



Dr. Eduardo Anitua

Práctica privada dedicada a la Implantología y Rehabilitación Oral en Vitoria.
Director de BTI Biotechnology Institute.

Dr. Ricardo Tejero

Investigador de BTI Biotechnology Institute.

UN PASO MÁS EN LA OSEOINTEGRACIÓN

INTRODUCCIÓN

Las terapias regenerativas con implantes son actualmente técnicas ampliamente utilizadas para intentar revertir las situaciones de pérdida de funcionalidad o ausencia de hueso. Debido a la conveniencia de acortar los tiempos de tratamiento y de acometer reconstrucciones cada vez más complejas, tanto el diseño de los implantes como las técnicas quirúrgicas están siendo objeto de una evolución constante.

La integración ósea se produce cuando existe una unión directa, duradera y funcional entre el hueso y la superficie del implante (1). De ahí la importancia del diseño superficial de los implantes. Las modificaciones de sus propiedades físicas, químicas y biológicas han sido objeto de numerosas publicaciones y un trabajo reciente de nuestro grupo de investigación ha permitido contribuir con una síntesis actual a la literatura enfatizando el aspecto de la interacción biológica (2). Los diseños y las funciones de los implantes intraóseos han evolucionado con la incorporación paulatina de elementos biomiméticos tales como estructuras topográficas jerárquicas, adaptación geométrica a las biomoléculas y células de interés, características hidro-compatibles, etc. Algunas de estas modificaciones han permitido una mejora notable en la práctica clínica.

Aun así, siguen existiendo numerosos retos por superar y de ahí el interés en concebir los implantes y sus superficies como agentes activos del proceso regenerativo, en vez de meros soportes pasivos de la carga mecánica funcional. Con este fin, las nuevas estrategias de modificación de las superficies clásicas han comenzado a introducir elementos de la matriz extracelular con funciones conocidas en la formación, regeneración y/o reparación de tejidos.

Este artículo se centra precisamente en el estudio de los

DEBIDO A LA CONVENIENCIA DE ACORTAR LOS TIEMPOS DE TRATAMIENTO Y DE ACOMETER RECONSTRUCCIONES CADA VEZ MÁS COMPLEJAS, TANTO EL DISEÑO DE LOS IMPLANTES COMO LAS TÉCNICAS QUIRÚRGICAS ESTÁN SIENDO OBJETO DE UNA EVOLUCIÓN CONSTANTE

efectos en la osteointegración de implantes modificados con iones de calcio (unicCa) y bioactivados con plasma autólogo rico en factores de crecimiento.

LA SUPERFICIE UNICCA

El calcio iónico es un cofactor natural y necesario de la cascada de coagulación que permite la formación de la matriz provisional y extracelular y la liberación controlada de los factores de crecimiento. El calcio es esencial en la formación y reparación del hueso (3-6) y en la osteointegración de los implantes, ya que modifica la configuración electrónica de la superficie y permite la unión de proteínas y células, así como su activación y función. El ión calcio posee una gran afinidad por el óxido de titanio y, a través de sus dos cargas positivas, establece puentes electrostáticos con la superficie del implante, cargada negativamente, y con las funcionalidades aniónicas (cargadas negativamente) de numerosas proteínas con importantes funciones regenerativas (5,7,8).

A diferencia de cualquier otro implante, el implante con superficie unicCa tiene un aspecto húmedo derivado de la hidratación natural de los iones de calcio en la superficie, sin necesidad de estar sumergido en ninguna solución líquida



Figura 1. Aspecto macroscópico del implante con superficie unicCa. Los iones de calcio superficiales hidratan de manera natural la superficie del implante y dan un aspecto húmedo. Esta modificación química de la superficie permite protegerla ante contaminantes atmosféricos (ver Figura 3A).

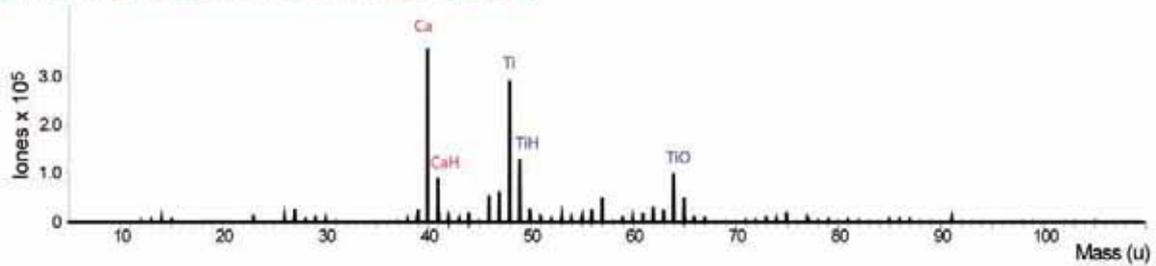


Figura 2. Coagulación de la sangre alrededor de la superficie unicCa. Los iones de calcio de la superficie unicCa estimulan la coagulación en el microentorno del implante, de manera que, desde el primer momento, los diferentes procesos regenerativos suceden inducidos por la superficie, logrando así la regeneración ósea por contacto, desde la colocación del implante.

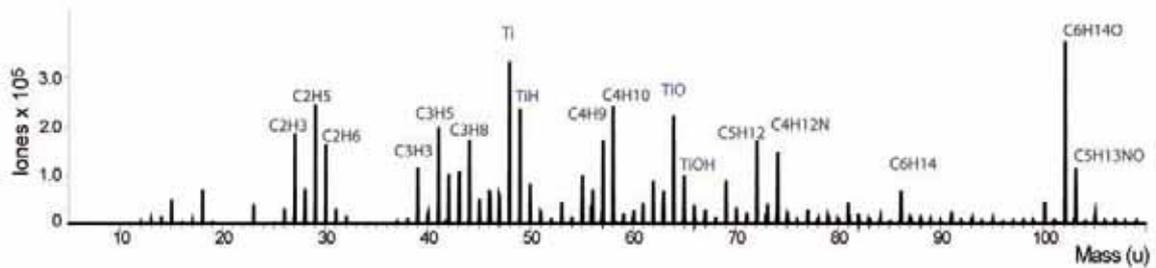
Factor	Funciones
VEGF	<ul style="list-style-type: none"> · Promueve la formación de capilares mediante la estimulación de las células endoteliales · Permite la permeabilidad capilar y la vasodilatación a través de la producción de óxido nítrico · Induce la diferenciación de pericitos en osteoblastos
bFGF	<ul style="list-style-type: none"> · Incrementa la producción de VEGF · Controla la proliferación y diferenciación osteoblástica · Estimula la adhesión y proliferación fibroblástica y la expresión genética de elementos de la matriz gingival
PDGF-BB	<ul style="list-style-type: none"> · Estabiliza y dota de estructura a los vasos sanguíneos mediante la regulación de las células del músculo liso y los pericitos · Capta y estimula la migración de células madre osteoprogenitoras
TGF-β	<ul style="list-style-type: none"> · En dosis altas, estimula las células endoteliales para el engrosamiento de las paredes de los vasos sanguíneos e inhibe la proliferación y diferenciación de las células madre en osteoblastos · En dosis bajas, estimula la renovación de vasos sanguíneos e incrementa la proliferación y diferenciación de las células madre en osteoblastos · Ayuda a mantener el nivel óseo porque limita la apoptosis de los osteocitos · Induce la síntesis de glicosaminoglicanos osteogénicos que facilitan la mineralización de la matriz extracelular
HGF	<ul style="list-style-type: none"> · Incrementa la formación de vasos sanguíneos mediante la estimulación de la proliferación y la migración de células endoteliales y hematopoiéticas.
IGF	<ul style="list-style-type: none"> · Estimula la angiogénesis y miogénesis en situaciones de isquemia y daño vascular · Incrementa la proliferación y quimiotaxis osteoblástica · Reduce la inflamación mediante la inhibición de la expresión de marcadores genéticos pro-inflamatorios
BMP	<ul style="list-style-type: none"> · Estimula la migración y diferenciación de células madre pluripotenciales en osteoblastos · En dosis altas, reduce el remodelado óseo mediante la inhibición de la formación y activación de los osteoclastos · En dosis bajas, incrementa el remodelado óseo al estimular la formación y activación de los osteoclastos

Tabla 1. Factores de crecimiento implicados en la angiogénesis y osteogénesis y algunas de sus funciones principales.

A Superficie modificada con iones de calcio (unicCa)



B Superficie clásica sin modificar



C Coagulación

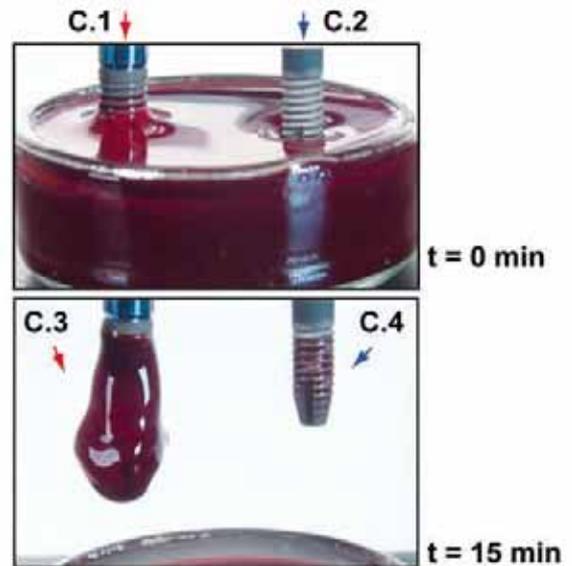
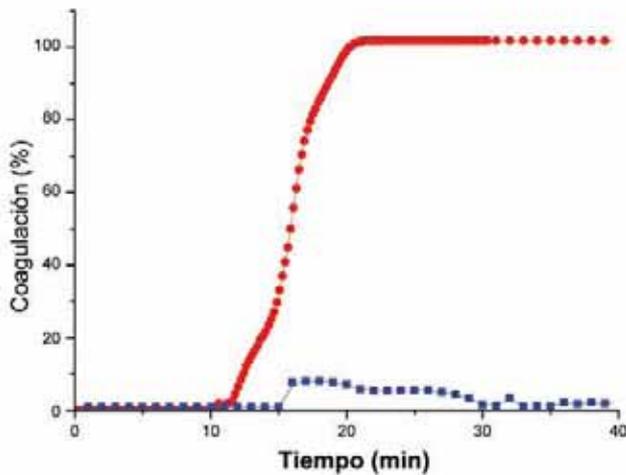


Figura 3. Superficies de implantes modificadas con calcio, unicCa (A) y sin modificar (B) comparadas por su composición química y por sus efectos en la coagulación. Los espectros de cationes obtenidos por ToF-SIMS muestran que la elevada afinidad del óxido de titanio por el calcio da lugar a una superficie muy pura de iones de calcio y de titanio del sustrato (A), mientras que en las superficies clásicas se detectan abundantes señales de hidrocarburos (CxHy) adsorbidos del aire junto con las señales de titanio del sustrato (B). La química superficial de las superficies modificadas con calcio provoca su humectación completa en presencia de la sangre o el PRGF (C.1), cosa que no ocurre en las superficies clásicas (C.2). En presencia de sangre o plasma, las superficies modificadas con calcio estimulan la coagulación y la activación plaquetaria (C, línea roja), mientras que las superficies desprovistas de calcio no lo hacen (C, línea azul). Las interfases resultantes a los 15 minutos de exposición al PRGF son claramente distintas, como se puede ver en C.3 y C.4, respectivamente. En el implante unicCa (C.3) se ha formado el coágulo en su superficie. En el implante sin calcio, no (C.4). Además, en este último caso, se pueden observar algunas burbujas de hidrofobicidad por las cuales el medio biológico no ha podido entrar ni siquiera en contacto con la superficie.

SIGUEN EXISTIENDO NUMEROSOS RETOS POR SUPERAR Y DE AHÍ EL INTERÉS DE CONCEBIR LOS IMPLANTES Y SUS SUPERFICIES COMO AGENTES ACTIVOS DEL PROGRESO REGENERATIVO, EN VEZ DE MEROS SOPORTES PASIVOS DE LA CARGA MECÁNICA FUNCIONAL

(Figura 1). Estos iones, que se liberan al medio biológico en el mismo acto de colocación del implante, desencadenan la formación de la matriz provisional de fibrina y la activación plaquetaria y orientan así las primeras fases regenerativas en íntimo contacto con el implante (Figuras 2 y 3). De esta manera la superficie unicCa es capaz de modular la composición y conformación del microentorno regenerativo desde el principio de la regeneración (9-11).

LA BIOACTIVACIÓN AUTÓLOGA: PRGF

El PRGF es una tecnología diseñada para la administración de factores de crecimiento plaquetarios y plasmáticos endógenos así como biomateriales autólogos en el lugar de la lesión con el fin de promover la curación de heridas y la regeneración de los tejidos.

Las plaquetas contenidas en el PRGF son fundamentales en el proceso de curación de heridas. Tras su activación, las plaquetas liberan una gran variedad de proteínas y citoquinas con funciones clave en los procesos osteogénicos (Tabla 1) (12-17). La diversidad y complejidad de los mediadores biológicos presentes en el PRGF hacen de esta tecnología un instrumento particularmente atractivo para su uso clínico en diversos ámbitos biomédicos (18-21) (Figura 4).

El hecho de que el PRGF sea un producto 100% autólogo presenta dos grandes ventajas. Por un lado, es una garantía contra los riesgos inmunogénicos, de compatibilidad biológica y de transmisión de enfermedades que pueden darse en derivados animales o humanos heterólogos. Por otro lado, no se ve afectado por la gran variabilidad entre sujetos,

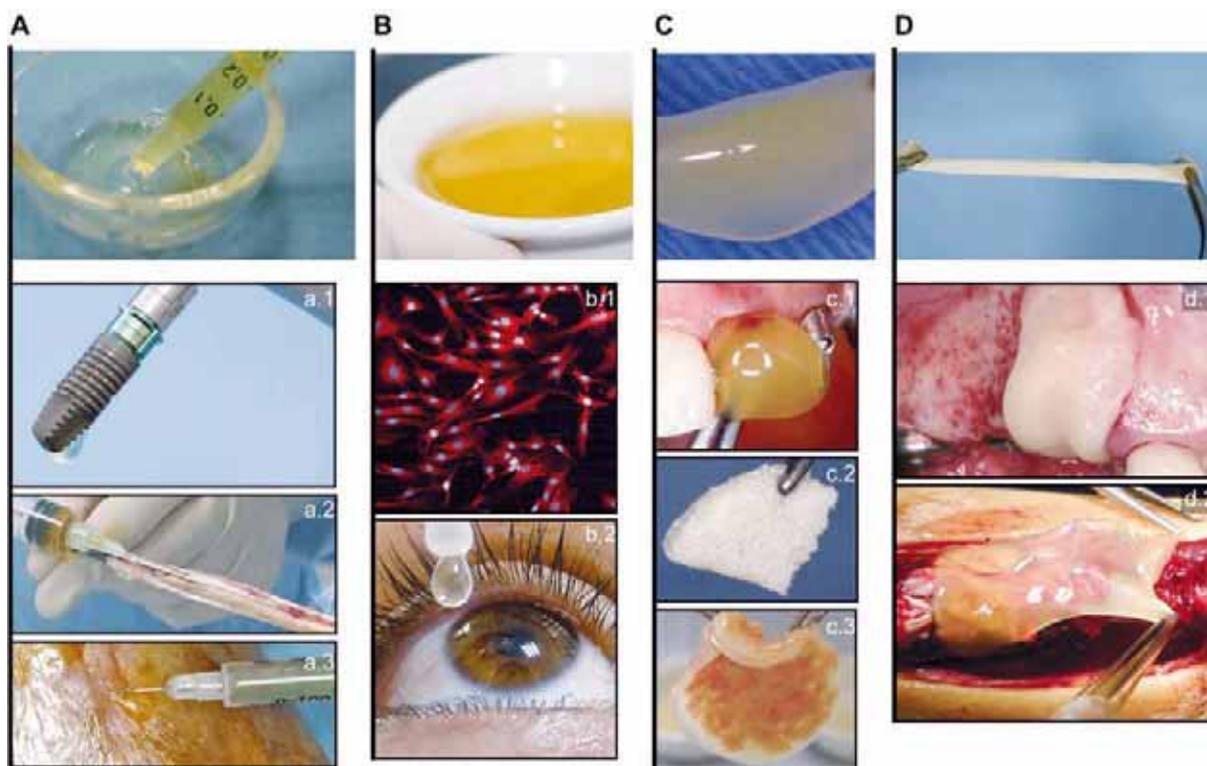


Fig. 4 Formulaciones y aplicaciones del PRGF. La tecnología endógena PRGF permite la preparación de distintas formulaciones a través del control del proceso de elaboración y del grado de coagulación. Las principales formulaciones y algunas de sus aplicaciones terapéuticas: (A) PRGF líquido, usado para humectar superficies de implantes antes del desarrollo unicCa (a.1) y realizar infiltraciones en traumatología (a.2) o dermatología, curación de heridas y úlceras (a.3). (B) Sobrenadante del exudado plaquetario, usado para cultivar células *in vitro* en ingeniería de tejidos (b.1) o para oftalmología (b.2). (C) Coágulo con consistencia de gel, usado como estructura para la formación de injertos autólogos c.1 y c.3) o heterólogos (c.2). (D) Membrana de fibrina de consistencia elástica, densa y hemostática, usada para la contención y sutura de los tejidos intervenidos en cirugía (oral d.1 y ortopédica d.2).

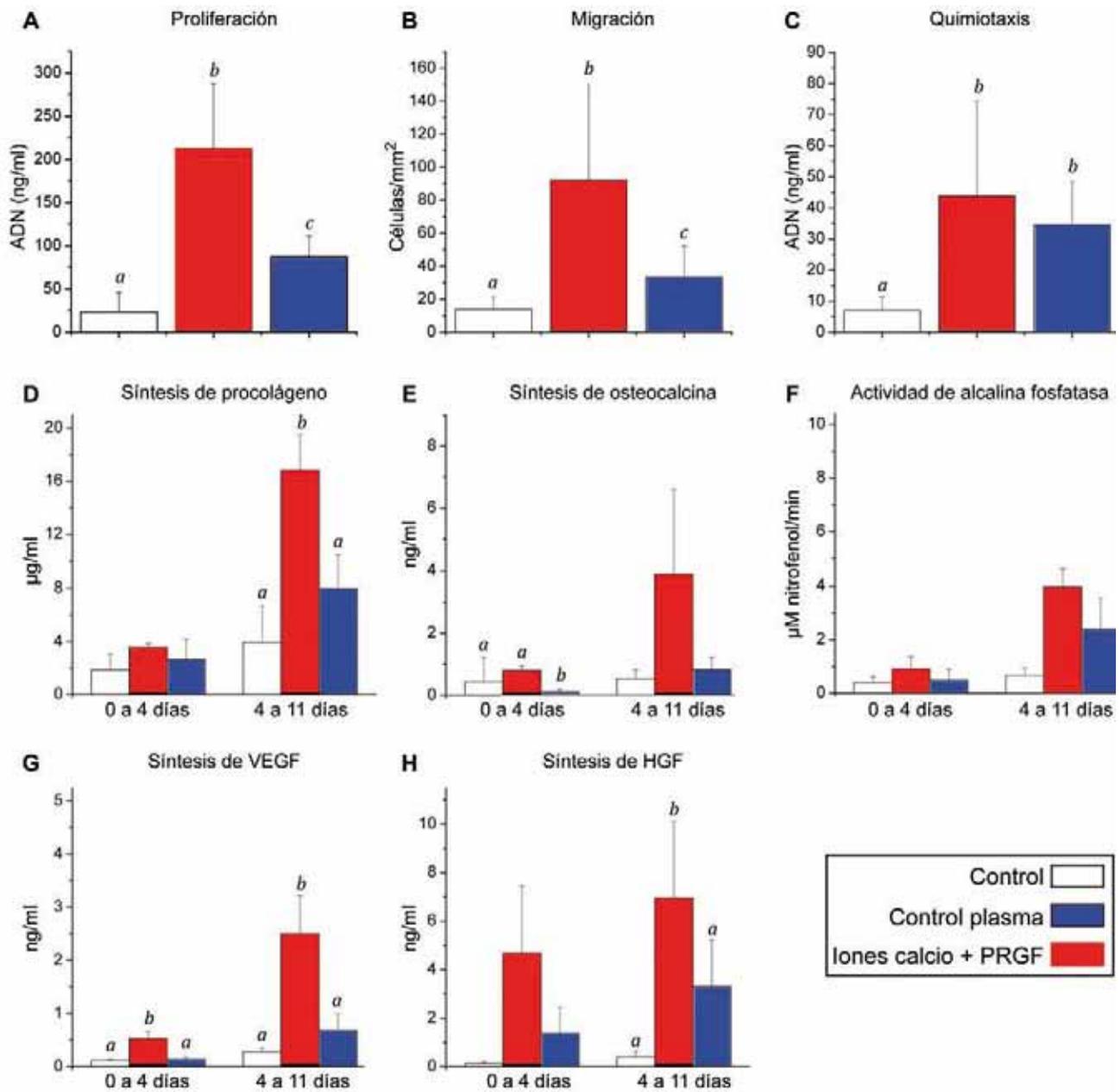


Figura 5. Efectos del PRGF en células osteoblásticas. Resultados de los cultivos celulares con células primarias alveolares en presencia o ausencia de iones de calcio y PRGF. (A) Proliferación. (B) Migración. (C) Quimiotaxis. (D) Síntesis de procolágeno. (E) Síntesis de osteocalcina. (F) Actividad de fosfatasa alcalina. (G) Expresión de VEGF. (H) Expresión de HGF. Las barras señaladas con letras diferentes presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

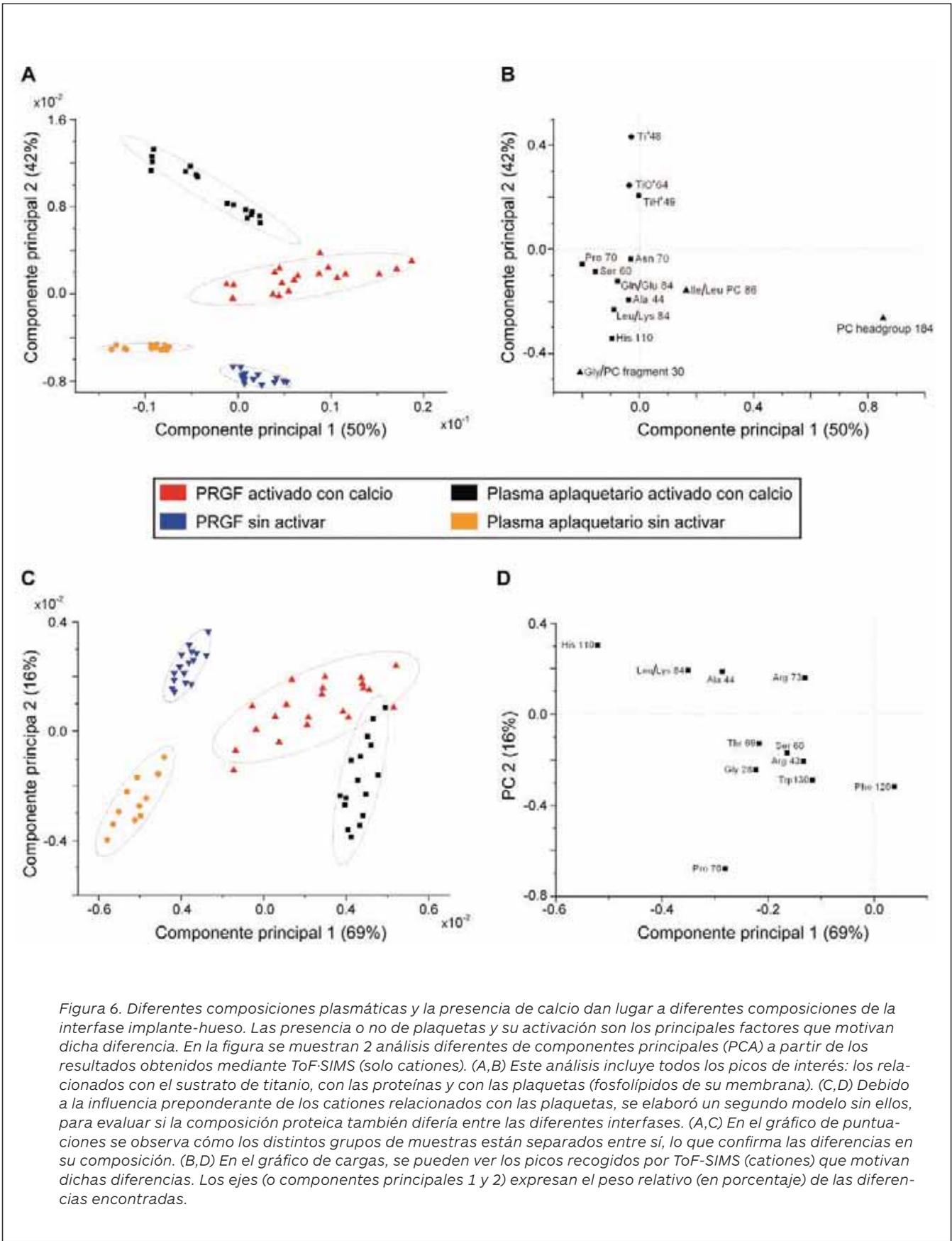
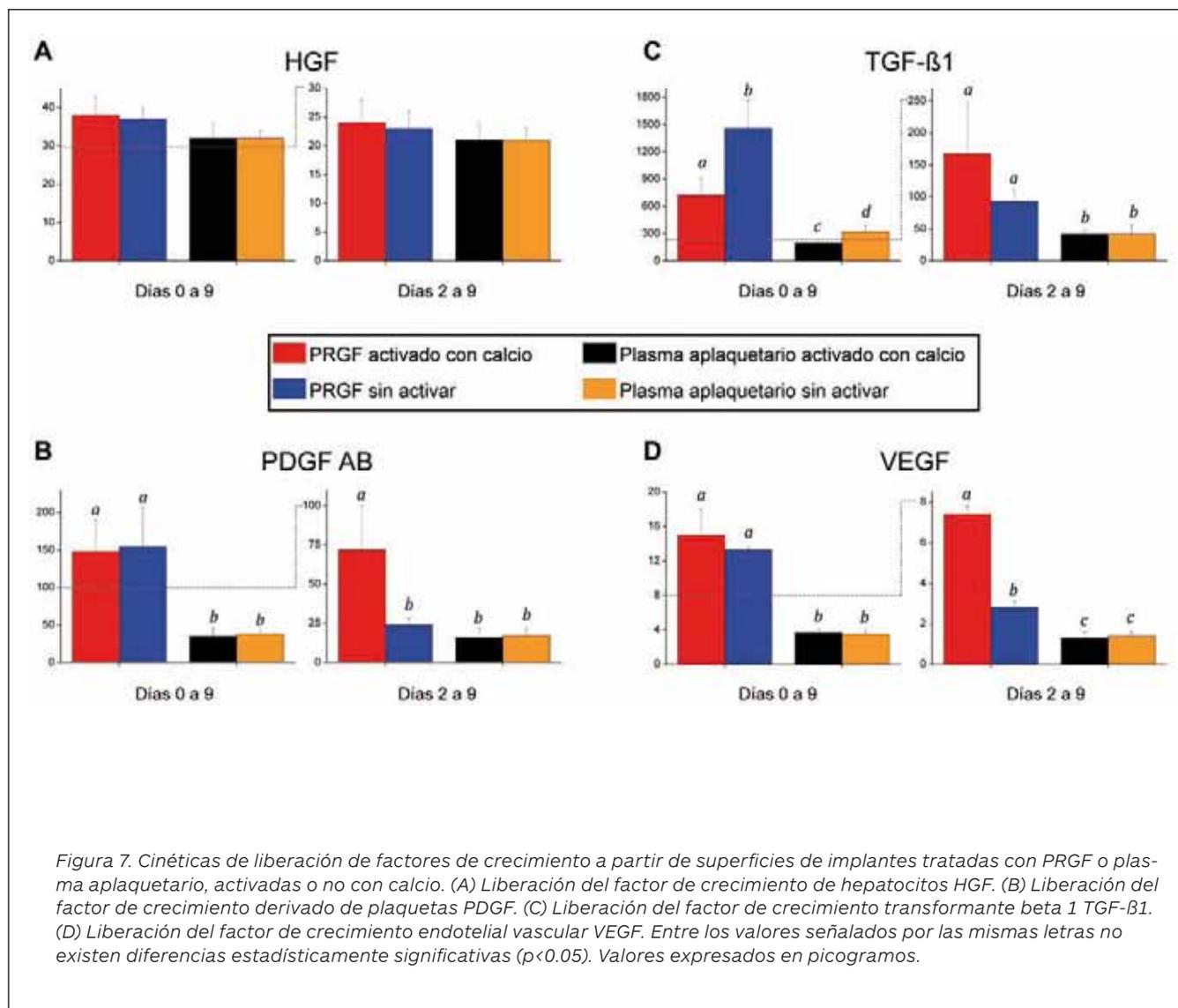


Figura 6. Diferentes composiciones plasmáticas y la presencia de calcio dan lugar a diferentes composiciones de la interfase implante-hueso. La presencia o no de plaquetas y su activación son los principales factores que motivan dicha diferencia. En la figura se muestran 2 análisis diferentes de componentes principales (PCA) a partir de los resultados obtenidos mediante ToF-SIMS (solo cationes). (A,B) Este análisis incluye todos los picos de interés: los relacionados con el sustrato de titanio, con las proteínas y con las plaquetas (fosfolípidos de su membrana). (C,D) Debido a la influencia preponderante de los cationes relacionados con las plaquetas, se elaboró un segundo modelo sin ellos, para evaluar si la composición proteica también difería entre las diferentes interfases. (A,C) En el gráfico de puntuaciones se observa cómo los distintos grupos de muestras están separados entre sí, lo que confirma las diferencias en su composición. (B,D) En el gráfico de cargas, se pueden ver los picos recogidos por ToF-SIMS (cationes) que motivan dichas diferencias. Los ejes (o componentes principales 1 y 2) expresan el peso relativo (en porcentaje) de las diferencias encontradas.



de manera que no existe el riesgo de sobre o infra estimulación detectado en otras estrategias regenerativas con factores de crecimiento (22,23). Ambas situaciones podrían anular la acción terapéutica de los factores de crecimiento, que es altamente dependiente de una adecuada dosificación.

EFFECTOS EN LA REGENERACIÓN DEL TEJIDO ÓSEO Y DE LA MATRIZ EXTRACELULAR

Con el fin de valorar el efecto del calcio y del PRGF en la regeneración ósea, se ha analizado la función celular de líneas osteoblásticas primarias aisladas a partir de hueso alveolar de pacientes sometidos a cirugía oral (24). Los resultados de este estudio muestran que el uso de PRGF con iones de calcio permite estimular los procesos esenciales de regeneración del tejido óseo. En particular, hemos podido detectar una mayor proliferación (Figura 5a), migración y quimiotaxis celular (Figura 5a-c) y el aumento de la expresi-

ón de agentes angiogénicos y anti-inflamatorios (factores de crecimiento endotelial vascular: VEGF y de hepatocitos: HGF) claves en la aceleración de la regeneración (Figura 5g-h). Las células osteogénicas expresaron significativamente más marcadores propios de la matriz extracelular (procolágeno tipo I, Osteocalcina, Alcalina Fosfatasa) en presencia de PRGF activado por el calcio iónico (Figura 5d-f), lo que indica la validez de esta terapia para inducir una respuesta regenerativa ósea más favorable.

DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE BIOMOLÉCULAS EN LA INTERFASE UNICCA - PRGF

El siguiente objetivo fue evaluar el comportamiento de estas tecnologías en combinación con implantes. En comparación con otras estrategias biomiméticas, el PRGF presenta la ventaja de intervenir en los eventos relacionados con los primeros momentos post-implantación. De esta forma la res-

LOS DISEÑOS Y FUNCIONES DE LOS IMPLANTES INTRAÓSEOS HAN EVOLUCIONADO CON LA INCORPORACIÓN PAULATINA DE ELEMENTOS BIOMIMÉTICOS TALES COMO ESTRUCTURAS TOPOGRÁFICAS JERÁRQUICAS O ADAPTACIÓN GEOMÉTRICA A LAS BIOMOLÉCULAS

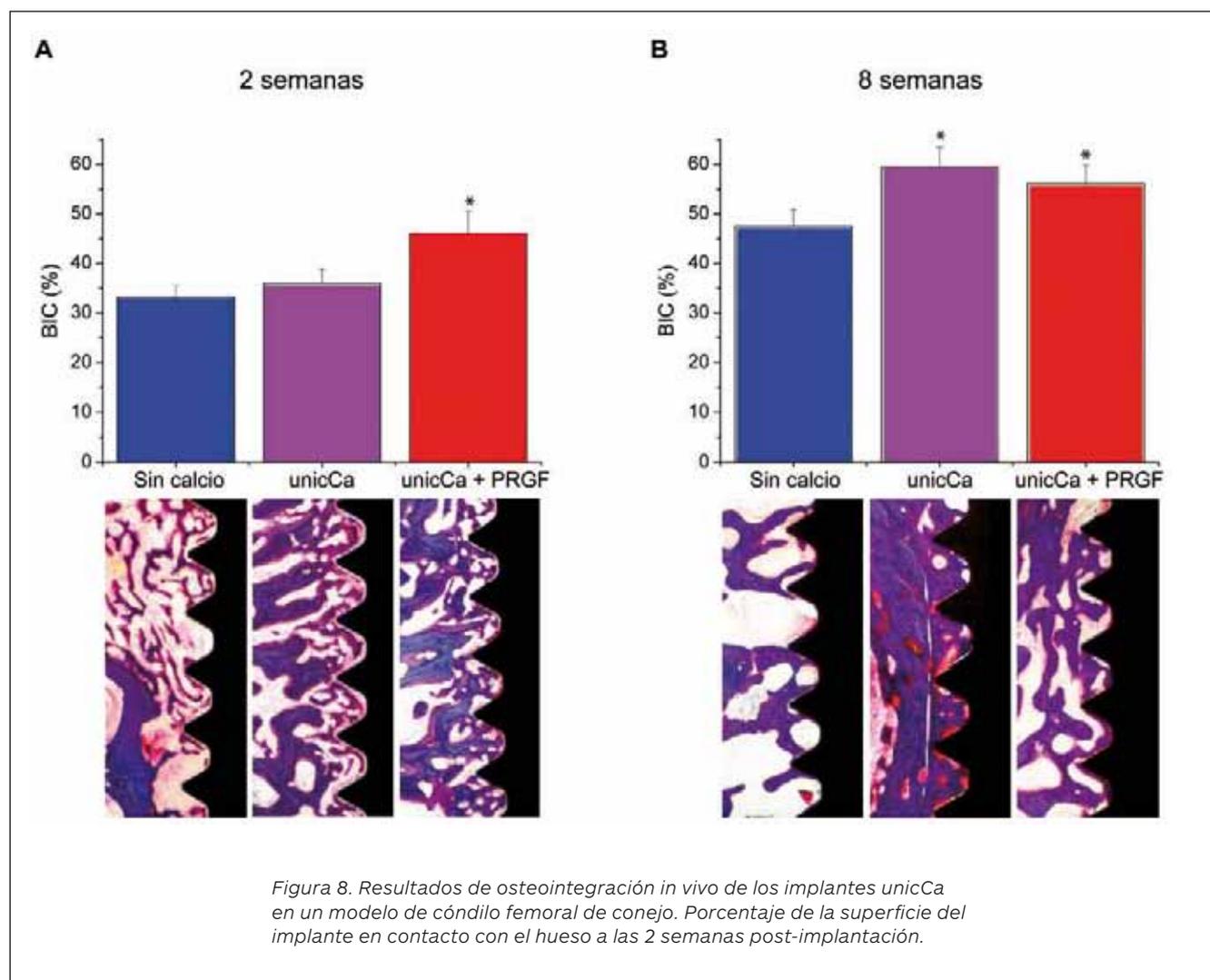
puesta regenerativa puede iniciarse antes de que la superficie del implante quede «pasivada» o recubierta por otras biomoléculas de carácter genérico.

El análisis de la interfase PRGF-titanio nos ha permitido comprobar de manera muy precisa que existen diferencias

de composición en función de la exposición de superficies de implantes a diferentes formulaciones plasmáticas y que la presencia de iones de calcio es determinante (**Figura 6**). Morfológicamente, la presencia de plaquetas y la activación de las mismas mediante calcio permitió la formación de una red más homogénea y densa de fibrina sobre la superficie, con grupos de agregados plaquetarios formando nodos de estabilización de la matriz.

Este resultado es consistente con el hecho conocido de que las plaquetas organizan la red de fibrina y catalizan su producción (25). Mediante la aplicación de una técnica muy sensible que es capaz de analizar las primeras capas atómicas formadas sobre las superficies (la Espectrometría de Masas por Tiempo de Vuelo de Iones Secundarios, ToF-SIMS) (26) pudimos detectar que la composición de la interfase no solo era morfológicamente distinta sino que también había una diferencia de composición química.

También pudimos comprobar que la activación con calcio dejaba porciones de la superficie accesibles. En otras



ESTE TRABAJO HA PERMITIDO DEMOSTRAR QUE LA MODIFICACIÓN DE LA SUPERFICIE DE IMPLANTES CON CALCIO ESTIMULA LA ADHESIÓN Y ACTIVIDAD PLAQUETARIA Y LA FORMACIÓN DE LA MATRIZ PROVISIONAL

palabras, la superficie no quedaba «pasivada» o recubierta inespecíficamente, lo que puede ser clínicamente positivo. El proteoma superficial, por su parte, dependió más de la presencia o no de fibrina. La capacidad de retención de factores de crecimiento de esta estructura se postula como el elemento diferencial en términos de composición de la interfase.

En definitiva, la presencia o no de plaquetas, mediada por el PRGF y su activación mediada por unicCa se traduce en diferencias en la composición proteica de la interfase y en su conformación/orientación. Por lo tanto, las células que interactúan con estas interfaces recibirán un tipo muy particular de estimulación química y morfológica que determinará su orientación funcional. Este hecho es muy relevante ya que conociendo la composición de la interfase inicial, podemos comenzar a controlar los mecanismos biológicos regenerativos y su evolución.

DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE LIBERACIÓN DE FACTORES DE CRECIMIENTO DESDE EL IMPLANTE UNICCA

El siguiente trabajo experimental tuvo como objetivo determinar el efecto de unicCa en la liberación de los agentes bioactivos del PRGF o de la sangre. Para ello realizamos estudios de liberación de factores en función de la química y la morfología de las interfaces (**Figura 7**). De nuevo, la activación

plaquetaria desencadenada por las superficies unicCa fue determinante en este proceso. Pudimos consolidar el dato ya obtenido en el estudio anterior que nos mostraba que unicCa permite una mayor retención de plaquetas en la superficie.

En el estudio evaluamos el uso de trombina como activador, además del calcio. Pudimos confirmar que la presencia de trombina da lugar a una fibrina con fibras considerablemente más delgadas que usando calcio solo (27,28). En términos de liberación y retención de factores de crecimiento, la presencia de trombina inhibió la liberación del factor PDGF, hecho también detectado por Borrelli et al. (29), lo que no ocurría cuando la activación se producía exclusivamente con calcio.

Como era de esperar, los factores plasmáticos, como el HGF, estaban presentes en el exudado, independientemente de la presencia de plaquetas y de su estado. De la misma manera, los factores plaquetarios fueron detectados en los primeros días tras la activación, momento a partir del cual su concentración comenzó a descender. La activación plaquetaria por unicCa permitió además una liberación más controlada y sostenida en el tiempo desde las superficies de los implantes lo que, desde un punto de vista biológico es muy favorable.

OSTEOINTEGRACIÓN DE LOS IMPLANTES UNICCA CON Y SIN PRGF

El estudio in vivo en cóndilo femoral de conejo ha permitido demostrar que la modificación de las superficies de los implantes con calcio, especialmente en combinación con PRGF, supone una estimulación muy significativa de la osteogénesis alrededor de éstos. Aunque la modificación con calcio *per se* ya consiguió una mejora con respecto a los controles especialmente en el periodo de remodelado óseo, la combinación con el PRGF mostró resultados altamente sinérgicos en todos los tiempos de curación estudiados. Tanto en los

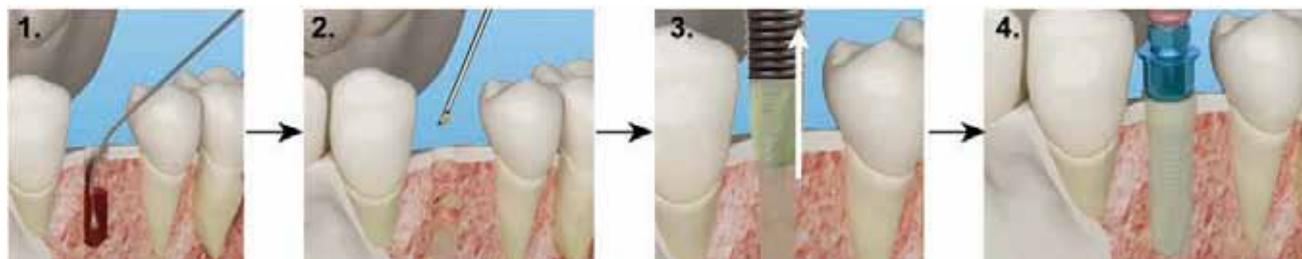


Figura 9. Protocolo de bioactivación de implantes con superficie unicCa y PRGF. 1) Una vez realizado el protocolo de fresado, se aspira la sangre. 2) Se escoge la fracción rica de PRGF y se rellena el alveolo con la misma. 3) Se coloca el implante en el alveolo, sumergiendo solo la parte apical, de manera que por capilaridad, el plasma asciende por la superficie del implante. 4) Pasados unos segundos, se procede a la inserción completa del implante en el alveolo.

primeros momentos de la regeneración como en el largo plazo, los implantes con calcio en su superficie y PRGF alcanzaron valores de osteointegración significativamente más elevados que los controles sin este recubrimiento (**Figura 8**).

Esto es consistente con los mecanismos de regeneración que intervienen al usar PRGF y que han sido observados previamente en otros estudios: reducción de la inflamación, estimulación celular y promoción de la angiogénesis (30,31). Además de los resultados funcionales aquí presentados, estos implantes activan directamente el plasma. Así desaparece la necesidad de introducir pasos intermedios, lo que facilita la aplicación clínica de la técnica del PRGF (**Figura 9**). Por último, estudios recientes señalan que el calcio iónico en la superficie de los implantes unicCa ejerce un potente

efecto de inhibición de la adhesión bacteriana, por lo que estos implantes serían más resistentes a la aparición y desarrollo de fenómenos de mucositis y periimplantitis. Especialmente significativos en implantes post-extracción inmediata.

CONCLUSIÓN

En definitiva, este trabajo ha permitido demostrar que la modificación de la superficie de implantes con calcio (unicCa) estimula la adhesión y activación plaquetaria y la formación de la matriz provisional. Además, el control del equilibrio iónico entre la superficie de los implantes con calcio y el microentorno biológico permite mejorar la osteointegración y reducir los tiempos de curación en condiciones reales de implantación. ●

BIBLIOGRAFÍA

1. **Brånemark PI.** Osseointegration and its experimental background. *J Prosthet Dent.* 1983; 50 (3): 399–410.
2. **Tejero R, Anitua E, Orive G.** Toward the biomimetic implant surface: Biopolymers on titanium-based implants for bone regeneration. *Prog Polym Sci.* 2014; 39 (4): 1406–47.
3. **Habibovic P, Barralet JE.** Bioinorganics and biomaterials: bone repair. *Acta Biomater.* 2011; 7 (8): 3013–26.
4. **Gorbet MB, Sefton M V.** Biomaterial-associated thrombosis: roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes. *Biomaterials.* 2004; 25 (26): 5681–703.
5. **Mann S.** *Biomaterialization Principles and Concepts in Bioinorganic Materials Chemistry.* Compton RG, Davies SG, Evans J, editors. Oxford chemistry masters. Oxford University Press; 2001.
6. **Dvorak MM, Siddiqua A, Ward DT, Carter DH, Dallas SL, Nemeth EF, et al.** Physiological changes in extracellular calcium concentration directly control osteoblast function in the absence of calciotropic hormones. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101 (14): 5140–5.
7. **Ellingsen JE.** A study on the mechanism of protein adsorption to TiO₂. *Biomaterials.* 1991; 12 (6): 593–6.
8. **Gupta S, Reviakine I.** Platelet activation profiles on TiO₂: effect of Ca²⁺ binding to the surface. *Biointerphases.* 2012; 7 (1-4): 28.
9. **Tejero R, Rossbach P, Keller B, Anitua E, Reviakine I.** Time-of-flight secondary ion mass spectrometry with principal component analysis of titanium-blood plasma interfaces. *Langmuir.* 2013;29(3):902–12.
10. **Sánchez-Ilárduya MB, Trouche E, Tejero R, Orive G, Reviakine I, Anitua E.** Time-dependent release of growth factors from implant surfaces treated with plasma rich in growth factors. *J Biomed Mater Res A.* 2013; 101 (5): 1478–88.
11. **Anitua E, Prado R, Orive G, Tejero R.** Effects of calcium-modified titanium implant surfaces on platelet activation, clot formation, and osseointegration. *J Biomed Mater Res A.* 2014;DOI: 10.1002/jbm.a.35240
12. **Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn T a.** The role of growth factors in the repair of bone. *Biology and clinical applications.* *J Bone Joint Surg Am.* 2002;84-A(6):1032–44.
13. **Anitua E, Sánchez M, Orive G, Andía I.** Delivering growth factors for therapeutics. *Trends Pharmacol Sci.* 2008; 29 (1): 37–41.
14. **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; 24 (5): 227–34.
15. **Anitua E, Troya M, Orive G.** Plasma rich in growth factors promote gingival tissue regeneration by stimulating fibroblast proliferation and migration and by blocking transforming growth factor- β 1-induced myodifferentiation. *J Periodontol.* 2012; 83 (8): 1028–37.
16. **Sánchez M, Anitua E, Azofra J, Prado R, Muruzabal F, Andía I.** Ligamentization of tendon grafts treated with an endogenous preparation rich in growth factors: gross morphology and histology. *Arthroscopy.* 2010; 26 (4): 470–80.
17. **Chen F-M, Zhang J, Zhang M, An Y, Chen F, Wu Z-F.** A review on endogenous regenerative technology in periodontal regenerative medicine. *Biomaterials.* 2010; 31 (31): 7892–927.
18. **Anitua E, Orive G, Aguirre JJ, Andía I.** Clinical outcome of immediately loaded dental implants bioactivated with plasma rich in growth factors: a 5-year retrospective study. *J Periodontol.* 2008; 79 (7): 1168–76.
19. **López-Vidriero E, Goulding K a, Simon D a, Sánchez M, Johnson DH.** The use of platelet-rich plasma in arthroscopy and sports medicine: optimizing the healing environment. *Arthroscopy.* 2010; 26 (2): 269–78.
20. **Burnouf T, Goubran HA, Chen T-M, Ou K-L, El-Ekiaby M, Radosevic M.** Blood-derived biomaterials and platelet growth factors in regenerative medicine. *Blood Rev.* 2013; 27 (2): 77–89.
21. **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; 84 (2): 415–21.
22. **Liu Y, Huse RO, de Groot K, Buser D, Hunziker EB.** Delivery mode and efficacy of BMP-2 in association with implants. *J Dent Res.* 2007; 86 (1): 84–9.
23. **Wikesjö UME, Qahash M, Polimeni G, Susin C, Shanaman RH, Rohrer MD, et al.** Alveolar ridge augmentation using implants coated with recombinant human bone morphogenetic protein-2: histologic observations. *J Clin Periodontol.* 2008; 35 (11): 1001–10.
24. **Anitua E, Tejero R, Zalduendo MM, Orive G.** Plasma Rich in Growth Factors (PRGF-Endoret) Promotes Bone Tissue Regeneration by Stimulating Proliferation, Migration and Autocrine Secretion on Primary Human Osteoblasts. *J Periodontol.* 2013; 84 (8): 1180–90.
25. **Weisel JW.** Fibrinogen and fibrin. *Adv Protein Chem;* 1984; 70 (04): 247–99.
26. **Wagner M.** Analysis of adsorbed proteins by static time-of-flight secondary ion mass spectrometry. *Appl Surf Sci.* 2004; 231-232: 366–76.
27. **Ryan E a, Mockros LF, Weisel JW, Lorand L.** Structural origins of fibrin clot rheology. *Biophys J.* 1999; 77 (5): 2813–26.
28. **Weisel JW, Nagaswami C.** Computer modeling of fibrin polymerization kinetics correlated with electron microscope and turbidity observations: clot structure and assembly are kinetically controlled. *Biophys J.* 1992; 63 (1): 111–28.
29. **Borrelli V, Sterpetti A V, Coluccia P, Randone B, Cavallaro A, Santoro D'Angelo L, et al.** Bimodal concentration-dependent effect of thrombin on endothelial cell proliferation and growth factor release in culture. *J Surg Res.* 2001; 100 (2): 154–60.
30. **Mozzati M, Martinasso G, Pol R, Polastri C, Cristiano A, Muzio G, et al.** The impact of plasma rich in growth factors on clinical and biological factors involved in healing processes after third molar extraction. *J Biomed Mater Res A.* 2010; 95 (3): 741–6.
31. **Anitua E, Prado R, Orive G.** Bilateral sinus elevation evaluating plasma rich in growth factors technology: a report of five cases. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2012; 14 (1): 51–60.