



IL CONCENTRATO PIASTRINICO IN CHIRURGIA ORALE E IMPLANTARE

Maria Cristina Sacchi, Marco Bellanda, Tomaso Vercellotti

RIASSUNTO: *Scopo di questo lavoro è quello di dimostrare che, grazie a una metodica rapida, economica e di facile esecuzione, è possibile preparare in ambulatorio a partire da piccole quantità di sangue intero (50-60 ml) un concentrato piastrinico (PC), ottenuto da plasma ricco di piastrine (PRP), ampiamente utilizzabile nella chirurgia orale e implantare, secondo l'impiego clinico proposto da Marx et al. negli innesti di osso autogeno. L'applicazione di questo protocollo comporta una scarsa morbidità per il paziente e un uso più estensivo dei fattori di crescita (PDGF, TNF- β , IGF).*

PAROLE CHIAVE: *chirurgia implantare, concentrato piastrinico, fattori di crescita (PDGF, TNF- β , IGF), morbidità, plasma ricco di piastrine*

SUMMARY: *A Novel Laboratory Technique to Prepare the Platelet Concentrate The purpose of this study is to demonstrate that with a rapid and easy technique is possible to prepare in office, from a small quantity of whole blood (40-50 ml), a platelet concentrate (PC), obtained from a platelet rich plasma (PRP), which can be used in oral and implant surgery to increase bone regeneration, as well as recently proposed by Marx et al. The employment of this protocol is characterized by a less morbidity for the patient and by a more extensive use of growth factors (PDGF, TNF- β , IGF).*

KEY WORDS: *bone regeneration, growth factors, implant and dental surgery, morbidity, platelet concentrate, platelet rich plasma*

Negli ultimi anni, la tecnologia per separare le cellule del sangue è diventata finalmente accessibile ai clinici. Infatti, sono ora disponibili strumenti che permettono di isolare e concentrare, in un ambiente completamente sterile e per un uso clinico immediato, i vari componenti del sangue intero, incluse le piastrine. Pertanto, dal sangue in toto è possibile separare plasma, crioprecipitato e concentrati piastrinici¹.

Al momento, il concentrato piastrinico (PC) può essere preparato sia processando unità di sangue intero

sia usando un separatore cellulare^{1,2}. Le piastrine vengono così concentrate in un piccolo volume di plasma allo scopo di ottenere un plasma ricco di piastrine (PRP), una fonte autologa di fattori di crescita come PDGF (*platelet-derived growth factor*)³⁻⁷, IGF (*insulin-like growth factor*)⁸⁻¹¹ e TNF- β (*transforming growth factor*)¹²⁻¹⁴.

Marx et al.^{5,6} hanno recentemente dimostrato che l'uso di PRP rappresenta una delle possibili strategie per poter modulare e accelerare il processo di guarigione delle ferite^{15,16}. La tecnica è caratterizzata dall'iso-

lamento e dalla sedimentazione delle piastrine e, di conseguenza, dalla concentrazione dei numerosi fattori di crescita che esse contengono nei loro granuli^{7,17,18}.

Questa metodica, attualmente molto semplificata, ha come obiettivo quello di amplificare e potenziare gli effetti dei fattori di crescita contenuti nelle piastrine che, come è noto, sono gli iniziatori delle guarigioni di quasi tutte le ferite^{5,10,19}.

In conclusione, il PRP autologo, che non è tossico né immunoreattivo, favorito nell'esplicare la sua funzione sia dalla presenza di processi di ri-

generazione fisiologica sia da tutti i fattori di crescita noti e finora identificati nelle piastrine, accelera le vie metaboliche coinvolte nelle fasi di guarigione.

Dati di letteratura^{5,6} hanno dimostrato che, quando il calcio e la trombina vengono aggiunti al PRP, le piastrine si attivano e possono così rilasciare il contenuto dei loro α -granuli, che includono PDGF²⁰ e TGF- β ²¹⁻²³.

Nello stesso tempo, la trombina e il calcio iniziano il processo di coagulazione, caratterizzato dalla conversione del fibrinogeno in fibrina, che risulta nella formazione di un gel di PRP clinicamente utile per migliorare la manipolazione e l'efficacia di particolari innesti di osso autologo o di sostituti^{9,20,24}.

Recentemente, il gruppo di Marx⁵ ha dimostrato che, usando la tecnica che prevede l'impiego di PRP, le concentrazioni piastriniche possono essere aumentate da una media di 232.000 a 785.000.

In uno studio clinico e analitico, sempre il gruppo di Marx ha effettivamente confermato la presenza di PDGF e TNF- β nel gel piastrinico (formato dall'aggiunta di trombina e cloruro di calcio (CaCl) al PRP) ma, soprattutto, ha verificato che sulla superficie delle cellule trovate all'interno dell'osso spugnoso sono presenti i recettori per PDGF e TNF- β ^{21,22,25}. Inoltre, 88 pazienti sottoposti a chirurgia ricostruttiva sono stati trattati con innesti autologhi di cresta iliaca, utilizzati sia da soli sia in combinazione con gel piastrinico. I risultati di questo lavoro hanno evidenziato, da un lato, un aumento del tasso di velocità di formazione dell'osso e, dall'altro, della densità di

quest'ultimo (valutata clinicamente, radiograficamente e istologicamente) quando veniva impiegata la miscela di innesto osseo autologo con PRP/gel piastrinico piuttosto che l'uso di soli innesti di cresta iliaca autologa.

Il PRP/gel piastrinico viene anche usato per trattare difetti parodontali e perimplantari. In questi casi il PRP/gel piastrinico è preparato secondo il metodo di Marx^{5,6} e Hannon (comunicazione personale), in base al quale il PRP viene ottenuto da sangue autologo con un separatore cellulare (*Electromedics 500*, Medtronic) che, sfruttando un gradiente di densità, può raccogliere e concentrare le piastrine durante l'intervento senza interferire con la procedura chirurgica in corso o rallentandola. La raccolta di PRP viene effettuata in 20-30 minuti da un tecnico specializzato o da un infermiere qualificato; in ogni caso è necessaria la presenza di personale dedicato.

Il separatore cellulare preleva da 400 a 500 ml di sangue intero autologo mediante un catetere centrale venoso inserito durante l'intervento.

Il separatore cellulare raccoglie 50 ml di sangue al minuto, usando una velocità di centrifugazione di 5600 rpm. Non appena il sangue è stato raccolto, si aggiunge come anticoagulante acido citrico-destrosio.

Una volta che il sangue è stato centrifugato, esso viene separato, in base alla densità, nei suoi tre componenti di base.

Il plasma povero di piastrine (PPP) esce per primo, il PRP (talvolta anche denominato *buffy coat*) esce per secondo e, infine, lo strato più denso di globuli rossi (RBC) esce per ul-

timo. Il PPP non è altro che plasma privo di cellule; ha un volume di circa 200 ml e viene reinfuso al paziente. Il componente RBC, costituito essenzialmente da cellule rosse impacchettate, ha un volume di circa 180 ml e, come il PPP, viene restituito al paziente. Il PRP è plasma ricco di piastrine con globuli bianchi e ha un volume di circa 70 ml. PPP e PRP sono frazioni del plasma, quindi contengono abbondante fibrinogeno e fattori della coagulazione. La formazione della fibrina, sebbene non costituisca un fattore di crescita, fornisce la naturale matrice osteoconduttiva necessaria nel processo di rigenerazione ossea²⁴. Durante la centrifugazione a 5400 rpm il PPP viene separato per primo. Una volta che il PPP è stato raccolto, la velocità di centrifugazione viene abbassata a 2400 rpm per determinare una netta e precisa separazione del PRP dalle cellule rosse del sangue.

Esperienze cliniche di Marx indicano che lo strato formato dai primi millilitri di RBC contiene le piastrine più grandi e quelle più giovani. Per questa ragione, tale strato viene incluso nel PRP.

Come si può ben capire, la metodica originale proposta da Marx non è attualmente realizzabile in un ambulatorio dentistico, in considerazione sia della quantità di sangue che deve essere prelevata al paziente sia della strumentazione e del personale specializzato necessario per la preparazione del PRP.

Sulla base di queste osservazioni, scopo di questo lavoro è quello di proporre una metodica facile e rapida che offra la possibilità di ottenere in ambulatorio un PRP/gel pia-

strinico con caratteristiche del tutto sovrapponibili a quelle del gel presentato da Marx et al.

La tecnica qui di seguito proposta permette di ottenere, in un tempo alquanto contenuto (da 10 minuti a un massimo di 45 minuti, a seconda dello schema di centrifugazione seguito), un concentrato piastrinico mediante due fasi di centrifugazione, il cui prodotto intermedio è PRP. Questo protocollo prevede come attrezzatura soltanto l'impiego di una piccola centrifuga, così facile da usare da non richiedere personale dedicato. Tuttavia, l'aspetto che appare più interessante e che, seppur nella nostra limitata esperienza sperimentale, rende operativamente realizzabile il protocollo di Marx è la contenuta quantità di sangue effettivamente necessaria per preparare il PRP/gel piastrinico: è, infatti, sufficiente prelevare al paziente 50-60 ml di sangue intero. Inoltre, dati preliminari sembrano indicare che la bassa morbilità di questa metodica, accompagnata dalla semplicità di esecuzione, possa rendere possibile un utilizzo routinario del PRP/PC quale fonte autologa di fattori di crescita elaborati dalle piastrine e, da dati di letteratura, indispensabili per accelerare i processi di rigenerazione ossea^{15,16,19,26}.

MATERIALI E METODI

Il concentrato piastrinico può essere preparato sia processando unità di sangue intero sia usando un separatore cellulare (figura 1).

60 ml di sangue venoso raccolto in 12 ml di sodio citrato (76 mg/2ml, Jacopo Monico), usato come anti-

coagulante, vengono prelevati al paziente secondo la procedura di routine e tenuti a temperatura ambiente per 30 minuti prima di iniziare la preparazione.

Il numero di piastrine viene valutato mediante un contatore di particelle automatico (*Advia 120*, Bayer, Milano, Italia). Inoltre, vengono allestiti sia strisci di sangue periferico sia citocentrifugati di plasma ricco di piastrine e di concentrato piastrinico, successivamente colorati con May Grunwald/Giemsa per effettuare una conta manuale.

PREPARAZIONE DEL PRP/PC

Attualmente, il PRP/PC viene preparato a partire da sangue intero, mediante due fasi di centrifugazione con la formazione di un prodotto intermedio che è plasma ricco di piastrine (PRP). Questo metodo permette di recuperare almeno il 70% delle piastrine presenti nel sangue intero. Il sangue venoso viene suddiviso in 4 provette e centrifugato (180 giri per 20 minuti).

Al termine della centrifugazione si ottengono due fasi: una scura, rappresentata da globuli rossi e globuli bianchi che precipitano al fondo della provetta, e una chiara, visibile nella parte superiore della provetta, costituita da plasma ricco di piastrine (PRP). Il PRP viene prelevato e trasferito, mediante una pipetta sterile, in un'altra provetta e centrifugato (580 giri per 20 minuti).

Grazie a questa centrifugazione, più veloce rispetto alla prima, è possibile ottenere la precipitazione delle piastrine al fondo della provetta, identificabili in un piccolo fondello denso detto *pellet*, e una parte liquida soprastante che altro non è che

plasma povero di piastrine (PPP) e che viene parzialmente eliminato.

Le provette vengono quindi rovesciate lasciando in ognuna 1,5 ml di PPP, necessario per risospendere il fondello di piastrine. Così facendo, dopo aver riunito le sospensioni di piastrine presenti in ognuna delle 4 provette, è possibile ottenere un concentrato piastrinico che avrà un volume finale di 6 ml. A questo punto, il concentrato piastrinico è pronto per essere attivato a formare il gel piastrinico (figura 2).

Dal momento che molti sono i fattori che possono interferire con la preparazione delle piastrine, è importante che ogni laboratorio stabilisca e controlli un proprio protocollo di centrifugazione, così da ottenere la massima resa in piastrine e il minimo contenuto in leucociti.

Il contenuto piastrinico viene calcolato in percentuale secondo la formula:

$$\frac{n. \text{ di piastrine nel PRP/PC} \times 100}{n. \text{ di piastrine nel sangue intero}} = \% \text{ di resa.}$$

PROCEDURA

PER LA PREPARAZIONE DEL GEL PIASTRINICO

La procedura implica l'utilizzo di PRP/PC autologo per formare gel piastrinico. Il PRP/PC può essere utilizzato da solo o mescolato con osso autologo. Il protocollo per la formazione del gel piastrinico da impiegarsi nella chirurgia implantare richiede PRP/PC, calcio cloruro 80 mM e botropase (batroxobina, Ravizza Farmaceutici Spa, Milano, Italia). La quantità di ogni componente necessaria per la formazione del gel dipende dal volume di coagulo piastrinico che si vuole usare

	CONCENTRATO PIASTRINICO PREPARATO DA BUFFY COAT		CONCENTRATO PIASTRINICO PREPARATO DA PLASMA RICCO DI PIASTRINE (PRP)	
Velocità della prima centrifugazione	Alta		Bassa	
	Componenti del sangue	Caratteristiche	Componenti del sangue	Caratteristiche
Strato superiore	Plasma povero di piastrine (PPP)	200-250 ml di plasma contenente la maggior parte di anticoagulante	Plasma ricco di piastrine (PRP)	200-250 ml di plasma contenente 70-90% di piastrine e 10% di globuli bianchi
Interfaccia plasma/cellule	Buffy coat	50 ml contenenti 10% di globuli rossi, 70% di globuli bianchi e 80% di piastrine		
Strato inferiore	Globuli rossi	160-180 ml di globuli rossi + 100 ml contenenti 30% di globuli bianchi	Globuli rossi	180-200 ml di globuli rossi + 100 ml contenenti 90% di globuli bianchi
Velocità della seconda centrifugazione	Bassa		Alta	
Strato superiore	Concentrato piastrinico (PC) da buffy coat	50 ml contenenti 50-60 x 10 ⁹ di piastrine	Plasma povero di piastrine	150-200 ml di plasma contenente la maggior parte di anticoagulante
Strato inferiore	Buffy coat povero di piastrine	10% di globuli rossi e 70% di globuli bianchi	Concentrato piastrinico da plasma ricco di piastrine	50 ml contenenti 50-70 x 10 ⁹ di piastrine

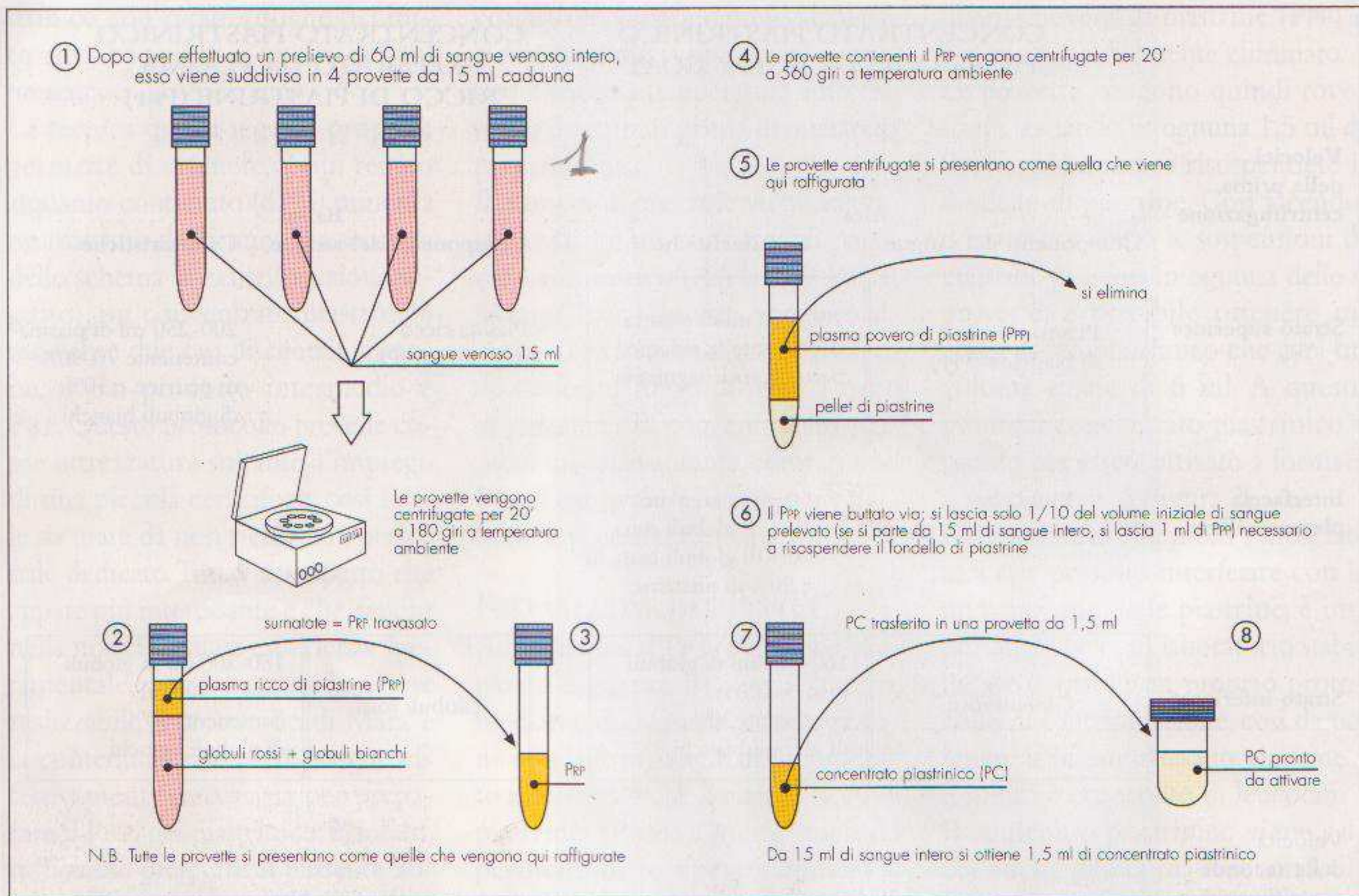
1 Descrizione delle principali caratteristiche delle due metodiche utilizzate per ottenere, rispettivamente, il concentrato piastrinico via buffy coat o il plasma ricco di piastrine. La figura mostra le condizioni di centrifugazione e i valori tipici che si possono ottenere da 450 ml di sangue raccolto in sacche contenenti 63 ml di sodio citrato usato come anticoagulante. 450 ml di sangue da donatore contengono 190-200 ml di globuli rossi, 60-65 g di emoglobina, 25-30 x 10⁸ di globuli bianchi, 10-12 x 10¹² di piastrine e 250 ml di plasma

per la rigenerazione ossea in quel particolare intervento; per esempio: 2 ml di PRP/PC, 1 ml di CaCl 80 mM e 1 ml di botropase sono suffi-

cienti, nella nostra seppur limitata esperienza, per ottenere la formazione di una quantità apprezzabile di gel piastrinico da utilizzare in

chirurgia orale, implantare e/o parodontale.

Questo particolare gel si sviluppa quando il PRP/PC e il miscuglio di



2 Metodo di preparazione del PRP/PC

calcio cloruro/botropase vengono uniti, simultaneamente, in un dappen. Dopo un'agitazione di circa 30 secondi, inizia il processo di coagulazione ed è così possibile ottenere il gel (figura 3).

RISULTATI

ANALISI DELLA CONTA PIASTRINICA

Le conte piastriniche basali e nel PRP/PC sono state eseguite su 7 pazienti mediante un sistema ematologico automatico (tabella 1). I valori ottenuti confermano la reale capacità della tecnica presentata in

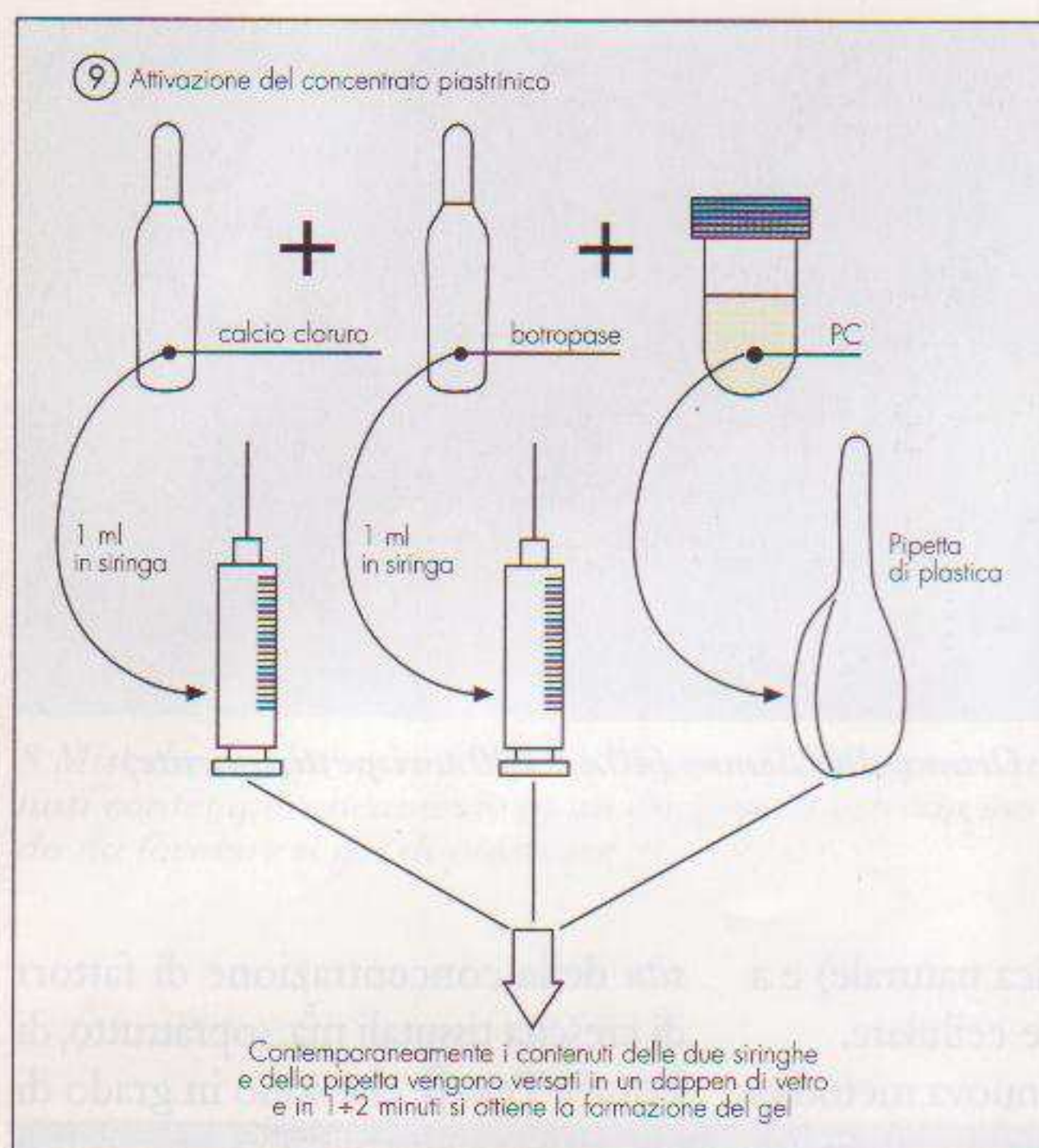
questo studio di isolare le piastrine ma, soprattutto, di determinare un incremento della concentrazione media nel PRP/PC del 357%, vale a dire un aumento, rispetto alla conta basale piastrinica, di almeno 3 volte.

ANALISI MORFOLOGICHE

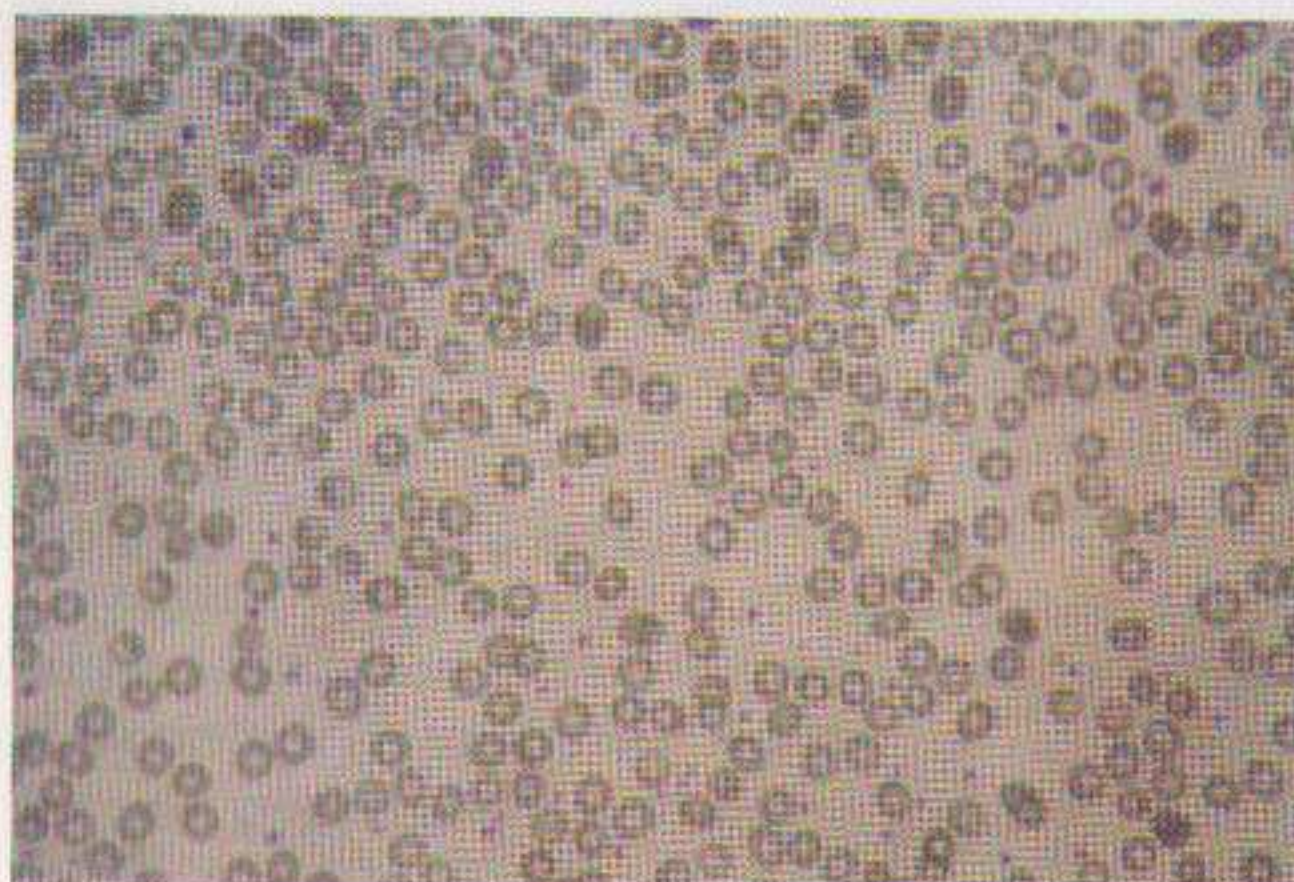
Un'ulteriore conferma dell'incremento della densità piastrinica nel PRP/PC è stata ottenuta dall'osservazione al microscopio ottico di strisci di sangue periferico (figura 4) e di citocentrifugati di PRP e PRP/PC (figure 5-7), allestiti a partire da sangue venoso dello stesso paziente e colorati con la colorazione May Grunwald/Giemsa. In par-

ticolare, viene confrontata la densità delle piastrine che si può ottenere in un citocentrifugato di PRP/PC (figura 5) con quella di un citocentrifugato di PRP (figure 6 e 7).

Come si può ben notare, il citocentrifugato allestito a partire da PRP/PC si presenta come un tappeto unico di piastrine; di contro, in quello allestito da PRP, seppur caratterizzato già da un elevato aumento della concentrazione delle piastrine, specialmente se paragonata a quella osservabile nello striscio di sangue periferico (figura 4), si ritrovano ancora degli spazi vuoti assolutamente inesistenti nel concentrato.



3 Procedura per la preparazione del gel piastrinico



4 Densità piastrinica in uno striscio di sangue periferico di donatore sano. Colorazione May Grunwald/Giemsa (40x)

APPLICAZIONI DEL GEL PIASTRINICO

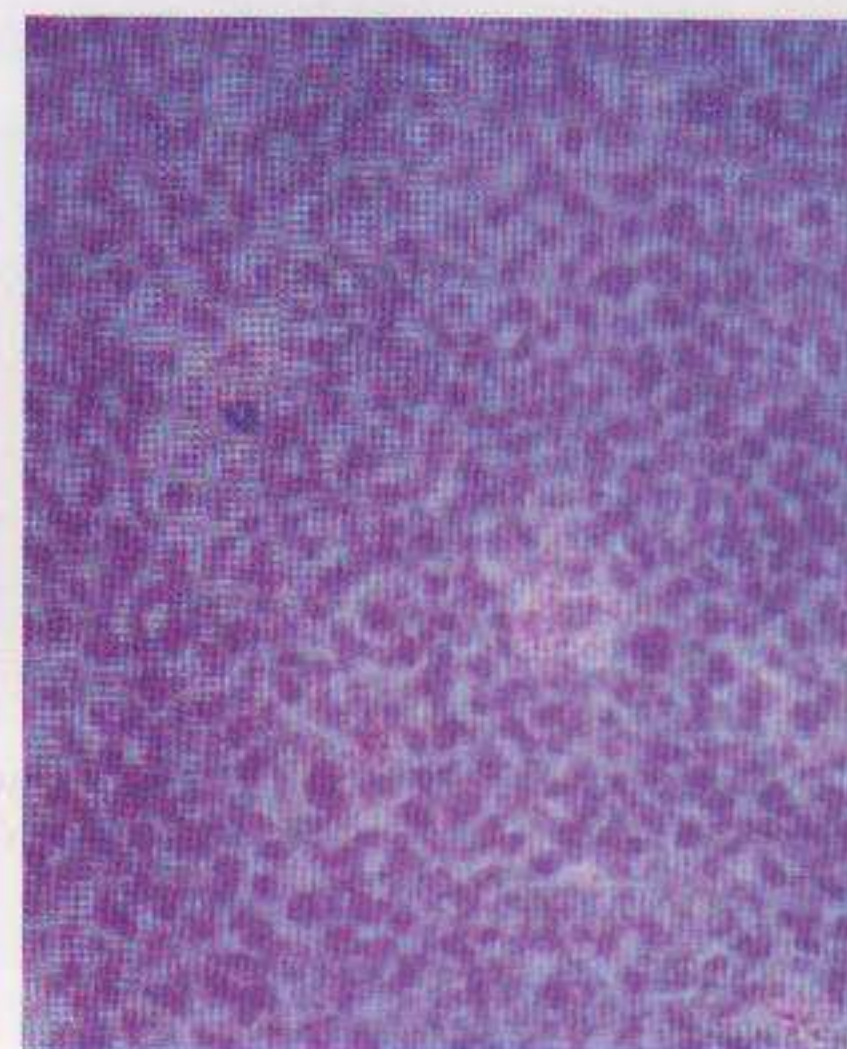
L'utilizzo clinico del PRP/PC negli innesti di osso autologo richiede un processo di coagulazione che inizia

quando viene utilizzata una miscela costituita da calcio cloruro 80 μ M mescolato con botropase. Il gel piastrinico si forma nell'arco di qualche secondo dopo l'aggiunta della

CONTA DELLE PIASTRINE

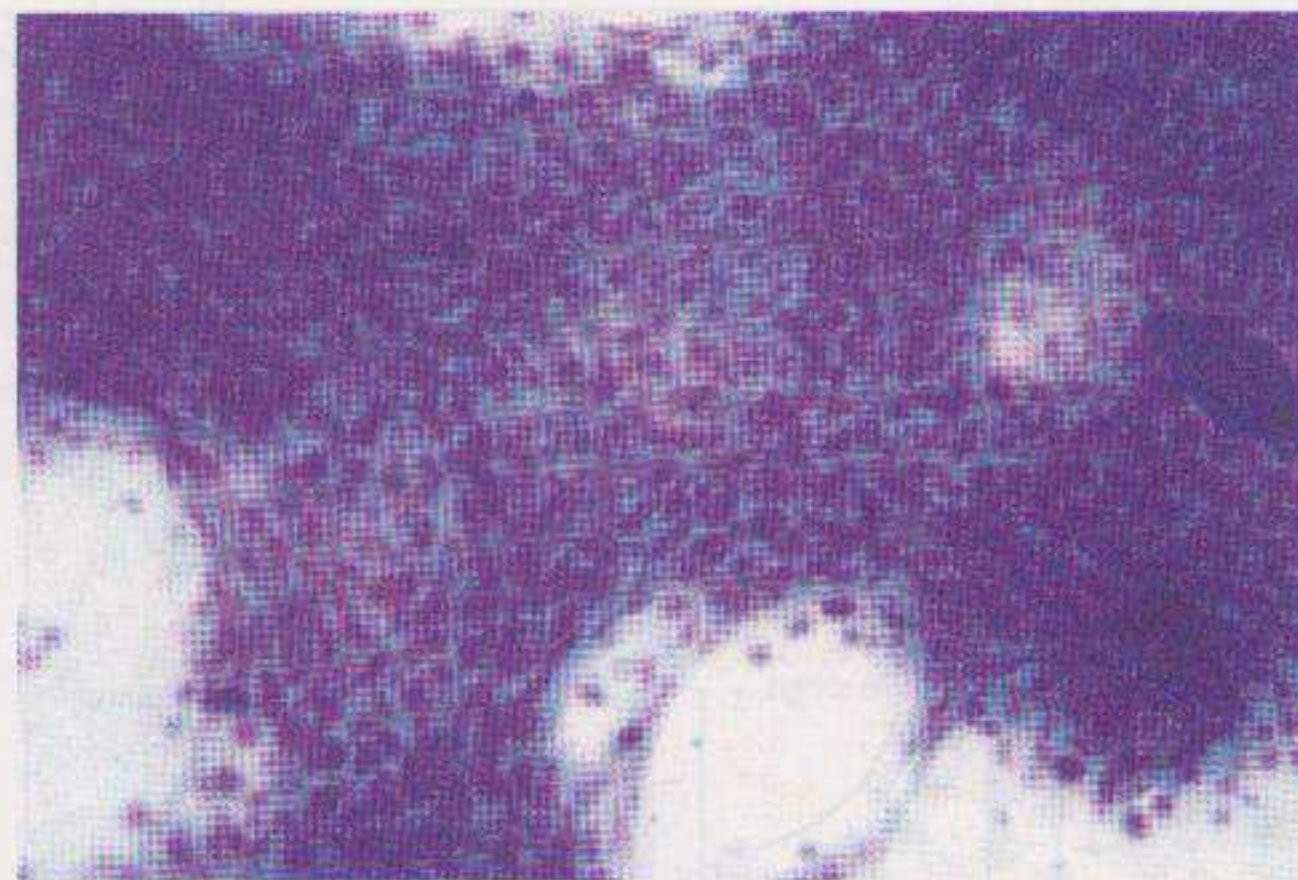
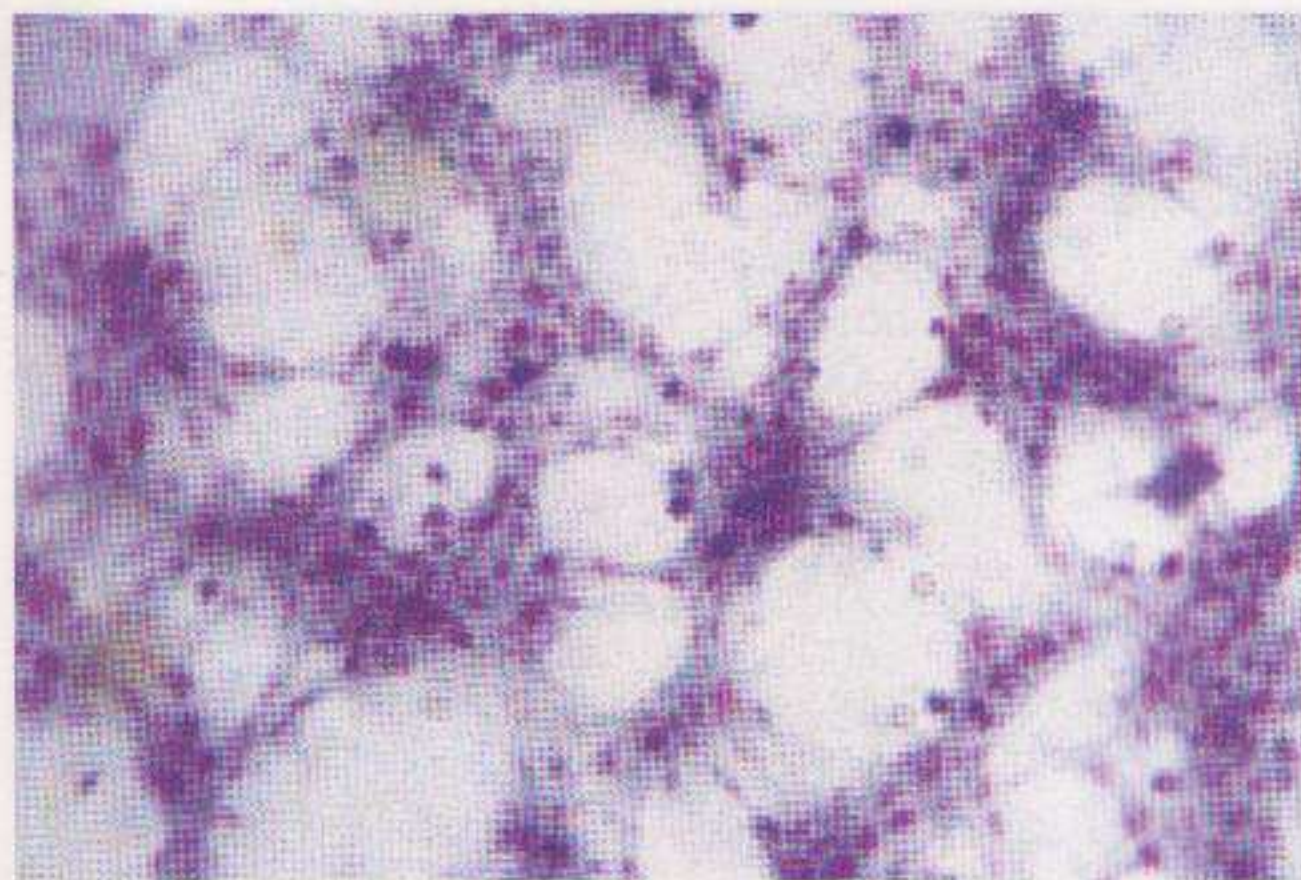
Paziente	Conta piastrinica basale (x 000)	Conta piastrinica PRP/PC (x 000)	Incremento (%)
1	235	790	336
2	150	590	393
3	210	870	387
4	400	1.480	370
5	362	1.117	323
6	275	860	312
7	335	1.270	379

TABELLA 1



5 Densità piastrinica in un citocentrifugato di PRP/PC. Colorazione May Grunwald/Giemsa (100x)

miscela calcio cloruro/botropase al PRP/PC (figura 8) e il coagulo ottenuto da questa manipolazione (figura 9) può essere mescolato all'innesto a seconda delle necessità cliniche.



6-7 Piastrine in un citocentrifugato di PRP colorate con May Grunwald/Giemsa (40x e 100x, rispettivamente)

Osservando le immagini presentate nelle figure 10 e 11, è possibile constatare come il gel piastrinico possa anche essere modellato, così da portare alla formazione di un coagulo consistente (figura 10) e/o di una membrana (figura 11).

In questo modo è possibile, nella pratica chirurgica implantare, sfruttare il gel piastrinico per raggiungere obiettivi clinici differenti.

DISCUSSIONE

Marx et al.^{5,6} hanno recentemente elaborato una tecnica che permette di concentrare fattori di crescita in modo tale da poter essere immediatamente utilizzati nella pratica chirurgica clinica.

Questa procedura prevede l'impiego di plasma autologo ricco di piastrine, indispensabile per formare il gel piastrinico. Le piastrine vengono isolate e concentrate a partire dal sangue del paziente, permettendo di ottenere quei fattori di crescita tissutali fisiologici in esse contenuti (PDGF, TGF- β) insieme alla fibrina

(una matrice biologica naturale) e a molecole di adesione cellulare.

Attualmente, questa nuova metodologia offre ai clinici la possibilità di poter applicare principi di ingegneria tissutale prima ancora che l'ingegneria genetica divenga fruibile mediante l'impiego di fattori di crescita e di proteine morfogenetiche. Pertanto, è verosimile ipotizzare che, in futuro, il gel piastrinico possa essere arricchito di fattori di crescita tissutali «geneticamente ingegnerizzati», per incrementare ulteriormente la loro capacità d'azione. Il gel piastrinico ottenuto secondo questo nuovo protocollo, che comporta una sua combinazione sia con osso autogeno spugnoso e corticale sia con matrice ossea di sintesi, fornisce diversi vantaggi che traggono origine dai benefici derivanti dall'ingegneria tissutale.

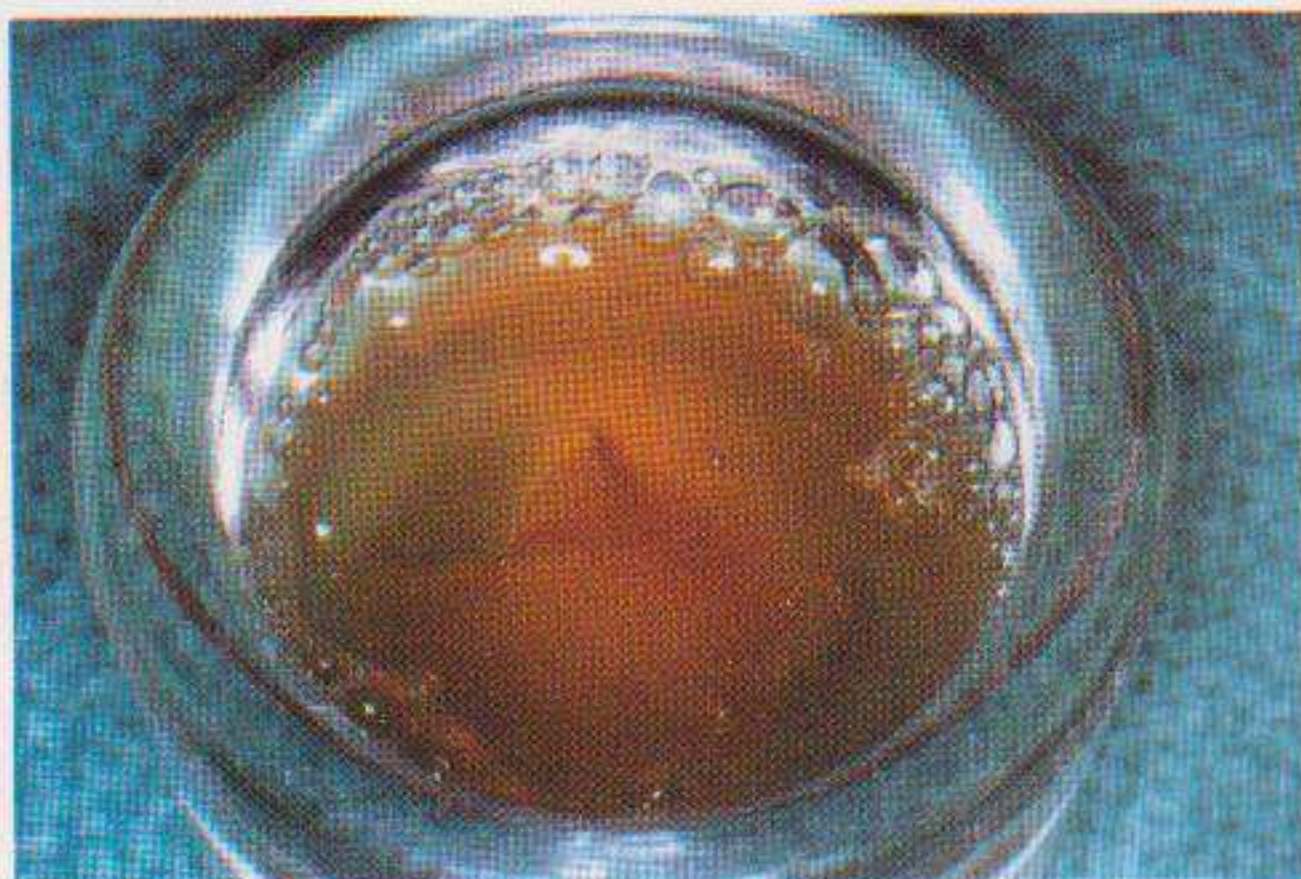
Come riportato dalla letteratura^{5,6}, questa metodica rappresenta un'evoluzione se paragonata alle tecniche standard degli innesti ossei.

Innanzitutto, applicando il gel piastrinico, si determina proprio all'interno della ferita un incremento in

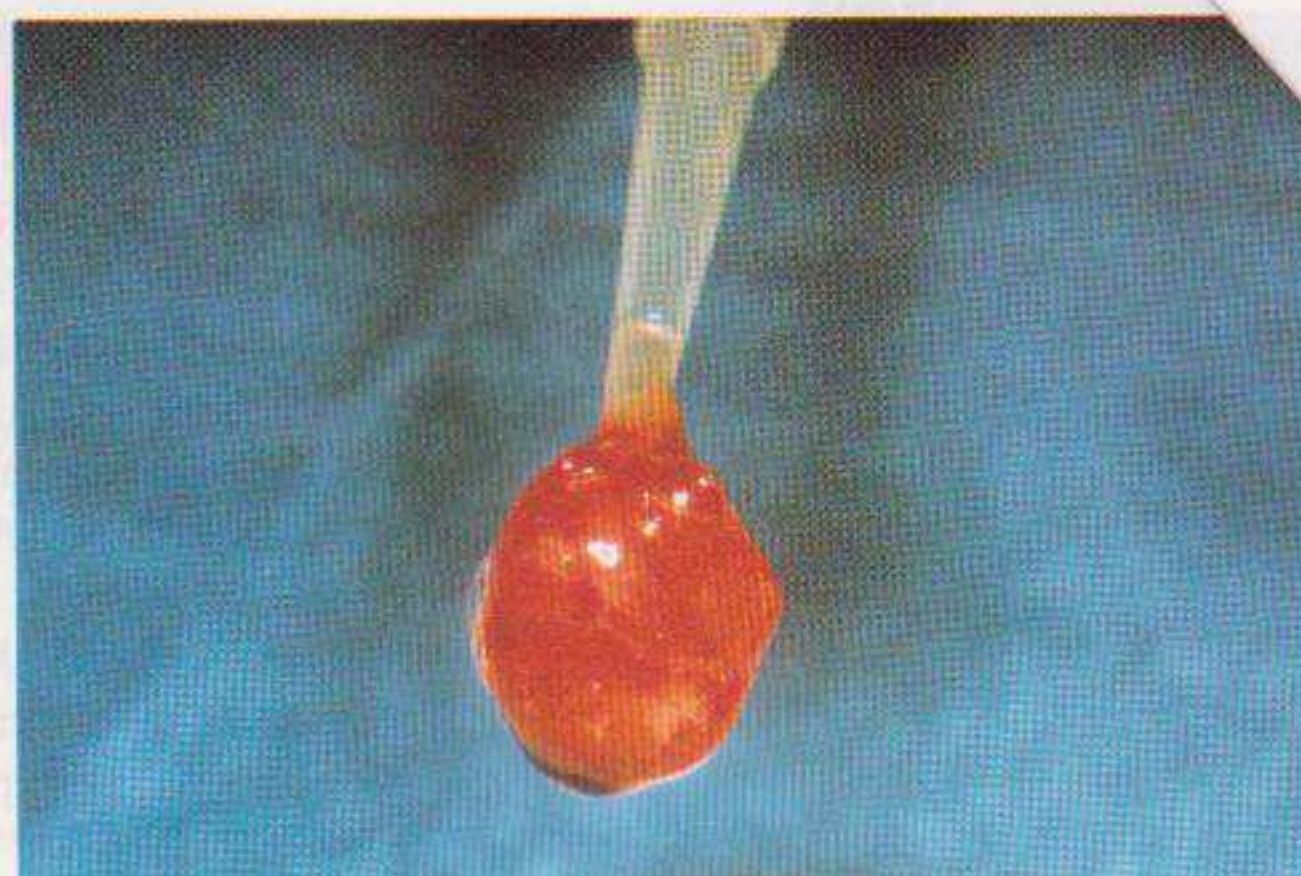
situ della concentrazione di fattori di crescita tissutali ma, soprattutto, di PDGF e TGF- β , che sono in grado di favorire, accelerandoli, i processi di guarigione dei tessuti molli circostanti. Inoltre, l'impiego di osso spugnoso autogeno permette da un lato il processo di osteoconduzione, che fornisce un'impalcatura rigida di sostegno alle nuove cellule ossee, dall'altra l'osteoiduzione, vale a dire quel processo biologico di trasformazione delle cellule mesenchimali totipotenti in cellule osteoblastiche o condroblastiche.

Infine, l'impiego di osso autogeno e corticale mescolato con il gel piastrinico determina un aumento delle cellule osteoprogenitrici, note per essere responsive al PDGF e al TGF- β , che si è rivelato particolarmente importante in presenza di gravi difetti ossei dove, al contrario, questo tipo di cellule sono carenti.

Riflettendo sull'importanza dell'utilizzo del gel piastrinico nella pratica chirurgica, come dimostrato dai recenti risultati ottenuti da Marx et al., si è cercato di mettere a punto una metodica di facile esecuzione,



8 Miscela di botropase/calcio cloruro e PRP/PC posizionati contemporaneamente in un dappen di vetro in modo da formare il gel di piastrine



9 Coagulo ottenuto dal gel di piastrine pronto per l'utilizzo clinico



10-11 Il gel di piastrine può essere modellato così da ottenere un coagulo consistente, a sinistra, o una membrana, a destra, utilizzabili, a seconda delle necessità, nella pratica chirurgica implantare

poco costosa e che permetta di ottenere rapidamente in ambulatorio il gel piastrinico, così da poter essere utilizzato di routine nella chirurgia orale e implantare.

I risultati preliminari raggiunti finora sono del tutto sovrapponibili a quelli di Marx, con la differenza che è possibile preparare il gel piastrini-

co partendo da una quantità di sangue decisamente inferiore (8-9 volte minore). La possibilità di poter prelevare poco sangue rappresenta un vantaggio in termini pratici e, senza dubbio, comporta un enorme beneficio per il paziente, dal momento che, almeno psicologicamente, provoca un minor disagio.

CONCLUSIONI

Il PRP/PC rappresenta un miglioramento rispetto alle tecniche standard di innesti ossei.

Il gel piastrinico, permettendo l'accesso clinico chirurgico a fattori di crescita autologhi, non tossici né immunogenici, aumenta e accelera

i normali processi di rigenerazione ossea. Quando il PRP/PC viene mescolato con osso autologo, si ottiene un tessuto da innesto autogeno con caratteristiche chirurgiche ottimali per facilità di stabilizzazione e caratterizzato da una qualità di guarigione superiore, per tempi e mineralizzazione, se paragonato all'osso autogeno da solo.

Il concentrato piastrinico ottenuto dal plasma ricco di piastrine fornisce, inoltre, prove scientifiche riproducibili della sua efficacia^{5,6}.

In conclusione, il PRP/PC permettendo l'utilizzo di fattori di crescita quali PDGF e TGF- β , attraverso la raccolta e la concentrazione delle piastrine, viene considerato un utile e disponibile strumento per incrementare la qualità e la quantità finale di osso neoformato.

Nel nostro ambulatorio è stata recentemente elaborata una procedura semplice, economica e rapida, che permette di ottenere un'adeguata quantità di PRP/PC da utilizzare nella pratica chirurgica orale e implantare. Tuttavia, riteniamo che questa metodica possa essere ulteriormente migliorata per permettere, da un lato, di raccogliere le piastrine in un tempo più breve e, dall'altro, di raggiungere densità piastriniche maggiori rispetto a quelle ottenute finora.

Corrispondenza a: dottoressa Maria Cristina Sacchi,
clo Studio dentistico dottor Bellanda,
Via XX Settembre 37,
15100 Alessandria

BIBLIOGRAFIA

1. Seghatchien MJ, Brozovic B. An overview of current trends in platelet preparation, storage and transfusion. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 1992;3:617-20.

2. Rebull P. In vitro and in vivo properties of various types of platelets. *Vox Sanguinis* 1998;74(suppl 2):217-22.

3. Antonaides HN. Human platelet-derived growth factor (PDGF): purification of PDGF-I and PDGF-II and separation of their reduced sub-units. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:7314-7.

4. Bowen-Pope DF, Voget A, Ross R. Production of platelet-derived growth factor-like molecules reduce expression of platelet-derived growth factor receptors accompany transformation by a wide spectrum of agent. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:2396-400.

5. Marx RE. Platelet-rich plasma: a source of multiple autologous growth factors for bone grafts. In: Lynch SE, Genco RJ, Marx RE (eds). *Tissue engineering: applications in maxillofacial surgery and periodontics*. Chicago: Quintessence, 1999:179-98.

6. 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* 1998;85:638-46.

7. Ross R. Platelet-derived growth factor. *Ann Rev Med* 1987;38:71-9.

8. Greenlagh DG. The role of growth factors in wound healing. *J Trauma* 1996;41:159-67.

9. Lynch SE, Buser D, Hernandez RA, et al. Effects of the platelet-derived growth factor/insulin-like growth factor combination on bone regeneration around titanium dental implants. Result of a pilot study in beagle dogs. *J Periodontol* 1991;62:710-6.

10. Lynch SE, Ruiz de Castilla G, Williams RC, et al. The effects of short-term application of a combination of platelet-derived and insulin-like growth factor on periodontal wound healing. *J Periodontol* 1991;62:458-67.

11. Rutherford RB, Niekrash CE, Kennedy JE, Charette MF. Platelet-derived and insulin-like growth factors stimulate regeneration of periodontal attachment in monkeys. *J Periodontol Res* 1992;27:285-90.

12. Beck LS, De Guzman L, Lee WP, Yvette XU, Siegel MW, Amento EP. One systemic administration of transforming growth factor-beta 1 reverses age or glucocorticoid-impaired wound healing. *J Clin Invest* 93:2841-9.

13. Pierce GE, Mustoe TA, Lingelbach J, Musakowski VR, Griffin RM, Deuel TF. Platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta enhance tissue repair activities by unique mechanisms. *J Cell Biol* 1989;109:429-40.

14. Ross R, Raines EW, Bowen Pope DE. The biology of platelet-derived growth factor. *Cell* 1986;46:155-69.

15. American Academy of Periodontol Position Paper. The potential role of growth and differentiation factors in periodontal regeneration. *J Periodontol* 1996;67:543-53.

16. Cho MI, Lin WL, Genco RJ. Platelet-derived growth factor-modulated guided tissue regenerative therapy. *J Periodontol* 1995;66:522-30.

17. Kaplan DR, Chao FC, Stiles CD, Antonaides HN, Scher CD. Platelet α -granules contain a growth factor for fibroblasts. *Blood* 1979;53:1043-52.

18. Kohler N, Lipton A. Platelets as a source of fibroblast growth-promoting activity. *Exp Cell* 1986;46:155-69.

19. Pierce GE, Tarpley J, Yanagihara D, Deuel TF. PDGF, TGF- β and basic FGF in dermal wound healing: neovessel and matrix formation and cessation of repair. *Am J Pathol* 1992;140:1375-88.

20. Mohan S, Baylink DJ. Bone growth factors. *Clin Orthop Rel Res* 1991;263:30-43.

21. Caplan AI. Bone development and repair. *Bioessays* 1987;6:171-5.

22. Miyazono K, Ten-Dijke P, Ichiyo H, Heldin CH. Receptors for transforming growth factor- β . *Adv Immunol* 1994;55:181-220.

23. Roberts AB, Spron MB. Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor- β (FGF- β). *Growth Factors* 1993;8:1-9.

24. Taayapongsak P, O'Brien DA, Monteiro CB, Arceo-Diaz LLI. Autologous fibrin adhesive in mandibular reconstruction with particulate cancellous bone and marrow. *J Oral Maxillofac Surg* 1994;52:161-6.

25. Singh JP, Chaikin MA, Stiles CD. Phylogenetic analysis of platelet-derived growth factor by radio-receptor assay. *J Cell Biol* 1982;95:667-71.

26. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1991;9:641-50.

In redazione da settembre 1999

