

¿Existen riesgos al utilizar los concentrados de Plasma Rico en Plaquetas (PRP) de uso ambulatorio?

AUTORES/AUTHORS

José María Martínez-González (1), Jorge Cano Sánchez (2), Juan Carlos Gonzalo Lafuente (2), Julián Campo Trapero (3), Germán Carlos Esparza Gómez (1), Juan Manuel Seoane Lestón (4).

- (1) Profesor Titular. Departamento de Medicina y Cirugía Bucofacial. Facultad de Odontología. Universidad Complutense Madrid (UCM). España.
- (2) Licenciado en Odontología. Especialista en Implantología Oral. Facultad Odontología. UCM.
- (3) Profesor Asociado. Departamento de Medicina y Cirugía Bucofacial. Facultad de Odontología. UCM.
- (4) Profesor Titular. Departamento de Estomatología. Facultad de Medicina y Odontología. Universidad de Santiago de Compostela. España.

Martínez JM, Cano J, Gonzalo JC, Campo J, Esparza GC, Seoane JM. ¿Existen riesgos al utilizar los concentrados de Plasma Rico en Plaquetas (PRP) de uso ambulatorio? *Medicina Oral* 2002; 7: 375-90.
© Medicina Oral. B-96689336
ISSN 1137-2834.

RESUMEN

Los concentrados de PRP han sido ampliamente utilizados en la última década como complemento en las técnicas de regeneración de tejidos. Los autores que han empleado clínicamente el PRP aseguran que no existen riesgos de infección o transmisión de enfermedades y niegan la existencia de algún tipo de efecto indeseable. Sin embargo, se ha relacionado la sobreexpresión de factores de crecimiento (*GFs*, *Growth Factors*) y sus receptores en tejidos tumorales y displásicos. Esto nos lleva a formularnos algunas preguntas en relación a las posibles coincidencias entre el proceso carcinogénico y la vía mitogénica que utilizan los *GFs*. El objetivo del presente trabajo ha sido efectuar una revisión bibliográfica sobre los posibles efectos de las aplicaciones terapéuticas de los *GFs* (incluido el PRP) en el proceso de la carcinogénesis, su influencia sobre tejidos con displasia epitelial o carcinoma oral y su relación con el crecimiento e invasión tumoral.

Recibido: 28/10/01. Aceptado: 18/05/02.

Received: 28/10/01. Accepted: 18/05/02.

Palabras clave: PRP, factor de crecimiento, carcinogénesis, oncogénesis.

INTRODUCCIÓN

La utilización de fibrina liofilizada y de la fibrina autóloga se ha llevado a cabo desde hace décadas en los campos de la traumatología y la cirugía oral y maxilofacial con el fin de compactar y realizar una función osteoconductiva en los procedimientos de colocación de injertos (1). En la década de los noventa varios autores utilizaron los concentrados a base de plasma rico en plaquetas (PRP) en injertos orales y maxilofaciales, con el fin de obtener la fibrina de manera autóloga, activando el PRP con trombina bovina. Observaron que además del beneficioso efecto osteoconductivo que aportaba la fibrina, existía un aporte de *GFs* beneficioso para la curación ósea (2, 3).

Inicialmente los procedimientos de obtención de PRP partían de cantidades de sangre muy grandes (500 cc) que requerían de una aparatología especial y costosa que impedían la utilización en procedimientos ambulatorios (3). Además, en estos sistemas y en algunos sistemas ambulatorios, se utilizaba la trombina bovina para la activación que puede provocar rechazo inmunitario y aparición de coagulopatías. Su utilización es controvertida, por lo que no está difundido a nivel europeo.

Los factores de crecimiento son polipéptidos, contenidos en diferentes tipos celulares y en la matriz extracelular, que juegan un papel fundamental en la estimulación y regulación de la curación de heridas en diferentes tejidos del organismo. Parecen regular diversos procesos celulares, como son la mitogénesis, quimiotaxis, diferenciación y el metabolismo celular (4).

No se han publicado referencias sobre el riesgo de infección, transmisión de enfermedades o cualquier otro efecto indeseable con la utilización de PRP. Tampoco se conocen las concentraciones ideales de cada factor de crecimiento o la dosificación adecuada para cada situación terapéutica en concreto y también destacar la existencia de *GFs* que todavía no han sido descritos (4, 5).

Durante el desarrollo del embrión humano o en ciertos procesos de regeneración de tejidos, existe una integración de señales que coordinan la proliferación, la diferenciación, metabolismo celular y la apoptosis. La interacción de *GFs*, otras citoquinas y hormonas con receptores específicos de membrana, desencadena una serie de señales bioquímicas intracelulares que conlleva la activación o represión de genes que controla el equilibrio de estos procesos. Existen, sin embargo, aberraciones genéticas que afectan a estos factores de crecimiento, a sus receptores o a sus vías de transducción que pueden romper el equilibrio celular, conduciendo al crecimiento anormal de una neoplasia. Por tanto, desarrollo o regeneración por un lado, y el cáncer por otro, representan los aspectos fisiológicos y patológicos del equilibrio celular (6).

Hollinger y cols. han estudiado las aplicaciones clínicas de las proteínas morfogenéticas óseas (*BMPs*, *Bone Morphogenetic*

Proteins) (factor que no ha sido encontrado en el PRP) y afirman que, hasta hoy, no existen evidencias en estudios clínicos o experimentales acerca de que la aplicación exógena de *BMPs* produzca una respuesta oncogénica. Establece que “las *BMPs* son un factor de diferenciación que promueve la diferenciación de las células mesenquimales a un fenotipo normal y adulto y no debería promover la oncogénesis” y establece además que “los efectos a largo plazo de las *BMPs* recombinadas no se puede predecir categóricamente, y la corriente de efectos de las dosis terapéuticas de las *BMPs* pueden ocultar influencias no expresadas inmediatamente” (7). En base a estas afirmaciones, y conociendo las diferencias y similitudes entre *BMPs* y otros *GFs* presentes en el PRP, podemos decir que la posible relación entre la aplicación terapéutica de los factores de crecimiento y el proceso oncogénico no debería ser rechazada de manera rotunda y definitiva.

Sin duda, son innegables los buenos resultados de los tratamientos con concentrados de PRP, en relación a la mejor y más rápida regeneración de los tejidos donde se han aplicado (3, 5, 8). Sin embargo la evidencia científica muestra también que los *GFs* encontrados en las plaquetas (*PGFs*, *Platelet Growth Factors*), aparecen sobreexpresados en los tejidos tumorales. Estos hechos nos llevan a plantearnos algunas preguntas: 1.- ¿El aumento de las concentraciones de estos *GFs* utilizados en las dosis terapéuticas habituales, y en determinados tejidos y localizaciones anatómicas, podría iniciar un proceso oncogénico en tejidos normales? 2.- ¿Podrían inducirlo en tejidos displásicos o que han sido expuestos a carcinógenos? 3.- ¿Qué mecanismos bioquímicos nos harían sospechar que la oncogénesis se podría producir de una manera dosis-dependiente o tiempo-dependiente?

Los *GFs* actúan sobre la membrana celular, a través de la cual transmiten su señal hacia el núcleo celular. La visión simplista de que al no incorporarse al núcleo celular no pudieran producir efectos genéticos, nos hace recordar que las dosis de *GFs* en el PRP son dosis terapéuticas y no fisiológicas, y que por tanto actúan sobre el incremento de la proliferación celular y la replicación del ADN de manera indirecta, a través de complejas vías de transducción de señal. El objetivo del presente trabajo ha sido efectuar una revisión bibliográfica sobre los posibles efectos de las aplicaciones terapéuticas de los *GFs* (incluido el PRP) en el proceso de la carcinogénesis, su influencia sobre tejidos con displasia epitelial o carcinoma oral y su relación con el crecimiento e invasión tumoral.

FACTORES DE CRECIMIENTO PLAQUETARIOS (*PGFs*)

Las plaquetas son fragmentos anucleares de los megacariocitos, con una forma discoide y cuya cantidad normal en sangre se ha considerado habitualmente de 150.000-400.000/ μ l ó 1,5-4 $\times 10^8$ /ml. Cuando se produce una herida, a la membrana plaquetaria se une el factor plasmático de Von Willebrand (a través de la glicoproteína Ib) que hace que se unan al colágeno expuesto de la pared vascular (adhesión), y de esta manera se unan entre sí (agregación). La agregación entre unas y otras plaquetas se hace a través de puentes de

fibrinógeno entre glicoproteínas de membrana (glicoproteína IIb-IIIa). La activación (degranulación) de las plaquetas se puede realizar por varios mecanismos mecánicos o químicos: uno de los más fuertes es la adhesión de las plaquetas al colágeno y otros componentes del subendotelio, o por la presencia de trombina. Todos los mecanismos de activación plaquetaria, al parecer, lo hacen activando fosfolipasas de la membrana celular que promueven la liberación de Ca^{++} , el cual por sí solo produce agregación y secreción. La degranulación plaquetaria libera tromboxano A2 (Tx A2), adenosindifosfato (ADP) y serotonina que estimulan el reclutamiento y activación de las plaquetas circundantes. También van a contener fibrinógeno, fibronectina e interleuquinas (IL) 1, 3 y 6. Cuando se activan las plaquetas asumen una morfología esférica y espinosa con movimientos de pseudópodos y expulsión de los gránulos (9).


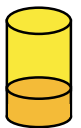
Después de agregarse y activarse las plaquetas se liberan nuevos factores agregantes, que, junto con la fase plasmática de la coagulación, van a originar la formación de trombina y posteriormente la sustitución del fibrinógeno soluble por la red de fibrina. En los gránulos α liberados por las plaquetas se van a encontrar una serie de *GFs* que ya han sido descubiertos y seguramente alguno más que todavía es desconocido (10, 11). Hay una serie de variaciones en los procedimientos de obtención de PRP, que sin duda modifican las cantidades de PRP obtenidas y por tanto las concentraciones de *GFs* contenidos en el interior de las plaquetas que se están aplicando. Entre los procedimientos descritos podemos distinguir métodos de un centrifugado y de dos centrifugados (Tabla 1) (12-14). Los diferentes tipos de *GFs* descritos en las plaquetas están expuestos en la Tabla 2 (15-20).

El mecanismo de acción de los distintos *GFs* sobre las células es bastante similar, aunque todavía no se conocen las moléculas exactas ni los caminos específicos de cada factor de crecimiento. Por otro lado, diferentes *GFs* pueden producir efectos biológicos opuestos en la misma célula (p. ej. *PDGF* y *TGF β*). En el torrente circulatorio, la matriz extracelular se une a proteínas específicas (*Binding-Proteins*) poco conocidas, que impiden su rápida degradación. De manera general los *GFs* actúan a nivel de la membrana celular a través de receptores específicos; estos receptores se activan iniciando en el citoplasma una actividad de fosforilación del tipo tirosina-quinasa (*PDGF*, *FGF*, *IGF*, *VEGF*, *EGF*) o bien serina-treonina-quinasa (*TGF β* , *BMPs*), que activan rutas específicas de transducción de señal que se introducen posteriormente en el núcleo, para la expresión de genes específicos. El efecto final producido es multifuncional y va a depender de la célula diana y del estado fisiológico de la misma, de su relación con otras células, de la matriz extracelular y de la presencia de otros *GFs* (21, 22).

Una de las acciones de los *GFs* es la función de diferenciación celular. En el tejido óseo se ha descrito el mecanismo molecular por el que los *GFs* favorecen la diferenciación osteoblástica de las células madre mesenquimales (*MSCs*, *Mesenchymal Stem Cells*). En este proceso intervendrían las

TABLA 1

Procedimientos de obtención de PRP

TÉCNICA MANUAL: 1 CENTRIFUGADO	TÉCNICA AUTOMÁTICA: 2 CENTRIFUGADOS
4,5 ml sangre + 0,5 ml anticoagulante E ₁ centrifugado a 280 g (1.400 rpm) durante 7 minutos (citrato sódico al 3,8%).	SmartPREP® (Harvest Technologies, Norwel, EE.UU.)
 <p>- 0,5 ml PPP fase amarilla (se desecha) - PRP fase roja (componente celular).</p>	45-50 ml sangre (según sexo o hematocrito) ↓ 12 minutos 1º centrifugado 1. 3.650 rpm 2. 60 rpm
1 ml de PRP + 50 µl CaCl ₂ 10% 5-8 minutos a Tª ambiente ó 2-3 minutos a 37° C	↓ 2º centrifugado a 3.000 rpm Se consiguen 7 ml PC de 90 ml sangre completa. Concentrado de plaquetas (PC: Platelet Concentrate) en el fondo de la cámara del plasma.
↓ Formación del gel Se coloca en el defecto óseo. Una vez colocado el PRP en el lecho receptor, parece ser que las plaquetas se degranulan totalmente en 3-5 días y la actividad de los GFs terminaría a los 7-10 días (4, 12).	↓  <p>2/3 PPGF 1/3 PC</p>
<p>PPP: Plasma pobre en plaquetas PRP: Plasma rico en plaquetas</p> <ul style="list-style-type: none"> • En estudios anteriores Anitua y cols. (5), incluían también 1-2 mm del componente celular (fase roja). Parece que en este lugar se encuentran las plaquetas más grandes y recientemente formadas, pero también leucocitos, linfocitos y eritrocitos (12). • Se obtiene 7,9x10⁸ plaquetas/ml en el PRGF (3). 	<ul style="list-style-type: none"> • Con este procedimiento se recomienda para la activación una mezcla de 1 ml de trombina bovina y cloruro cálcico (4, 8, 13). • Se obtiene 22,8 x10⁸ plaquetas/ml en el PC (13). Otros estudios (Landesberg y cols.) han observado que con un procedimiento de 2 centrifugados, las mayores concentraciones se obtendrían con los 2 centrifugados a 200 g durante 10 minutos (14).

moléculas de transducción SMAD y los factores de transcripción CBFA-1 (Core Binding Factor A) y AP-1 (17, 23, 24).

En la función mitogénica de los GFs, la señal de transducción que llega al núcleo induce la activación de factores de transcripción como el ELK-1 que transcribe los proto-oncogenes *c-fos* y *c-jun* o fosforila directamente el factor AP-1. El AP-1 es un factor de transcripción para transcribir otros genes implicados en la mitogénesis (p. ej. el gen de la ciclina D₁ también denominado PRAD1 ó CCND1). En esta señal parece que cumple un factor fundamental el camino citoplasmático Ras/Raf/MEK/MAPK (MAPK: Mitogenic-Activated Protein Kinase Protein; y MEK: por el acronismo MAPK/ERK)/ERK (Extracelular Regulated Kinase) aunque intervienen otras quinasas específicas (JNKs, Jun N-terminal Kinase y FRKs, Fos Regulated Kinase) (Fig. 1). Sin embargo, en este camino hay una autorregulación negativa, de tal manera que cuando existe una excesiva estimulación de Ras se produce inducción de p21 que frena el ciclo celular. En otras ocasiones la vía de señalización lleva a la fosforilación de factores de transcripción que están en el citoplasma en vez de en el núcleo, p. ej. la proteína p91, que se transloca al núcleo y transcribe genes como el *c-fos* (25, 26).

En cualquier caso se ha establecido que cuando un GF

llega a su receptor sólo produce una división celular, ya que al enviarse la señal, su acción se inactiva por internalización del complejo ligando-receptor. Una célula normal necesita la llegada de una nueva señal para volver a dividirse (21, 22).

RELACIÓN DE LOS PGFs Y LA CARCINOGENÉISIS ORAL

La formación de tumores humanos es muy compleja y requiere la acumulación de múltiples alteraciones moleculares oncogénicas que superen los controles fisiológicos de proliferación celular y diversos factores inmunológicos. La transformación maligna de las células normales lleva implícito el fallo de las células al diferenciarse y a la activación de las vías de proliferación, que además suele variar según los tipos celulares en función de la capacidad de reparación de las alteraciones reversibles producidas. Actualmente es ampliamente reconocida la teoría epigenética de la carcinogénesis por la cual se establece una primera fase de *iniciación*, que incluye las alteraciones que se producen a nivel del ADN que son irreversibles, seguida por *promoción*, que aumenta la probabilidad de que aparezcan nuevas alteraciones genéticas celulares, y terminando con la *progresión*,

TABLA 2

Factores de crecimiento plaquetarios (incluidos en el PRP)

FACTOR DE CRECIMIENTO DE TRANSFORMACIÓN B	ISOFORMAS	5 isoformas β ₁ y β ₂ son las más investigadas
	CÉLULAS PRODUCTORAS	Plaquetas, macrófagos, linfocitos neutrófilos, MSCs, osteoblastos, matriz ósea
	FUNCIÓN	Quimiotaxis, diferenciación de las MSCs, producción de colágeno por osteoblastos, favorece la angiogénesis, inhibe la formación de osteoclastos y la reabsorción ósea (12). Tiene efecto mitogénico en las células mesenquimales e inhibe la proliferación en células epiteliales dependiendo de la presencia de otros GFs (15)
FACTOR DE CRECIMIENTO DE ORIGEN PLAQUETARIO	ISOFORMAS	3 isoformas: AA, AB y BB
	CÉLULAS PRODUCTORAS	Plaquetas (principalmente), macrófagos, osteoblastos (isoforma BB), condrocitos, fibroblastos y células endoteliales
	FUNCIÓN	Facilita la angiogénesis por vía indirecta a través de los macrófagos que actúan sobre las células endoteliales, efecto quimiotáctico y activador sobre las células de inflamación (macrófagos); favorecen la quimiotaxis y proliferación de células mesenquimales (mitogénico); facilita la formación de colágeno tipo I; 50% del efecto mitogénico proveniente de las plaquetas (16, 17)
FACTOR DE CRECIMIENTO FIBROBLÁSTICO	ISOFORMAS	2 isoformas. Tipo I y II. La forma II o básica parece que es la más potente en la función mitogénica
	CÉLULAS PRODUCTORAS	Fibroblastos (principalmente), macrófagos, osteoblastos, plaquetas y células endoteliales
	FUNCIÓN	Aumentan la proliferación y diferenciación de osteoblastos y la inhibición de osteoclastos. Actúan sobre los fibroblastos aumentando su proliferación y la producción de fibronectina, Favorece la angiogénesis por su acción mitogénica y quimiotáctica sobre células endoteliales
FACTOR DE CRECIMIENTO SIMILAR A LA INSULINA	ISOFORMAS	2 isoformas. Tipo I y II
	CÉLULAS PRODUCTORAS	Plaquetas, macrófagos, osteoblastos, MSCs y matriz ósea
	FUNCIÓN	Estimula la proliferación (mitogénesis) y diferenciación de las MSCs y de las células de revestimiento, así como la formación por parte de los osteoblastos de osteocalcina, fosfatasa alcalina y de colágeno tipo I; induce la diferenciación de MSCs y de las células de revestimiento, durante el remodelado óseo, al igual que las BMPs y el TGFβ (12)
FACTOR DE CRECIMIENTO ENDOTELIAL VASCULAR	ISOFORMAS	4 isoformas. También denominado Factor de permeabilidad vascular (VPF, <i>Vascular Permeability Factor</i>)
	CÉLULAS PRODUCTORAS	Plaquetas, macrófagos, osteoblastos y células musculares lisas, sobre todo en estados de hipoxia
	FUNCIÓN	Actúan sobre la quimiotaxis y la proliferación de las células endoteliales, realiza una hiperpermeabilidad de los vasos. Su acción parece estar regulada por la acción de TGFβ y PDGF (18, 19)
FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO	ISOFORMAS	1 isoforma. Gran similitud con el TGFα, lo que hace que se unan al mismo receptor
	CÉLULAS PRODUCTORAS	Plaquetas, fibroblastos, células endoteliales
	FUNCIÓN	Tiene función mitogénica, proapoptótico, migración y de diferenciación no sólo de las células epiteliales, sino también sobre fibroblastos, células renales y células gliales a partir de células mesenquimales (20)

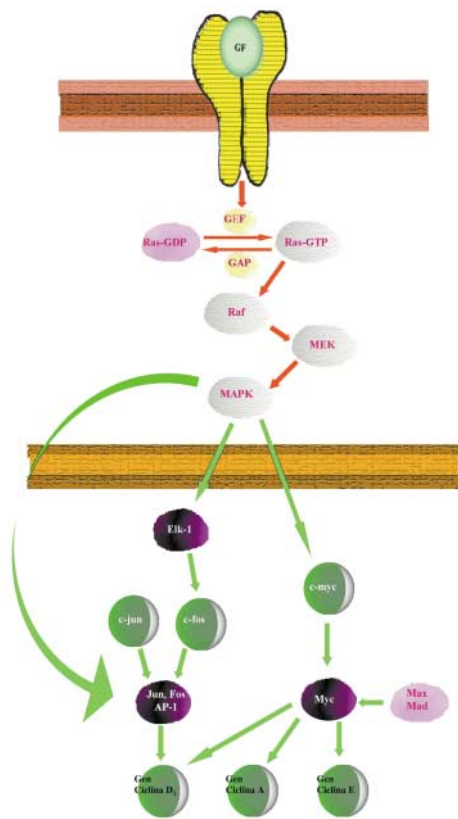


Fig. 1.
Esquema simplificado de la vía mitogénica de los GFs.
Simplified schematic representation of the mitogenic pathways of growth factors (GFs).

donde se produciría la transformación maligna de esas células iniciales benignas (27-29).

Hay que tener en cuenta que las células normales sólo son capaces de proliferar un número determinado de veces, hasta llegar a un límite máximo (“límite Hayflick”) a partir del cual la célula sufre una serie de cambios bioquímicos entrando en una etapa de *senescencia*. Se ha calculado que un fibroblasto de una persona de mediana edad es capaz de dividirse 20-40 veces, produciendo en la cascada de división 2⁴⁰ células. La adquisición de la habilidad para proliferar un número ilimitado de veces se denomina *inmortalización* y se considera un paso importante en la transformación maligna de células normales. Es motivo de controversia la necesidad del proceso de *inmortalización* para el desarrollo de tumores, ya que se han observado células con límite Hayflick en tumores de gran tamaño. Los mecanismos de control celular (fundamentalmente genes supresores y proapoptóticos), van a evitar que la célula sobrepase ese límite y entre en 2 posibles etapas: apoptosis o *senescencia/diferenciación terminal* (30).

Con el fin de observar si existe algún tipo de relación entre la carcinogénesis y la función mitogénica de los concentrados de PRP, nos proponemos establecer una serie de preguntas

que nos hemos planteado y que intentamos contestar con la ayuda de los estudios revisados.

1.- Cuando existe una sobreconcentración de GFs, ¿se induce la sobreexpresión de receptores de membrana? Si esto fuera así, ¿se producirían de manera normal o fisiológica, o sólo en tejido tumoral? ¿Podría esto originar la aparición de receptores mutados?

En células tumorales, se han observado unos 400.000 receptores normales de EGFR por célula (*EGFR, Epidermal Growth Factor Receptor*), en contraposición a fibroblastos normales que pueden tener 5.000-10.000 receptores por célula, y parece que este incremento se debe a alteraciones de genes codificadores de los receptores y no como consecuencia de la sobreproducción de GFs, aunque estos aumentarían por un mecanismo autocrino. Parece que en un tejido normal el incremento de receptores sería moderado y transitorio. Por otro lado parece difícil que la sobreexposición de GFs dé lugar a la mutación de receptores (31).

En relación a los receptores de los GFs, se ha observado en células tumorales que puede existir una sobreexpresión de estos receptores normales (32) alimentada por una sobreproducción autocrina de GFs mutados (p. ej. aumento de PDGF mutado por expresión de oncogenes) o sobreproducción de GFs normales; o bien, que esos receptores presenten una morfología aberrante truncada, de tal manera que se presentan continuamente activados (dimerización alostérica), sin que se requiera la unión del GF, de la misma manera que cuando son activados por los GFs, pero de manera continua y generando una señalización inapropiada y aberrante hacia el núcleo (22) (Fig. 2).

En determinadas ocasiones, sin embargo, la activación del receptor al EGF (*EGFR*) puede inducir en ciertas células tumorales una parada de la proliferación celular y la inducción de apoptosis. Este efecto parece estar mediado por las proteínas reguladoras de la transcripción denominadas *STATs* (*Signal Transducers Activators Transcription*) que aumentan la expresión del inhibidor del ciclo celular p21^{WAF1/CIP1}, quedando así bloqueado el mismo, y también de la Caspasa 1, proteasa implicada en la apoptosis.

En las células tumorales la presencia de un número excesivamente alto de copias de *EGFR* normal en la célula provoca un aumento de la sensibilidad a sus ligandos que, incluso a concentraciones muy bajas, son capaces de estimular las células e inducir proliferación celular. Por otro lado, el proceso de internalización (de eliminación del complejo GF-receptor de la membrana) en estas circunstancias es más lento, porque se excede la capacidad de endocitosis de la célula, por lo que éstas no pueden reprimir adecuadamente la transmisión de las señales mitogénicas que se generan de una forma continuada (Fig. 2) (31).

2.- ¿Si se produjera una sobreexpresión de receptores, los complejos ligando-receptor se podrían internalizar y volver de nuevo a la membrana celular a enviar su señal mitogénica, incluso cuando ya no existiera una sobreconcentración externa de GFs?

Una vez que el complejo ligando-receptor ha realizado su función enviando la señal, parece que sufre un proceso de internali-

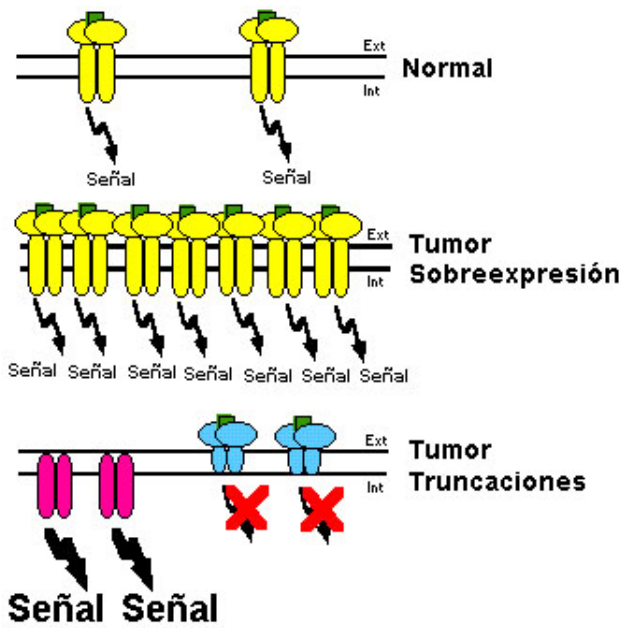


Fig. 2.

Alteraciones del *EGFR* en células tumorales. En células normales (panel superior) se expresa un número moderado del *EGFR* (dímeros en forma de T) que señalizan adecuadamente. En ciertas células tumorales el *EGFR* puede sobreexpresarse generando un alto nivel de señalización (panel central). Otros tumores expresan formas truncadas aberrantes del *EGFR* que carecen del dominio extracelular, presentando una actividad tirosina-quinasa hiperactiva que señala en ausencia del control ejercido por el ligando (panel inferior- izquierda), o formas truncadas que carecen del dominio intracelular y no tienen actividad tirosina-quinasa y por lo tanto no señalizan directamente, aunque son capaces de unir el ligando (panel inferior-derecha) (Autorizado por Palomo-Jiménez y cols. (31)).

EGFR alterations in tumor cells. In normal cells (upper level) a moderate number of EGFR are expressed (T-shaped dimers), which signal adequately. In certain tumour cells, EGFR may undergo over-expression, thus generating high signal levels (central level). Other tumours in turn express aberrant truncated forms of EGFR that lack the extracellular domain and exhibit tyrosine-kinase hyperactivity which signals in the absence of ligand mediated control (left bottom level). Alternatively, the EGFR may present truncated forms that lack the intracellular domain and possess no tyrosine-kinase activity, and consequently do not signal directly – though they are able to bind ligand (right bottom level) (Reproduction authorized by Palomo-Jiménez et al. (31)).

zación que puede tener dos caminos: o bien sufrir una degradación proteolítica por lisosomas o bien volver a la membrana plasmática donde podrían reiniciar la señal mitogénica (Fig. 3). La internalización del *EGFR* aminora la señal mitogénica, jugando así un papel relevante en la prevención de la proliferación celular incontrolada. Cuando este fenómeno de internalización se encuentra en fase de endosomas parece que sigue manteniendo funciones importantes de señalización. De hecho, en las células en las que existen mutaciones en los genes que codifican las proteínas implicadas en la internalización de los receptores *erbB*, se observa un aumento de la proliferación celular y su transforma-

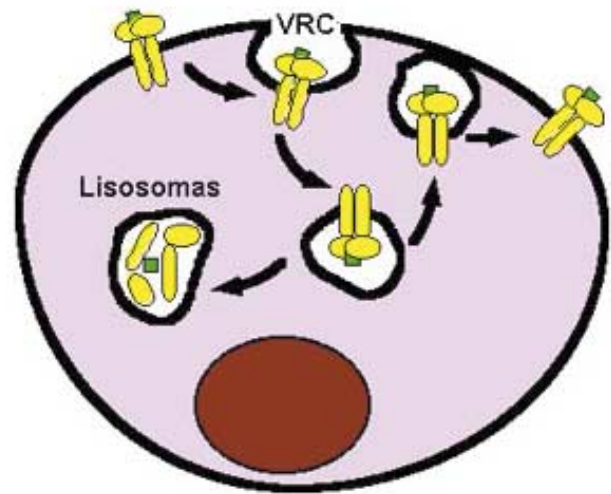


Fig. 3.

Internalización del complejo ligando-receptor. Degradación por lisosomas, formación de endosomas o reciclaje a membrana. VRC (vesículas recubiertas de clatrina) (Autorizado por Palomo-Jiménez y cols. (31)).

Internalization of the ligand-receptor complex. Lysosome degradation, formation of endosomes or membrane recycling. CCV (Clathrin-Coated Vesicles) (Reproduction authorized by Palomo-Jiménez et al. (31)).

ción en fenotipos malignos. El *EGFR* tiende más a reciclarse si se une a *TGF α* que si se une a *EGF* (31).

3.- ¿Cuándo existe una sobreconcentración de GFs, con esa sobreexpresión de receptores, la señal mitogénica sería transmitida por todos los receptores hacia el núcleo, activando múltiples genes en el núcleo; o por el contrario al llegar una señal al núcleo las demás se inactivarían?

Las vías de señalización saturadas por la sobreconcentración externa de *GFs* podrían dar lugar a señales anómalas y poco conocidas, ya que las vías de señalización celular están interconectadas funcionalmente entre ellas de forma transversal («cross-talk»). Evidentemente las dianas donde actúen las vías de los *GFs*, estarán en continuo “trabajo” y, cuando esas dianas estén saturadas, posiblemente las señales dadas por receptores adicionales sean ignoradas por falta de dianas disponibles.

En relación a los transductores de señal (segundos mensajeros), los más estudiados han sido las proteínas codificadas por la familia de genes *ras*. Se estima que el 30% de los tumores humanos presenta un oncogén *ras* activado. Su acción principal es el de transmitir la señal mitogénica a través de la vía *Ras/Raf/MEK/MAPK* al núcleo celular. *Ras* manda la señal cuando se une a *GTP* (guanina trifosfato). En la conversión de la forma activa *Ras-GTP* a inactiva *Ras-GDP* interviene una enzima importante, las *GAP* (*GTPase-activating protein*). Cuando existe una mutación, la proteína *Ras* se encuentra permanentemente unida a un *GTP* y es resistente a la actividad de *GAP*, lo que crea un complejo continuamente activo de transducción de señal mitogénica. En relación a esta vía parece que también existe una importante enzima, la fosfatidilinositol-3-quinasa (*p13K*), aun-

que no se conoce si es un activador de *Ras*, o se encuentra por debajo como un mediador de *Ras*. Además de la función mitógena de *Ras*, realiza una regulación negativa del ciclo celular por inducción de la proteína p53 y la p21 subsiguiente (26, 33).

4.- ¿Qué genes implicados en la progresión del ciclo celular serían los que recibirían directamente la señal mitogénica de los *GFs*? ¿Una continua o excesiva transcripción de los mismos podría aumentar la posibilidad de mutaciones o activación de oncogén?

Cuando la señal de los *GFs* llega al núcleo va a activar una serie de factores de transcripción que facilitan la transcripción de diferentes genes implicados en el ciclo celular o en la diferenciación fenotípica de la célula. Los proto-oncogenes *c-jun* y *c-fos* son inducidos rápida y transitoriamente tras el tratamiento con *GFs*. Los genes de estas dos familias controlan la respuesta proliferativa de un modo primario, activando (o inhibiendo) en cascada, genes cuyos productos ponen en marcha o paran el ciclo celular. Se ha encontrado sobreexpresión de *c-Jun* en cánceres de pulmón y colorrectal (26). La proteína oncogénica *v-Jun* proveniente del oncogén *v-jun*, tiene una permanente afinidad de unión al ADN, y por tanto, mayor actividad transcripcional que *c-Jun*.

En relación a la proteína del proto-oncogén *c-myc*, la *c-Myc*, hoy en día se sabe que su mera sobreexpresión origina una transformación celular (sin necesidad de que exista la forma mutada), aunque esa sobreexpresión va precedida de translocaciones cromosómicas (25). El oncogén *myc* se ha observado amplificado en el 4-15% de los tumores de cabeza y cuello, y se piensa que esta amplificación se asocia a estadios avanzados del tumor (34). En carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello se han encontrado amplificaciones cromosómicas en 11q13 en el 20-50% de los casos. En esta localización se encuentra el gen de la ciclina D₁ y del *FGF(FGF3 y FGF4)*(34). En estos tumores también se han relacionado deleciones del gen p16 (cromosoma 9p21) (inhibidor importante del complejo ciclina D₁-*CDK4*) en fases iniciales (displasia y carcinoma "in situ") que precederían a la inactivación de la p53 (27).

RELACIÓN DE LOS *PGFs* CON LA DISPLASIA EPITELIAL ORAL Y EL CRECIMIENTO E INVASIÓN DEL CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS (COCE)

Se han establecido relaciones de la sobreexpresión de *GFs* y sus receptores con tejidos tumorales y tejidos displásicos.

1.- ¿La sobreexpresión de *GFs* en tejidos tumorales, son *GFs* normales o son péptidos mutados? ¿Si existieran células cancerosas o displásicas en el tejido, los concentrados de PRP facilitarían su proliferación y migración por facilitar la mitogénesis y la angiogénesis?

En general se considera la sobreexpresión de *GFs* en los tejidos tumorales como secuencias polipeptídicas normales, inducida por las células tumorales mediante un mecanismo autocrino o paracrino para mantener el fenotipo tumoral sin

necesidad de un aporte externo de *GFs*. Por otro lado la activación tumoral de células por la presencia de *GFs* mutados es poco conocida (26).

Se ha observado sobreexpresión de *GFs* en carcinomas de mucosa oral, ovario, mama, pulmón, esofágico y gástrico, así como en osteosarcomas. Hay una serie de tumores que presentan una sobreexpresión de *GFs*. Así, la *BMP-2* en relación al adenoma pleomorfo, o en carcinoma epidermoide de lengua o encía, indica una progresión maligna por la formación ectópica de formaciones óseas o condroides (35); también existe un incremento significativo de *FGF-II* en el COCE, aumentando esta expresión progresivamente desde las fases iniciales de la carcinogénesis (hiperplasia, displasia, carcinoma *in situ*), y disminuyendo de manera importante al abandonar el hábito de consumo de tabaco (36).

Sulzbacher y cols. realizaron un estudio clínico en 23 casos de osteosarcomas y 17 osteoblastomas, para ver la expresión de *PDGF-AA* y el receptor *PDGFR- α* . En los osteosarcomas se observó positividad del 33,9% de los casos para el *GF* y de 27,1% para el receptor, observando menor expresión en los tumores de bajo grado. Los osteoblastomas presentaron una expresión significativamente menor que los osteosarcomas (15,7% para el factor y 17,5% para el receptor). Además observaron una correlación en la coexpresión de factor y receptor en osteosarcomas, pero no en los tumores benignos (37).

Se ha relacionado al *TGF- β* como un inhibidor de la proliferación en células epiteliales. Se ha observado además que la pérdida de expresión de la *SMAD 2* se observa en el 38% de los casos de COCE, y se incrementa en los casos pobremente diferenciados; además la evidencia con *PCR (Polymerase Chain Reaction)* revela que esta pérdida es atribuible a mecanismos distintos a la alteración genética (38). Sin embargo la sobreexpresión del *TGF- β* se ha asociado con progresión tumoral de estirpe epitelial por facilitar la proliferación estromal, angiogénesis, y actuar como inmunosupresor (15).

Se ha relacionado en estudios clínicos prospectivos un incremento significativo del *IGF-I* y la proteína de unión *IGFBP-3* en plasma sanguíneo, con un aumento del riesgo relativo de originarse un cáncer epitelial de próstata (*Odds Ratio* 2,41). No se observó esta relación con el *IGF-II* (39). Pollak y cols. establecen la hipótesis de que el aumento sérico de *IGF* se relacionaría con un aumento de renovación epitelial a nivel local. El potente efecto mitógeno y antiapoptótico del *IGF* conllevaría a nivel local un aumento de la proliferación celular (40).

Se ha estudiado también experimentalmente en hámsters el efecto que produce la aplicación exógena de *EGF* (10 μ g/kg de peso, aproximadamente 1.400 ng/animal) en el crecimiento de un tumor inducido en mucosa oral mediante 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno (*DMBA*). Se observó a las 14 semanas que los tumores tratados con *EGF* tenían un aumento de tamaño en relación a los grupos no tratados, y un menor tamaño tumoral en los animales sialoadenectomizados, ya que en la glándula submaxilar de ratón se encuentran grandes cantidades de *EGF*. La mayoría de los tumores se diagnosticaron histológicamente como carcinoma *in situ* (41).

En células tumorales se ha observado un aumento de formas normales de receptores de los *GFs* que parece que favorecerían el crecimiento y la invasión de las células tumorales. El receptor del *PDGF* normal (*PDGFR*) se ha visto sobreexpresado en una amplia variedad de tumores mesenquimales benignos y malignos (lipomas, hemangioma, leiomioma, angiosarcoma...), y mayor coexpresión con el *PDGF* cuando se trata de tumores malignos que de esta manera mantiene una estimulación autocrina (42).

La sobreexpresión de los *GFs* producidos por las células tumorales, además, estimulan la proliferación de las células estromales (fibroblastos y células endoteliales) necesarias para el crecimiento de tumores sólidos (43). El oncogén *ERBB1*, que codifica el *EGFR*, se ha observado amplificado en el 7-25% de los tumores de cabeza y cuello (34). La expresión del receptor aberrante de *TGFβR-II* contribuye también a la patogénesis del COCE (38).

Otro fenómeno a valorar es la capacidad que tienen las plaquetas para facilitar el proceso de metástasis de las células tumorales. Esto se origina porque las plaquetas recubren las células tumorales, facilitando su supervivencia y adhesión a las paredes vasculares, y por otro lado por aumentar la permeabilidad vascular que permite la penetración tumoral en el tejido perivascular, mediado principalmente por el *VEGF*. Parece además que las células tumorales facilitan la agregación plaquetaria liberando el *VEGF* de las plaquetas que necesitan para su invasión tisular (19, 44). Se ha observado un efecto del *VEGF* inhibitorio de la apoptosis en células madre hematopoyéticas normales y células tumorales leucémicas tras recibir irradiación por rayos gamma, indicando un potencial papel en la supervivencia e inmortalización de estas células (45).

En relación a los tejidos displásicos, Shih y cols. realizaron un estudio experimental en el que observaron la repercusión de la aplicación terapéutica de *PDGF BB* e *IGF I* (4.000 ng/animal de *GF*) sobre mucosa de mejilla donde previamente se había inducido una displasia. Observaron que la aplicación de los *GFs* no producía un efecto exacerbado sobre el tejido displásico para su transformación en carcinomas, en comparación a las muestras donde no se aplicaron los *GFs*. Realizaron una medición de la gamma-glutamyl transpeptidasa (GGT), considerando que este método de tinción sirve para valorar tejidos preneoplásicos; sin embargo los autores establecen que no es un buen método para valorar diferentes grados de displasia. Por otro lado afirmaron que otras concentraciones o valoraciones en el tiempo podrían producir otros resultados, y establecen la necesidad de estudios que aclaren la relación de los *GFs* y la condición precancerosa (46).

DISCUSIÓN

Es conocido que en la carcinogénesis las sustancias promotoras van a actuar únicamente sobre el aumento de la proliferación celular en los clones de células inicialmente mutadas mediante la modificación de algunos procedimientos bioquímicos celulares (p. ej. ésteres de forbol, fenoles, fenobarbital). Si no se promoviera la mitogénesis de esas células ini-

cialmente mutadas, los mecanismos de control podrían desencadenar la muerte de esa célula alterada antes de que pudiera llegar a su diferenciación final (29).

Los concentrados terapéuticos de *GFs* podrían actuar, más que como iniciadores, como promotores en la carcinogénesis, favoreciendo la división y promoción de células previamente mutadas o "iniciadas" en la carcinogénesis, o lo que es lo mismo, como facilitadores de la evolución clonal y de una posible inmortalización y progresión maligna celular. En todo caso, este fenómeno estaría sometido a las exigencias dependientes del tiempo de evolución y de las alteraciones previas para desarrollar una neoplasia.

Al aumentar la división de esa célula mutada por un fenómeno de promoción, se aumenta el riesgo de que aparezcan nuevas alteraciones moleculares oncogénicas que inducirían a la transformación maligna y la progresión tumoral. El aumento de las mitosis en un clon de células iniciadas por un evento mutagénico aumenta las probabilidades de que aparezca un segundo evento mutagénico y así sucesivamente. Sin embargo, este fenómeno podría necesitar de dosis más continuadas en el tiempo que las que se aplican en la terapéutica del *PRP*, teniendo en cuenta que los *GFs* extracelulares se degradan a los 7-10 días (4). Los procesos de internalización y de reciclaje del complejo ligando-receptor podrían mantener la señal mitogénica aumentada pasados esos 7-10 días de sobreconcentración inicial. Por otro lado, desconocemos los efectos del fenómeno de "cross-talk" o señales transversales en la vía de transducción de señal cuando se emiten numerosas y continuas señales desde la membrana plasmática por la sobreconcentración de *GFs*.

Se ha descrito también que, agentes químicos promotores como los ésteres de forbol y en particular el 12-O-tetradecanoil-13-forbol-acetato (*TPA*), parecen estimular la proliferación celular de manera muy similar a como lo hacen los factores de crecimiento y poseen receptores en la membrana celular de fibroblastos y células epidérmicas del ratón, e incluso utilizan para la transcripción el factor *AP-1*. El *TPA*, al igual que el *PDGF*, estimula la activación de una proteína quinasa C (*PKC*, *Protein Kinase C*) proteína implicada en la progresión del ciclo celular en el paso G_2/M (25).

En un revelador estudio se ha comprobado experimentalmente en ratones transgénicos que presentaban una actividad continua de *IGF-I*, que este *GF* ejercía un efecto promotor de la tumorogénesis de piel en lesiones iniciadas anteriormente con 7-12 dimetilbenzantraceno (*DMBA*). Por otro lado, estos animales eran más sensibles a presentar papilomas en presencia de promotores como el *TPA*, sin necesidad de un carcinógeno iniciador anterior. La observación de estos papilomas evidenció que en todos los casos existían mutaciones de *Ha-ras* y además se disminuía de manera significativa la reacción apoptótica tras la aplicación de rayos ultravioleta. También se observó la aparición de papilomas escamosos de manera espontánea (sin aplicar *DMBA* y/o *TPA*) en el 50% de los animales transgénicos de mayor edad (> 6 meses de edad) (47).

Otro factor a considerar es la capacidad antiapoptótica que se ha asignado a ciertos factores de crecimiento (*IGF*, *VEGF*) (40, 45, 47). Teniendo en cuenta las estimaciones que se han hecho en

cuanto a la proliferación de las células mesenquimales en zonas tratadas con PRP (de 1/400.000 células mesenquimales en tejido normal a 1/2 en tejido tratado) (12), ¿hasta qué punto esta masiva proliferación es debida a un fenómeno de quimiotaxis, o bien a un peligroso proceso de mitogénesis y a antiapoptosis, que crearía peligrosas células inmortalizadas?

Los resultados y observaciones aquí descritas son únicamente hipótesis, sospechas o indicios que establecen la posible relación de la aplicación terapéutica de PRP y la carcinogénesis, teniendo en cuenta ciertas semejanzas de ambos mecanismos bioquímicos que se han observado en las investigaciones publicadas y revisadas. En cualquier caso, la revisión de la literatura no ha permitido aportar evidencias científicas que relacionen la aplicación terapéutica de PRP o GFs recombinantes con la transformación carcinomatosa de tejidos normales o displásicos.

Consideramos necesaria la realización de estudios experimentales y clínicos para descartar la existencia de alteraciones genéticas y/o cromosómicas en tejidos donde se han aplicado dosis terapéuticas de GFs. Sólo la evidencia científica de estas futuras investigaciones demostraría que los mecanismos bioquímicos y moleculares que ejercen los sobreconcentrados tisulares de GFs no son carcinogénicos, ni favorecen la

progresión maligna de tejidos displásicos. Aunque no se ha descrito ningún efecto indeseable en los numerosos casos clínicos tratados con esta terapia, la mínima posibilidad de que aparezca una patología tan grave como el cáncer oral justificaría en nuestra opinión la realización de estos estudios.

Los conocimientos previos sobre los efectos y mecanismos de actuación de los factores de crecimiento parecen sugerir como más apropiado:

1.- Realizar técnicas de obtención de PRP de una sola centrifugación, para obtener la mínima dosis efectiva, ya que se han observado similares resultados clínicos e histológicos con respecto a los procedimientos de dos centrifugados para obtener PC.

2.- Evitar la utilización de PRP en pacientes con condiciones precancerosas orales y en la proximidad de lesiones precancerosas (leucoplasia oral, eritroplasia o quelosis solar) y de tejidos con displasia epitelial oral.

3.- Evitar la aplicación de PRP en el "campo de cancerización" de pacientes con exposición previa a carcinógenos o antecedentes de COCE primario. En este sentido consideramos poco recomendable utilizar el PRP en pacientes fumadores y/o bebedores, puesto que están expuestos a potentes agentes mutágenos y tienen por ello una mayor probabilidad de que existan células iniciadas en el proceso de la carcinogénesis (48).

Do ambulatory-use Platelet-Rich Plasma (PRP) concentrates present risks?

SUMMARY

Platelet-Rich Plasma (PRP) concentrates have been widely used in the past decade as a complement to tissue regeneration procedures. The authors who have clinically used PRP refer no risk of infection, disease transmission, or undesirable effects. Nevertheless, there have been reports on the over-expression of growth factors (GFs) and their receptors related to tumour and dysplastic tissues. This has led to evaluation of the possible coincidences between carcinogenesis and the mitogenic pathways employed by GFs. The present study provides a review of the literature on the possible effects of the therapeutic uses of GFs (including PRP) in relation to carcinogenesis, their influence upon tissues with epithelial dysplasia or oral carcinoma, and their relation to tumour growth and infiltration.

Key words: PRP, growth factor, carcinogenesis, oncogenesis.

INTRODUCTION

Lyophilized fibrin and autologous fibrin have been used for decades in traumatology and oral and maxillofacial surgery for compacting and managing an osteoconductive function in graft pla-

cement procedures (1). In the nineties, a number of authors used Platelet-Rich Plasma (PRP) concentrates in application to oral and maxillofacial grafting procedures, in order to secure an autologous fibrin source, activating PRP with bovine thrombin. In addition to the beneficial osteoconductive effects of fibrin, this technique offered a source of growth factors (GFs) for the facilitation of bone healing (2, 3).

PRP was initially obtained from very large blood volumes (500 ml), requiring special and costly techniques making it difficult to use in procedures conducted in an ambulatory setting (3). Moreover, with these systems and in some ambulatory contexts, bovine thrombin was used for activation – a practice that may induce immune rejection and the appearance of coagulopathies. Its use is effectively controversial, and has not been implemented on a European scale.

Growth factors are polypeptides found in different cell types and in the extracellular matrix, and are known to play a key role in the stimulation and regulation of wound healing in different body tissues. GFs appear to regulate different cellular processes such as mitogenesis, chemotaxis, cell differentiation and metabolism (4).

There have been no published references to the risk of infection, disease transmission or any other undesirable effects associated with the use of PRP. On the other hand, little is known of the ideal concentrations of each GF or of the optimum dosage for each concrete therapeutic situation. Furthermore, additional as yet unidentified factors may also exist (4, 5).

In the course of human embryonic development, or in certain tissue regeneration processes, signal integration takes place to coordinate cell proliferation, differentiation, metabolism and apoptosis. The interaction of GFs, other cytokines and hormones with specific cell membrane receptors triggers a series of intracellular biochemical signals that lead to the activation or repression of genes which

control the equilibrium of such processes. However, a series of genetic aberrations can affect these GFs, their receptors or transduction routes, thereby disrupting cellular equilibrium and leading to abnormal neoplastic growth. Consequently, development or regeneration on one hand, and cancer on the other, represent the physiological and pathological aspects of cellular equilibrium (6).

Hollinger et al. have investigated the clinical applications of the so-called Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) (a factor which has not been found in PRP), and claim that no clinical or experimental evidence exists to date to suggest that the exogenous administration of BMPs can induce an oncogenic response. They consider that "BMPs constitute a differentiation factor that promotes mesenchymal cell differentiation towards a normal adult phenotype, and should not be expected to facilitate oncogenesis". Furthermore, "the long-term effects of recombinant BMPs cannot be predicted categorically, and therapeutic BMP doses may possess hidden influences which are not immediately expressed" (7). Based on these statements, and knowing the differences and similarities between BMPs and other GFs found in PRP, it may be concluded that a possible relation between the therapeutic use of GFs and oncogenic processes should not be discarded outright.

The good results obtained by treatments with PRP concentrate are undeniable, yielding improved and faster tissue regeneration (3, 5, 8). However, scientific evidence also indicates that the GFs found in platelets (Platelet Growth Factors, PGFs) are over-expressed in tumour tissues. This leads us to pose a series of questions: 1.-Could the increased concentration of these GFs administered at therapeutic doses and in certain tissues and anatomical locations induce oncogenic processes in normal tissues? 2.-Could such processes be induced in dysplastic tissues or tissues which have been exposed to carcinogens? 3.-What biochemical mechanisms should cause us to suspect that oncogenesis might occur in a dose- or time-dependant manner?

GFs act upon the cell membrane, through which they transmit their corresponding signal to the cell nucleus. The simplistic notion that such factors are unable to induce genetic effects because they are not actually incorporated to the cell nucleus should lead us to remember that the GFs levels found in PRP are therapeutic rather than physiological doses, and therefore act indirectly upon cell proliferation and DNA replication, via complex signal transduction pathways. The present study provides a review of the literature on the possible effects of the therapeutic utilization of GFs (including PRP) in relation to carcinogenesis, their influence upon tissues with epithelial dysplasia or oral carcinoma, and their relation to tumour growth and infiltration.

PLATELET GROWTH FACTORS (PGFs)

Platelets are non-nucleated, discoid-shaped megakaryocyte fragments with a normal count of 150,000-400,000/ μ l of blood ($1.5-4 \times 10^5$ /ml). In the event of injury, the platelet membrane binds to Von Willebrand's plasmatic factor (via glycoprotein Ib), which causes the platelets to bind to the exposed collagen fibers in the vascular wall (adhesion) and to each other (platelet aggregation). Such platelet aggregation takes place via fibrinogen links between membrane glycoproteins (glycoprotein IIb-IIIa). Platelet activation (degranulation) can be induced by different mechanical as well as chemical mechanisms. One of the most important degranulation stimuli is platelet adhesion to collagen and other subendothelial components, or the presence of thrombin. All platelet activation mechanisms appear to involve the activation of cell membrane phospholipases

which promote Ca^{2+} release – which in itself is responsible for aggregation and secretion. Platelet degranulation in turn releases thromboxane A2 (Tx A2), adenosine diphosphate (ADP) and serotonin, which stimulate the recruitment and activation of additional surrounding platelets. Degranulation also releases fibrinogen, fibronectin and interleukins (ILs) 1, 3 and 6. Activated platelets become spherical and spindle-shaped, with pseudopod movements and degranulation (9).

After aggregating and activating, the platelets release further aggregating factors which in combination with the plasma phase of blood coagulation give rise to thrombin formation and the subsequent conversion of soluble fibrinogen to the non-soluble fibrin network. The α granules released by activated platelets contain a series of known GFs, though others are surely also present that remain to be identified (10, 11). In this context, there are variations in the procedures used to obtain PRP, and these undoubtedly modify both the amount of PRP obtained and the corresponding GF concentrations. Among the existing procedures, we can distinguish between single- and two-step centrifugation techniques (Table 1) (12-14). The different GFs identified within platelets are in turn described in Table 2 (15-20).

The mechanisms of action of the different GFs upon the cells are quite similar, though knowledge of the precise molecules and specific pathways of each factor is still limited. On the other hand, different GFs are able to induce opposite biological effects in the same type of cell (e.g., PDGF and TGF β). In the bloodstream the factors bind to specific proteins (Binding Proteins, BPs) of which little is known, that prevent their rapid degradation. In general, GFs act at cell membrane level through specific receptors. Upon activation, these receptors trigger tyrosine-kinase (PDGF, FGF, IGF, VEGF, EGF) or serine-threonine-kinase (TGF β , BMPs) type phosphorylation activity within the cytoplasm, which in turn activates specific signal transduction routes that posteriorly reach the cell nucleus to induce the expression of specific genes. The final effect is multifunctional and depends on the target cell involved, its relation to other cells, the extracellular matrix, and the presence of other GFs (21, 22).


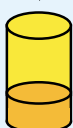
One of the actions of GFs focuses on cell differentiation. In bone tissue, the molecular mechanism whereby GFs favour osteoblastic differentiation of the Mesenchymal Stem Cells (MSCs) has been described. This process appears to involve SMAD transduction molecules and transcription factors CBFA-1 (Core Binding Factor A) and AP-1 (17, 23, 24).

In relation to the mitogenic effect of GFs, the transduction signal reaching the cell nucleus induces the activation of transcription factors such as ELK-1, which transcribes the proto-oncogenes *c-fos* and *c-jun* or directly phosphorylates factor AP-1, the latter being a transcription factor for transcribing other genes implicated in mitogenesis (e.g., the cycline *D₁* gene, also known as *PRAD1* or *CCND1*). In relation to this signal, a key role appears to be played by the cytoplasmic route *Ras/Raf/MEK/MAPK* (MAPK: Mitogenic-Activated Protein Kinase Protein; MEK from the acronym MAPK/ERK; ERK: Extracellular Regulated Kinase) – though other specific kinases also intervene (JNKs: Jun N-terminal Kinase and FRKs: Fos Regulated Kinase) (Fig. 1). This route also possesses a negative feedback mechanism, however, whereby excess Ras stimulation induces P21 protein, which in turn slows the cell cycle. In other situations the signal pathway leads to the phosphorylation of transcription factors which are present both in the cytoplasm and in the nucleus (e.g., protein p91, which translocates to the nucleus and transcribes genes such as *c-fos*) (25, 26).

In any case, it has been established that when a GF binds to its cell receptor it induces only a single cell division, since signaling

TABLA 1

Procedures for obtaining Platelet-Rich Plasma (PRP)

MANUAL TECHNIQUE: 1 CENTRIFUGATION	MANUAL TECHNIQUE: 2 CENTRIFUGATIONS
4.5 ml blood + 0.5 ml anticoagulant (3.8% sodium citrate) Centrifugation at 280 g (1400 rpm) for 7 minutes	SmartPREP® (Harvest Technologies, Norwel, USA)
 <ul style="list-style-type: none"> - 0.5 ml PPP yellow phase (discard) (discard) - PRP red phase (cellular component) 	45-50 ml blood (according to sex or hematocrit) 12 minutes first centrifugation 1. 3650 rpm 2. 60 rpm
1 ml PRP + 50 µl CaCl ₂ 10% 5-8 minutes at room temperature or 2-3 minutes at 37° C	Obtained second centrifugation at 3000 rpm 7 ml PC of 90 ml blood complete Platelet Concentrate (PC) at the bottom of the plasma chamber
Gel consolidation	 <ul style="list-style-type: none"> 2/3 PPGF 1/3 PC
Place in bone defect. After placing the PRP in the receptor bed, the platelets appear to totally degranulate within 3-5 days, and GF activity would terminate after 7-10 days (4, 12).	<ul style="list-style-type: none"> • With this procedure, activation is advised with a mixture of 1 ml of bovine thrombin and calcium chloride (4, 8, 13).
PPP: Platelet-Poor Plasma PRP: Platelet-Rich Plasma	<ul style="list-style-type: none"> • 22.8 x 10⁸ platelets/ml are obtained in the PC (13). Other studies (Landesberg et al.) have observed that with a procedure involving 2 centrifugations, the highest concentrations would be obtained with 2 centrifugations at 200 g for 10 minutes (14).

causes the GF effect to inactivate due to internalization of the ligand-receptor complex. Thus, the cell requires the arrival of a new signal to divide again (21, 22).

THE RELATION BETWEEN PGFs AND ORAL CARCINOGENESIS

Human tumour development is very complex process which requires the accumulation of multiple oncogenic molecular alterations capable of overcoming the physiological control of cell proliferation and different immune obstacles. The malignant transformation of normal cells implies failure of cell differentiation and the activation of cell proliferation – with variations according to the type of cell involved which depend on the host capacity to repair the different reversible alterations occurring in the course of malignant transformation. The epigenetic theory of carcinogenesis is now widely accepted. According to this theory, a first initiation phase is established in which DNA suffers irreversible changes. This is followed by promotion to increase the probability of the appearance of new cellular genetic alterations, and finally by progression of the transformation of initially benign cells into malignant cells (27-29).

It should be taken into account that normal cells are only able to divide a certain number of times, until a limit is reached (the so-called Hayflick limit), after which the cells undergo a series of biochemical changes and enter senescence. It has been calculated that a fibroblast in a middle-aged person can divide 20-40 times, yielding 2⁴⁰ cells at the end of the resulting division cascade. Acquisition of

the capacity to divide an unlimited number of times is known as immortalization, as is considered to be an important step in the malignant transformation of normal cells. The need for such an immortalization process for the development of tumors is subject to debate, however, since cells at the Hayflick limit have been observed in large tumours. The cell control mechanisms (fundamentally suppressor and pro-apoptotic genes) prevent the cell from exceeding this limit, and cause it to either undergo apoptosis or enter a senescent/terminal differentiation phase (30).

With the aim of determining whether some relation exists between carcinogenesis and the mitogenic effects of PRP concentrates, a series of questions can be raised and attempts will be made to answer them, based on a review of the studies published in the literature.

1.- In the event of GF over-concentration, is membrane receptor over-expression induced as a result? If so, would it occur normally or physiologically, or only in tumor tissue? Could this give rise to mutant receptors?

Tumor cells have been seen to possess approximately 400,000 normal receptors per cell (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR) - in contrast to normal fibroblasts, which may have 5,000-10,000 receptors per cell. This comparative increase seems to be due to alterations of the receptor-encoding genes rather than to GF over-production, though the latter would still increase via an autocrine mechanism. In normal tissue the increase in receptor number seems to be moderate and transient. On the other hand, GF over-expression seems unlikely to give rise to receptor mutation (31).

TABLE 2

Platelet growth factors (PGFs)(included in Platelet-Rich Plasma, PRP)

TRANSFORMING GROWTH FACTOR TGFβ	<i>ISOFORMS</i>	5 isoforms β_1 , and β_2 , are the most extensively investigated forms
	<i>PRODUCER CELLS</i>	Platelets, macrophages, lymphocytes neutrophils, MSCs, osteoblasts, bone matrix
	<i>FUNCTION</i>	Chemotaxis, MSC differentiation, osteoblast collagen production favoring angiogenesis, inhibiting osteoclast formation and bone resorption (12). Exerts mitogenic effect on mesenchymal cells and inhibits epithelial cell proliferation, depending on the presence of other GFs (15)
PLATELET DERIVED GROWTH FACTOR, PDGF	<i>ISOFORMS</i>	3 isoforms: AA, AB and BB
	<i>PRODUCER CELLS</i>	Platelets (mainly), macrophages, osteoblasts (isoform BB), chondrocytes, fibroblasts and endothelial cells
	<i>FUNCTION</i>	Facilitates angiogenesis indirectly via macrophages, which act upon the endothelial cells, chemotactic effect and activation of inflammatory cells (macrophages); facilitates chemotaxis and mesenchymal cell proliferation (mitogenesis); facilitates collagen type I formation; 50% of mitogenic effect originates from platelets (16, 17)
FIBROBLAST GROWTH FACTOR: FGF	<i>ISOFORMS</i>	2 isoforms. Types I and II Form II (basic) seems to be the most potent in terms of mitogenic function
	<i>PRODUCER CELLS</i>	Fibroblasts (mainly), macrophages, osteoblasts, platelets and endothelial cells
	<i>FUNCTION</i>	Increases proliferation and differentiation of osteoblasts and inhibition of osteoclasts. Acts upon fibroblasts, increasing their proliferation and production of fibronectin. Favors angiogenesis via mitogenic and chemotactic action on endothelial cells
INSULIN LIKE GROWTH FACTOR: IGF	<i>ISOFORMS</i>	2 isoforms. Types I and II
	<i>PRODUCER CELLS</i>	Platelets, macrophages, osteoblasts, MSCs and bone matrix
	<i>FUNCION</i>	Stimulates proliferation (mitogenesis) and differentiation of MSCs and lining cells, as well as osteoblast formation of osteocalcin, alkaline phosphatase and type I collagen; induces differentiation of MSCs and lining cells, during bone remodeling, in the same way as the BMPs and TGF β (12)
ENDOTHELIAL VASCULAR ENDOTHELIAL FACTOR: VEGF)	<i>ISOFORMS</i>	4 isoforms. Also known as Vascular Permeability Factor (VPF)
	<i>PRODUCER CELLS</i>	Platelets, macrophages, osteoblasts and smooth muscle cells – particularly under conditions of hypoxia
	<i>FUNCTION</i>	Acts upon chemotaxis and proliferation of endothelial cells, with vessel hyper-permeability. Action appears to be regulated by TGF β and PDGF (18, 19)
EPIDERMAL GROWTH FACTOR: EGF	<i>ISOFORMS</i>	1 isoform. Great similarity to TGF α , causing them to bind to the same receptor
	<i>PRODUCER CELLS</i>	Platelets, fibroblasts, endothelial cells
	<i>FUNCTION</i>	Possesses mitogenic, pro-apoptotic, migratory and differentiation activity not only upon epithelial cells but also on fibroblasts, renal cells and glial cells derived from mesenchymal cells (20)

Regarding the GF receptors, it has been shown in tumor cells that over-expression of these normal receptors may exist (32), induced by an autocrine over-production of mutant GFs (e.g., increased mutant PDGF due to oncogene expression) or an over-production of normal GFs. Alternatively, the receptors may exhibit an abnormal, aberrant morphology causing them to be permanently activated (allosteric dimerization) – without the need for GF binding. As a result, the receptors would continuously emit inadequate and aberrant signals to the cell nucleus (22).

In certain situations, however, activation of the EGF receptor (EGFR) in certain tumour cells may induce cell proliferation arrest and apoptosis. This effect appears to be mediated by transcription-regulating proteins called STATs (Signal Transducers Activators Transcription), which increase expression of the cell cycle inhibitor P21^{WAF1/CIP1} and thus block the cycle, and by Caspase 1 – a protease implicated in cell apoptosis.

In tumour cells the presence of an excessively large number of normal EGFR copies induces increased sensitivity to the corresponding ligands, which even at very low concentrations are able to stimulate the cells and induce proliferation. On the other hand, internalization (with elimination of the GF-receptor complex from the cell membrane) is slower under these circumstances, since the endocytic capacity of the cell is overwhelmed. As a result, the cells are unable to adequately suppress the continuously generated mitogenic signals (Fig. 2) (31).

2.- In the event of receptor over-expression, could the receptor-ligand complexes become internalized and return to the cell membrane to emit their mitogenic signal even in the absence of external GF over-expression?

Once the ligand-receptor complex has completed signaling, it appears to undergo internalization which may lead to two different situations: lysosome-mediated proteolytic degradation or a return to the cell membrane where the complex may resume mitogenic signaling (Fig. 3). EGFR internalization reduces the mitogenic signal, thereby playing a relevant role in preventing uncontrolled cell proliferation. While in the endosome phase of internalization, the receptor-ligand complex appears to retain important signaling functions. In fact, in cells with mutations of the genes encoding for the proteins implicated in erbB receptor internalization, increased cell proliferation and transformation into malignant phenotypes is observed. The recycling tendency of EGFR is greater when the receptor binds to TGF α than when it binds to EGF (31).

3.- In the presence of both GF and receptor over-expression, would the mitogenic signal be transmitted by all the receptors to the nucleus - with multiple gene activation - or would the arrival of one signal in the nucleus inactivate the rest?

Signaling routes saturated by an external over-concentration of GFs could give rise to abnormal signals, of which little is known, since the cellular signaling pathways are functionally interconnected, leading to so-called “cross-talk” among cells. Obviously, the GF targets would be continuously “working” as a result, and on becoming saturated the signals emitted by additional receptors might be ignored due to a lack of available receptors.

Regarding the signal transducers (i.e., secondary messengers), the proteins encoded for by the Ras family of genes are the most extensively studied to date. It is estimated that 30% of all human tumours have an activated Ras oncogene. Its principal action focuses on transmission of the mitogenic signal through the Ras/Raf/MEK/MAPK pathway to the cell nucleus. The Ras protein triggers the signal upon binding to guanine triphosphate (GTP). An

important enzyme intervenes in conversion of the active form Ras-GTP to the inactive form Ras-GDP: the so-called GTPase-activating protein (GAP). In the presence of mutation, the Ras protein is permanently bound to GTP, and is resistant to GAP action. This in turn produces a continuously active mitogenic signal-transducing complex. In relation to this pathway, an important enzyme also appears to exist (phosphatidylinositol-3-kinase, p13K) - though it is not clear whether it is a Ras activator or intervenes at a lower level as a Ras mediator. In addition to its mitogenic function, the Ras protein also exerts negative regulatory action upon the cell cycle by inducing the expression of protein P53 and the subsequent P21 protein (26, 33).

4.- What genes implicated in cell cycle progression would directly receive the GF mitogenic signals? Could their continuous or excessive transcription increase the possibility of mutations or oncogene activation?

When the GF signals reach the cell nucleus, a series of transcription factors come into play to facilitate transcription of different genes implicated in the cell cycle or in the phenotypic differentiation of cells. The proto-oncogenes c-Jun and c-Fos are rapidly and transiently induced following treatment with GFs. The genes of these two families control the proliferative response on a primary basis, cascade-activating (or inhibiting) genes whose products either start or stop the cell cycle. Over-expression of c-Jun has been identified in lung, colon and rectal cancers (26). The oncogenic protein v-Jun, derived from the oncogene v-Jun, shows permanent DNA binding affinity, and therefore possesses greater transcriptional activity than c-Jun.

Regarding the protein of the proto-oncogene c-Myc (i.e., c-Myc), it is now known that its mere over-expression leads to cell transformation, without requiring the presence of the mutant form – though such over-expression is preceded by chromosomal translocations (25). The Myc oncogene has been shown to be amplified in 4-15% of head and neck tumors, and such amplification is thought to be associated with advanced tumour stages (34). In squamous cell carcinomas of the head and neck, chromosomal amplifications have been found in 11q13 in 20-50% of cases. In this location is found the gene encoding for cycline D₁ and for FGF (FGF3 and FGF4)(34). In these tumors there have also been descriptions of depletions of gene P16 (chromosome 9p21)(an important inhibitor of the cycline D₁-CDK4 complex) in initial neoplastic stages (dysplasia and carcinoma in situ), which would precede the inactivation of P53 (27).

RELATION OF PGFS TO ORAL EPITHELIAL DYSPLASIA AND ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA (OSCC) GROWTH AND INFILTRATION

Associations have been established between the over-expression of GFs and their receptors, and tumour or dysplastic tissues.

1.- Does GF over-expression in tumor tissues involve normal GFs or are they mutant peptides? In the presence of cancer or dysplastic cells in tissue, would PRP concentrates facilitate their proliferation and migration by favouring mitogenesis and angiogenesis?

In general, GF over-expression in tumor tissues is considered to involve normal polypeptide sequences induced by the tumor cells via an autocrine or paracrine mechanism to maintain the tumour phenotype without requiring the contribution of external GFs. On the other hand, very little known is known on the tumour activation of cells due to the presence of mutant GFs (26).

GF over-expression has been observed in carcinomas of the oral mucosa, ovary, breast, lung, esophagus and stomach, as well as in osteosarcomas. A series of tumours are known to over-express GFs.

Thus, BMP-2 over-expression has been identified in relation to pleomorphic adenoma and epidermoid carcinoma of the tongue or gums – indicating malignant progression due to the ectopic formation of bone or chondroid structures (35). In turn, a significant increase in FGF-II has been identified in OSCC, with progressively greater expression from the early stages of carcinogenesis (hyperplasia, dysplasia, carcinoma in situ), and important reductions on discontinuing tobacco smoking (36).

Sulzbacher et al. carried out a clinical study of 23 osteosarcomas and 17 osteoblastomas to determine the expression of PDGF-AA and the PDGFR- α receptor. The osteosarcomas showed a 33.9% positivity for the GF versus 27.1% for the receptor – with lesser expression in the lower grade tumors. The osteoblastomas showed significantly less expression than the osteosarcomas (15.7% for the factor and 17.5% for the receptor). In addition, a correlation was established between factor and receptor co-expression in the osteosarcomas, though not so among the benign tumours (37).

TGF- β has been described as an inhibitor of epithelial cell proliferation. In addition, a loss of SMAD-2 expression is observed in 38% of cases of OSCC, and is comparatively greater in the poorly differentiated malignancies. Moreover, Polymerase Chain Reaction (PCR) techniques have shown this loss to be due to mechanisms unrelated to genetic alterations (38). However, TGF- β over-expression has been associated to epithelial tumour progression by facilitating stromal proliferation and angiogenesis, and by exerting immune suppressor action (15).

Prospective clinical studies have reported a significant increase in IGF-I and IGFBP-3 binding protein in plasma, with an increased risk of developing prostate epithelial cancer (Odds Ratio 2.41). No such relation is observed for IGF-II (39). Pollak et al. suggested that serum IGF higher levels are related to increased epithelial turnover locally. The potent mitogenic and anti-apoptotic effect of IGF would imply locally increased cell proliferation (40).

Experimental studies in hamsters have also been made of the effect of exogenous EGF (10 μ g/kg body weight, or approximately 1,400 ng/animal) upon the growth of a tumour induced in oral mucosa by 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene (DMBA). After 14 weeks the EGF-treated tumours were seen to have increased in size compared with the untreated groups, with a smaller tumour size among the animals subjected to sialadenectomy – since the murine submaxillary gland contains abundant EGF. Most of the tumors were histologically diagnosed as carcinoma in situ (41).

Tumour cells have been found to exhibit an increase in normal receptors of GFs, which appears to favour tumour cell growth and infiltration. The normal PDGF receptor (PDGFR) has been shown to be over-expressed in a large variety of both benign and malignant mesenchymal tumours (lipomas, hemangioma, leiomyoma, angiosarcoma, etc.), with increased co-expression with PDGF in the case of malignant lesions – which in this way maintain autocrine stimulation (42).

The over-expression of GFs produced by tumour cells moreover stimulates the proliferation of stromal cells (fibroblasts and endothelial cells) required for the growth of solid tumors (43). The ERBB1 oncogene, which encodes for EGFR, has been shown to be amplified in 7-25% of head and neck tumours (34). Expression of the aberrant receptor of TGF β R-II also contributes to the pathogenesis of OSCC (38).

Another phenomenon requiring consideration is platelet capacity to facilitate tumour cell metastasis. This is explained by the fact that platelets coat the tumour cell surface, thus facilitating their survival and adhesion to the vascular walls. On the other hand, vascular permeability is increased, thus allowing tumour cell penetration to the perivascular tissues – principally mediated by VEGF. Moreover, it

seems that the tumour cells facilitate platelet aggregation, releasing from the latter the VEGF required for tissue infiltration (19, 44). An inhibitory effect of VEGF upon apoptosis has been observed in normal hematopoietic stem cells and leukemic tumour cells following irradiation with gamma rays – thus indicating an important role in the survival and immortalization of these cells (45).

As regards dysplastic tissues, Shih et al. conducted an experimental study demonstrating the repercussions of the therapeutic application of PDGF-BB and IGF-I (4000 ng GF per animal) upon cheek mucosa subjected to prior dysplasia induction. They found that application of the GFs did not exert an exacerbated effect upon the dysplastic tissue as regards transformation into carcinoma, compared with samples not exposed to GFs. They determined gamma-glutamyl transpeptidase (GGT), considering this staining method to be adequate for assessing preneoplastic tissues. However, the authors pointed out that the method is not suitable for evaluating different degrees of dysplasia. On the other hand, they considered that other concentrations or evaluations in time could yield different results, and pointed out the need for further studies to clarify the relation between GFs and precancerous states (46).

DISCUSSION

In carcinogenesis, promoting substances are known to act only upon increased proliferation among the initially mutated cell clones, by modifying certain cellular biochemical processes (e.g., phorbol esters, phenols, phenobarbital). If the mitogenesis of these initially mutated cells were not promoted, the host control mechanisms could induce the death of these altered cells before the latter reach end-differentiation (29).

Therapeutic GF concentrates could act more as promoters than as initiators of carcinogenesis, favouring the division and promotion of previously mutated or carcinogenically “initiated” cells, i.e., as facilitators of clonal evolution and of cellular immortalization and malignant progression. In any case, however, this phenomenon would be subject to the evolution time and existing prior alterations for developing a neoplasm.

On increasing mutated cell division as a result of promotion phenomena, the risk increases for new oncogenic molecular alterations to occur, capable of inducing malignant transformation and tumour progression. Enhanced mitosis in a clonal cell line triggered by a mutagenic event increases the likelihood of successive mutagenic events. However, this phenomenon could require more continuous doses in time than those applied in PRP therapy, taking into account that extracellular GFs degrade within 7-10 days (4). The ligand-receptor internalization and recycling processes could maintain increased mitogenic signaling beyond these 7-10 days of initial over-concentration, however. On the other hand, little is known of the effects of cellular “cross-talk” (i.e., transverse signaling within the signal transduction pathway), when numerous and continuous signals are emitted from the cell membrane due to GF over-concentration.

It has also been reported that certain chemical promoters such as phorbol and particularly 12-O-tetradecanoyl-13-phorbol-acetate (TPA) appear to stimulate cell proliferation in a way very similar to GFs, possessing receptors on murine epidermal cell and fibroblast membranes, and even making use of factor AP-1 for transcription purposes. TPA, in the same way as PDGF, stimulates the activation of Protein Kinase C (PKC), implicated in cell cycle progression in stage G₂/M (25).

In a revealing study it has been shown experimentally in transgenic mice exhibiting continuous IGF-I activity that this GF exerts a promoter effect on skin tumour genesis in lesions previously initia-

ted with 7-12 dimethyl benzanthracene (DMBA). On the other hand, these animals were more susceptible to developing papillomas in the presence of promoters such as TPA, without requiring prior exposure to the mentioned initiating carcinogen. The observation of these papillomas indicated the existence of Ha-ras mutations in all cases, with a significant decrease in apoptotic reaction after the application of ultraviolet rays. Squamous papillomas were also seen to develop spontaneously (without applying DMBA and/or TPA) in 50% of the older transgenic mice (> 6 months of age) (47).

Another aspect to be taken into account is the anti-apoptotic capacity attributed to certain growth factors (IGF, VEGF) (40, 45, 47). Considering the estimations made as regards the proliferation of mesenchymal cells in zones treated with PRP (from 1/400,000 mesenchymal cells in normal tissue to 1/2 in treated tissue)(12), up to what extent would such massive proliferation be due to chemotactic phenomena or to a hazardous mitogenic and anti-apoptosis processes, and which would give rise to dangerous immortalized cells?

The results and observations described here are mere hypotheses, suspicions or indications defining a possible relation between the therapeutic application of PRP and carcinogenesis – taking into account certain similarities of both biochemical mechanisms reported in the literature. In any case, however, a review of the literature has yielded no scientific evidence relating the therapeutic application of PRP or recombinant GFs to the carcinomatous transformation of normal or dysplastic tissues.

We consider further experimental and clinical research to be necessary to discard the existence of genetic and/or chromosomal alterations in tissues exposed to therapeutic doses of GFs. Only the scientific evidence provided by such studies will be able to show that the biochemical and molecular mechanisms influenced by GF tissue over-concentration are not carcinogenic and do not favour malignant progression of dysplastic tissues. Although no undesirable

effects have been reported in the many clinical cases subjected to such therapy, the minimal possibility of serious pathology such as oral cancer justifies the conduction of such studies.

Prior knowledge of the effects and mechanisms of action of GFs appears to advise the following:

1.- Perform single-centrifugation PRP obtainment techniques, to secure the minimum effective dose, since the observed clinical and histological results are similar to those afforded by double-centrifugation procedures for obtaining plasma concentrates (PCs).

2.- Avoid the use of PRP in patients with precancerous oral conditions and in the vicinity of precancerous lesions (oral leukoplakia, erythroplasia or solar cheilitis) and areas of oral epithelial dysplasia.

3.- Avoid the use of PRP in patients with a prior history of exposure to carcinogens or primary oral squamous cell carcinoma. In this sense we consider it unadvisable to administer PRP to smokers and/or drinkers of alcohol, since such individuals are exposed to potent mitogens and are therefore more likely to present cells initiated in the process of carcinogenesis (48).

CORRESPONDENCIA/CORRESPONDENCE

J.M. Martínez-González
Departamento de Medicina y Cirugía Bucofacial
Facultad de Odontología. Universidad Complutense de Madrid
Avda. Complutense s/n
28040-Madrid
Tfno.: 913941964 /67/03, fax: 913941973
E-mail: jmargo@odon.ucm.es

BIBLIOGRAFÍA/REFERENCES

1. Arbes H, Bösch P, Salzer M. First clinical experience with heterologous cancellous bone grafting, combined with the fibrin adhesive system (FAS). Arch Orthop Trauma Surg 1981; 98: 183-8.
2. Whitman DH, Berry R, Green D. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with application in oral and maxillofacial surgery. J Oral Maxillofac Surg 1997; 55: 1294-9.
3. Marx R, Carlsson E, 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: 638-46.
4. Garg AK. The use of platelet rich plasma to enhance the success of bone grafts around dental implants. Dent Impl Update 2000; 11: 17-20.
5. Anitua E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. Int J Oral Maxillofac Impl 1999; 14: 529-35.
6. Lorenzo M, Valverde AM. Receptores y factores de crecimiento tirosinaquinasa. Rev Cancer 1999; 13: 110-5.
7. Hollinger JO, Buck DC, Bruder SP. Biology of bone healing: its impact on clinical therapy. In: Lynch SE, Genco RJ, Marx RE (eds.) Tissue engineering. Applications in maxillofacial surgery and periodontics. Illinois: Quintessence Editores 1999. p. 17-53.
8. Man D, Plosker H, Winland-Brown JE. The use of autologous platelet rich plasma (platelet gel) and autologous platelet-poor plasma (fibrin glue) in cosmetic surgery. Plast Reconstr Surg 2001; 107: 229-37.
9. Esnaola MM. Diagnóstico y tratamiento de las coagulopatías. 1998. www.neurología.rediris.es/congreso-1/conferencias/vascular-2.htm.
10. Mundy GR. Factores locales en el control de la reabsorción y formación de hueso. In: Cannata JB (eds.) Actualizaciones en metabolismo óseo. Madrid: Jarpyo Editores 1992. p. 41-6.
11. Anitua E. La utilización de los factores de crecimiento plasmáticos en cirugía oral, maxilofacial y periodoncia (PRGF). RCOE 2001; 6: 305-15.
12. 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. Illinois: Quintessence Editores 1999. p. 71-82.
13. Información Comercial Técnica Harverst. 2001. www.harverstech.com/USSPRep.htm.
14. Landesberg R, Roy M, Glickman RS. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet rich plasma gel preparation. J Oral Maxillofac Surg 2000; 58: 297-300.
15. Kloen P, Gebhardt MC, Perez-Atayde A, Rosenberg AE, Springfield DS, Gold LI *et al.* Expression of transforming growth factor-β (TGF-β) isoforms in osteosarcomas. TGF-β3 is related to disease progression. Cancer 1997; 80: 2230-9.

16. Ross R, Raines EW, Bowen-Pope DF. The biology of platelet derived growth factor. *Cell* 1986; 46: 155-69.
17. Barnes G, Kostenuik P, Gerstenfeld L, Einhorn TA. Growth factor regulation of fracture repair. *J Bone Min Res* 1999; 14: 1805-15.
18. Lakey LA, Akella R, Ranieri JP. Angiogenesis: implications for tissue repair. In: Davies JE (eds.) *Bone engineering*. Toronto: Em squared Editores 2000. p. 137-42.
19. Banks RE, Forbes MA, Kinsey SE, Stanley A, Ingham E, Walters C *et al*. Release of the angiogenic cytokine vascular endothelial growth factor (VEGF) from platelets: significance for VEGF measurements and cancer biology. *Br J Cancer* 1998; 77: 956-64.
20. Bolufer P. Factor de crecimiento epidérmico y su papel en el desarrollo tumoral. *Oncología* 1988; 11: 1-7
21. Martínez-Valverde AM, Lorenzo M. Transducción de señales mitogénicas y de diferenciación celular. *Rev Cancer* 1999; 13: 100-9.
22. Martín D. Activación oncogénica de receptores tirosina quinasa. *Rev Cancer* 1995; 9: 202-18.
23. Yamaguchi A, Komori T, Suda T. Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa 1. *Endocrine Reviews* 2000; 21: 393-411.
24. Gronowicz G, Krause A, Mc Carthy MB, Cowles EA. Integrin-mediated signaling osteoblasts on implant materials. In : Davies JE (eds.) *Bone engineering*. Toronto: Em squared Editores 2000. p. 256-67.
25. Caelles C, Muñoz A. Oncogenes nucleares. *Rev Cancer* 1999; 13: 27-40.
26. Perkins AS, Stern DF. Molecular biology of cancer: Oncogenes. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA (eds.) *Cancer: principles & practice of oncology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers Editores 1997. p. 79-192.
27. Sidransky D. Cancer of the head and neck. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA (eds.) *Cancer: principles & practice of oncology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers Editores 1997. p. 735-40.
28. Ramón y Cajal S. Carcinogénesis humana. *Rev Cancer* 1999; 13: 116-28.
29. Trosko JE, Ruch R. Cell-cell communication in carcinogenesis. *Frontiers in Bioscience* 1998; 15: 208-36.
30. Reddel RR. The role of senescence and immortalization in carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2000; 21: 477-84.
31. Palomo-Jiménez PI, Ruano MJ, Villalobo. El receptor del factor de crecimiento epidérmico. *Vitae. Academia Biomédica Digital* 2000, 5: <http://caibco.ucv.ve/Vitae/VitaeCinco/Articulos/BiologiaCelular/internal.htm>.
32. Merlino GT, Xu YH, Ishii S, Clark AJ, Semba K, Toyoshima K *et al*. Amplification and enhanced expression of the epidermal growth factor receptor gene in A431 human carcinoma cells. *Science*, 1984; 224: 417-9.
33. Lucas L, Lacal JC. Efectos moleculares de las proteínas Ras. *Rev Cancer* 1999; 13: 16-26.
34. Rodrigo JP, Suárez C, Sánchez P, Ramos S, Coto E, Álvarez V *et al*. Alteraciones moleculares en los carcinomas epidermoides de la orofaringe. *Acta Otorrinolaringol Esp* 2001; 52: 24-31.
35. Jin Y, Tipoe GL, Liong EC, Lau TYH, Fung PCW, Leung KM. Over-expression of BMP 2/4 and BMPR-IA associated with malignancy of oral epithelium. *Oral Oncology* 2001; 37: 225-33.
36. Hughes CJ, Reed JA, Cabal R, Huvos AG, Albino AP, Schantz SP. Increased expression of basic fibroblast growth factor in squamous carcinogenesis of the head and neck is less prevalent following smoking cessation. *Am J Surg* 1994; 168: 381-5.
37. Sulzbacher I, Träxler M, Mosberger I, Lang S, Chott A. Platelet derived growth factor-AA and α -receptor expression suggests an autocrine and/or paracrine loop in osteosarcoma. *Mod Pathol* 2000; 13: 632-7.
38. Muro-Cacho CA, Rosario-Ortiz K, Livingston S, Muñoz-Antonia T. Defective transforming growth factor β signaling pathway in head and neck squamous cell carcinoma as evidenced by the lack of expression of activated samad 2. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 1618-26.
39. Chan JM, Stampfer MJ, Giovannucci E, Gann PH, Ma J, Wilkinson P *et al*. Plasma insulin-like growth factor-I and prostate cancer risk: a prospective study. *Science* 1998; 279: 563-6.
40. Pollak M. Insulin-like growth factor physiology and cancer risk. *Eur J Cancer* 2000; 36: 1224-8.
41. Harada K, Yura Y, Tsujimoto H, Kusaka J, Yoshida H, Sato M. Effect of local administration of epidermal growth factor on 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene induced tumour formation in hamster cheek pouch. *Oral Oncol Eur J Cancer* 1995; 31B: 27-31.
42. Palman C, Bowen-Pope DF, Brooks JJ. Platelet derived growth factor receptor (β -subunit) immunoreactivity in soft tissue tumors. *Lab Invest* 1992; 66: 108-15.
43. Woodburn JR. The epidermal growth factor receptor and its inhibition in cancer therapy. *Pharmacol Ther* 82: 241-50.
44. Mehta P. Potential role of platelets in the pathogenesis of tumor metastasis. *Blood* 1984; 63: 55-63.
45. Katoh O, Tauchi H, Kawaishi K, Kimura A, Satow Y. Expression of the vascular endotelial 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: 5687-92.
46. Shih SD, Rees TD, Miller EG, Wright JM, Iacopino AM. The effects of platelet-derived growth factor-BB and insulin-like growth factor on epithelial dysplasia. *J Periodont* 1996; 67: 1224-32.
47. DiGiovanni J, Bol DK, Wilker E, Beltran L, Carvajal S, Motas S *et al*. Constitutive expression of insulin-like growth factor-I in epidermal basal cells of transgenic mice leads to spontaneous tumor promotion. *J Cancer Res* 2000; 60: 1561-70.
48. Peñarrocha M, Sanchís JM, Martínez-González JM. Factores de crecimiento y proteínas que influyen en el crecimiento óseo: aplicaciones en implantología oral. *Periodoncia* 2001; 11: 205-16.