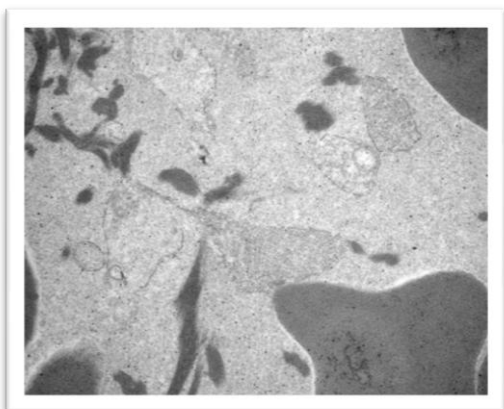


Fig. 44. Sangre periférica.

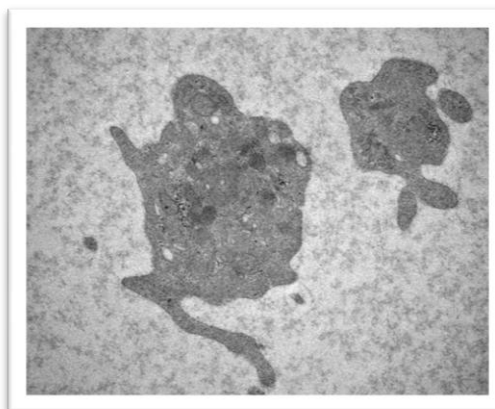


Fig. 45. Concentrados.

5.4.1.4. Degranulación.

Otro factor importante en la función de la plaqueta es la integridad de sus organelos y sobre todo de los gránulos α que son el almacén principal de las proteínas activas.

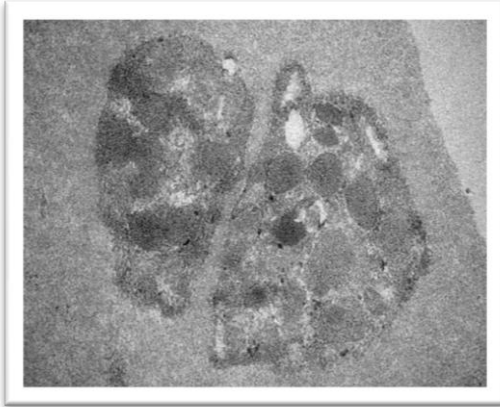


Fig. 46. Sangre periférica.

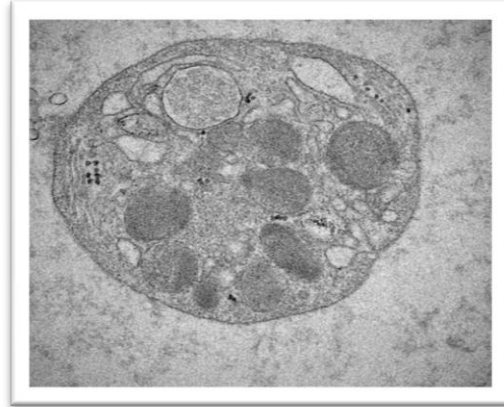


Fig. 47. Concentrados.

En las figuras 46, 48 y 50 y en las figuras 47, 49 y 51, que representan las plaquetas de los concentrados, se puede observar que tanto los gránulos α como el sistema canalicular se encuentran intactos y que todo su contenido se conserva en el interior, de forma que toda la funcionalidad de las plaquetas está intacta y, por tanto, serán funcionantes a la hora de ser utilizadas. Los pocos defectos que se encuentran en el interior de las plaquetas aparecen más por un problema en el corte de las muestras que por la situación de actividad de las plaquetas.

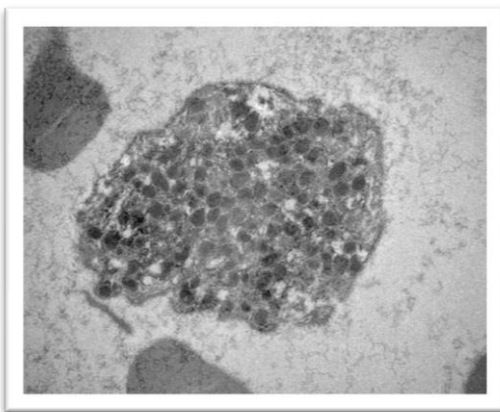


Fig. 48. Sangre periférica.

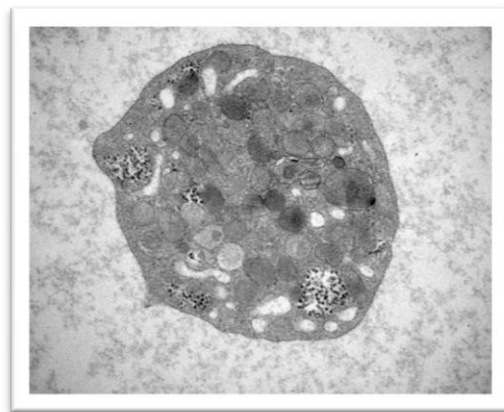


Fig. 49. Concentrados.

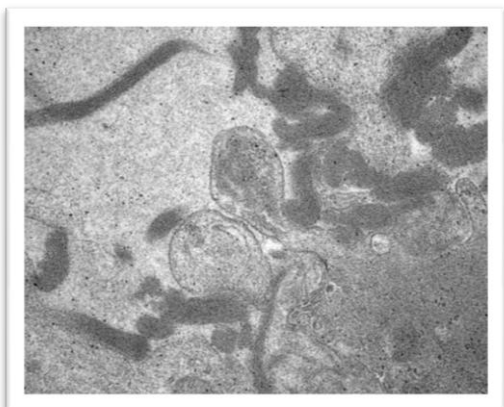


Fig. 50. Sangre periférica.

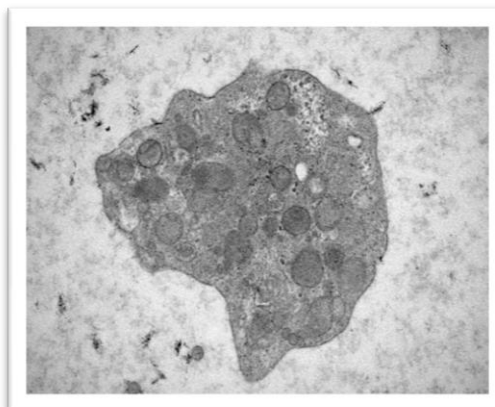


Fig. 51. Concentrados.

5.4.1.5. Grado de actividad plaquetaria.

Analizando las figuras anteriores y el resto de las que se disponen se puede decir que la actividad plaquetaria de las muestra de concentrados no es mayor que la que presentan las plaquetas de sangre periférica y que la integridad celular, el FF, la degranulación y la morfología de las plaquetas pueden considerarse iguales en ambos grupos de plaquetas.

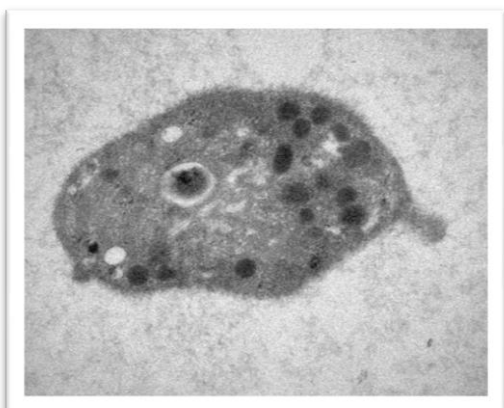


Fig. 52. Concentrado.

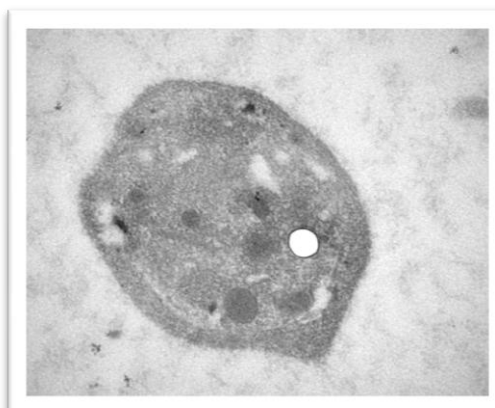


Fig. 53. Concentrado.

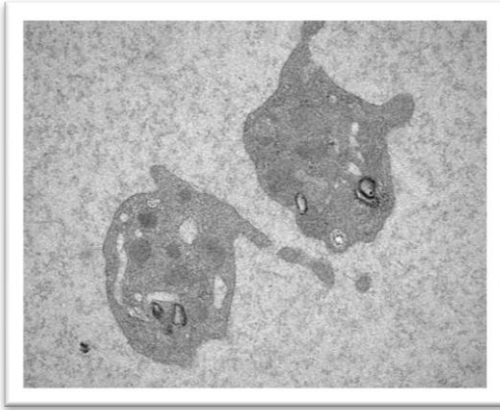


Fig. 54. Concentrado.



Fig. 55. Concentrado.



Fig. 56. Concentrado.

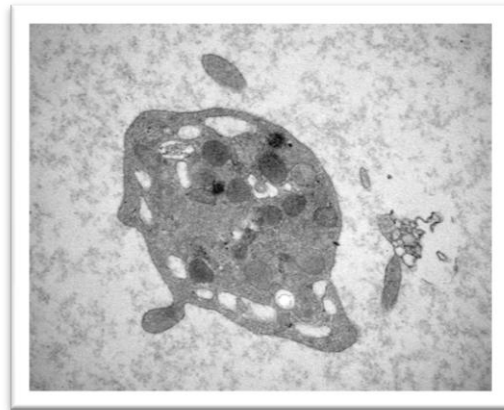


Fig. 57. Concentrado.

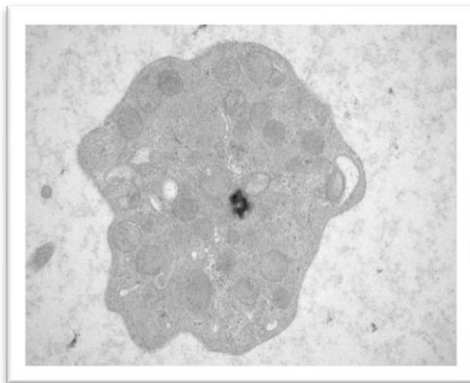


Fig. 58. Concentrado

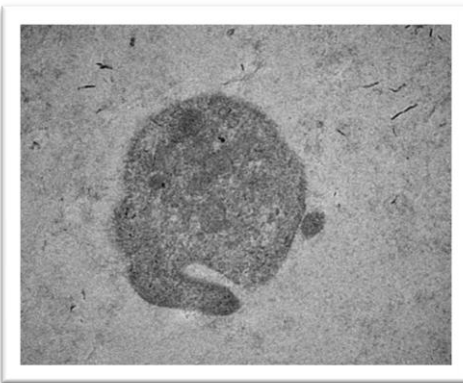


Fig. 59. Concentrado

6. DISCUSIÓN

Los objetivos planteados al inicio de esta investigación estaban encaminados a encontrar un nuevo método de obtención de plasma rico en plaquetas (PRP) de forma ambulatoria, sencillo y cerrado, que evitara la contaminación de la muestra hasta su utilización, que contuviera la concentración necesaria para la regeneración en factores de crecimiento y que mantuviera intactos hasta su utilización los depósitos de dichos factores de crecimiento que son las plaquetas.

Para conseguir este objetivo se desarrolló un método de obtención de PRP ambulatorio, aséptico y sencillo, que se pasó posteriormente a analizar comprobando que las concentraciones en factores de crecimiento eran similares a los obtenidos por otros autores. Los resultados en la concentración de plaquetas podrían hacer pensar que el método fuera algo bajo en su rendimiento ya que no llegaba a alcanzar los niveles de los sistemas existentes en el mercado, pero, sin embargo, la concentración en factores de crecimiento si es equiparable, reforzándose la hipótesis del manejo de las plaquetas y su integridad.

En segundo lugar, con el objetivo de corroborar la integridad de las plaquetas y su bajo grado de activación, se realizó un estudio mediante microscopía electrónica para poder ver los diferentes factores morfológicos que determinasen su actividad. Como se verá a lo largo de la discusión, no existe una correlación entre el número de plaquetas y la concentración de factores de crecimiento, lo que avala la hipótesis de trabajo planteada.

ESTUDIO DE LA CONCENTRACIÓN DE PLAQUETAS Y FACTORES DE CRECIMIENTO.

Antes de comenzar la discusión consideramos de interés reseñar brevemente los últimos trabajos realizados con PRP, que justifican el estudio y comprobación de un nuevo método de obtención de PRP.

Una de las aplicaciones más discutidas ha sido la regeneración de hueso; al respecto, Cheng¹³⁰, como anteriormente discutieron otros autores, llega a la conclusión de que el PRP en combinación con células madre forman un composite que es capaz de mejorar la regeneración de hueso en defectos críticos generados en conejos. Con este mismo criterio Nair y col¹³¹ llegan a la misma conclusión con la salvedad de incluir en la mezcla un biomaterial como la hidroxiapatita.

Liu¹³² llega a estos mismos resultados con la diferencia de que las células madre que obtiene son de tejido adiposo del animal de experimentación. Sugiere incluso que esta mezcla que llama hueso inyectable (injectable tissue-engineered bone) puede generar hueso en zonas ectópicas de los ratones de experimentación.

Kawasumi¹³³ en un estudio con ratas también consigue regenerar defectos críticos provocados para alargar los huesos largos usando una mezcla de células madre de médula con PRP.

Pieri y col.¹³⁴ consiguen un mayor índice de formación ósea con una mezcla de células madre y PRP en defectos alveolares generados en mandíbulas de cerdos minipigs. En defectos verticales periodontales pero sin células madre, Camargo y col.¹³⁵ obtienen un mayor índice de regeneración.

El concepto de ingeniería tisular también se ha utilizado en la regeneración de cartílago con el mismo procedimiento de condrocitos más PRP para regenerar defectos del cartílago de articulaciones en ratas de experimentación¹³⁶. Drengk y col¹³⁷ han mejorado la diferenciación hacia condrocitos a partir de células madre gracias a la influencia de PRP. Otros trabajos hablan de la reparación del cartílago y la prevención de la osteoartritis con inyecciones intraarticulares de PRP^{138, 139}.

En el campo de la medicina del deporte se está estudiando la utilidad del PRP para la cicatrización de lesiones ligamentosas y tendinosas^{140, 141}, así como también en lesiones musculares para mejorar los tiempos de recuperación de los deportistas^{142, 143}.

Plachokova¹⁴⁴ en el año 2008 realizó una revisión bibliográfica sistemática para ver el efecto del PRP sobre la regeneración de hueso en odontología y obtuvo como conclusión la utilidad del mismo en elevaciones de seno y en defectos periodontales, contradiciendo las conclusiones que ella misma había obtenido en el 2006. En 2009 Plachokova¹⁴⁵ ha realizado un estudio en el que demuestra que en animales de experimentación como la rata el PRP no presenta grandes ventajas. Sin embargo, el PRP humano en combinación con biomateriales favorece la cicatrización de injertos óseos.

En otro estudio Lee HW¹⁴⁶ determinó el grado de cicatrización que puede aportar el PRP analizando diferentes parámetros como la epitelización, el ratio de contracción de la herida y la formación de nuevos vasos en conejos de Nueva Zelanda. Los resultados determinan que se produce una aceleración en la epitelización y angiogénesis en dichos estudios.

Suaid¹⁴⁷ demuestra lo mismo en injertos de conectivo en los que también observa una formación de nuevo cemento. En esta misma línea, durante el año 2009, han aparecido numerosos estudios de los efectos beneficiosos del PRP, solo o en combinación con células madre, aumentando la cicatrización al favorecer la angiogénesis y, por tanto, acelerando la cicatrización^{148, 149, 150, 151, 152, 153}.

Li X¹⁵⁴ describe los beneficios de la inyección de PRP en la zona infartada del miocardio a modo de efecto de protección. En dicho trabajo provoca un infarto en ratas Wistar ligando la coronaria descendente y posteriormente inyecta el PRP en la zona infartada. Se sacrifican las ratas a los 28 días. El resultado es que se puede observar una remodelación ventricular y una aceleración en la cicatrización, demostrando la menor dilatación ventricular y facilitando la angiogénesis y arteriogénesis en la zona infartada. Más recientemente en un estudio con humanos se ha visto este mismo efecto. Wehberg y col¹⁵⁵ han confirmado mayor eficacia en el tratamiento de la angina de pecho en una combinación de revascularización transmiocárdica e inyección de PRP que con el tratamiento clásico de la revascularización. En los pacientes se mejoró la fracción de eyección de una forma significativa.

Los problemas que pueden aparecer tras un tratamiento quirúrgico oral en pacientes tratados con bifosfonatos están empezando a ser abordados con la aplicación de PRP según Bards y col¹⁵⁶. Este mismo procedimiento ha sido sugerido por uno de los pioneros en el PRP como Marx RE¹⁵⁷. En esta misma línea de tratamiento, aunque en osteomielitis no causada por bifosfonato, se ha empezado a utilizar como un nuevo agente terapéutico; lo describen en su trabajo Jian W y Zhang C¹⁵⁸.

En nuestro estudio, como ya se mencionó, se diluyeron los concentrados con el fin de tener suficiente muestra sobre la que hacer las determinaciones de proteínas, por lo que nuestros resultados y determinaciones, que son por unidad de volumen, serán la mitad de las que se habrían obtenido si se hubiera cogido la cantidad de suero correcta para ser usada en la regeneración. La cantidad correcta para tener un volumen de concentrado suficiente sería de 10 ml. ya que el analizador Cell Dyn necesita un volumen mínimo de muestra para la determinación del número de plaquetas al igual que para la determinación de factores de crecimiento. De ahí que algunas determinaciones se perdieran al tener que repetir las por algún error de lectura. Esta ha sido la justificación de diluir la muestra.

La media de la concentración de plaquetas que se obtuvo fue el doble del recuento en sangre periférica, lo que supuso un resultado más pobre del que se consiguió con otros

métodos que se han estudiado^{7, 42, 80}. Este análisis se ha realizado con los valores absolutos en las muestras realizadas, que recordemos, están diluidos. Estos datos podrían parecer desalentadores con respecto a los demás métodos ya que muchos de ellos multiplicaban por cuatro el número de plaquetas.

La concentración de IGF prácticamente es la misma en los concentrados que en las muestras control lo que también reflejan otros autores como Weibrich⁸³; en otros estudios no es una determinación que se estudie. La explicación de este resultado probablemente sea que las plaquetas no son depósito de IGF y por mucho que se las concentre no aumentará su cantidad con este procedimiento.

La media de los resultados en la concentración de TGF β 2 es 521 veces más alta que el conseguido por otros autores al medir el rendimiento de diferentes métodos^{82, 43, 80, 84}. Una de las razones por la que se consiguen estos valores tan altos puede ser debida a los valores extremos que salieron en las muestras y que desviaron la media (11.000 ngr/ml), pero eliminados dichos valores el aumento sigue siendo superior al basal en ocho veces. Esto se puede explicar por el estado temprano de activación de las plaquetas que ha impedido que se liberen los depósitos de dichas proteínas. Nuestros resultados son similares y, en algún caso, mejores que en otros trabajos.

Se puede pensar que aunque la concentración plaquetaria conseguida no es la misma que con otros sistemas, en el nuestro se conserva la integridad plaquetaria en mayor medida, lo que favorece que los depósitos de TGF que están en los gránulos alfa se mantengan íntegros hasta el final sin perder su contenido pudiendo liberarse en el momento de su utilización.

La PDG y la VGF se ha concentrado seis veces más que en la sangre periférica lo que mejora los resultados o por lo menos iguala a los que presentan otros autores como Mazzucco⁸² o Weibrich^{83, 46}.

En el trabajo de Anitua⁹³ se analiza una muestra casi idéntica a la nuestra. Relaciona el concentrado de plaquetas con la obtención de factores de crecimiento llegando a la conclusión de la variabilidad de la concentración de VGF en diferentes individuos, al igual que nosotros. Consigue concentrarse en la media pero se presentan también valores dispares tanto por exceso como por defecto. La concentración de IGF es totalmente independiente del número de plaquetas ya que su depósito en las mismas es mínimo. La concentración de los otros dos factores de crecimiento, consigue llegar a ser

entre 2,5 y 3 veces mientras que con nuestro sistema varía entre 6 veces para PDGF y 8 para TGF lo que mejora los resultados anteriormente citados.

Las cuatro determinaciones proteicas obtenidas en nuestro método han alcanzado los resultados de otros sistemas a pesar de que la concentración de plaquetas es menor que en la mayoría de los sistemas ya que solo es del doble y no del cuádruple. Esto nos hizo pensar en que lo importante no era el número de plaquetas, sino el estado de las mismas y su función para ser utilizadas en caso de necesidad. Es lógico que si el procesado de la muestra deteriora o activa las plaquetas, el contenido de sus gránulos se liberará antes de tiempo y, por tanto, se perderá antes de ser utilizado.

El trabajo de Mazzucco¹⁵⁹ en 2009 fortalece esta hipótesis. Analiza cuatro métodos diferentes de obtención de plasma rico en plaquetas. Como se ha expuesto, los diferentes métodos tienen sistemáticas de centrifugación diferentes en cuanto a fuerzas centrífugas lo que hace pensar que no es un factor determinante para concentrar plaquetas. También utilizan diferentes anticoagulantes y métodos de gelificación. A pesar de las diferentes metodologías todos los sistemas consiguen un buen concentrado de plaquetas, pero se demuestra que no existe una relación directa entre la cantidad de plaquetas y el concentrado en factores de crecimiento. La conclusión del autor es que la manipulación de la sangre de las muestras provoca injurias en las plaquetas, de forma que se activan y liberan su contenido. Esto provoca que el resultado clínico no sea el mismo en el caso de utilización de diferentes PRP.

Los valores obtenidos por nosotros hacen pensar que en el caso de no haber diluido la muestra el rendimiento habría sido mejor. En cualquier caso, la concentración de factores de crecimiento obtenidos por nosotros son equiparables a cualquier otro sistema, lo que le haría apto para ser utilizado.

ANALISIS DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.

Los resultados obtenidos en las determinaciones de factores de crecimiento nos hicieron desarrollar la segunda parte del estudio para justificar los resultados. El estudio morfológico de las plaquetas con microscopía electrónica determina que el grado de activación de las plaquetas es prácticamente el mismo que en las muestras basales y que el proceso de centrifugación a baja velocidad y la decantación mantienen la integridad de las plaquetas al máximo, lo que permite que sus almacenamientos de proteínas se mantengan intactos. El número de pseudópodos de la muestra de

concentrados, es aproximadamente el mismo que en la muestra basal. Esto puede estar provocado por el método de extracción sanguínea, ya que en él, la sangre es sometida a un aumento de velocidad y entra en contacto con materiales diferentes al endotelio vascular, razón suficiente para provocar el cambio morfológico.

En las plaquetas del concentrado también podemos observar, gracias a la microscopía electrónica, que los gránulos que poseen se encuentran íntegros sin tener contacto con la membrana de la plaqueta. Si se produjese dicho contacto es muy probable que se pudiese en marcha el proceso de liberación de su contenido.

Hemos podido observar también que el número de gránulos en las plaquetas antes y después del procesado es prácticamente el mismo, lo que explica el buen estado de conservación de las plaquetas después de su manipulación.

A pesar de concentrar menos el número de plaquetas el resultado de los factores de crecimiento es mayor, lo que supone que el rendimiento del sistema es óptimo. No todos los sistemas se han sometido a este análisis, pero Leitner³⁹ que es el único que lo ha hecho mediante microscopía electrónica de Vivostat® frente a Pccs®, obtiene una activación determinada por la morfología de las plaquetas muy baja en el método Vivostat® con respecto a Pccs®.

Anitua¹⁶⁰ hizo microscopía electrónica de las plaquetas que resultaban de su método de obtención, observando que la integridad de su membrana se encontraba conservada y con su contenido proteico en su interior.

Al analizar estadísticamente estos resultados se puede decir que con excepción de la IGF el resto de los factores de crecimiento se concentran con una gran significación estadística ($p > 0,001$), lo que teóricamente catalogaría el nuevo método de obtención de factores de crecimiento como un sistema óptimo para su utilización en la práctica clínica, tanto en las indicaciones de uso con materiales de injerto, como complemento fundamental en la ingeniería tisular con las células madre, augurando un buen futuro en la regeneración.

7. CONCLUSIONES

1. Al conseguir que la sangre no cambie de recipiente desde el momento de la extracción hasta su utilización, se dispone de un sistema cerrado que evita la contaminación.
2. La doble centrifugación a baja velocidad proporciona una concentración de factores de crecimiento más que suficiente para ser utilizado en procesos de regeneración tisular.
3. Se ha comprobado que el sistema respeta la integridad de las plaquetas y que impide su activación antes de ser utilizadas. Por tanto, el plasma rico en plaquetas obtenido mediante el nuevo método estudiado muestra unas características óptimas para su utilización.

8. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA POR ORDEN ALFABÉTICO

A

Akça K, Cehreli M, Demiralp B, Güzel E, Dağdeviren A. Platelet-rich plasma and bone healing: A histologic study in titanium bone chambers. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2007 08; 27(4): 387-92.

Andrade MGS, de Freitas Brandão CJ, Sá CN, de Bittencourt TC, Borio Dos Santos C, Sadigursky M. Evaluation of factors that can modify platelet-rich plasma properties. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008 01; 105(1): 5-12.

Anitua E, Aguirre JJ, Algorta J, Ayerdi E, Cabezas AI, Orive G, et al. Effectiveness of autologous preparation rich in growth factors for the treatment of chronic cutaneous ulcers. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2008 02; 84(2): 415-21.

Anitua E, Andía I, Sanchez M, Azofra J, del Mar Zalduendo M, de la Fuente M, et al. Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture. *J Orthop Res.* 2005 03; 23(2): 281-6.

Anitua E, Andia I, Sánchez M. PRGF (Plasma Rico en Factores de Crecimiento). *Dental dialogue.* 2004; 3(1): 2-15.

Anitua E, Andia I. Valoración de la regeneración ósea en un modelo animal: utilización de plasma rico en factores de crecimiento. *Gaceta Dental.* 2001: 50-3.

Anitua E, Sánchez M, Nurden AT, Nurden P, Orive G, Andía I. New insights into and novel applications for platelet-rich fibrin therapies. *Trends Biotechnol.* 2006 05; 24(5): 227-34

Anitua E, Sanchez M, Nurden AT, Zalduendo M, de la Fuente M, Orive G, et al. Autologous fibrin matrices: A potential source of biological mediators that modulate tendon cell activities. *J Biomed Mater Res A.* 2006 05; 77(2): 285-93.

Anitua E, Sánchez M, Orive G, Andía I. The potential impact of the preparation rich in growth factors (PRGF) in different medical fields. *Biomaterials.* 2007 11; 28(31): 4551-60.

Anitua E. Factores de crecimiento plasmático. Una revolución terapéutica. Ideas y Trabajos Odontoestomatológicos. 2001; 2(2): 90-4.

Anitua E. Plasma rich in growth factors: Preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. Int J Oral Maxillofac Implants. 1999 07; 14(4): 529-35.

Anitua E. The use of plasma-rich growth factors (PRGF) in oral surgery. Pract Proced Aesthet Dent. 2001 08; 13(6): 487.

Anitua EA. Enhancement of osseointegration by generating a dynamic implant surface. J Oral Implantol. 2006; 32(2): 72-6.

Annunziata M, Oliva A, Buonaiuto C, Di Feo A, Di Pasquale R, Passaro I, et al. In vitro cell-type specific biological response of human periodontally related cells to platelet-rich plasma. J Periodontal Res. 2005 12; 40(6): 489-95.

Appel TR, Pötzsch B, Müller J, von Lindern J, Bergé SJ, Reich RH. Comparison of three different preparations of platelet concentrates for growth factor enrichment. Clin Oral Implants Res. 2002 10; 13(5): 522-8.

Arnás M, Ballester JF, Molinos JR, Alvarez A. Factores de crecimiento: Estado del conocimiento actual. Revista española odontoestomatológica de implantes. 2002; 10(4): 202-8.

Aukhil I. Biology of wound healing. Periodontol 2000. 2000 02; 22: 44-50.

B

Badr MS, Oliver RJ. Platelet-rich plasma: An adjunctive treatment modality for bisphosphonate osteonecrosis? J Oral Maxillofac Surg. 2009 06; 67(6): 1357.

Ballester JF, Alvarez A, López I, Molinos JR, Arnás M, Vera JM. Protocolo para la obtención de PDGF a partir de PRF. Revista española odontoestomatológica de implantes. 2004; 12(1): 14-29.

Ballester JF, Sola J, Borrás J, Ferreira J, Morales D, Arnás M, et al. Estudio comparativo de cuatro procedimientos para la obtención del coágulo concentrado en plaquetas. Revista española odontoestomatológica de implantes. 2003; 11(1): 6-13.

Bartold PM, McCulloch CA, Narayanan AS, Pitaru S. Tissue engineering: A new paradigm for periodontal regeneration based on molecular and cell biology. *Periodontol* 2000. 2000 10; 24: 253-69.

Berezin V, Skladchikova G, Bock E. Evaluation of cell morphology by video recording and computer-assisted image analysis. *Cytometry*. 1997 02/01; 27(2): 106-16.

Beutler E, Lichtman M.A, Coller B.S, Kipps T.J, Selgson U. *Williams Hematología* 6 ed. Edit. McGraw-Hill. 2005.

Blanton MW, Hadad I, Johnstone BH, Mund JA, Rogers PI, Eppley BL, et al. Adipose stromal cells and platelet-rich plasma therapies synergistically increase revascularization during wound healing. *Plast Reconstr Surg*. 2009 02; 123(2): 56s-64s.

C

Camargo PM, Lekovic V, Weinlaender M, Divnic-Resnik T, Pavlovic M, Kenney EB. A surgical reentry study on the influence of platelet-rich plasma in enhancing the regenerative effects of bovine porous bone mineral and guided tissue regeneration in the treatment of intrabony defects in humans. *J Periodontol*. 2009 06; 80(6): 915-23.

Camargo PM, Lekovic V, Weinlaender M, Vasilic N, Madzarevic M, Kenney EB. Platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral combined with guided tissue regeneration in the treatment of intrabony defects in humans. *J Periodontol Res*. 2002 08; 37(4): 300-6.

Chen D, Bernstein AM, Lemons PP, Whiteheart SW. Molecular mechanisms of platelet exocytosis: Role of SNAP-23 and syntaxin 2 in dense core granule release. *Blood*. 2000 02/01; 95(3): 921-9.

Chen D, Lemons PP, Schraw T, Whiteheart SW. Molecular mechanisms of platelet exocytosis: Role of SNAP-23 and syntaxin 2 and 4 in lysosome release. *Blood*. 2000 09/01; 96(5): 1782-8.

Cheng X, Lei D, Mao T, Yang S, Chen F, Wu W. Repair of critical bone defects with injectable platelet rich plasma/bone marrow-derived stromal cells composite: Experimental study in rabbits. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg*. 2008 04; 14(2): 87-95.

Claesson-Welsh L. Platelet-derived growth factor receptor signals. *J Biol Chem.* 1994 12/23; 269(51): 32023-6.

D

Dagobert Tutsch, Norbert Boss, Gunter Wangerin, editor. *Diccionario Médico Roche;* 1993.

De Obarrio JJ, Araúz-Dutari JI, Chamberlain TM, Croston A. The use of autologous growth factors in periodontal surgical therapy: Platelet gel biotechnology-case reports. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2000 10; 20(5): 486-97.

Ding X, Li S, Zheng X, Hu L, Hu W, Luo Y. The effect of platelet-rich plasma on cavernous nerve regeneration in a rat model. *Asian J Androl.* 2009 03/19; 11(2):215-21.

Drengk A, Zapf A, Stürmer EK, Stürmer KM, Frosch K. Influence of platelet-rich plasma on chondrogenic differentiation and proliferation of chondrocytes and mesenchymal stem cells. *Cells Tissues Organs.* 2009 08/11; 189(5): 317-26.

Duran H, Arcelus I, García-Sancho L, González F, Alvarez Fernandez J, Ferrández L, Méndez J., editor. *Tratado de Patología y Clínica Quirúrgica.* 4ª ed. Madrid: Edit. McGraw-Hill; 1987.

E

Efron J. Role of platelet-rich plasma in accelerating the wound-healing process and recovery in patients undergoing operation for pilonidal sinus disease: Preliminary results. *World J Surg.* 2009 08; 33(8): 1770-1.

Eppley BL, Pietrzak WS, Blanton M. Platelet-rich plasma: A review of biology and applications in plastic surgery. *Plast Reconstr Surg.* 2006 11; 118(6): 147-59.

Eppley BL, Woodell JE, Higgins J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: Implications for wound healing. *Plast Reconstr Surg.* 2004 11; 114(6): 1502-8.

Erkilet E, Koyuncu M, Atmaca S, Yarim M. Platelet-rich plasma improves healing of tympanic membrane perforations: Experimental study. *J Laryngol Otol.* 2009 05/28; 123(5): 482-7.

Everts PAM, Hoffmann J, Weibrich G, Mahoney CB, Schönberger, JPAM, van Zundert A, et al. Differences in platelet growth factor release and leucocyte kinetics during autologous platelet gel formation. *Transfus Med.* 2006 10; 16(5): 363-8.

Everts PAM, Knape JTA, Weibrich G, Schönberger, Jacques PAM, Hoffmann J, Overdevest EP, et al. Platelet-rich plasma and platelet gel: A review. *J Extra Corpor Technol.* 2006 06; 38(2): 174-87.

F

Fernández-Barbero JE, Galindo-Moreno P, Avila-Ortiz G, Caba O, Sánchez-Fernández E, Wang H. Flow cytometric and morphological characterization of platelet-rich plasma gel. *Clin Oral Implants Res.* 2006 12; 17(6): 687-93.

Froum SJ, Wallace SS, Tarnow DP, Cho S. 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 02; 22(1): 45-53.

Fujita K, Yamada K, Sato T, Takagi I, Sakashita T. A rapid method for embedding biological tissues in a low viscosity epoxy resin "quetol 651" for electron microscopy. *J Electron Microsc (Tokyo).* 1977; 26(2): 165-6.

Fürst G, Gruber R, Tangl S, Zechner W, Haas R, Mailath G, et al. Sinus grafting with autogenous platelet-rich plasma and bovine hydroxyapatite. A histomorphometric study in minipigs. *Clin Oral Implants Res.* 2003 08; 14(4): 500-8.

G

García de la Fuente AM, Estefanía Cundín E, Aguirre Zorzano LA. Actualización sobre el uso de los factores de crecimiento y proteínas en el tratamiento regenerativo periodontal (I). *Periodoncia: Revista Oficial de la Sociedad Española de Periodoncia.* 1999; 9(5): 341-54.

Garg AK, Gargenese D, Peace I. Using platelet-rich plasma to develop an autologous membrane for growth factor delivery in dental implant therapy. *Dent Implantol Update.* 2000 06; 11(6): 41-4.

Garg AK. The use of platelet-rich plasma to enhance the success of bone grafts around dental implants. *Dent Implantol Update.* 2000 03; 11(3): 17-21.

Gehring S, Hoerauf H, Laqua H, Kirchner H, Klüter H. Preparation of autologous platelets for the ophthalmologic treatment of macular holes. *Transfusion*. 1999 02; 39(2): 144-8.

Gemmel CC. Comparative performance of two platelet-concentrating cell separators. A prospective, patient-controlled, clinical evaluation. *Hematology laboratories Toronto General Hospital*. March, 2001: 1-8.

Giannobile WV, Hernandez RA, Finkelman RD, Ryan S, Kiritsy CP, D'Andrea M, et al. Comparative effects of platelet-derived growth factor-BB and insulin-like growth factor-I, individually and in combination, on periodontal regeneration in macaca fascicularis. *J Periodontal Res*. 1996 07; 31(5): 301-12.

Gil Albarova J, Garrido Lahiguera R, Gil Albarova R, Melgosa Gil M. Materiales para la reparación y sustitución ósea: Factores de crecimiento y terapia génica en cirugía ortopédica y traumatología [revisión]. *Mapfre Medicina*. 2003; 14(1): 51-65.

Gonshor A. Technique for producing platelet-rich plasma and platelet concentrate: Background and process. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2002 12; 22(6): 547-57.

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 Implants Res*. 2006 04; 17(2): 212-9.

Guillén Salazar MJ, Mirabet Lis V, Sopena Juncosa J, Fernández Ferri P, Segura Gil P, Corpa Arenas JM. Rediferenciación de condrocitos en plasma rico en factores de crecimiento plaquetarios para condroplastia articular. *Patología del aparato locomotor*. 2005; 3(1): 13-23.

H

Hammond JW, Hinton RY, Curl LA, Muriel JM, Lovering RM. Use of autologous platelet-rich plasma to treat muscle strain injuries. *Am J Sports Med*. 2009 06/12; 37(6): 1135-42.

Hartwig D, Harloff S, Liu L, Schlenke P, Wedel T, Geerling G. Epitheliotropic capacity of a growth factor preparation produced from platelet concentrates on corneal epithelial cells: A potential agent for the treatment of ocular surface defects? *Transfusion*. 2004 12; 44(12): 1724-31.

Hartwig D, Harloff S, Liu L, Schlenke P, Wedel T, Geerling G. Epitheliotropic capacity of a growth factor preparation produced from platelet concentrates on corneal epithelial cells: A potential agent for the treatment of ocular surface defects? *Transfusion*. 2004 12; 44(12): 1724-31.

Hatakeyama M, Beletti ME, Zanetta-Barbosa D, Dechichi P. Radiographic and histomorphometric analysis of bone healing using autogenous graft associated with platelet-rich plasma obtained by 2 different methods. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008 01; 105(1): 13-8.

Hu Z, Peel SAF, Ho SKC, Sándor GKB, Clokie CML. Platelet-rich plasma induces mRNA expression of VEGF and PDGF in rat bone marrow stromal cell differentiation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009 01/28; 107(1): 43-8.

I

Inkinen K, Wolff H, Lindroos P, Ahonen J. Connective tissue growth factor and its correlation to other growth factors in experimental granulation tissue. *Connect Tissue Res*. 2003; 44(1): 19-29.

J

Jakse N, Tangl S, Gilli R, Berghold A, Lorenzoni M, Eskici A, et al. Influence of PRP on autogenous sinus grafts. An experimental study on sheep. *Clin Oral Implants Res*. 2003 10; 14(5): 578-83.

Jia W, Zhang C. Comment on "platelet-rich plasma as a novel therapeutic agent in osteomyelitis". *Med Hypotheses*. 2009 08/24; 73(2): 270-1.

K

Kark LR, Karp JM, Davies JE. Platelet releasate increases the proliferation and migration of bone marrow-derived cells cultured under osteogenic conditions. *Clin Oral Implants Res*. 2006 06; 17(3): 321-7.

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 10; 71(10): 1654-61.

Kawasumi M, Kitoh H, Siwicka KA, Ishiguro N. The effect of the platelet concentration in platelet-rich plasma gel on the regeneration of bone. *J Bone Joint Surg Br.* 2008 07; 90(7): 966-72.

Keceli HG, Sengun D, Berberoğlu A, Karabulut E. Use of platelet gel with connective tissue grafts for root coverage: A randomized-controlled trial. *J Clin Periodontol.* 2008 03/05; 35(3): 255-62.

Keles GC, Cetinkaya BO, Albayrak D, Koprulu H, Acikgoz G. Comparison of platelet pellet and bioactive glass in periodontal regenerative therapy. *Acta Odontol Scand.* 2006 11; 64(6): 327-33.

Kim S, Kim W, Park J, Kim H. A comparative study of osseointegration of avana implants in a demineralized freeze-dried bone alone or with platelet-rich plasma. *J Oral Maxillofac Surg.* 2002 09; 60(9): 1018-25.

Kjaergard HK, Pedersen JH, Krasnik M, Weis-Fogh US, Fleron H, Griffin HE. Prevention of air leakage by spraying vivostat fibrin sealant after lung resection in pigs. *Chest.* 2000 04; 117(4): 1124-7.

Klongnoi B, Rupprecht S, Kessler P, Thorwarth M, Wiltfang J, Schlegel KA. Influence of platelet-rich plasma on a bioglass and autogenous bone in sinus augmentation. An explorative study. *Clin Oral Implants Res.* 2006 06; 17(3): 312-20.

L

Landesberg R, Moses M, Karpatkin M. Risks of using platelet rich plasma gel. *J Oral Maxillofac Surg.* 1998 09; 56(9): 1116-7.

Las sorprendentes posibilidades de las células madre adultas [homepage on the Internet]. 6 octubre 2005. Available from: bioeticaweb.com.

Lee H, Reddy MS, Geurs N, Palcanis KG, Lemons JE, Rahemtulla FG, et al. Efficacy of platelet-rich plasma on wound healing in rabbits. *J Periodontol.* 2008 04; 79(4): 691-6.

Leitner GC, Gruber R, Neumuller J, Wagner A, Kloimstein P, Hocker P, et al. Platelet content and growth factor release in platelet-rich plasma: A comparison of four different systems. *Vox Sang.* 2006 08/21; 91(2): 135-9.

Lekovic V, Camargo PM, Weinlaender M, Vasilic N, Aleksic Z, Kenney EB. Effectiveness of a combination of platelet-rich plasma, bovine porous bone mineral and guided tissue regeneration in the treatment of mandibular grade II molar furcations in humans. *J Clin Periodontol.* 2003 08; 30(8): 746-51.

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 02; 73(2): 198-205.

Li X, Zhou X, Zeng S, Ye F, Yun J, Huang T, et al. Effects of intramyocardial injection of platelet-rich plasma on the healing process after myocardial infarction. *Coron Artery Dis.* 2008 08; 19(5): 363-70.

Lindeboom JAH, Mathura KR, Aartman IHA, Kroon FHM, Milstein DMJ, Ince C. Influence of the application of platelet-enriched plasma in oral mucosal wound healing. *Clin Oral Implants Res.* 2007 02; 18(1): 133-9.

Liu Y, Zhou Y, Feng H, Ma G, Ni Y. Injectable tissue-engineered bone composed of human adipose-derived stromal cells and platelet-rich plasma. *Biomaterials.* 2008 08/15; 29(23): 3338-45.

Lorente Pérez-Sierra A, Rodríguez Escudero F. ¿Conseguimos plasma concentrado rico en plaquetas de forma ambulatoria? *Científica Dental. Revista científica de formación continuada.* 2005; 2(2): 73-8.

Lozada JL, 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): 38-42.

Lynch SE, Buser D, Hernandez RA, Weber HP, Stich H, Fox CH, et al. Effects of the platelet-derived growth factor/insulin-like growth factor-I combination on bone regeneration around titanium dental implants. Results of a pilot study in beagle dogs. *J Periodontol.* 1991 11; 62(11): 710-6

Lynch SE, de Castilla GR, Williams RC, Kiritsy CP, Howell TH, Reddy MS, et al. The effects of short-term application of a combination of platelet-derived and insulin-like growth factors on periodontal wound healing. *J Periodontol.* 1991 07; 62(7): 458-67.

Lynch SE, Nixon JC, Colvin RB, Antoniades HN. Role of platelet-derived growth factor in wound healing: Synergistic effects with other growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 11; 84(21): 7696-700.

Lynch SE, Williams RC, Polson AM, Howell TH, Reddy MS, Zappa UE, et al. A combination of platelet-derived and insulin-like growth factors enhances periodontal regeneration. *J Clin Periodontol*. 1989 09; 16(8): 545-8.

M

Maiorana C, Sommariva L, Brivio P, Sigurtà D, Santoro F. Maxillary sinus augmentation with anorganic bovine bone (bio-oss) and autologous platelet-rich plasma: Preliminary clinical and histologic evaluations. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2003 06; 23(3): 227-35.

Márquez de Aracena del Cid, R., Montero de Espinosa Escoriaza, I., Muñoz Saez M, Pereira Gutiérrez G, Martín Leal F. Tratamiento con concentrado plaquetario plasmático subconjuntival y tópico en el trasplante de limbo. *Mapfre Medicina*. 2006; 17(4): 280-5.

Martínez González JM, Cano Sánchez J, Gonzalo Lafuente JC, Campo Trapero J, Esparza Gómez GC, Seoane Lestón M. ¿Existen riesgos al utilizar los concentrados de plasma rico en plaquetas (PRP) de uso ambulatorio? *Medicina Oral*. 2002; 7(5): 375-90.

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 06; 85(6): 638-46.

Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): What is PRP and what is not PRP? *Implant Dent*. 2001; 10(4): 225-8.

Marx RE. Reconstruction of defects caused by bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaws. *J Oral Maxillofac Surg*. 2009 05; 67(5): 107-19.

Mazzucco L, Balbo V, Cattana E, Borzini P. Platelet-rich plasma and platelet gel preparation using PlateltexR. *Vox Sang*. 2008 04/92; 94(3): 202-8.

Mazzucco L, Balbo V, Cattana E, Guaschino R, Borzini P. Not every PRP-gel is born equal. evaluation of growth factor availability for tissues through four PRP-gel

preparations: Fibrinet, RegenPRP-kit, plateltex and one manual procedure. *Vox Sang.* 2009 08/09; 97(2): 110-8.

McCarrel T, Fortier L. Temporal growth factor release from platelet-rich plasma, trehalose lyophilized platelets, and bone marrow aspirate and their effect on tendon and ligament gene expression. *J Orthop Res.* 2009 08; 27(8): 1033-42.

Miranda SR, Nary Filho H, Padovan LEM, Ribeiro DA, Nicolielo D, Matsumoto MA. Use of platelet-rich plasma under autogenous onlay bone grafts. *Clin Oral Implants Res.* 2006 12; 17(6): 694-9.

Mollenhauer HH, Droleskey RE. Image contrast in sections of epoxy resin-embedded biological material: Maintenance of a proper anhydride-epoxy ratio during tissue impregnation. *Microsc Res Tech.* 1997 03/01; 36(5): 417-21.

Monteiro SO, Lepage OM, Theoret CL. Effects of platelet-rich plasma on the repair of wounds on the distal aspect of the forelimb in horses. *Am J Vet Res.* 2009 02; 70(2): 277-82.

N

Nair MB, Varma HK, Menon KV, Shenoy SJ, John A. Reconstruction of goat femur segmental defects using triphasic ceramic-coated hydroxyapatite in combination with autologous cells and platelet-rich plasma. *Acta Biomater.* 2009 06/21; 5(5): 1742-55.

O

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 Implants Res.* 2005 10; 16(5): 622-9.

Okada H, Murakami S. Cytokine expression in periodontal health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1998; 9(3): 248-66.

Okuda K, Kawase T, Momose M, Murata M, Saito Y, Suzuki H, et al. Platelet-rich plasma contains high levels of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta and modulates the proliferation of periodontally related cells in vitro. *J Periodontol.* 2003 06; 74(6): 849-57.

Olea Rosson J, Olea Rosson N. Plasma enriquecido de plaquetas en regeneración ósea maxilar con implantes óseointegrados y estudio de microscopía óptica y electrónica. *Revista española odontoestomatológica de implantes*. 2002; 10(3): 146-50.

Olmedo N, Murature DA, Villarreal N. Preparación y usos clínicos del P.R.P. en cirugía odontológica. *Revista española odontoestomatológica de implantes*. 2003; 11(3): 145-56.

P

Palmer DS, Aye MT, Dumont L, Dumont D, McCombie N, Giulivi A, et al. Prevention of cytokine accumulation in platelets obtained with the COBE spectra apheresis system. *Vox Sang*. 1998; 75(2): 115-23.

Peñarrocha Diago M, Sanchís Bielsa JM, Martínez González JM. Factores de crecimiento y proteínas que influyen en el crecimiento óseo: Aplicaciones en implantología oral. *Periodoncia: Revista Oficial de la Sociedad Española de Periodoncia*. 2001; 11(3): 205-16.

Petrungaro P. Platelet-rich plasma for dental implants and soft-tissue grafting. interview by arun K. garg. *Dent Implantol Update*. 2001 06; 12(6): 41-6.

Petrungaro P. The use of platelet rich plasma with growth factor (autologous platelet gel) to enhance hard and soft tissue healing and maturation in surgical implant dentistry. *Clinical Update*. 2000; 1(8).

Petrungaro P. The use of platelet rich plasma with growth factors (autologous platelet gel) to enhance hard and soft tissue healing and maturation in the reconduction of the maxillary pneumatized sinus. *Clinical Update*. 2001; 1(9).

Pieri F, Lucarelli E, Corinaldesi G, Fini M, Aldini NN, Giardino R, et al. Effect of mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma on the healing of standardized bone defects in the alveolar ridge: A comparative histomorphometric study in minipigs. *J Oral Maxillofac Surg*. 2009 02; 67(2): 265-72.

Plachokova AS, Nikolidakis D, Mulder J, Jansen JA, Creugers NHJ. Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in dentistry: A systematic review. *Clin Oral Implants Res*. 2008 06/16; 19(6): 539-45.

Plachokova AS, Nikolidakis D, Mulder J, Jansen JA, Creugers NHJ. Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in dentistry: A systematic review. *Clin Oral Implants Res.* 2008 06/16; 19(6): 539-45.

Plachokova AS, van den Dolder J, van den Beucken JP, Jansen JA. Bone regenerative properties of rat, goat and human platelet-rich plasma. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2009 08/13; 38(8): 861-9.

Plachokova AS, van den Dolder J, Stoelinga PJ, Jansen JA. The bone regenerative effect of platelet-rich plasma in combination with an osteoconductive material in rat cranial defects. *Clin Oral Implants Res.* 2006 06; 17(3): 305-11.

Pryor ME, Polimeni G, Koo K, Hartman MJ, Gross H, April M, et al. Analysis of rat calvaria defects implanted with a platelet-rich plasma preparation: Histologic and histometric observations. *J Clin Periodontol.* 2005 09; 32(9): 966-72.

Q R

Rábago D, Best TM, Zgierska AE, Zeisig E, Ryan M, Crane D. A systematic review of four injection therapies for lateral epicondylitis: Prolotherapy, polidocanol, whole blood and platelet-rich plasma. *Br J Sports Med.* 2009 07/21; 43(7): 471-81.

Raghoobar GM, Schortinghuis J, Liem RSB, Ruben JL, van der Wal, Jacqueline E, Vissink A. Does platelet-rich plasma promote remodeling of autologous bone grafts used for augmentation of the maxillary sinus floor? *Clin Oral Implants Res.* 2005 06; 16(3): 349-56.

Reed GL, Fitzgerald ML, Polgár J. Molecular mechanisms of platelet exocytosis: Insights into the "secrete" life of thrombocytes. *Blood.* 2000 11/15; 96(10): 3334-42.

Rendu F, Brohard-Bohn B. The platelet release reaction: Granules' constituents, secretion and functions. *Platelets.* 2001 08; 12(5): 261-73.

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 06; 60(6): 630-5.

S

Saito M, Takahashi KA, Arai Y, Inoue A, Sakao K, Tonomura H, et al. Intraarticular administration of platelet-rich plasma with biodegradable gelatin hydrogel microspheres prevents osteoarthritis progression in the rabbit knee. *Clin Exp Rheumatol*. 2009; 27(2): 201-7.

Sampson S, Gerhardt M, Mandelbaum B. Platelet rich plasma injection grafts for musculoskeletal injuries: A review. *Curr Rev Musculoskelet Med*. 2008 12; 1(3-4): 165-74.

Sánchez AR, Sheridan PJ, Kupp LI. Is platelet-rich plasma the perfect enhancement factor? A current review. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2003 01; 18(1): 93-103.

Sánchez M, Anitua E, Azofra J, Andía I, Padilla S, Mujika I. Comparison of surgically repaired achilles tendon tears using platelet-rich fibrin matrices. *Am J Sports Med*. 2007 02/12; 35(2): 245-51.

Sánchez M, Azofra J, Aizpurúa B, Elorriaga R, Anitua E, Andía I. Use of autologous plasma rich in growth factors in arthroscopic surgery. *Arthroscopia* 2003; 10(1): 12-20.

Schips L, Dalpiaz O, Cestari A, Lipsky K, Gidaro S, Zigeuner R, et al. Autologous fibrin glue using the vivostat system for hemostasis in laparoscopic partial nephrectomy. *Eur Urol*. 2006 10/24; 50(4): 801-5.

Serrano Cuenca V, Casas Hernández A. Factores de crecimiento: ¿Un nuevo enfoque terapéutico? *Periodoncia: Revista Oficial de la Sociedad Española de Periodoncia*. 1997 Abril-Junio; 7(2): 99-115

Shanaman R, Filstein MR, Danesh-Meyer MJ. Localized ridge augmentation using GBR and platelet-rich plasma: Case reports. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2001 08; 21(4): 345-55

Sidman JD, Lander TA, Finkelstein M. Platelet-rich plasma for pediatric tonsillectomy patients. *Laryngoscope*. 2008 10; 118(10): 1765-7.

Skripchenko A, Kurtz J, Moroff G, Wagner SJ. Platelet products prepared by different methods of sedimentation undergo platelet activation differently during storage. *Transfusion*. 2008 07/13; 48(7): 1469-77.

Sodek J, McKee MD. Molecular and cellular biology of alveolar bone. *Periodontol* 2000. 2000 10; 24: 99-126.

Soffer E, Ouhayoun J, Dosquet C, Meunier A, Anagnostou F. Effects of platelet lysates on select bone cell functions. *Clin Oral Implants Res.* 2004 10; 15(5): 581-8.

Sonnleitner D, Huemer P, Sullivan DY. 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 11; 15(6): 879-82.

Suaid FF, Carvalho MD, Santamaria MP, Casati MZ, Nociti FH, Sallum AW, et al. Platelet-rich plasma and connective tissue grafts in the treatment of gingival recessions: A histometric study in dogs. *J Periodontol.* 2008 05; 79(5): 888-95.

T

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 02; 52(2): 161.

Thomas S, Jones M, Wynn K, Fowler T. The current status of maggot therapy in wound healing. *Br J Nurs.* 2001 12; 10(22): S5.

U

V

Vassallo RR, Murphy S. A critical comparison of platelet preparation methods. *Curr Opin Hematol.* 2006 09; 13(5): 323-30.

W

Wagner T, Vetter A, Dimovic N, Guber SE, Helmberg W, Kroll W, et al. Ultrastructural changes and activation differences in platelet concentrates stored in plasma and additive solution. *Transfusion.* 2002 06/15; 42(6): 719-27.

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 periodontium: An autoradiographic study on dogs. *J Periodontol.* 1994 05; 65(5): 429-36

Wehberg KE, Answini G, Wood D, Todd J, Julian J, Ogburn N, et al. Intramyocardial injection of autologous platelet-rich plasma combined with transmyocardial revascularization. *Cell Transplant.* 2009; 18(3): 353-9.

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 04; 34(4): 665-71.

Weibrich G, Kleis WKG, Buch R, Hitzler WE, Hafner G. The harvest smart PRePTM system versus the friadent-schütze platelet-rich plasma kit. *Clin Oral Implants Res*. 2003 04; 14(2): 233-9.

Weibrich G, Kleis WKG, 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 Implants Res*. 2003 06; 14(3): 357-62.

Whitman DH, Berry RL, Green DM. Platelet gel: An autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg*. 1997 11; 55(11): 1294-9. 17(4): 1124-7.

Wiltfang J, Schlegel KA, Schultze-Mosgau S, Nkenke E, Zimmermann R, Kessler P. Sinus floor augmentation with beta-tricalciumphosphate (beta-TCP): Does platelet-rich plasma promote its osseous integration and degradation? *Clin Oral Implants Res*. 2003 04; 14(2): 213-8.

Wu W, Zhang J, Dong Q, Liu Y, Mao T, Chen F. Platelet-rich plasma - A promising cell carrier for micro-invasive articular cartilage repair. *Med Hypotheses*. 2009 04/12; 72(4): 455-7.

**X
Y**

Yamada Y, Ueda M, Hibi H, Baba S. A novel approach to periodontal tissue regeneration with mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma using tissue engineering technology: A clinical case report. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2006 08; 26(4): 363-9.

Yuan N, Wang C, Wang Y, Yu T, Long Y, Zhang X, et al. [Preparation of autologous platelet-rich gel for diabetic refractory dermal ulcer and growth factors analysis from it]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*. 2008 04; 22(4): 468-71.

Z

Zimmermann R, Arnold D, Strasser E, Ringwald J, Schlegel A, Wiltfang J, et al. Sample preparation technique and white cell content influence the detectable levels of growth factors in platelet concentrates. *Vox Sang.* 2003 11; 85(4): 283-9

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 10; 41(10): 1217-24.

BIBLIOGRAFÍA POR ORDEN DE REFERENCIA

- ¹ . Dagobert Tutsch“, Norbert Boss“, Gunter Wangerin, editor. Diccionario Médico Roche; 1993.
- ² . Las sorprendentes posibilidades de las células madre adultas [homepage on the Internet]. 6 octubre 2005. Available from: bioéticaweb.com.
- ³ . Thomas S, Jones M, Wynn K, Fowler T. The current status of maggot therapy in wound healing. *Br J Nurs*. 2001 12; 10(22): S5.
- ⁴ . Gil Albarova J, Garrido Lahiguera R, Gil Albarova R, Melgosa Gil M. Materiales para la reparación y sustitución ósea: Factores de crecimiento y terapia genética en cirugía ortopédica y traumatología [revisión]. *Mapfre Medicina*. 2003; 14(1): 51-65.
- ⁵ . Okada H, Murakami S. Cytokine expression in periodontal health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1998; 9(3): 248-66.
- ⁶ . 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 02; 52(2): 161.
- ⁷ . 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 06; 85(6): 638-46.
- ⁸ . 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 07; 14(4): 529-35.
- ⁹ . Anitua E, Sánchez M, Nurden AT, Nurden P, Orive G, Andía I. New insights into and novel applications for platelet-rich fibrin therapies. *Trends Biotechnol*. 2006 05/15; 24(5): 227-34.
- ¹⁰ . Anitua E, Sánchez M, Orive G, Andía I. The potential impact of the preparation rich in growth factors (PRGF) in different medical fields. *Biomaterials*. 2007 11/30; 28(31): 4551-60.
- ¹¹ . Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): What is PRP and what is not PRP? *Implant Dent*. 2001; 10(4): 225-8.

-
- ¹² . Anitua E. The use of plasma-rich growth factors (PRGF) in oral surgery. *Pract Proced Aesthet Dent*. 2001 08; 13(6): 487
- ¹³ . Olea Rosson J, Olea Rosson N. Plasma enriquecido de plaquetas en regeneración ósea maxilar con implantes óseointegrados y estudio de microscopía óptica y electrónica. *Revista española odontoestomatológica de implantes*. 2002; 10(3): 146-50.
- ¹⁴ . Anitua E, Aguirre JJ, Algorta J, Ayerdi E, Cabezas AI, Orive G, et al. Effectiveness of autologous preparation rich in growth factors for the treatment of chronic cutaneous ulcers. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2008 02; 84(2): 415-21.
- ¹⁵ . Sánchez M, Azofra J, Aizpurúa B, Elorriaga R, Anitua E, Andía I. Use of autologous plasma rich in growth factors in arthroscopic surgery. *Artroscopia* 2003; 10(1): 12-20.
- ¹⁶ . Sánchez M, Anitua E, Azofra J, Andía I, Padilla S, Mujika I. Comparison of surgically repaired achilles tendon tears using platelet-rich fibrin matrices. *Am J Sports Med*. 2007 02/12; 35(2): 245-51.
- ¹⁷ . Guillén Salazar MJ, Mirabet Lis V, Sopena Juncosa J, Fernández Ferri P, Segura Gil P, Corpa Arenas JM. Rediferenciación de condrocitos en plasma rico en factores de crecimiento plaquetarios para condroplastia articular. *Patología del aparato locomotor*. 2005; 3(1): 13-23.
- ¹⁸ . Gehring S, Hoerauf H, Laqua H, Kirchner H, Klüter H. Preparation of autologous platelets for the ophthalmologic treatment of macular holes. *Transfusion*. 1999 02; 39(2): 144-8.
- ¹⁹ . Hartwig D, Harloff S, Liu L, Schlenke P, Wedel T, Geerling G. Epitheliotropic capacity of a growth factor preparation produced from platelet concentrates on corneal epithelial cells: A potential agent for the treatment of ocular surface defects? *Transfusion*. 2004 12; 44(12): 1724-31.
- ²⁰ . Márquez de Aracena del Cid,R., Montero de Espinosa Escoriaza,I., Muñoz Saez M, Pereira Gutiérrez G, Martín Leal F. Tratamiento con concentrado plaquetario plasmático subconjuntival y tópico en el trasplante de limbo. *Mapfre Medicina*. 2006; 17(4): 280-5.
- ²¹ . Kjaergard HK, Pedersen JH, Krasnik M, Weis-Fogh US, Fleron H, Griffin HE. Prevention of air leakage by spraying vivostat fibrin sealant after lung resection in pigs. *Chest*. 2000 04; 1.

-
- ²² . Whitman DH, Berry RL, Green DM. Platelet gel: An autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg.* 1997 11; 55(11): 1294-9. 17(4): 1124-7.
- ²³ . 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 06; 85(6): 638-46.
- ²⁴ . Anitua EA. Enhancement of osseointegration by generating a dynamic implant surface. *J Oral Implantol.* 2006; 32(2): 72-6.
- ²⁵ . Ballester JF, Alvarez A, López I, Molinos JR, Arnás M, Vera JM. Protocolo para la obtención de PDGF a partir de PRF. *Revista española odontoestomatológica de implantes.* 2004; 12(1): 14-29.
- ²⁶ . Peñarrocha Diago M, Sanchís Bielsa JM, Martínez González JM. Factores de crecimiento y proteínas que influyen en el crecimiento óseo: Aplicaciones en implantología oral. *Periodoncia: Revista Oficial de la Sociedad Española de Periodoncia.* 2001; 11(3): 205-16.
- ²⁷ . Yamada Y, Ueda M, Hibi H, Baba S. A novel approach to periodontal tissue regeneration with mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma using tissue engineering technology: A clinical case report. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2006 08; 26(4): 363-9.
- ²⁸ . Martínez González JM, Cano Sánchez J, Gonzalo Lafuente JC, Campo Trapero J, Esparza Gómez GC, Seoane Lestón M. ¿Existen riesgos al utilizar los concentrados de plasma rico en plaquetas (PRP) de uso ambulatorio? *Medicina Oral.* 2002; 7(5): 375-90.
- ²⁹ . Landesberg R, Moses M, Karpatkin M. Risks of using platelet rich plasma gel. *J Oral Maxillofac Surg.* 1998 09; 56(9): 1116-7.
- ³⁰ . Lorente Pérez-Sierra A, Rodríguez Escudero F. ¿Conseguimos plasma concentrado rico en plaquetas de forma ambulatoria? *Científica Dental. Revista científica de formación continuada.* 2005; 2(2): 73-8.
- ³¹ . Lynch SE, Buser D, Hernandez RA, Weber HP, Stich H, Fox CH, et al. Effects of the platelet-derived growth factor/insulin-like growth factor-I combination on bone

regeneration around titanium dental implants. results of a pilot study in beagle dogs. *J Periodontol.* 1991 11; 62(11): 710-6

³² . Lynch SE, de Castilla GR, Williams RC, Kiritsy CP, Howell TH, Reddy MS, et al. The effects of short-term application of a combination of platelet-derived and insulin-like growth factors on periodontal wound healing. *J Periodontol.* 1991 07; 62(7): 458-67.

³³ . Lynch SE, Buser D, Hernandez RA, Weber HP, Stich H, Fox CH, et al. Effects of the platelet-derived growth factor/insulin-like growth factor-I combination on bone regeneration around titanium dental implants. Results of a pilot study in beagle dogs. *J Periodontol.* 1991 11; 62(11): 710-6.

³⁴ . Lynch SE, Williams RC, Polson AM, Howell TH, Reddy MS, Zappa UE, et al. A combination of platelet-derived and insulin-like growth factors enhances periodontal regeneration. *J Clin Periodontol.* 1989 09; 16(8): 545-8.

³⁵ . Lynch SE, Nixon JC, Colvin RB, Antoniades HN. Role of platelet-derived growth factor in wound healing: Synergistic effects with other growth factors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1987 11; 84(21): 7696-700.

³⁶ . Palmer DS, Aye MT, Dumont L, Dumont D, McCombie N, Giulivi A, et al. Prevention of cytokine accumulation in platelets obtained with the COBE spectra apheresis system. *Vox Sang.* 1998; 75(2): 115-23.

³⁷ . Leitner GC, Gruber R, Neumuller J, Wagner A, Kloimstein P, Hocker P, et al. Platelet content and growth factor release in platelet-rich plasma: A comparison of four different systems. *Vox Sang.* 2006 08/21; 91(2): 135-9.

³⁸ . Gemmel CCE. Comparative performance of two platelet-concentrating cell separators. A prospective, patient-controlled, clinical evaluation. Hematology laboratories Toronto General Hospital. March, 2001: 1-8.

³⁹ . Ballester JF, Sola J, Borrás J, Ferreira J, Morales D, Arnás M, et al. Estudio comparativo de cuatro procedimientos para la obtención del coágulo concentrado en plaquetas. *Revista española odontoestomatológica de implantes.* 2003; 11(1): 6-13.

⁴⁰ . 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 10; 41(10): 1217-24.

-
- ⁴¹ . Gonshor A. Technique for producing platelet-rich plasma and platelet concentrate: Background and process. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2002 12; 22(6): 547-57.
- ⁴² . Anitua E, Andía I, Sanchez M, Azofra J, del Mar Zaldueño M, de la Fuente M, et al. Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture. *J Orthop Res*. 2005 03; 23(2): 281-6.
- ⁴³ . Ballester JF, Sola J, Borrás J, Ferreira J, Morales D, Arnás M, et al. Estudio comparativo de cuatro procedimientos para la obtención del coágulo concentrado en plaquetas. *Revista española odontoestomatológica de implantes*. 2003; 11(1): 6-13.
- ⁴⁴ . Weibrich G, Kleis WKG, Buch R, Hitzler WE, Hafner G. The harvest smart PRP system versus the friadent-schütze platelet-rich plasma kit. *Clin Oral Implants Res*. 2003 04; 14(2): 233-9.
- ⁴⁵ . Fernández-Barbero JE, Galindo-Moreno P, Avila-Ortiz G, Caba O, Sánchez-Fernández E, Wang H. Flow cytometric and morphological characterization of platelet-rich plasma gel. *Clin Oral Implants Res*. 2006 12; 17(6): 687-93.
- ⁴⁶ . Everts PAM, Hoffmann J, Weibrich G, Mahoney CB, Schönberger JPAM, van Zundert A, et al. Differences in platelet growth factor release and leucocyte kinetics during autologous platelet gel formation. *Transfus Med*. 2006 10; 16(5): 363-8.
- ⁴⁷ . Everts PAM, Knappe JTA, Weibrich G, Schönberger Jacques P A M., Hoffmann J, Overdevest EP, et al. Platelet-rich plasma and platelet gel: A review. *J Extra Corpor Technol*. 2006 06; 38(2): 174-87.
- ⁴⁸ . Vassallo RR, Murphy S. A critical comparison of platelet preparation methods. *Curr Opin Hematol*. 2006 09; 13(5): 323-30.
- ⁴⁹ . Skripchenko A, Kurtz J, Moroff G, Wagner SJ. Platelet products prepared by different methods of sedimentation undergo platelet activation differently during storage. *Transfusion*. 2008 07/13; 48(7): 1469-77.
- ⁵⁰ . Andrade MGS, de Freitas Brandão CJ, Sá CN, de Bittencourt TC, Borio Dos Santos C, Sadigursky M. Evaluation of factors that can modify platelet-rich plasma properties. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008 01; 105(1): e5-e12.

-
- ⁵¹ . Rendu F, Brohard-Bohn B. The platelet release reaction: Granules' constituents, secretion and functions. *Platelets*. 2001 08; 12(5): 261-73.
- ⁵² . Wagner T, Vetter A, Dimovic N, Guber SE, Helmberg W, Kroll W, et al. Ultrastructural changes and activation differences in platelet concentrates stored in plasma and additive solution. *Transfusion*. 2002 06/15; 42(6): 719-27.
- ⁵³ . Beutler E, Lichtman M.A, Coller B.S, Kipps T.J, Selgson U. *Williams Hematología* 6 ed. Edit. McGraw-Hill. 2005.
- ⁵⁴ . Reed GL, Fitzgerald ML, Polgár J. Molecular mechanisms of platelet exocytosis: Insights into the "secrete" life of thrombocytes. *Blood*. 2000 11/15; 96(10): 3334-42.
- ⁵⁵ . Chen D, Bernstein AM, Lemons PP, Whiteheart SW. Molecular mechanisms of platelet exocytosis: Role of SNAP-23 and syntaxin 2 in dense core granule release. *Blood*. 2000 02/01; 95(3): 921-9.
- ⁵⁶ . Chen D, Lemons PP, Schraw T, Whiteheart SW. Molecular mechanisms of platelet exocytosis: Role of SNAP-23 and syntaxin 2 and 4 in lysosome release. *Blood*. 2000 09/01; 96(5): 1782-8.
- ⁵⁷ . García de la Fuente AM, Estefanía Cundín E, Aguirre Zorzano LA. Actualización sobre el uso de los factores de crecimiento y proteínas en el tratamiento regenerativo periodontal (I). *Periodoncia: Revista Oficial de la Sociedad Española de Periodoncia*. 1999; 9(5): 341-54.
- ⁵⁸ . Garcia de la fuente AM, Estefania Cundín E, Aguirre Zorzano LA. Actualización sobre el uso de los factores de crecimiento y proteínas en el tratamiento regenerativo periodontal (II). *Periodoncia: Revista Oficial de la Sociedad Española de Periodoncia*. 2000; 10(1): 27-36.
- ⁵⁹ . Serrano Cuenca V, Casas Hernández A. Factores de crecimiento: ¿Un nuevo enfoque terapéutico? *Periodoncia: Revista Oficial de la Sociedad Española de Periodoncia*. 1997 Abril-Junio; 7(2): 99-115.
- ⁶⁰ . Arnás M, Ballester JF, Molinos JR, Alvarez A. Factores de crecimiento: Estado del conocimiento actual. *Revista española odontoestomatológica de implantes*. 2002; 10(4): 202-8.

-
- ⁶¹ . Claesson-Welsh L. Platelet-derived growth factor receptor signals. *J Biol Chem.* 1994 12/23; 269(51): 32023-6.
- ⁶² . 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 periodontium: An autoradiographic study on dogs. *J Periodontol.* 1994 05; 65(5): 429-36
- ⁶³ . Giannobile WV, Hernandez RA, Finkelman RD, Ryan S, Kiritsy CP, D'Andrea M, et al. Comparative effects of platelet-derived growth factor-BB and insulin-like growth factor-I, individually and in combination, on periodontal regeneration in macaca fascicularis. *J Periodontal Res.* 1996 07; 31(5): 301-12.
- ⁶⁴ . Okuda K, Kawase T, Momose M, Murata M, Saito Y, Suzuki H, et al. Platelet-rich plasma contains high levels of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta and modulates the proliferation of periodontally related cells in vitro. *J Periodontol.* 2003 06; 74(6): 849-57.
- ⁶⁵ . Durán H, Arcelus I, García-Sancho L, González F, Alvarez Fernandez J, Ferrández L, Méndez J, editor. *Tratado de Patología y Clínica Quirúrgica.* 4ª ed. Madrid: Edit. McGraw-Hill; 1987.
- ⁶⁶ . Aukhil I. Biology of wound healing. *Periodontol 2000.* 2000 02; 22: 44-50.
- ⁶⁷ . Bartold PM, McCulloch CA, Narayanan AS, Pitaru S. Tissue engineering: A new paradigm for periodontal regeneration based on molecular and cell biology. *Periodontol 2000.* 2000 10; 24: 253-69.
- ⁶⁸ . Sodek J, McKee MD. Molecular and cellular biology of alveolar bone. *Periodontol 2000.* 2000 10; 24: 99-126.
- ⁶⁹ . Sánchez AR, Sheridan PJ, Kupp LI. Is platelet-rich plasma the perfect enhancement factor? A current review. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2003 01; 18(1): 93-103.
- ⁷⁰ . Soffer E, Ouhayoun J, Dosquet C, Meunier A, Anagnostou F. Effects of platelet lysates on select bone cell functions. *Clin Oral Implants Res.* 2004 10; 15(5): 581-8.
- ⁷¹ . Annunziata M, Oliva A, Buonaiuto C, Di Feo A, Di Pasquale R, Passaro I, et al. In vitro cell-type specific biological response of human periodontally related cells to platelet-rich plasma. *J Periodontal Res.* 2005 12; 40(6): 489-95.

-
- ⁷² . 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 Implants Res.* 2006 04; 17(2): 212-9.
- ⁷³ . Kark LR, Karp JM, Davies JE. Platelet releasate increases the proliferation and migration of bone marrow-derived cells cultured under osteogenic conditions. *Clin Oral Implants Res.* 2006 06; 17(3): 321-7.
- ⁷⁴ . Lindeboom JAH, Mathura KR, Aartman IHA, Kroon FHM, Milstein DMJ, Ince C. Influence of the application of platelet-enriched plasma in oral mucosal wound healing. *Clin Oral Implants Res.* 2007 02; 18(1): 133-9.
- ⁷⁵ . Schips L, Dalpiaz O, Cestari A, Lipsky K, Gidaro S, Zigeuner R, et al. Autologous fibrin glue using the vivostat system for hemostasis in laparoscopic partial nephrectomy. *Eur Urol.* 2006 10/24; 50(4): 801-5.
- ⁷⁶ . Appel TR, Pötzsch B, Müller J, von Lindern J, Bergé SJ, Reich RH. Comparison of three different preparations of platelet concentrates for growth factor enrichment. *Clin Oral Implants Res.* 2002 10; 13(5): 522-8.
- ⁷⁷ . Sonnleitner D, Huemer P, Sullivan DY. 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 11; 15(6): 879-82.
- ⁷⁸ . Mazzucco L, Balbo V, Cattana E, Borzini P. Platelet-rich plasma and platelet gel preparation using PlateltexR. *Vox Sang.* 2008 04/92; 94(3): 202-8.
- ⁷⁹ . 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 04; 34(4): 665-71.
- ⁸⁰ . 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 10; 41(10): 1217-24.
- ⁸¹ . Weibrich G, Kleis WKG, 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 Implants Res.* 2003 06; 14(3): 357-62.

-
- ⁸² . Zimmermann R, Arnold D, Strasser E, Ringwald J, Schlegel A, Wiltfang J, et al. Sample preparation technique and white cell content influence the detectable levels of growth factors in platelet concentrates. *Vox Sang*. 2003 11; 85(4): 283-9
- ⁸³ . Hartwig D, Harloff S, Liu L, Schlenke P, Wedel T, Geerling G. Epitheliotropic capacity of a growth factor preparation produced from platelet concentrates on corneal epithelial cells: A potential agent for the treatment of ocular surface defects? *Transfusion*. 2004 12; 44(12): 1724-31.
- ⁸⁴ . Kjaergard HK, Pedersen JH, Krasnik M, Weis-Fogh US, Fleron H, Griffin HE. Prevention of air leakage by spraying vivostat fibrin sealant after lung resection in pigs. *Chest*. 2000 04; 117(4): 1124-7.
- ⁸⁵ . Eppley BL, Pietrzak WS, Blanton M. Platelet-rich plasma: A review of biology and applications in plastic surgery. *Plast Reconstr Surg*. 2006 11; 118(6): 147e-59e.
- ⁸⁶ . Eppley BL, Woodell JE, Higgins J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: Implications for wound healing. *Plast Reconstr Surg*. 2004 11; 114(6): 1502-8.
- ⁸⁷ . Sidman JD, Lander TA, Finkelstein M. Platelet-rich plasma for pediatric tonsillectomy patients. *Laryngoscope*. 2008 10; 118(10): 1765-7.
- ⁸⁸ . Yuan N, Wang C, Wang Y, Yu T, Long Y, Zhang X, et al. [Preparation of autologous platelet-rich gel for diabetic refractory dermal ulcer and growth factors analysis from it]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*. 2008 04; 22(4): 468-71.
- ⁸⁹ . Anitua E, Sánchez M, Nurden AT, Nurden P, Orive G, Andía I. New insights into and novel applications for platelet-rich fibrin therapies. *Trends Biotechnol*. 2006 05/15; 24(5): 227-34
- ⁹⁰ . Anitua E, Sánchez M, Nurden AT, Zalduendo M, de la Fuente M, Orive G, et al. Autologous fibrin matrices: A potential source of biological mediators that modulate tendon cell activities. *J Biomed Mater Res A*. 2006 05; 77(2): 285-93.
- ⁹¹ . Anitua e, Andía, I. Valoración de la regeneración ósea en un modelo animal: utilización de plasma rico en factores de crecimiento. *Gaceta Dental*. 2001: 50-3.

-
- ⁹² . Anitua E, Andia I, Sánchez M. PRGF (Plasma Rico en Factores de Crecimiento). *Dental dialogue*. 2004; 3(1): 2-15.
- ⁹³ . Olmedo N, Murature DA, Villarreal N. Preparación y usos clínicos del P.R.P. en cirugía odontológica. *Revista española odontoestomatológica de implantes*. 2003; 11(3): 145-56.
- ⁹⁴ . Pryor ME, Polimeni G, Koo K, Hartman MJ, Gross H, April M, et al. Analysis of rat calvaria defects implanted with a platelet-rich plasma preparation: Histologic and histometric observations. *J Clin Periodontol*. 2005 09; 32(9): 966-72.
- ⁹⁵ . Akça K, Cehreli M, Demiralp B, Güzel E, Dağdeviren A. Platelet-rich plasma and bone healing: A histologic study in titanium bone chambers. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2007 08; 27(4): 387-92.
- ⁹⁶ . Hatakeyama M, Beletti ME, Zanetta-Barbosa D, Dechichi P. Radiographic and histomorphometric analysis of bone healing using autogenous graft associated with platelet-rich plasma obtained by 2 different methods. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008 01; 105(1): e13-8.
- ⁹⁷ . Plachokova AS, van den Dolder J, Stoelinga PJ, Jansen JA. The bone regenerative effect of platelet-rich plasma in combination with an osteoconductive material in rat cranial defects. *Clin Oral Implants Res*. 2006 06; 17(3): 305-11.
- ⁹⁸ . 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 10; 71(10): 1654-61.
- ⁹⁹ . Petrunaro P. The use of platelet rich plasma with growth factors (autologous platelet gel) to enhance hard and soft tissue healing and maturation in the reconstruction of the maxillary pneumatized sinus. *Clinical Update*. 2001 february-march; 1(9): 2001.
- ¹⁰⁰ . Lozada JL, 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): 38-42.

-
- ¹⁰¹ . Froum SJ, Wallace SS, Tarnow DP, Cho S. 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 02; 22(1): 45-53.
- ¹⁰² . Wiltfang J, Schlegel KA, Schultze-Mosgau S, Nkenke E, Zimmermann R, Kessler P. Sinus floor augmentation with beta-tricalciumphosphate (beta-TCP): Does platelet-rich plasma promote its osseous integration and degradation? *Clin Oral Implants Res.* 2003 04; 14(2): 213-8.
- ¹⁰³ . Jakse N, Tangl S, Gilli R, Berghold A, Lorenzoni M, Eskici A, et al. Influence of PRP on autogenous sinus grafts. an experimental study on sheep. *Clin Oral Implants Res.* 2003 10; 14(5): 578-83.
- ¹⁰⁴ . Fürst G, Gruber R, Tangl S, Zechner W, Haas R, Mailath G, et al. Sinus grafting with autogenous platelet-rich plasma and bovine hydroxyapatite. A histomorphometric study in minipigs. *Clin Oral Implants Res.* 2003 08; 14(4): 500-8.
- ¹⁰⁵ . Maiorana C, Sommariva L, Brivio P, Sigurtà D, Santoro F. Maxillary sinus augmentation with anorganic bovine bone (bio-oss) and autologous platelet-rich plasma: Preliminary clinical and histologic evaluations. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2003 06; 23(3): 227-35.
- ¹⁰⁶ . Raghoobar GM, Schortinghuis J, Liem RSB, Ruben JL, Van der Wal JE, Vissink A. Does platelet-rich plasma promote remodeling of autologous bone grafts used for augmentation of the maxillary sinus floor? *Clin Oral Implants Res.* 2005 06; 16(3): 349-56.
- ¹⁰⁷ . Klongnoi B, Rupprecht S, Kessler P, Thorwarth M, Wiltfang J, Schlegel KA. Influence of platelet-rich plasma on a bioglass and autogenous bone in sinus augmentation. an explorative study. *Clin Oral Implants Res.* 2006 06; 17(3): 312-20.
- ¹⁰⁸ . 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 Implants Res.* 2005 10; 16(5): 622-9.

-
- ¹⁰⁹ . De Obarrio JJ, Araúz-Dutari JI, Chamberlain TM, Croston A. The use of autologous growth factors in periodontal surgical therapy: Platelet gel biotechnology-case reports. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2000 10; 20(5): 486-97.
- ¹¹⁰ . Camargo PM, Lekovic V, Weinlaender M, Vasilic N, Madzarevic M, Kenney EB. Platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral combined with guided tissue regeneration in the treatment of intrabony defects in humans. *J Periodontal Res*. 2002 08; 37(4): 300-6.
- ¹¹¹ . Camargo PM, Lecovik V, Weinlaender M, Divnic-Resnik T, Pavlovic M, Kenney EB. A surgical reentry study on the influence of platelet-rich plasma in enhancing the regenerative effects of bovine porous bone mineral and guided tissue regeneration in the treatment of intrabony defects in humans. *J. Periodontology*. 2009 06; 80(6): 915-23.
- ¹¹² . 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 02; 73(2): 198-205.
- ¹¹³ . Lekovic V, Camargo PM, Weinlaender M, Vasilic N, Aleksic Z, Kenney EB. Effectiveness of a combination of platelet-rich plasma, bovine porous bone mineral and guided tissue regeneration in the treatment of mandibular grade II molar furcations in humans. *J Clin Periodontol*. 2003 08; 30(8): 746-51.
- ¹¹⁴ . Keles GC, Cetinkaya BO, Albayrak D, Koprulu H, Acikgoz G. Comparison of platelet pellet and bioactive glass in periodontal regenerative therapy. *Acta Odontol Scand*. 2006 11; 64(6): 327-33.
- ¹¹⁵ . Petrungraro P. The use of platelet rich plasma with growth factor (autologous platelet gel) to enhance hard and soft tissue healing and maturation in surgical implant dentistry. *Clinical Update*. 2000 november; 1(8).
- ¹¹⁶ . Inkinen K, Wolff H, Lindroos P, Ahonen J. Connective tissue growth factor and its correlation to other growth factors in experimental granulation tissue. *Connect Tissue Res*. 2003; 44(1): 19-29.

-
- ¹¹⁷ . Keceli HG, Sengun D, Berberoğlu A, Karabulut E. Use of platelet gel with connective tissue grafts for root coverage: A randomized-controlled trial. *J Clin Periodontol*. 2008 03/05; 35(3): 255-62.
- ¹¹⁸ . Shanaman R, Filstein MR, Danesh-Meyer MJ. Localized ridge augmentation using GBR and platelet-rich plasma: Case reports. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2001 08; 21(4): 345-55
- ¹¹⁹ . 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 06; 60(6): 630-5.
- ¹²⁰ . Miranda SR, Nary Filho H, Padovan LEM, Ribeiro DA, Nicolielo D, Matsumoto MA. Use of platelet-rich plasma under autogenous onlay bone grafts. *Clin Oral Implants Res*. 2006 12; 17(6): 694-9.
- ¹²¹ . Petrunaro P. The use of platelet rich plasma with growth factors (autologous platelet gel) to enhance hard and soft tissue healing and maturation in the reconstruction of the maxillary pneumatized sinus. *Clinical Update*. 2001 february-march; 1(9): 2001.
- ¹²² . Petrunaro P. Platelet-rich plasma for dental implants and soft-tissue grafting. interview by arun K. garg. *Dent Implantol Update*. 2001 06; 12(6): 41-6.
- ¹²³ . Garg AK. The use of platelet-rich plasma to enhance the success of bone grafts around dental implants. *Dent Implantol Update*. 2000 03; 11(3): 17-21.
- ¹²⁴ . Garg AK, Garg D, Peace I. Using platelet-rich plasma to develop an autologous membrane for growth factor delivery in dental implant therapy. *Dent Implantol Update*. 2000 06; 11(6): 41-4.
- ¹²⁵ . Kim S, Kim W, Park J, Kim H. A comparative study of osseointegration of avana implants in a demineralized freeze-dried bone alone or with platelet-rich plasma. *J Oral Maxillofac Surg*. 2002 09; 60(9): 1018-25.
- ¹²⁶ . Fujita K, Yamada K, Sato T, Takagi I, Sakashita T. A rapid method for embedding biological tissues in a low viscosity epoxy resin "quetol 651" for electron microscopy. *J Electron Microsc (Tokyo)*. 1977; 26(2): 165-6.

-
- ¹²⁷ . Mollenhauer HH, Droleskey RE. Image contrast in sections of epoxy resin-embedded biological material: Maintenance of a proper anhydride-epoxy ratio during tissue impregnation. *Microsc Res Tech*. 1997 03/01; 36(5): 417-21.
- ¹²⁸ . Wagner T, Vetter A, Dimovic N, Guber SE, Helmberg W, Kroll W, et al. Ultrastructural changes and activation differences in platelet concentrates stored in plasma and additive solution. *Transfusion*. 2002 06/15; 42(6): 719-27.
- ¹²⁹ . Berezin V, Skladchikova G, Bock E. Evaluation of cell morphology by video recording and computer-assisted image analysis. *Cytometry*. 1997 02/01; 27(2): 106-16.
- ¹³⁰ . Cheng X, Lei D, Mao T, Yang S, Chen F, Wu W. Repair of critical bone defects with injectable platelet rich plasma/bone marrow-derived stromal cells composite: Experimental study in rabbits. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg*. 2008 04; 14(2): 87-95.
- ¹³¹ . Nair MB, Varma HK, Menon KV, Shenoy SJ, John A. Reconstruction of goat femur segmental defects using triphasic ceramic-coated hydroxyapatite in combination with autologous cells and platelet-rich plasma. *Acta Biomater*. 2009 06/21; 5(5): 1742-55.
- ¹³² . Liu Y, Zhou Y, Feng H, Ma G, Ni Y. Injectable tissue-engineered bone composed of human adipose-derived stromal cells and platelet-rich plasma. *Biomaterials*. 2008 08/15; 29(23): 3338-45.
- ¹³³ . Kawasumi M, Kitoh H, Siwicka KA, Ishiguro N. The effect of the platelet concentration in platelet-rich plasma gel on the regeneration of bone. *J Bone Joint Surg Br*. 2008 07; 90(7): 966-72.
- ¹³⁴ . Pieri F, Lucarelli E, Corinaldesi G, Fini M, Aldini NN, Giardino R, et al. Effect of mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma on the healing of standardized bone defects in the alveolar ridge: A comparative histomorphometric study in minipigs. *J Oral Maxillofac Surg*. 2009 02; 67(2): 265-72.
- ¹³⁵ . Camargo PM, Lekovic V, Weinlaender M, Divnic-Resnik T, Pavlovic M, Kenney EB. A surgical reentry study on the influence of platelet-rich plasma in enhancing the regenerative effects of bovine porous bone mineral and guided tissue regeneration in the treatment of intrabony defects in humans. *J Periodontol*. 2009 06; 80(6): 915-23.

-
- ¹³⁶ . Plachokova AS, Nikolidakis D, Mulder J, Jansen JA, Creugers NHJ. Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in dentistry: A systematic review. *Clin Oral Implants Res.* 2008 06/16; 19(6): 539-45.
- ¹³⁷ . Drengk A, Zapf A, Stürmer EK, Stürmer KM, Frosch K. Influence of platelet-rich plasma on chondrogenic differentiation and proliferation of chondrocytes and mesenchymal stem cells. *Cells Tissues Organs.* 2009 08/11; 189(5): 317-26.
- ¹³⁸ . Saito M, Takahashi KA, Arai Y, Inoue A, Sakao K, Tonomura H, et al. Intraarticular administration of platelet-rich plasma with biodegradable gelatin hydrogel microspheres prevents osteoarthritis progression in the rabbit knee. *Clin Exp Rheumatol.* 2009 2009; 27(2): 201-7.
- ¹³⁹ . Wu W, Zhang J, Dong Q, Liu Y, Mao T, Chen F. Platelet-rich plasma - A promising cell carrier for micro-invasive articular cartilage repair. *Med Hypotheses.* 2009 04/12; 72(4): 455-7.
- ¹⁴⁰ . McCarrel T, Fortier L. Temporal growth factor release from platelet-rich plasma, trehalose lyophilized platelets, and bone marrow aspirate and their effect on tendon and ligament gene expression. *J Orthop Res.* 2009 08; 27(8): 1033-42.
- ¹⁴¹ . Rábago D, Best TM, Zgierska AE, Zeisig E, Ryan M, Crane D. A systematic review of four injection therapies for lateral epicondylitis: Prolotherapy, polidocanol, whole blood and platelet-rich plasma. *Br J Sports Med.* 2009 07/21; 43(7): 471-81.
- ¹⁴² . Hammond JW, Hinton RY, Curl LA, Muriel JM, Lovering RM. Use of autologous platelet-rich plasma to treat muscle strain injuries. *Am J Sports Med.* 2009 06/12; 37(6): 1135-42.
- ¹⁴³ . Sampson S, Gerhardt M, Mandelbaum B. Platelet rich plasma injection grafts for musculoskeletal injuries: A review. *Curr Rev Musculoskelet Med.* 2008 12; 1(3-4): 165-74.
- ¹⁴⁴ . Plachokova AS, Nikolidakis D, Mulder J, Jansen JA, Creugers NHJ. Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in dentistry: A systematic review. *Clin Oral Implants Res.* 2008 06/16; 19(6): 539-45.

-
- ¹⁴⁵ . Plachokova AS, van der Dolder J, van den Beucken JP, Jansen JA. Bone regenerative properties of rat, goat and human platelet-rich plasma. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2009 08/13; 38(8): 861-9.
- ¹⁴⁶ . Lee H, Reddy MS, Geurs N, Palcanis KG, Lemons JE, Rahemtulla FG, et al. Efficacy of platelet-rich plasma on wound healing in rabbits. *J Periodontol*. 2008 04; 79(4): 691-6.
- ¹⁴⁷ . Suaid FF, Carvalho MD, Santamaria MP, Casati MZ, Nociti FH, Sallum AW, et al. Platelet-rich plasma and connective tissue grafts in the treatment of gingival recessions: A histometric study in dogs. *J Periodontol*. 2008 05; 79(5): 888-95.
- ¹⁴⁸ . Blanton MW, Hadad I, Johnstone BH, Mund JA, Rogers PI, Eppley BL, et al. Adipose stromal cells and platelet-rich plasma therapies synergistically increase revascularization during wound healing. *Plast Reconstr Surg*. 2009 02; 123(2): 56s-64s.
- ¹⁴⁹ . Ding X, Li S, Zheng X, Hu L, Hu W, Luo Y. The effect of platelet-rich plasma on cavernous nerve regeneration in a rat model. *Asian J Androl*. 2009 03/19; 11(2): 215-21.
- ¹⁵⁰ . Efron J. Role of platelet-rich plasma in accelerating the wound-healing process and recovery in patients undergoing operation for pilonidal sinus disease: Preliminary results. *World J Surg*. 2009 08; 33(8): 1770-1.
- ¹⁵¹ . Erkilet E, Koyuncu M, Atmaca S, Yarim M. Platelet-rich plasma improves healing of tympanic membrane perforations: Experimental study. *J Laryngol Otol*. 2009 05/28; 123(5): 482-7.
- ¹⁵² . Hu Z, Peel SAF, Ho SKC, Sándor GKB, Clokie CML. Platelet-rich plasma induces mRNA expression of VEGF and PDGF in rat bone marrow stromal cell differentiation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009 01/28; 107(1): 43-8.
- ¹⁵³ . Monteiro SO, Lepage OM, Theoret CL. Effects of platelet-rich plasma on the repair of wounds on the distal aspect of the forelimb in horses. *Am J Vet Res*. 2009 02; 70(2): 277-82.
- ¹⁵⁴ . Li X, Zhou X, Zeng S, Ye F, Yun J, Huang T, et al. Effects of intramyocardial injection of platelet-rich plasma on the healing process after myocardial infarction. *Coron Artery Dis*. 2008 08; 19(5): 363-70.

-
- ¹⁵⁵ . Wehberg KE, Answini G, Wood D, Todd J, Julian J, Ogburn N, et al. Intramyocardial injection of autologous platelet-rich plasma combined with transmyocardial revascularization. *Cell Transplant*. 2009; 18(3): 353-9.
- ¹⁵⁶ . Badr MS, Oliver RJ. Platelet-rich plasma: An adjunctive treatment modality for bisphosphonate osteonecrosis? *J Oral Maxillofac Surg*. 2009 06; 67(6): 1357
- ¹⁵⁷ .Marx RE. Reconstruction of defects caused by bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaws. *J Oral Maxillofac Surg*. 2009 05; 67(5): 107-19.
- ¹⁵⁸ .Jia W, Zhang C. Comment on "platelet-rich plasma as a novel therapeutic agent in osteomyelitis". *Med Hypotheses*. 2009 08/24; 73(2): 270-1.
- ¹⁵⁹ . Mazzucco L, Balbo V, Cattana E, Guaschino R, Borzini P. Not every PRP-gel is born equal. Evaluation of growth factor availability for tissues through four PRP-gel preparations: Fibrinet, RegenPRP-kit, plateltex and one manual procedure. *Vox Sang*. 2009 08/09; 97(2): 110-8.
- ¹⁶⁰ . Anitua E. Factores de crecimiento plasmático. Una revolución terapéutica. *Ideas y Trabajos Odontoestomatológicos*. 2001; 2 (2): 90-4.