

# Enriquecimiento de injerto autólogo con concentrado de factores de crecimiento

ALBERTO CID CASTEULANI

*Grupo de Traumatología y Ortopedia, (GTO) SA  
Equipo de Trauma, Grupo Salud Ocupacional Integral (SOI). La Caja  
Buenos Aires*

## RESUMEN

**Introducción:** Debido a los cambios recientes en torno al tratamiento de las fracturas, en los últimos años se ha priorizado una combinación de métodos no sólo mecánicos sino también biológicos. En este estudio se evalúan los resultados de un tratamiento combinado mediante osteosíntesis y aplicación de injerto enriquecido con agregado plaquetario, con resultados alentadores.

**Materiales y métodos:** Nuestra serie comprendió 29 pacientes tratados entre 1999 y 2006, laboralmente activos, con una edad promedio de 42 años (rango, 26 a 62 años). En todos los casos se efectuó osteosíntesis con el agregado plaquetario rico en factores de crecimiento plaquetario. Los resultados se analizaron en función de la formación de callo fracturario a los 6 meses. La obtención de injerto esponjoso fue dificultosa en los pacientes reintervenidos.

**Resultados:** La obtención y preparación del agregado plaquetario no presentó inconvenientes. La consolidación clínica y radiológica se alcanzó en los 29 casos al término de 4 meses (2-6 meses); en 2 casos fue necesario repetir el procedimiento de aporte sin recambio del implante a los 2 meses de la primera intervención.

**Conclusiones:** El injerto autólogo enriquecido con plasma rico en factores de crecimiento pudo haber contribuido de manera favorable a la consolidación de estos casos complejos, con gran ausencia biológica, en los que habían fracasado otros métodos.

**PALABRAS CLAVE:** Fracturas óseas. Sustitutos óseos. Sustancias de crecimiento. Plaquetas. Seudoartrosis. Trasplante autólogo.

## AUTOLOGOUS GRAFT COMBINED WITH GROWTH-FACTORS CONCENTRATE

### ABSTRACT

**Background:** Due to the latest advances in orthopaedic trauma surgery it is now current practice to combine mechanical and biological techniques to enhance fracture healing. In this study we report the results of a series of patients with delayed or non-unions treated with osteosynthesis plus a growth factor-rich platelet concentrate. **Methods:** Twenty nine patients with delayed or non-union treated between 1999 and 2006 were prospectively included in the study. They were all working, and aged 26 to 62, average 42. All patients received a combination treatment of plate fixation and platelet aggregate gel. Follow-up measurements included callus formation at 6 months on plain radiographs.

**Results:** Gel preparation presented no problems. Callus formation was observed in all patients at an average of 4 months post-op (range 2 to 6). In 2 cases the addition of platelet concentrate was repeated at 2 months without changing the osteosynthesis.

**Conclusions:** We believe that in our series the use of platelet aggregate may have helped to achieve union, especially given the complex nature of the cases where other procedures had previously failed.

**KEY WORDS:** Fractures. Bone substitutes. Growth substances. Blood platelets. Non-united fractures. Autologous transplantation.

## Introducción

En los últimos años se asistió a un avance sin precedentes en el campo de los sustitutos óseos y la osteobiología.<sup>9,15</sup> La aparición simultánea de matrices sintéticas, factores quimiotácticos, y productos celulares y subcelulares, con el apoyo de investigaciones en animales e *in vi-*

Recibido el 08-08-2006. Aceptado luego de la evaluación 21-11-2007.  
Correspondencia:

Dr. ALBERTO CID CASTEULANI  
cidcasteulani@yahoo.com

tro ha modificado muchas de las conductas quirúrgicas tradicionales.<sup>9,18,29</sup> Estos grandes adelantos dieron como fruto injertos biológicos para ser utilizados en cirugía ortopédica y traumatológica.<sup>3,8,15</sup>

El injerto de hueso esponjoso de cresta ilíaca es el estándar frente al cual se comparan todos los otros métodos de injerto.<sup>6,15</sup> Provee células, matriz ósea y proteína morfogenética ósea; además es osteogénico, osteoinductor y osteoconductor.

En la última década, los implantes, en sus más variadas expresiones, han evolucionado de la mano de las nuevas tecnologías industriales, pasando de los sistemas rígidos convencionales a los elásticos o flexibles y hasta los actuales sistemas bloqueados.<sup>13,17</sup> En algunos casos complejos, como la pseudoartrosis, la estabilización mecánica o el agregado de injerto óseo esponjoso es a veces insuficiente para estimular la consolidación luego de la reconstrucción quirúrgica. En estas situaciones, el enriquecimiento del injerto con factores plaquetarios podría potenciar la capacidad osteoinductora del injerto y mejorar su capacidad de adherencia y reparación.<sup>11,17,18,28</sup> Si bien estos factores de crecimiento son uno de los productos osteobiológicos más utilizados y su capacidad de estímulo parece intuitiva, existe aún confusión en relación con su eficacia.<sup>2,4,10,14,21,24</sup>

El objetivo de este trabajo es presentar los resultados de tratamiento de una serie de pacientes con retardos de consolidación y pseudoartrosis de los miembros tratados con osteosíntesis y con el método de enriquecimiento de injerto óseo esponjoso con concentrado de plaquetas rico en factores de crecimiento.

## Materiales y métodos

Se evaluaron 29 pacientes hasta el alta definitiva en un sistema cerrado de atención, de 36 tratados hasta la fecha con diagnóstico de retardo de consolidación o pseudoartrosis, secuela de politraumatismos entre los años 1999 y 2006 en forma consecutiva. Siete pacientes excluidos aún continúan en tratamiento.

La edad promedio fue de 42 años (rango, 26 a 62). La serie se conformó con 5 mujeres y 24 varones laboralmente activos.

De los 29 pacientes, 9 presentaban signos activos de infección y continuaron el tratamiento específico acorde con los cultivos en cada caso.

Todos los pacientes habían recibido al menos dos cirugías antes de la consulta (2-14; promedio 4) incluida la obtención de injerto esponjoso de cresta ilíaca en reiteradas oportunidades, lo que dificultó la posibilidad de obtener una cantidad sustancial de hueso para aportar durante la cirugía final de reconstrucción. Las lesiones comprendieron: 9 tibia distal, 4 diáfisis tibial, 4 diáfisis del húmero, 2 húmero distal, 1 clavícula, 1 astrágalo, 2 fémur proximal, 4 diáfisis femoral y 2 fémur distal. Todas las lesiones eran clínicamente inestables y dolorosas en el momento de la consulta, por lo que se decidió su resolución quirúrgica mediante la estabilización y el aporte de injerto óseo esponjoso enriquecido con gel plaquetario rico en factores de crecimiento, luego de una preparación exhaustiva del foco.

## Preparación del injerto

El hueso esponjoso fue obtenido de las crestas ilíacas anteriores en 16 casos, en 11 casos de las crestas ilíacas posteriores y en 2, del cóndilo femoral lateral de acuerdo con las técnicas convencionales. El hueso fue procesado para eliminar las corticales y los tejidos blandos, para luego triturarlo en un mortero hasta lograr un microgranulado o una consistencia pastosa. Se lo mantuvo seco y tapado en la mesa de instrumentación.

## Preparación del concentrado de factores

Se obtienen de 60 a 100 cm<sup>3</sup> de sangre venosa periférica antes de la inducción anestésica en condiciones estériles en 8 a 12 tubos de ensayo de 5 cm<sup>3</sup> con tapa guardados en sobres plásticos (*pauchs*) con medio anticoagulante en su interior. La cantidad por extraer depende del tamaño del defecto. Los tubos con sangre se colocan dentro de un equipo de centrifuga durante 7 minutos a 1.400 rpm. Es importante no excederse en la velocidad para evitar la hemólisis. Luego del centrifugado los tubos presentan tres interfaces: región roja (gruesa), región blanca (fina) y sobrenadante plasmático (Fig. 1).

La capa de suero "rico" en factores de crecimiento plaquetario se ubica en la zona inferior de la región de suero, cerca de la región blanca. Mediante la utilización de una gradilla y pipetas estériles se transfiere la región de suero a una serie de otros 4 tubos estériles a 37 °C en un baño térmico.

La secuencia serial de extracciones es:

Con una pipeta de 500  $\mu$ l se obtienen las primeras capas de plasma que se colocan en el tubo 1, las segundas capas se colocan en el tubo 2 y así sucesivamente.

Al aproximarse a la región de plasma con mayor concentración de factores de crecimiento se utiliza una pipeta de 100  $\mu$ l y luego una de 50  $\mu$ l para reducir la posibilidad de aspirar leucocitos.

Al concluir la aspiración del suero se obtienen los últimos tubos con mayor concentrado de factores y los primeros tubos con menor proporción.

En el momento de agregar el concentrado de factores al hueso esponjoso, se adicionan privilegiando aquellos con mayores concentraciones.



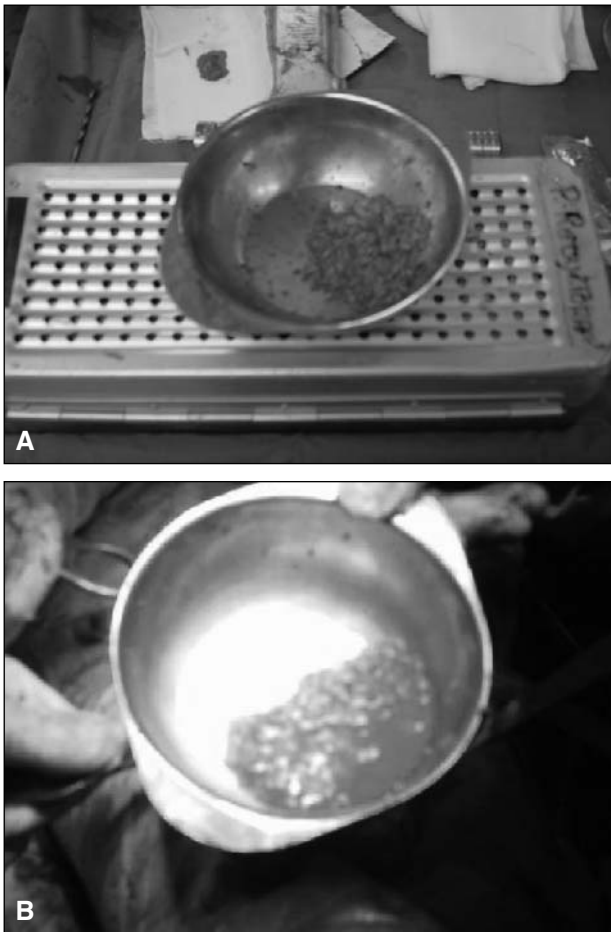
**Figura 1.** Separación con pipetas automáticas de las diferentes capas de plasma.

Si fuera necesario se utiliza el contenido del resto de los tubos o si sobran se colocan en las partes blandas adyacentes a fin de mejorar su cicatrización, como se realiza en el caso de úlceras y escaras, cuyo análisis escapa al propósito de esta presentación.

Ya listo el centrifugado plaquetario y una vez finalizado el tiempo de preparación del foco y la colocación del implante, se realiza la activación agregando 50  $\mu$ l de cloruro de calcio (CaCl) al 10% v/v por cada  $\text{cm}^3$  de centrifugado plaquetario a fin de activar la cascada de la coagulación del preparado.

El gel obtenido se adiciona al hueso esponjoso granulado o molido, con lo que se obtiene una masa de consistencia pastosa, gelatinosa, similar a la carne molida (Fig. 2). Este injerto esponjoso enriquecido puede ser luego manipulado y moldeado en la región por tratar dada su increíble adhesividad, a tal punto que puede tomarse con una pinza (Fig. 3) o inyectarse en forma líquida percutánea en el foco, según el tiempo transcurrido, la temperatura ambiente del quirófano y el baño térmico.

El objetivo final es “detener la cascada de la coagulación y volverla a activar en el momento de necesitarla” para su colocación, con la consistencia adecuada en cada caso.



**Figura 2.** A. Injerto esponjoso molido seco. B. Preparado obtenido luego del agregado del plasma rico en factores de crecimiento. Obsérvese la consistencia (gel).

## Seguimiento

Los pacientes fueron seguidos mensualmente hasta la consolidación, la cual se determinó en forma clínica por la ausencia de dolor, apoyo y carga total, y en forma radiológica en función de la aparición del callo óseo (muchas veces exuberante) en al menos tres de las cuatro corticales en las radiografías simples a los 6 meses de seguimiento.

## Resultados

La estabilización mecánica se logró mediante la utilización de 18 placas LC-DCP, 9 LCP bloqueadas y 2 DCP convencionales.

Luego de los procedimientos de centrifugado y concentrado se observó que en 9 casos no se obtuvo la gelificación sino un preparado de consistencia líquida. Esto pudo deberse a fallas en la activación del preparado.



**Figura 3.** Adherencia y solidez final del preparado.

Su estado gel tiene una dependencia con la temperatura (en este caso, la misma que la temperatura ambiente) y esto dificultaba calcular el volumen exacto de CaCl que se debía añadir. En algunos casos debió recurrirse a un baño térmico para incrementar la temperatura del preparado y, con la cantidad correcta de ClCa conseguir su activación y el estado gel requerido.

Las dos veces que el excedente fue analizado en nuestro laboratorio los resultados bioquímicos dieron un concentrado entre 4 a 6 veces el normal plaquetario para sangre periférica.

Bajo nuestra supervisión 4 casos fueron realizados por el servicio de hemoterapia, 22 por el laboratorio y 3 por el mismo equipo quirúrgico. En todos los casos se obtuvo el consentimiento por parte de los pacientes, quienes se mostraron satisfechos con la naturaleza "autóloga" del procedimiento.

Se observó una complicación inherente al implante y a la carga precoz, el cual debió ser recambiado.

En ningún caso se utilizaron sustitutos óseos ni cerámicas; sólo cemento óseo con antibióticos en 4 de los 9 casos infectados a manera de espera hasta obtener los resultados de nuevos cultivos y de la anatomía patológica.

En 2 casos en los que no se observó la presencia del callo esperado a los 2 meses del primer injerto, se repitió la aplicación en forma percutánea.

En el seguimiento se observó la sólida formación de callo óseo en un tiempo promedio de 4 meses (rango, 2 a 6 meses) en todos los casos tratados, incluso exuberante en muchos de ellos (Fig. 4).

Todos los pacientes cumplieron con el objetivo de la consolidación, fueron recalificados laboralmente y un 69% volvió a su labor habitual, mientras que un 31% cambió de puesto de trabajo.

## Discusión

Alrededor del 5% al 10% de las fracturas no consolidan luego de un intento de tratamiento.<sup>11,17,16</sup> Las causas de este fenómeno son multifactoriales, y a pesar de que se han modificado las técnicas quirúrgicas y la tecnología de los implantes, la tasa de pseudoartrosis continúa siendo elevada.<sup>11,17,18,28</sup>

El momento de actuar para solucionar el problema sigue siendo un punto de controversia. Los tiempos clásicos en relación con la consolidación de las fracturas señalan 3 meses para los casos de retardo de consolidación y 6 meses para los de pseudoartrosis.<sup>13,17,18</sup> Siguiendo este lineamiento se deberían esperar 6 meses para intervenir cuando la consolidación no es evidente o suficiente.<sup>6,17,18,29</sup> Esto contrasta con las necesidades actuales de la población, que pretende y necesita una rápida reinscripción productiva luego del traumatismo.<sup>12,17</sup> Aunque las maneras de intervenir suelen requerir cirugía, muchas veces no está

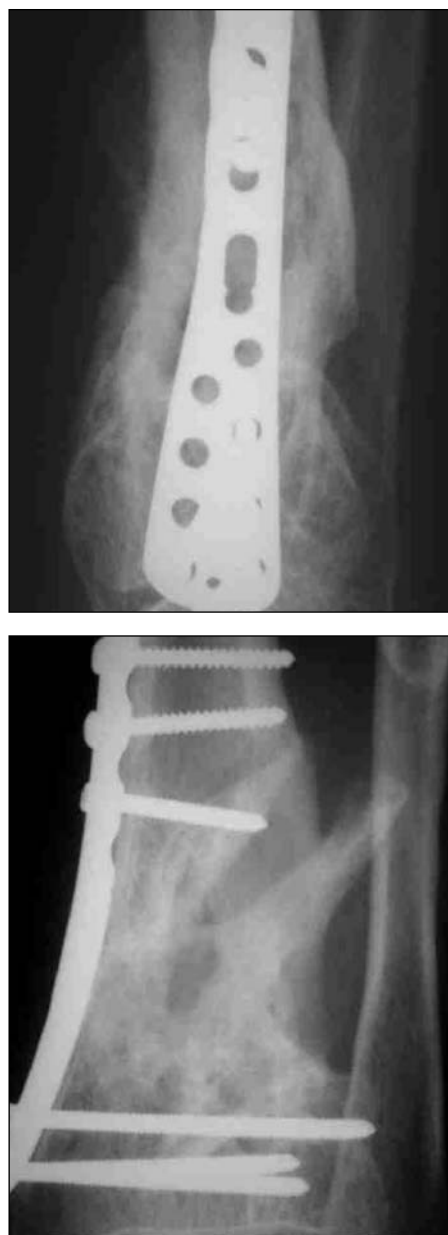


Figura 4. Callo exuberante.

claro qué procedimiento efectuar, más aún cuando se agotaron las técnicas.

En el campo de la pseudoartrosis es importante restaurar la estabilidad mecánica y las condiciones biológicas para lograr la consolidación.<sup>5,11,29</sup> Si bien las técnicas actuales permiten restaurar las condiciones mecánicas, existe controversia sobre cómo corregir la disfunción biológica.

El estándar de oro hasta ahora era el injerto autólogo de cresta ilíaca.<sup>3,8,15</sup> Esto es un problema, ya que los procedimientos de obtención de injerto autólogo están asociados con una morbilidad del 10% a 30%.<sup>8,15,26</sup>

Otra opción es la utilización de proteínas morfogenéticas óseas. En este caso, el costo se torna prohibitivo y sería un tratamiento sólo para algunos pacientes privilegiados.

La utilización de factores de crecimiento se ha popularizado en los últimos años en múltiples especialidades médicas debido a su potencial regenerador de estimulación biológica.<sup>10,14,16,19-21</sup>

Diversos informes histológicos adjudican a estos concentrados proteicos un aumento de la cicatrización y varios efectos a nivel celular: favorecen la quimiotaxis, tienen un efecto mitogénico y de reproducción celular, y aceleran la matriz extracelular.<sup>2,4,7,10,14,16,19-21</sup>

Los componentes del concentrado de factores de crecimiento plasmático son:

### ***PDGF (Platelet derived growth factor)***

Encontrados por primera vez en los gránulos alfa de las plaquetas, también pueden hallarse en otras células, como macrófagos, células endoteliales y fibroblastos, y en la matriz ósea.

El PDGF es un polipéptido termoestable con un peso molecular de 30.000 daltons (Da). Tiene dos cadenas de aminoácidos denominadas A y B; ambas isoformas ejercen su actividad en las células objetivo ligándose a dos receptores de la proteína tirosinasa. Ambos receptores alfa y beta inducen una respuesta mitogénica. La migración selectiva hacia determinadas células o migración quimiotáctica de los precursores de los osteoblastos es una de las fases de la formación ósea.

Estos factores favorecen la angiogénesis a través de la activación de los macrófagos mediante la inducción de la formación de nuevos capilares por parte de las células endoteliales. También se ha demostrado que aumentan la tasa de proliferación de las células progenitoras (*stem*).<sup>5,15,22,25,31</sup>

### ***TGF-β (Transforming growth factor-β)***

El nombre de esta proteína se debe a que fue hallada por primera vez en tejidos transformados. Se origina en la proteólisis extracelular de un precursor formado por 391 aminoácidos. Su peso molecular es de 25.000 daltons.

Este factor tiene tres estructuras diferentes: TGF-β 1, TGF-β 2, TGF-β 3. La β1 se encuentra en grandes cantidades en las plaquetas, linfocitos y neutrófilos. Estos factores favorecen la formación de hueso aumentando la tasa de proliferación de las células progenitoras (*stem*).

Otro papel es la inhibición de la formación de osteoblastos y, por lo tanto, de la resorción ósea.<sup>23,24</sup>

### ***FGF (Factor de crecimiento fibroblástico)***

Son polipéptidos encargados de controlar la proliferación y la diferenciación. Sus acciones biológicas se basan en estimular la angiogénesis por un mecanismo directo al estimular la mitosis y migración de las células endoteliales.<sup>23,24</sup>

### ***IGF (Factor de crecimiento semejante a la insulina)***

Son proteínas séricas con una estructura similar en un 50% a la insulina.

Existen dos tipos y la mayor proporción de ellos se encuentran en el hígado. Sus acciones biológicas son su capacidad de estimular la síntesis de matriz ósea y su función diferenciadora de los osteoblastos.<sup>7,10,14,16</sup>

Las propiedades individuales de estos factores y la facilidad de obtención del suero rico en plaquetas hacen factible y atractiva la utilización del enriquecido. La cantidad de sangre por extraer depende de la magnitud y el tipo de defecto.

Como regla general, 5 cm<sup>3</sup> de sangre pueden generar unos 0,5 cm<sup>3</sup> de plasma rico en factores, ideal para su utilización como injerto (4 veces más plaquetas para un volumen comparable de sangre).<sup>1,2</sup>

El suero que se elimina de las capas superficiales de los tubos tiene un número de plaquetas similar al de la sangre periférica y se utiliza con frecuencia para mejorar el patrón de cicatrización de las partes blandas.<sup>5,23,24</sup> Así, en nuestra serie, las cantidades de sangre variaron entre 80 cm<sup>3</sup> para un pseudoartrosis del fémur y 20 cm<sup>3</sup> en un caso de pseudoartrosis del astrágalo, con un promedio de 50 cm<sup>3</sup>.

El enriquecimiento del foco de pseudoartrosis es un método complementario a la estabilización. Si bien es cierto que en algunos casos la sola estabilidad puede lograr la consolidación, todos los pacientes de nuestra serie estaban previamente operados con restitución de la estabilidad mecánica y hubo fallas en el primer intento de consolidación. Entendemos que a pesar de haber restablecido la estabilidad, el agregado de injerto pudo haber contribuido a la consolidación obtenida. La utilización de agregados plaquetarios como método de enriquecimiento del foco de pseudoartrosis, ya sea solos o con agregado de injerto molidos, es una opción económicamente viable en nuestro país. Esto es válido sobre todo cuando se requiere modificar la osteosíntesis con apertura del foco.

Todos los casos analizados fueron estabilizados con placas; se excluyeron de esta serie los retardos y las pseudoartrosis especialmente diafisarias tratadas con clavos endomedulares, y las hipertróficas en las que preferimos la técnica de múltiples fresados como aporte, cultivos y nuevo enclavado. En alguna medida esto acotó las variaciones interprocedimiento e hizo más valioso el análisis de nuestra serie.

## **Conclusiones**

Es posible crear agregado de factores de crecimiento plaquetario sin inconvenientes mayores y con un costo razonable. Creemos que en nuestra serie el injerto autólogo enriquecido contribuyó a lograr la consolidación en casos complejos, junto con una estabilización adecuada.



Consideramos que esta técnica complementaria o de aumentación no sustituye ni reemplaza a otras y debe acompañarse por un tratamiento adecuado del foco (de-corticación, recanalización, resección, perforaciones, avivamiento, etc.).

La preferencia en retardos diafisarios hipertróficos sigue siendo el fresado y nuevo enclavado endomedular.

El tiempo promedio de consolidación luego de las cirugías fue corto (3,9 meses). En varias oportunidades encontramos callos osteogénicos exuberantes, que en algunas regiones de escasa cobertura pudieron resultar notablemente palpables.

El tiempo total de preparación es de 15 a 20 minutos intraquirófono, se realiza en el mismo acto quirúrgico y bajo las mismas normas de asepsia y bioseguridad. Es repe-

tible y reproducible con bajo costo. Es una técnica absolutamente "autóloga", no utiliza hemoderivados, congelados ni conservantes que puedan provocar el mínimo efecto antigénico o de rechazo. Tampoco necesita trombina bovina.

Podemos recomendar su utilización en casos difíciles de pseudoartrosis, en pacientes polioperados o en aquellos en que la extracción de un injerto autólogo está disminuida u agotada. La morbilidad en el paciente es menor, teniendo en cuenta los antecedentes de múltiples procedimientos fallidos. Asimismo, se reduce el dolor en el sitio de toma del injerto.

Las posibilidades de complicaciones y de contagio son mínimas, similares a las de cualquier cirugía reconstructiva, dado que se utiliza la propia sangre del paciente.



**Figura 5. Caso 1.** Diafisectomía parcial con colocación de clavo endomedular con espaciador de cemento con antibióticos más agregado de injerto enriquecido con factores de crecimiento plaquetario y osteosíntesis final con placa larga LCP bloqueada. Consolidación final con callo exuberante. **A.** Frente. **B.** Perfil.



**Figura 6. Caso 2. A-E.** Clavo endomedular retrógrado de 8 meses de evolución con dolor e inestabilidad. **F.** Complementación con placa de sostén condíleo larga MIPO e injerto autólogo enriquecido con factores de crecimiento plaquetario. **G y H.** Consolidación final con resultado funcional posterior a la extracción de los implantes.



**Figura 7. Caso 3. A-G.** Fractura expuesta en la tibia distal de 5 meses de evolución tratada con fijador externo monolateral en colocación no convencional, placa LCP bloqueada e injerto autólogo con factores de crecimiento.

### Bibliografía

1. **Anitua E.** Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1999;14(4):529-35.
2. **Anitua E.** The use of plasma-rich growth factors (PRGF) in oral surgery. *Pract Proced Aesthet Dent.* 2001;13(6):487-93; quiz 487-93.
3. **Arbes H, Bosch P, Lintner F, Salzer M.** First clinical experience with heterologous cancellous bone grafting combined with the fibrin adhesive system (F.A.S.). *Arch Orthop Trauma Surg.* 1981;98(3):183-8.



4. **Barnes GL, Kostenuik PJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA.** Growth factor regulation of fracture repair. *J Bone Miner Res.* 1999;14(11):1805-15.
5. **Bick RL.** Acquired platelet function defects. *Hematol Oncol Clin North Am.* 1992;6(6):1203-28.
6. **Bostrom MP, Camacho NP.** Potential role of bone morphogenetic proteins in fracture healing. *Clin Orthop Relat Res.* 1998 (355 Suppl):S274-82.
7. **Bourque WT, Gross M, Hall BK.** Expression of four growth factors during fracture repair. *Int J Dev Biol.* 1993;37(4):573-9.
8. **Cook SD, Wolfe MW, Salkeld SL, Rueger DC.** Effect of recombinant human osteogenic protein-1 on healing of segmental defects in non-human primates. *J Bone Joint Surg Am.* 1995;77(5):734-50.
9. **Cornell CN.** Osteoconductive materials and their role as substitutes for autogenous bone grafts. *Orthop Clin North Am.* 1999; 30(4):591-8.
10. **Deng C, Wynshaw-Boris A, Zhou F, Kuo A, Leder P.** Fibroblast growth factor receptor 3 is a negative regulator of bone growth. *Cell.* 1996;84(6):911-21.
11. **Jupiter JB.** Complex non-union of the humeral diaphysis. Treatment with a medial approach, an anterior plate, and a vascularized fibular graft. *J Bone Joint Surg Am.* 1990;72(5):701-7.
12. **Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA.** 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. **Lind M.** Growth factor stimulation of bone healing. Effects on osteoblasts, osteomies, and implants fixation. *Acta Orthop Scand Suppl.* 1998;283:2-37.
14. **Linkhart TA, Mohan S, Baylink DJ.** Growth factors for bone growth and repair: IGF, TGF beta and BMP. *Bone.* 1996;19 (1 Suppl):1S-12S.
15. **Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR.** Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998;85(6):638-46.
16. **Miyazono K, Ten Dijke P, Ichijo H, Heldin CH.** Receptors for transforming growth factor-beta. *Adv Immunol.* 1994;55:181-220.
17. **Perren SM.** Evolution of the internal fixation of long bone fractures. The scientific basis of biological internal fixation: choosing a new balance between stability and biology. *J Bone Joint Surg Br.* 2002;84(8):1093-110.
18. **Praemer A, Furner S, Rice DP.** *Musculoskeletal conditions in the United States.* Park Ridge, IL: American Academy of Orthopaedic Surgeons;1992.
19. **Raines EW, Ross R.** Platelet-derived growth factor. I. High yield purification and evidence for multiple forms. *J Biol Chem.* 1982;257(9):5154-60.
20. **Roberts AB, Sporn MB.** Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Growth Factors.* 1993;8(1):1-9.
21. **Rosier RN, O'Keefe RJ, Hicks DG.** The potential role of transforming growth factor beta in fracture healing. *Clin Orthop Relat Res.* 1998(355 Suppl):S294-300.
22. **Serrano Cuenca V, Casas Hernández A.** Factores de crecimiento: ¿un nuevo enfoque terapéutico? *Periodoncia.* 1997;7(2):99-115.
23. **Slater M, Patava J, Kingham K, Mason RS.** Involvement of platelets in stimulating osteogenic activity. *J Orthop Res.* 1995; 13(5):655-63.
24. **Tayapongsak P, O'Brien DA, Monteiro CB, Arceo-Diaz LY.** Autologous fibrin adhesive in mandibular reconstruction with particulate cancellous bone and marrow. *J Oral Maxillofac Surg.* 1994;52(2):161-5; discussion 166.
25. **Trippel SB, Coutts RD, Einhorn TA, Mundy GR, Rosenfeld RG.** Instructional Course Lectures, The American Academy of Orthopaedic Surgeons - Growth Factors as Therapeutic Agents. *J Bone Joint Surg Am.* 1996;78(8):1272-86.
26. **Urist MR.** Bone: formation by autoinduction. *Science.* 1965;150(698):893-9.
27. **Weiland AJ, Moore JR, Hotchkiss RN.** Soft tissue procedures for reconstruction of tibial shaft fractures. *Clin Orthop Relat Res.* 1983(178):42-53.
28. **Whitman DH, Berry RL, Green DM.** Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg.* 1997;55(11):1294-9.
29. **Yasko AW, Lane JM, Fellingner EJ, Rosen V, Wozney JM, Wang EA.** The healing of segmental bone defects, induced by recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP-2). A radiographic, histological, and biomechanical study in rats. *J Bone Joint Surg Am.* 1992;74(5):659-70.
30. **Zucker MB, Borrelli J.** Reversible alterations in platelet morphology produced by anticoagulants and by cold. *Blood.* 1954;9 (6):602-8.