

Gel plaquetario. Actualización de su uso en técnicas de regeneración

María del Monte Trujillo Pérez / Faustino Acebal Blanco
Hdefonso L. Labrot-Moreno Moleón / Antonio Carrero González

Introducción

La investigación en el campo de la regeneración de tejidos persigue la reparación de los mismos de forma más eficaz y más temprana. De este modo, los conocimientos sobre la fisiología de los procesos de reparación son utilizados para diseñar diferentes técnicas y materiales que puedan aportar las condiciones óptimas. En este contexto, se incluye el gel plaquetario como aporte rico en factores de crecimiento para aplicación en el lugar preciso de la lesión.

Las primeras publicaciones sobre las bondades de los derivados plasmáticos ricos en plaquetas utilizados para la regeneración tisular, aparecieron en el ámbito de la Cirugía Oral y Maxilofacial en los años 90.

Desde entonces hasta ahora, se han utilizado en otras áreas de la Medicina, en estudios *in vitro* e *in vivo*, y usando modelos humanos y animales.

En esta revisión bibliográfica, repasaremos distintos aspectos sobre esta estrategia terapéutica, en cuanto a me-

todología de obtención de los productos, campos de aplicación, y evidencias y controversias de la aplicación clínica.

Concepto de Gel Plaquetario

Se emplean indistintamente los términos «gel de plaquetas» o «plasma rico en plaquetas», al que nos referiremos en adelante como PRP.

El término gel describe un producto maleable, de aspecto gelatinoso, que resulta de la activación del plasma rico en plaquetas, al mezclarlo con calcio y/o trombina; el fibrinógeno, contenido en este plasma, se transforma en fibrina, la cual polimeriza y da lugar a un gel similar a un pegamento.

Las plaquetas, atrapadas en este gel, están activadas y son capaces, a su vez, de activar otras moléculas bioactivas, que difunden lentamente al entorno y ejercen sobre él y sobre las células que éste contiene, acciones de proliferación, remodelación, y regeneración tisular.

Palabras clave: Factores de crecimiento tisulares. Gel plaquetario. Cirugía maxilofacial.

Fecha de recepción: Marzo 2008

Seminario Médico

Año 2008. Volumen 60, N.º 1. Págs. 25-42

Los preparados a que nos referimos son de origen autólogo y se administran localmente. La razón de su amplia utilización en la actualidad radica, por un lado, en la riqueza de factores de crecimiento que aportan, y por otro lado en la sensación de seguridad que transmiten al ser un producto autólogo y los resultados prometedores publicados en los primeros estudios (Marx 1998).

Metodología de obtención

El primer paso para la producción del gel de plaquetas, es la obtención del plasma rico en plaquetas, del donante-paciente, que posteriormente será activado y favorecerá la liberación de los factores de crecimiento.

El plasma rico en plaquetas de origen autólogo se obtiene básicamente, por los tres métodos siguientes, estando condicionada la diferencia entre ellos por el volumen que se procesa, que estará en relación con la extensión de la lesión sobre la que se quiere aplicar. Dichos métodos son:

– Aféresis de plaquetas, donde las plaquetas se obtienen a través de separadores celulares, de flujo continuo o discontinuo. En este proceso, los volúmenes procesados de sangre son grandes. El separador celular deberá ajustarse a una concentración de plaquetas de 1.500×10^6 /ml. De esta forma, se obtiene una suspensión de plaquetas, que se centrifugará a 3.000 r.p.m. durante 15 minutos para obtener el concentrado de plaquetas. Cuando se realiza el gel a partir de concentrados de plaquetas de aféresis, es conveniente activar

con cloruro cálcico, ya que la activación se está de por sí enlentecida por contener mayores cantidades de anticoagulante.

– Capa leucoplaquetaria, se centrifuga la sangre total de manera que las plaquetas se sedimenten en la capa leucoplaquetaria junto con los leucocitos. La capa leucoplaquetaria se separa y se suspende en el plasma sobrenadante. Tras una mezcla cuidadosa, se centrifuga la bolsa con la capa leucoplaquetaria, de forma que las plaquetas permanezcan en el sobrenadante, pero los glóbulos rojos y los leucocitos se sedimenten en el fondo de la bolsa.

– Por centrifugación diferencial a partir de sangre total extraída en tubos citratados (citrato sódico al 3'8%). Esta centrifugación debe ser suave permitiendo la concentración de las plaquetas en el plasma que se encuentra más próximo a los hematíes. Tras este centrifugado, se consigue la separación de la serie roja (en la parte inferior del tubo) y el plasma (por encima) en el que se diferencian tres porciones, de arriba abajo, plasma pobre en plaquetas, plasma con un número de plaquetas similar al de la sangre circulante y plasma rico en plaquetas, justo por encima de la serie roja. La centrifugación se realizará a 2.800 r.p.m. durante 7 minutos.

Además de estos métodos, empleados fundamentalmente en los laboratorios de los Centros y Servicios de Transfusión, en los últimos años han ido apareciendo en el mercado dispositivos que facilitan la obtención concreta del PRP, en el propio quirófano.

Entre los sistemas disponibles para la obtención ambulatoria de PRP, caben citar el Smart PRP® 2 APC™ (de Harvest Technologies) y el PCCS 3i (de Implant Innovation Inc.) que están aprobados para su uso por la FDA. Ambos sistemas utilizan la centrifugación diferencial y consiguen concentraciones de plaquetas superiores a $1 \times 10^6/\text{mL}$; y, en cuanto a rendimiento y facilidad de manejo, son similares. Existen otros sistemas diseñados con igual finalidad y aprobados por la Agencia Europea del Medicamento, como el PRGF (de BTI), el GPS™ (de Biomet) y el AGF™ (de MBA). Algunos de estos sistemas presentan ciertas ventajas como es la disponibilidad inmediata de los derivados plaquetarios, para el quirófano.

Hay estudios de morfología plaquetaria, a través de microscopía electrónica, que han demostrado diferencias en relación con el sistema de obtención de PRP.

El control de variables en esta fase de obtención y centrifugación es crucial, ya que se ha comprobado que la forma de preparación, el tipo de contenedor, y además, determinados medicamentos (ácido acetilsalicílico y otros antiagregantes) y hábitos del donante/paciente (tabaquismo, hiperlipidemia, estrés) tiene una repercusión directa sobre la activación de las plaquetas y, por tanto, repercusión en su posterior capacidad funcional.

El control de estos factores limitará en cierto modo la activación basal de las plaquetas, que, por otro lado, muestra una gran variabilidad individual.

La estandarización en esta primera fase permitirá que las plaquetas

mantengan íntegra su capacidad de liberación «in vivo» de los factores de crecimiento.

Contenido de plaquetas en el PRP

Según demuestran diferentes trabajos, existe una relación dosis-respuesta. Con un recuento de plaquetas de $12 \times 10^6/\mu\text{l}$, el PRP se considera terapéutico, ocurriendo las mejores respuestas cuando también el pH del medio es ácido. Sin embargo, es arriesgado afirmar que la concentración de plaquetas en el PRP va a predecir los niveles de factores de crecimiento que se liberan, ya que la heterogeneidad de las variables comentadas: la dosis total (en una o varias aplicaciones), el momento de la aplicación, la situación clínica del paciente y las condiciones locales de la lesión a tratar, influyen invariablemente en los niveles finales.

El paso siguiente a la obtención, que consiste en la «activación o manipulación» de los concentrados plaquetarios para estimular la liberación de factores de crecimiento, se lleva a cabo con cloruro cálcico o glucobionato de calcio y trombina de origen humano o bovino.

La trombina de origen humano se puede obtener a partir del plasma pobre en plaquetas, de modo que el proceso completo de preparación del gel plaquetario sería autólogo.

Es difícil precisar los niveles de factores de crecimiento necesarios para promover la regeneración tisular y ósea, ya que la cuantificación de estos niveles no es fácil, por ser proteínas inestables en plasma y, algunos de ellos, como el FGT-beta y el IGF-I,

estar unidos a proteínas formando complejos. Y, según como dependiendo de características bioquímicas del entorno como el pH, tienen la capacidad de pasar de un estado latente a un estado activo, no siempre es posible determinar o especificar su concentración activa. Se han publicado trabajos de cuantificación de los factores de crecimiento utilizando métodos de enzimo-inmunoensayo, determinando la concentración en nanogramos o picogramos por mL ó por 10^5 plaquetas; o bien por citometría de flujo.

Los valores difieren algo en las distintas publicaciones, siendo más altos estos valores en las preparaciones que no están desleucocitadas.

Hay dos factores principales que influyen en la liberación de factores de crecimiento a partir de preparados de plaquetas para aplicación local, son:

- grado de activación plaquetaria.
- contaminación de las preparaciones con leucocitos, porque éstos contienen y producen factores de crecimiento.

Factores de crecimiento

Los Factores de Crecimiento son una familia de polipéptidos capaces de actuar como señales y modificar las respuestas biológicas celulares. Están muy involucrados en el control del crecimiento y diferenciación celular. Son mediadores biológicos naturales que regulan la migración, proliferación, diferenciación y metabolismo celular.

Se conocen varios factores de crecimiento, que regulan los procesos de desarrollo: Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), Factor

de Crecimiento Epidérmico (EGF), Factor de crecimiento fibroblástico (FGF), Factor de crecimiento similar a la Insulina (IGF-I) (Alberts 2002).

Los factores de crecimiento actúan de manera compleja, ya que cada uno puede tener diferentes efectos en el mismo tejido y, además, el efecto de cada factor no es idéntico en todos los tejidos ni en todas las situaciones.

La interacción con los receptores de membrana, específico/os para cada factor de crecimiento, sobre las células diana, activa un mecanismo de señales intracelulares (segundos mensajeros), que inducen la transcripción del RNAm y proteínas, lo que conlleva la activación o represión de genes involucrados en los procesos de regeneración. La activación de los segundos mensajeros explica la persistencia de la acción de los factores de crecimiento aunque éstos hayan desaparecido. Los factores de crecimiento también inducen cambios específicos a nivel celular (Giannobile 1996).

Este modo de actuación diferencia a los factores de crecimiento liberados por las plaquetas de los factores recombinantes que actúan en una sola dirección.

Hay diferentes células capaces de producir factores de crecimiento: fibroblastos, osteoblastos, células endoteliales y leucocitos. Y diferentes lugares de almacenamiento de los mismos, como son las plaquetas y la matriz ósea.

Factores de Crecimiento de las plaquetas

Los principales factores de crecimiento contenidos en las plaquetas son

1. Factor de crecimiento derivado de las plaquetas PDGF
2. Factor de crecimiento transformador TGF
3. Factor de crecimiento epidérmico EGF
4. Factor de crecimiento fibroblástico FGF
5. Factor de crecimiento semejante a la insulina IGF
6. Factor de crecimiento endotelial VEGF
7. Factor derivado del cemento CGF
8. Factor plaquetario 4 (FP-4).

Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF)

Juega un papel crítico en la proliferación y desarrollo tisular. Fue aislado por primera vez a partir de la degranulación de los gránulos alfa de las plaquetas (Ross y Vogel 1978).

Son producidos por las plaquetas principalmente, por los macrófagos, fibroblastos, células endoteliales, condrocitos, y se deposita en la matriz ósea.

La forma biológicamente activa del PDGF es una glicoproteína dimérica, formado por dos cadenas polipeptídicas A y B, unidas por puentes disulfuro (Heldin 2002). Son posibles tres isoformas del PDGF: los homodímeros AA, BB, o el heterodímero AB, dependiendo de esto, muestra una actividad diferencial. Todas las isoformas son liberadas después de la adhesión plaquetar en el sitio dañado.

El PDGF tiene reconocidas diversas acciones como:

- Facilita la angiogénesis por vía indirecta, a través de los macrófagos

que actúan sobre las células endoteliales.

- Regulación del crecimiento y diferenciación celular en el SNC durante su desarrollo,
- Es el primero en actuar en las heridas y fomentar la revascularización. Su proporción casi indescifrable por coágulo (0.06 ng/millón de plaquetas) es suficiente para favorecer la cicatrización mediante la inducción de la mitogénesis, angiogénesis y producción de proteínas de la matriz extracelular (Marx 1999).
- Efecto quimiotáctico y activador sobre las células inflamatorias (macrófagos).
- Facilita la formación de colágeno tipo I y estimula la producción de fibronectina y de ácido hialurónico.
- Sobre el hueso y los tejidos periodontales se conocen bien sus efectos: estimula la mitosis, la quimiotaxis, el anabolismo, el crecimiento sostenido y modulado del hueso y el refortalecimiento del tejido ligamentario periodontal, mediante el cual promueve la capacidad de adherencia a éste (Giannobile 2003).

Factor de crecimiento transformante (TGF)

Se ha descrito en tejidos alterados con daños recientes. Se conocen 5 isoformas, de las cuales la $TGF_{\beta 1}$ y $TGF_{\beta 2}$ son las más investigadas.

Lo producen las plaquetas, macrófagos, linfocitos, células mesenquimales, osteoblastos y matriz ósea.

Su efecto biológico varía dependiendo del tipo celular y del entorno en el que actúa:

- Estimula la proliferación y migración de las células epiteliales o la inhibe dependiendo de la presencia de otros factores de crecimiento.
- Promueve la producción de matriz extracelular en las células del ligamento periodontal. Actúa de forma sinérgica con el PDGF BB.
- Inhibe la formación de osteoclastos y la reabsorción ósea.
- Efecto angiogénico.
- Tiene efecto mitogénico en las células mesenquimales.

Factor de crecimiento epidérmico (EGF)

Es sintetizado como un precursor de 1217 aminoácidos.

Es producido por plaquetas, fibroblastos y células endoteliales. Los fibroblastos del ligamento periodontal, los pre-osteoblastos y los pre-condrocitos expresan un número elevado de receptores para este factor de crecimiento.

Destacan las siguientes acciones biológicas:

- Efecto mitogénico y quimiotáctico de los fibroblastos y células epiteliales; este efecto es dosis dependiente.
- Induce la formación rápida del diente. Existen receptores en los tejidos apicales de los dientes en erupción.
- Estimula la formación de tejido de granulación.
- Estimula la formación de matriz extracelular de forma indirecta atrayendo fibroblastos y estimulando la producción de colágeno por éstos.

Factor de crecimiento fibroblástico (FGF)

Son una familia de polipéptidos que controlan la proliferación y diferenciación de las células derivadas del mesodermo y del neuroectodermo. Se conocen dos isoformas tipo I y tipo II, de las cuales la tipo II o básica es la más potente en cuanto a la función mitogénica.

Actúan indirectamente sobre la angiogénesis, estimulando la migración y mitosis de las células endoteliales.

Estimulan y coordinan la mitogénesis de células de origen mesenquimal como los fibroblastos, osteoblastos, condrocitos y células musculares durante el crecimiento y la reparación tisular.

Factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF)

Sus polipéptidos se asemejan en un 50% a los de la insulina. Existen dos formas IGF I e IGF II.

Lo producen plaquetas, macrófagos, osteoblastos, células mesenquimales y matriz ósea.

En el hueso se sintetizan grandes cantidades de IGF I, a partir de los osteoblastos, regulando la formación de hueso de forma autocrina.

Entre sus efectos biológicos destacan:

- Capacidad para aumentar el número de osteoclastos.
- Estimular la producción de matriz ósea, actuando en la diferenciación de los osteoblastos y aumentando la replicación de las células osteoprogenitoras.

- La IGF1 estimula la capacidad mitogénica y actúa como factor quimiotáctico de las células del ligamento periodontal, con potentes efectos sobre los fibroblastos del ligamento periodontal y sobre la síntesis de proteínas.
- Efecto quimiotáctico sobre las células endoteliales, favoreciendo la neovascularización.
- Actúa sinérgicamente con el PDGF estimulando la regeneración periodontal.

Factor de crecimiento vascular endotelial (VGF)

Se asemeja en un 24% al PDGF $_{\beta}$, aunque los receptores de unión son distintos y tiene diferentes efectos biológicos. Es un mitógeno potente y selectivo para las células endoteliales. Se le relaciona con el mantenimiento de la fisiología periodontal y en la progresión de las periimplantitis. Su acción parece estar regulada por la acción de los PDGF y TGF β .

Factor de crecimiento derivado del cemento (CGF)

Es mitógeno para los fibroblastos del ligamento periodontal y dérmicos. Esta acción mitogénica está potenciada por el EGF.

Se ha comprobado experimentalmente que en los defectos periimplantarios, es capaz de aumentar la cantidad de hueso periférico y en la interfase hueso-implante.

Factor plaquetario 4 (FP-4)

Es liberado por los gránulos α . Por ejercer un efecto quimiotáctico sobre

los neutrófilos es responsable de la afluencia de neutrófilos en el proceso de cicatrización.

Es preciso tener en consideración otras moléculas como la trombina, fibrina, fibrinógeno, trombospondina, y zinc, que ejercen una función relevante en el proceso de curación.

En la reparación de los tejidos se conocen tres fases consecutivas que se solapan entre sí:

1. Fase inicial: en la que predomina la inflamación aguda.
2. Fase intermedia de proliferación y reparación
3. Fase final de modelado.

En los protocolos de aplicación local de factores de crecimiento, el coágulo sanguíneo que se forma tras la rotura de vasos en la primera fase del daño tisular, y que está constituida por plaquetas, hematíes y leucocitos, se sustituye por el gel plaquetario, formado por una red de fibrina que contiene elevado número de plaquetas.

La malla de fibrina facilita la adhesión celular y su estructura tridimensional proporciona la base para iniciar la angiogénesis, evento de gran importancia para la posterior reparación. La fibrina se reabsorbe después de haber servido como molde para la regeneración. Estos hechos cambian el entorno bioquímico de la lesión, influyendo en la evolución clínica, observándose una disminución significativa de la inflamación y una aceleración de la fase de proliferación y reparación (Bennet NT, 1993).

En cuanto a los estudios publicados hasta ahora en referencia a la influencia de los derivados plaquetarios en la proliferación celular, no se observa ho-

mogeneidad en las condiciones de los mismos, como el tipo de células diana, las condiciones de cultivo y sobre todo en cuanto a la elección de parámetros y criterios para valorar los resultados clínicos. Además son pocos los estudios con grupo control. Esta variabilidad explica que los resultados finales no sean homogéneos, y sea por falta de un diseño adecuado del estudio o porque la mayoría proceden de la observación de casos aislados (Sánchez AR, 2003; Freymiller EG, 2004).

Aplicaciones clínicas de los factores de crecimiento.

El área de la Medicina de la que proceden la mayoría de las publicaciones sobre el efecto beneficioso del PRP en la regeneración tisular, y del que se recogen más referencias es el área de la Cirugía Oral y Maxilofacial.

La aplicación clínica se inició en los años 90 con el uso del adhesivo tisular autólogo (fibrinógeno y trombina) que se desarrolló como una sustancia con propiedades hemostáticas y adhesivas; las plaquetas, como fuente rica de factores de crecimiento se añadieron posteriormente. El gel de plaquetas autólogo fue empleado por primera vez por Whitman (Whitman, 1997), como un tratamiento auxiliar en la colocación de implantes osteointegrados de titanio.

Desde entonces se han publicado numerosos estudios en este campo. De entre los más significativos, por la inclusión de un número importante de casos o por el mejor diseño del estudio, se puede reconocer que la aplicación local de los factores de crecimiento ejerce

un efecto beneficioso en la regeneración ósea y resulta útil en el terreno de la implantología dental, y en el tratamiento de la enfermedad periodontal, como lo reconocen en nuestro país Anitúa y su grupo (Anitúa 2004).

En Cirugía Maxilofacial, la aplicación sobre injertos óseos, bien autólogos o bien sustitutos óseos, ha probado incrementar la regeneración del hueso, pero sobre todo, acelera la curación de las partes blandas (Marx RE, 1998 y 2004). Sin embargo, en este sentido hay referencias en las que los autores aprecian poco o nulo efecto del PRP (Forum SJ, 2002; Wiltfang J, 2003). Esta discrepancia hay que entenderla desde el punto de vista de la falta de ensayos clínicos controlados en condiciones estandarizadas. En esta misma situación se presenta la aplicación de las proteínas morfogenéticas BMP-2 y BMP-7 (Simpson A, 2006).

En el campo de la Cirugía Ortopédica y de reconstrucción ósea, se ha empleado en el tratamiento de patologías como la artroplastia de tobillo y la tendinitis crónica del codo. En un estudio de casos-control en la corrección del genu varus se obtuvieron mejores resultados en los pacientes en los que se aplicaba PRP, aunque en la biopsia posterior no se demostraron diferencias a nivel de la microestructura del tejido óseo (Savarino L, 2005). Se están comunicando resultados prometedores con el tratamiento conjunto PRP y ondas electromagnéticas, en pacientes con pseudoartrosis refractaria (Rughetti A, 2004).

En úlceras de la piel de carácter crónica de distinta etiología –diabética, vasculares, neuropática, de decúbito,

postradioterapia— el gel de plaquetas promueve la formación de tejido de granulación y acelera la curación. Se han referido tasas de eficacia del 76% a los 90 días, siendo las úlceras vasculares las que mejor responden, y las relacionadas con la radioterapia las que tiene peor respuesta (Caloprisko G, 2004). También han sido descritos casos de curación de úlceras en las extremidades inferiores en casos de β -Talasemia intermedia (Josifova D, 2001; Gilsanz F, 2001). Conviene recordar que es en esta área de aplicación, en la única que está aprobado para uso tópico el Factor de crecimiento recombinante PDGF-BB (Becaplermín®).

En la Oftalmología, hace años que se emplea el colirio de suero autólogo en el tratamiento de las úlceras corneales, y en el Síndrome del ojo seco, por su aporte en factores de crecimiento y vitaminas A y E, con bastante buenos resultados. En el tratamiento de los defectos del epitelio ocular persistentes, se pueden utilizar suero autólogo o gel de plaquetas en forma líquida o en suspensión, que tiene mayor concentración de factores de crecimiento que el suero, mientras que éste tiene más fibronectina y vitaminas A y E (Hartwig D, 2004).

En el Cirugía Plástica y Cosmética, se utilizan los factores de crecimiento en técnicas de antienvjecimiento como estiramientos faciales, en rinoplastias, o en como tratamiento colaborador de la reconstrucción de los tejidos blandos. Aceleran la curación y reducen el edema (Clevers RA, 2002; Bhanot S, 2002).

Se encuentran referencias bibliográficas en la literatura médica de la apli-

cación del gel plaquetario en injertos de piel, cirugía vascular, reparación de la duramadre, cirugía de los senos maxilares, rotura ligamentosas musculares y tendinosas (Sánchez M, 2007). En grandes quemados y en la disminución del sangrado en algunas intervenciones incluyendo pacientes hemofílicos se están observando resultados prometedores. Después de analizar varias publicaciones y revisiones se puede aceptar que la aplicación local del gel de plaquetas ejerce un impacto positivo sobre la reparación tisular en las primeras semanas acelerando el proceso, aunque no es extensible a un largo plazo. Es preciso recordar que los factores de crecimiento solo son parte del conjunto de agentes que intervienen en el proceso, en el que también juegan un importante papel otras proteínas y mediadores biológicos participando a través de vías y mecanismos de estimulación en la dinámica celular de proliferación, Quimiotaxis, regeneración y remodelación. El PRP, además de factores de crecimiento, contiene otras proteínas como fibronectina y ciertas proteínas adhesivas como la fibrina y la vitronectina, que desempeñan un papel importante en la biología ósea, ya que actúan como moléculas de adhesión, para la osteoconducción, como matriz para el hueso y tejido conectivo y además favorecen la migración epitelial.

Además, existen referencias en la literatura sobre la capacidad antimicrobiana que podría tener el PRP, en parte por el efecto antiséptico de las proteasas contenidas en los gránulos alfa de las plaquetas y fundamentalmente por los leucocitos que contienen estos

preparados, que liberan citocinas con dicha propiedad, fundamentalmente los granulocitos neutrófilos ricos en mieloperoxidasa. Las propias plaquetas liberan además una variedad de proteínas con propiedades microbicidas «proteínas microbicidas plaquetarias» (PMP) (Dohan, DM, 2006; Tang YQ, 2002).

Riesgos indeseables del PRP

Cabe preguntarse, si existen riesgos indeseables en cuanto a la aplicación local del gel plaquetario, planteándose incluso la posibilidad de un riesgo potencial carcinogénico. Por el momento no hay evidencias clínicas este efecto a las concentraciones utilizadas habitualmente. Otra circunstancia a considerar es la capacidad antiapoptótica que se atribuye a algunos factores de crecimiento, como el VEGF y el IGF (Katoh O, 1995), teniendo en cuenta esta posibilidad hay autores que proponen en general evitar la utilización de PRP en pacientes con procesos cancerosos o en la proximidad de los grandes vasos, así como en pacientes con exposición a carcinógenos.

Las plaquetas contienen así mismo citocinas proinflamatorias como el ligando CD 40 soluble, RANTES e interleukina 8, que podrían producir algún efecto indeseable en este sentido. Algunos factores de crecimiento a altas concentraciones podrían producir un depósito excesivo de colágeno y proliferación de fibroblastos, lo que podría resultar en una cicatrización hipertrófica.

El uso de trombina de origen bovino para la activación del PRP se está

abandonando debido al desarrollo de anticuerpos frente a los factores V, XI, y trombina lo que podría provocar un coagulopatía (Landesberg R, 1998) existiendo además un posible riesgo de transmisión de la variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob. Otro potencial efecto sería la liberación de micropartículas con efecto protrombótico como la interleukina 1 beta.

Gel de fibrina rico en plaquetas

El gel de fibrina rico en plaquetas (PRF) pertenece a una nueva generación de concentrados de plaquetas, con un procesamiento simplificado y sin manejo bioquímico de la sangre. El interés de este nuevo biomaterial se estructura alrededor de 4 acontecimientos fundamentales de la cicatrización, a saber, angiogénesis, reclutamiento de células madre circulantes, control inmune, y epitelización de la cubierta de la herida.

Los usos clínicos sabidos del PRF destacan una aceleración de la cicatrización del tejido debido al desarrollo de la neovascularización eficaz, el cierre acelerado de la herida con remodelado cicatricial tisular rápido y una ausencia casi total de eventos infecciosos. Esta investigación inicial por lo tanto, permite diseñar nuevos campos de futuro para el PRF, incluyendo cirugía plástica y de reconstrucción ósea.

Angiogénesis, inmunidad y cobertura epitelial

Estas son las tres claves de la cicatrización y maduración de los tejidos blan-

dos. Las membranas de plaquetas son capaces de favorecer simultáneamente el desarrollo de estos tres fenómenos. La fibrina es la guía natural para la angiogénesis. La angiogénesis consiste en la formación de nuevos vasos en el interior de la herida, lo que precisa de matriz extracelular que permita la migración, división y cambios fenotípicos de las células endoteliales. Se ha demostrado claramente que la matriz de fibrina conduce directamente hacia la angiogénesis (Dvorak HF, 1987). La capacidad angiogénica de la fibrina se explica por su estructura tridimensional y por la acción simultánea de las citokinas que ella contiene. Además, los principales factores solubles de la angiogénesis tales como factor de crecimiento fibroblástico básico (FGFb), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), angiopoyetina y factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) se encuentran incluidos en gel de fibrina (Van Hinsbergh VW, 2001). Algunos estudios indican que el FGFb y PDGF se unen a la fibrina con gran afinidad. Por lo tanto, la inducción directa de la angiogénesis se podría explicar por la unión de la fibrina con diversos factores de crecimiento. Estudios *in vitro* realizados por Nehl y Hermann (Nehls V, Hermann R, 1996) han demostrado que la estructura y las características mecánicas del coágulo de fibrina son también factores importantes, como por ejemplo, la rigidez de la matriz, que influencia considerablemente la formación capilar por células endoteliales en respuesta al estímulo de FGFb o de VEGF. Estas diferencias en la configuración de la matriz de fibrina son cruciales para

entender las diferencias de la cinética biológica entre el pegamento de fibrina, el plasma rico en plaquetas concentrado (cPRP), y la fibrina rica en plaquetas (PRF).

Finalmente, una fase importante de la angiogénesis es la expresión de la integrina $\alpha v \beta 3$ por las células endoteliales, permitiendo que las células se unan a la fibrina, fibronectina, y a la vitronectina. Una regulación importante de esta expresión de la integrina podía ser directa, traída por la propia fibrina. En cultivos de células endoteliales humanas, la fibrina estimula la expresión de la integrina $\alpha v \beta 3$. Esto no ocurre con el colágeno (Feng X, 1996).

La fibrina constituye una ayuda natural a la inmunidad. Los productos de la degradación de la fibrina y el fibrinógeno (FDP) estimulan la migración de los neutrófilos y aumentan la expresión en la membrana del receptor CD11c/CD18. Este receptor permite la adhesión del neutrófilo al endotelio y al fibrinógeno así como la trasmigración de neutrófilos (Loike JD, 1991). Por otra parte, la fagocitosis de los neutrófilos y el proceso de degradación enzimático son modulados por FDP. Los monocitos llegan al lugar de la lesión más tarde que los neutrófilos. Se ha demostrado que la colonización de la herida por los macrófagos es controlada por la fibronectina a través de las propiedades químicas y físicas de la fibrina y por los agentes quimiotácticos contenidos en su red (Lanir N, 1988).

La matriz de Fibrina dirige la cobertura de los tejidos blandos dañados, afectando al metabolismo de células

36

epiteliales y de fibroblastos. Alrededor de los márgenes de la herida, las células epiteliales pierden su polaridad basal y apical y producen extensiones basales y laterales hacia la herida. Las células emigran posteriormente a través de la matriz transitoria compuesta de fibrinógeno, fibronectina, tenascina, y vitronectina. Esta migración es más bien una degradación de la matriz que una translación simple. La fibrina, fibronectina, PDGF, y los factores del crecimiento que son transformadores (TGF- β) son esenciales para modular la expresión de la integrina, la proliferación de fibroblastos, y su migración hacia dentro de la herida (Gray AJ, 1993). Estos se pueden adherir directamente a la fibrina por diversas integrinas, de las cuales la integrina $\alpha_v\beta_3$ es la primaria. Gracias a la expresión de 2 activadores del plasminógeno, los fibroblastos desarrollan una actividad proteolítica importante para moverse dentro del coágulo de fibrina. Este hecho representa una de las diferencias más importantes entre la polimerización rápida del pegamento de fibrina (y por extensión, del cPRP) y la gelificación lenta del PRF. Después de la migración y de la degradación de la fibrina, los fibroblastos comienzan la síntesis de colágeno (Tuan TL, 1996). Con estas consideraciones fundamentales, el PRF se puede considerar como un biomaterial natural basado en la fibrina que favorece el desarrollo de la microvascularización y capaz de dirigir la migración de las células epiteliales hacia su superficie. El interés de tal membrana es evidente, proteger heridas abiertas y acelerar la cicatrización. Además, esta matriz contiene

leucocitos y promueve su migración. Su utilización podría ser de gran interés en el caso de heridas infectadas. Por ejemplo, sería útil en el relleno de un alveolo dentario con PRF, donde da lugar a la neovascularización a través del coágulo del PRF y al desarrollo de una cubierta epitelial. Finalmente, a pesar de la situación infecciosa e inflamatoria de tales alveolos, se observa una curación rápida de la herida sin dolor, sequedad, o complicaciones purulentas. En las úlceras crónicas de piel en pacientes con insuficiencia vascular o Diabetes Mellitas, también puede emplearse con este mismo objetivo.

Angiogénesis y reclutamiento de células madre

Durante cualquier fenómeno de hemostasia y cicatrización, el coágulo de fibrina atrapa las células madre que circulan y las lleva al sitio dañado gracias a la neovascularización inicial. El PRF, como matriz fisiológica de fibrina, sirve como red a las células madre, especialmente cuando se desarrolla una angiogénesis acelerada en la membrana de fibrina. Este aspecto es de particular interés en el caso de defectos óseos amplios. De hecho, la reparación de este defecto requiere la acumulación de las células madre de la médula ósea y su conversión hacia osteoblastos (Van Hinsbergh VW, 2001).

Las células madre mesenquimales de la médula ósea contribuyen a la regeneración de todos los tipos de células óseas y de las células de otros muchos tejidos blandos.

Estas células indiferenciadas se reclutan de la sangre a los tejidos dañados, donde son capaces de diferenciarse en otros tipos celulares (Badiavas EV, 2003). Esta diferenciación inicial ocurre necesariamente en una matriz transitoria formada por fibrina y fibronectina, por esta razón se usa como matriz de soporte para el trasplante de estas células a la fibrina. Muchos autores han demostrado que una matriz de fibrina es un soporte óptimo para las células madre mesenquimales trasplantadas para obtener la regeneración del defecto óseo (Bensaid W, 2003).

Una matriz experimental de fibrina, fabricada in vitro, con 18 mg/ml de fibrinógeno y activada con 100 IU/ml de trombina, es óptima para la proliferación y migración de las células madre. Esta matriz artificial es muy similar a un coágulo natural de fibrina, lo mismo que el PRF (Bensaid W, 2003).

Las interacciones directas entre la fibrina y las células óseas durante el proceso curativo están escasamente documentadas. Aunque sí se ha referido numerosos estudios en modelos animales acerca del efecto de la fibrina sobre la curación ósea. Los resultados son contradictorios, para unos se mejora y para otros permanece inalterado el proceso curativo óseo. Estas divergencias pueden ser debidas a diferencias entre los modelos de estudio usados (Soffer E, 2003).

Sin embargo la fibrina es una matriz reconocida de soporte para los injertos de proteína morfogenética de hueso (BMP).

La matriz de fibrina asociada a BMPs tiene propiedades angiogénicas, he-

mostáticas y conductivas. Las BMPs, embebidas en la matriz de fibrina, se liberan progresivamente y cuando las injertamos en el interior del músculo, es capaz de inducir formación de hueso (Kawamura M, 1988).

La liberación progresiva de citocinas es una característica común del coágulo natural de fibrina in vivo y probablemente del PRF.

Estos elementos se ilustran durante la exéresis de un quiste maxilar. Después de la extirpación de la lesión quística, la cavidad se llena rápidamente de sangre. Este coágulo de sangre no es nada más que una versión fisiológica del PRF. La matriz del coágulo de fibrina es una trampa para las células madre circulantes. Así el tiempo de curación fisiológico de estas cavidades oscila entre 6 meses y 1 año. Cuando la cavidad quística se rellena del PRF, se acelera este fenómeno curativo fisiológico. Debido a que la matriz de fibrina del PRF añadida, está mejor organizada, es más eficiente en la función de reclutamiento de las células madre y en el proceso curativo. Una cavidad quística rellena del PRF es probable que cure completamente en 2 meses, en lugar de los 6 a 12 meses que se requieren para el proceso de curación fisiológica.

Campos de aplicación para el PRF

El PRF se considera un biomaterial de fibrina. Su estructura molecular, con una baja concentración de trombina, es una matriz óptima para la migración de células endoteliales y fibroblastos. Permite una angiogénesis más rápida y una remodelación más fácil de la fi-

brina y conduce a un tejido conectivo más resistente.

Por tanto, sería aceptable que las membranas de PRF se pudieran utilizar en la curación de todo tipo de heridas cutáneas y mucosas superficiales.

Pero el PRF no es sólo una simple membrana de fibrina. Es también una matriz que contiene todos los elementos moleculares y celulares que permiten una curación óptima. La matriz lleva todos los componentes favorables a la cicatrización presentes en una muestra de sangre, por esto es un biomaterial que se puede considerar un concentrado fisiológico. Se obtiene sin ninguna adición o manipulación. Es posible imaginar por tanto, numerosas aplicaciones extraorales.

En cirugía plástica, el resultado estético de la herida cutánea constituye un problema recurrente. A este respecto, el pegamento de fibrina se utiliza en esta disciplina por sus capacidades de prevenir la formación de cicatrices queloides.

Los inconvenientes del PRF, provienen de que al proceder de la propia sangre del paciente, solamente es posible obtener un volumen limitado de PRF. Este hecho restringe la utilización sistemática del PRF para la cirugía general. La matriz de fibrina contiene todas las células inmunes circulantes y moléculas plasmáticas altamente antigénicas, por ello las membranas de PRF elaboradas son totalmente específicas para el donante-paciente en concreto, y no pueden ser utilizadas como un tejido alogénico de injerto.

Normativa

En nuestro país, el gel plaquetario se utiliza fundamentalmente en las clínicas odontológicas y maxilofaciales donde la aplicación se realiza in situ por el propio médico, y es en el ámbito de la Medicina Pública, donde se emplea en campos de cirugía maxilofacial, cirugía ortopédica y oftalmología. Son los Centros de Transfusión, o los Servicios de Transfusión de los hospitales quienes preparan estos productos como una donación autóloga aplicándose la normativa legal vigente en cuanto a requisitos, determinaciones analíticas, almacenamiento, etiquetado y trazabilidad (RD 1088/2005 BOE n.º 225 de 20/09/2005).

Teniendo en cuenta que la aplicación de estos productos debe realizarse de forma inmediata tras su activación, en muchas ocasiones será preciso llevar a cabo la fase final de preparación en el propio quirófano. En el marco hospitalario el Servicio de Transfusión debe asesorar y cuidar que estas prácticas se efectúen según la normativa legal y respetando las medidas de preparación y manipulación que se consideran correctas en base al conocimiento científico actual.

En otros contextos siempre es posible adherirse al principio de buenas prácticas y cumplir la normativa legal.

Hoy por hoy, en nuestro país estos productos encuentran sustento legal en la ley 29/2006, de 26 de julio de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios (Ley 29/2006, BOE n.º 173). En dicha ley se expresa que los derivados de la sangre y el plasma y el resto de sustancias de

origen humano deberán ser obtenidos en centros autorizados que adoptarán medidas de control, vigilancia y trazabilidad para impedir la transmisión de enfermedades infecciosas.

Otros países de la Unión Europea como Italia y Alemania, solamente permiten la preparación de estos productos en los Servicios o Centros de Transfusión.

Conclusiones

Tras este análisis, podemos concluir que la utilización del gel plaquetario o del gel de fibrina rico en plaquetas podía considerarse en lagunas situaciones clínicas en las que su aplicación tópica ha mostrado evidencias de contribuir a la curación, fundamentalmente en heridas crónicas, cirugía ortopédica y maxilofacial (injerto óseo y reconstrucción) y en oftalmología.

Este tratamiento hay que contemplarlo como complementario a otros tratamientos que procuran la regeneración tisular.

La experiencia clínica confirma que el PRF se puede considerar como biomaterial cicatrizante y que ofrece todos los ingredientes necesarios para una cicatrización óptima; estos son: matriz de fibrina polimerizada en una estructura tetramolecular, con incorporación de plaquetas, leucocitos, citokinas, y a la que se añaden células madre circulantes. A pesar de que las citokinas del PRF se liberan gradualmente y son capaces de acelerar

el fenómeno celular de cicatrización, la estructura de la red de fibrina es el elemento clave de todas las mejoras de los procesos curativos favorecidos por el PRF.

Las sociedades científicas deben sentar las indicaciones para estos productos de forma consensuada y promover el diseño de estudios rigurosos con el fin de que los resultados que se obtengan aporten datos objetivos que prueben su eficacia.

Es también necesaria la creación de una legislación que soporte las perspectivas de este tipo de estrategia terapéutica, ya que la práctica se ha adelantado a la legislación. Tarea a la que también deben contribuir las sociedades científicas.

Es preciso estandarizar los métodos de preparación y establecer criterios rigurosos en base a normas GMP, para que la fabricación de estos productos biológicos sea homogénea en todos los centros de producción y cumplan unos criterios mínimos de calidad, a la vez que cumplan su función de contribuir a una reparación tisular óptima, con riesgo mínimo, manejo fácil y a un coste asequible.

María del Monte Trujillo Pérez, Centro de Transfusión Sanguínea. Faustino Acebal Blanco, Servicio de C. Maxilofacial. Complejo Hospitalario de Jaén. Ildefonso L. Labrot-Moreno Moleón, Servicio de C. Maxilofacial. Complejo Hospitalario de Jaén. Antonio Carrero González, Centro de Transfusión Sanguínea.

Referencias bibliográficas

1. MARX, R. E.; CARLSON, E. R.; EICHSTAEDT, R. M. et al. Platelet rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998; 85: 638-646.
2. ALBERTS, B.; JONSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTERS, P. *Molecular Biology of the cell*. Fourth edition. Published by Garland Science. 2002, New York, NY, p1616.
3. GIANNOBILE, W. V. Periodontal tissue engineering by growth factors. *Bone* 1996; 19: Suppl 1: 23S=37S.
4. ROSS, G.; VOGEL, A. 1978. The platelet derived growth factor. *Cell*, 14: 203-210.
5. HELDIN, C.; OSTMAN A.; ERIKSSON U. 2002. New members of the platelet-derived growth factor family of mitogens. *Archives of Biochem and Biophysics*, 398: 284-290.
6. MARX, 1999.
7. GIANNOBILE, W. V.; SOMERMAM M. J. Growth and amelogenin like factors in periodontal wound healing. A review. *Ann Periodontol* 2003; 8:193-204.
8. BENNETT, N. T.; SCHULTZ, G. S. Growth factors and wound healing. Part II. Role in normal and chronic wound healing. *AM J Surg* 1993; 166: 74-81.
9. SÁNCHEZ, A. R.; SHERIDAN, Ph. J.; KUPP, Ll. Is platelet rich plasma the perfect enhancement factor? A current review. *Int J Oral Maxillofacial Implants* 2003; 18: 93-103.
10. FREYMILLER, E. G.; AGHALOO, T. L. Platelet rich plasma: ready or not? *J Oral Maxillofac Surg* 2004; 62: 484-488.
11. WHITMAN, D. H.; BERRY, R. L.; GREEN, D. M. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofacial Surg* 1997; 55: 1294-1299.
12. ANITÚA, E.; ANDIA, I.; ARDANZA, B., et al. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost* 2004; 91: 4-15.
13. MARX, R. E.; CARLSON, E. R.; EICHSTAEDT, R. M., et al. Platelet rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998; 85: 638-646.
14. MARX, R. E. Platelet rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofacial Surg* 2004; 62: 489-496.
15. FROUM, S. J.; WALLACE, S. S.; TARNOW, et al. Effect of PRP on bone growth and osseointegration in human maxillary sinus graft: three bilateral case reports. *Int J Period Restor Dent* 2002; 22: 45.
16. WILTFANG, J.; SCHLEGEL, K. A.; SCHULTZE-MORGAN, S., et al. Sinus floor augmentation with tricalcium-phosphate: does platelet rich plasma promote its osseous integration and degradation? *Clin Oral Implant Res* 2003; 14: 213.
17. SIMPSON, A.; MILLS, L.; NOBLE, B. The role of growth factors and related agents in accelerating fracture healing. *J Bone Joint Surg* 2006; 88-B: 701-705.
18. SAVARINO, L.; CENINI, E.; TARABUSI, C., et al. Evaluation of bone healing enhancement by liophilized bone grafts supplemented with platelet gel: a standardized methodology in patients with tibial osteotomy for genu varus. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 2005; 76-B: 364-372.

19. RUGHETTI, A.; FLAMINI, S.; COLAFARINA, O. et al. Closet surgery: autologous platelet gel for the treatment of pseudoarthrosis. *Blood Transf* 2004; 2: 37-43.
20. CALOPRISCO, G.; BOREAN, A. Chronic skin ulcers: a regenerative stimulation by topical hemotherapy. *Int J Artific Org* 2004; 27: 816-817.
21. JOSIFOVA, D.; GATT, G.; AQUILINA, A., et al. Treatment of leg ulcers derived wound healing factor (PDWHFS) in a patient with beta thalassemia intermedia. *Br J Haematol* 2001; 112: 527-529.
22. GILSANZ, F.; ESCALANTE, F.; AURAY, C., et al. Treatment of leg ulcers in thalassemia intermedia: use of platelet derived healing factors from the patients own platelets. *Br J Haematol* 2001; 115: 710.
23. HARTWIG, D.; HARLOFFS, LIU, L., et al. Epitiotrophic capacity of a growth factor preparation. *Transfusion* 2004; 44: 1724-1731.
24. CLEVENS, R. A. Autologous platelet rich plasma in facial plastic surgery. Proceedings from the 8th International symposium of facial plastic surgery. New York, May, 2002.
25. BHANOT, S.; ALEX, J. C. Current applications of platelet gels in facial plastic surgery 2002; 18: 27-33.
26. SÁNCHEZ, M.; ANITÚA, E.; AZOFRA, J., et al. Comparison of surgically repaired Achilles tendon tears using platelet rich fibrin matrices. *Am J Sports Med* 2007; 35: 245-251.
27. DOHAN, D. M.; CHOUKROUN, J.; DISS, A., et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second generation platelet concentrate. Part II: platelet related biologic features. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006; 101: 45-50.
28. TANG, Y. Q.; YEAMAN, M. R.; SELDSTED, M. E. Antimicrobial peptides from human platelets. *Infect Immun* 2002; 70: 6524-6533.
29. KATOH, O.; TAUCHI, H.; KAWAISHI, K., et al. Expresión of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor gene, KDR, in hematopoietic cells and inhibitory effect of VEGF on apoptotic cell death caused by ionizing radiation. *Cancer Res* 1995; 55: 5687-5692.
30. LANDESBURG, R.; MOSES, M.; KARPATKIN, M. Risk of using platelet rich plasma gel. *J Oral Maxillofac Surg* 1998; 56: 1116-1117.
31. DVORAK, H. F.; HARVEY, V. S.; ESTRELLA, P.; BROWN, L. F.; MCDONAGH, J.; DVORAK, A. M. Fibrin containing gels induce angiogenesis. Implications for tumor stroma generation and wound healing. *Lab Invest* 1987; 57: 673-686.
32. VAN HINSBERGH, V. W.; COLLEN, A.; KOOLWIJK, P. Role of fibrin matrix in angiogenesis. *Ann NY Acad Sci* 2001; 936: 426-437.
33. NEHLS, V.; HERRMANN, R. The Configuration of fibrin clots determines capillary morphogenesis and endothelial cell migration. *Microvasc Res* 1996; 51: 347-364.
34. FENG, X.; CLARK, R. A.; GALANAKIS, D.; TONNESEN, M. G. Fibrin and collagen differentially regulate human termal microvascular endothelial cell integrins: stabilization of alpha ν /beta 3 mRNA by fibrin. *J Invest Dermatol* 1999; 113: 913-919.
35. LOIKE, J. D.; SODEIK, B.; CAO, L.; LEUCONA, S.; WEITZ, J. I.; DETMERS, P. A., et al. CD11c/CD18 on neutrophils

- recognize a domain at the N terminus of the A alpha chain of fibrinogen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 1044-1048.
36. LANIR, N.; CIANO, P. S.; VAN DE WATER, L.; McDONAGH, J.; DVORAK, A. M.; DVORAK, H. F. Macrophage migration in fibrin gel matrices. II. Effects of clotting factor XIII, fibronectin, and glycosaminoglycan content on cell migration. *J Immunol* 1988; 140: 2340-2349.
 37. GRAY, A. J.; BISHOP, J. E.; REEVES, J. T.; LAURENT, G. J. A alpha and B beta chains of fibrinogen stimulate proliferation of human fibroblasts. *J Cell Sci* 1993; 142: 77: 94-100.
 38. TUAN, T. L.; SONG, A.; CHANG, S.; YOUNAI, S.; NIMNI, M. E. In vitro fibroplasias: matrix contraction, cell growth, and collagen production of fibroblasts cultured in fibrin gels. *Exp Cell Res* 1996; 223: 127-134.
 39. BADIYAS, E. V.; ABEDI, M.; BUTMARC, J.; FALANCA, V.; QUESENBERRY, P. Participation of bone marrow derived cells in cutaneous wound healing. *J Cell Physiol* 2003; 196: 245-250.
 40. BENSALD, W.; TRIFFITT, J. T.; BLANCHAT, C.; OUDINA, K.; EDEL, L.; PETITE, H. A biodegradable fibrin scaffold for mesenchymal stem cell transplantation. *Biomaterials* 2003; 24: 2497-2502.
 41. SOFFER, E.; OUHAYOUN, J. P.; ANAGNOSTOU, F. Fibrin sealants and platelet preparations in bone and periodontal healing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003; 95: 521-528.
 42. Kawamura M, Urist MR. Human Fibrin is a physiologic delivery system for bone morphogenetic protein. *Clin Orthop* 1988; 235: 302-310.
 43. Real Decreto 1088/2005, de 20 de Septiembre de 2005.
 44. Ley 29/2006, de 26 de Julio de 2006, de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios. BOE n.º 178, de 26/07/2006.