

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

POSTGRADO DE CIRUGÍA BUCAL

**EVALUACIÓN Y COMPARACIÓN *IN VITRO* DE LAS
CARACTERÍSTICAS ULTRAESTRUCTURALES DE FIBRINA RICA
EN PLAQUETAS (FRP) BAJO MICROSCOPIA ELECTRÓNICA EN
PACIENTES TRATADOS EN EL POSTGRADO DE CIRUGÍA BUCAL
DE LA UCV.**

Autor: Daniel Requena Rachadell

Tutor: Angela Lamura Anselmi

Caracas, octubre de 2012

Jurado Examinador

Principales

Prof. Héctor José Finol

Profa. María del Carmen González

Suplentes

Profa. Gema González

Prof. José Adolfo Cedeño

Agradecimientos

A Dios... Mi familia...

Universidad Central de Venezuela

Facultad de Odontología, Postgrado de Cirugía Bucal
Profa. Angela Lamura Anselmi

Hospital Ortopédico Infantil
Profa. Marycarmen González y Prof. Ystvan Papp

Facultad de Ciencias Centro de Microscopía Electrónica "Dr. Mitsuo Ogura" y al Prof. Finol y el Prof. Roshman y la pasante Karen Bracale

Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas IVIC
Profa. Gema González, Lcda. Lisbeth Lozada

Instituto Universitario de Tecnología IUT
Prof. Esteban García y Prof. Gustavo Castro

A mis profesores del postgrado de Cirugía Bucal, Personal y mis Residentes.

Dedicatoria

A la ciencia... y su maravilloso universo que no logramos ver a simple vista.

Tabla de contenido

I. Resumen	9
II. Introducción	12
III. Revisión de la literatura	27
I. Fibrina Rica en Plaquetas FRP.....	27
1. Fibrina.....	28
1.2. Fibrina y los aditivos quirúrgicos.....	29
1.3. Adhesivos de fibrina.....	32
1.4 Concentrados plaquetarios.....	34
2. Fibrina Rica en Plaquetas FRP.....	39
2.1. Actividad celular FRP.....	46
Plaquetas.....	47
Citocinas.....	48
2.2. Plaquetas y su relación con FRP.....	50
Distribución de plaquetas en FRP.....	53
Citocinas en concentrados plaquetarios.....	53
FRP Vs. Concentrados de PRP.....	59
2.3. Actividad leucocitaria.....	63
Inflamación.....	64
Citocinas inflamatorias.....	65
Citocinas cicatrizales.....	68
Citocinas leucocitaria en FRP.....	70
3. Generalidades de FRP en cicatrización y regeneración en tejidos	
Angiogénesis.....	75

Agente inmunitario.....	77
Recubrimiento epitelial.....	78
Células madre mesenquimales.....	79
Fibrina y tejido óseo.....	81
4. Aplicaciones de FRP en Cirugía Bucal y Maxilofacial.....	83
Exodoncias simples y complejas.....	85
Membranas de colágeno.....	88
Cirugía Pre-protésica.....	90
Patología.....	91
Elevación de seno maxilar.....	93
Implantes e injertos óseos.....	95
Otras.....	97
5. Aplicaciones de FRP en diferentes áreas de la medicina.....	98
6. Últimos avances.....	102
II. Microscopía Electrónica.....	110
1. Historia.....	110
2. Microscopio electrónico.....	111
Microscopio electrónico de Barrido MEB.....	112
3. Componentes de MEB.....	115
Fuente de energía.....	115
Portamuestra.....	116
Sistema de amplificación.....	117
4. Características de MEB.....	117
Poder de resolución.....	117

Profundidad de campo.....	118
Contraste.....	119
5. Construcción de MEB.....	120
Electrones secundarios.....	122
Electrones dispersos.....	122
6. Microanálisis de Rayos X por dispersión de energía.....	124
7. Principales aplicaciones.....	127
8. Técnica de fijación de muestra.....	136
Protocolo de fijación.....	137
9. Ultraestructura de la plaqueta.....	141
10. Ultraestructura de la fibrina.....	144
III. Hipertensión Arterial HTA.....	146
1. Concepto y Clasificación.....	146
2. Hipertensión primaria y secundaria.....	149
3. HTA y riesgos cardiovasculares.....	150
Factores de riesgo.....	150
IV. Diabetes Mellitus tipo 2.....	156
1. Definición.....	156
2. Clasificación.....	157
Clasificación actual.....	160
3. Diagnóstico.....	161
4. Patogenia.....	162
Etiopatogenia DMI.....	163
Etiopatogenia DMII.....	164

5. Epidemiología.....	167
IV. Objetivos.....	171
Objetivo general.....	171
Objetivos específicos.....	171
V. Materiales y métodos.....	172
1. Recursos humanos.....	172
2. Material descartable.....	172
Material complementario.....	173
Material para fijación de muestra.....	174
3. Material físico o aparatología.....	174
4. Metodología.....	177
1. Tipo de investigación.....	177
2. Tamaño de la muestra.....	178
Aspectos éticos.....	179
2.1 Controles.....	179
3. Definición de la población.....	179
Criterios de inclusión.....	180
Criterios de exclusión.....	180
4. Pacientes.....	181
4.1 Aspectos clínicos.....	181
4.1.1 Exámenes de laboratorio.....	181
4.1.1 Exámenes complementarios.....	182
4.2 Toma de muestra.....	182
4.2.1 Extracción de sangre y centrifugado.....	182

4.2.2 Fijación de la muestra.....	184
5. Rutina ultraestructural.....	185
6. Observación en MEB.....	188
VI. Resultados.....	189
1. Distribución por tipo de población.....	189
2. Distribución por edad.....	189
3. Distribución por género.....	190
4. Resultado ultraestructural.....	192
5. Enfoque estadístico.....	205
VII. Análisis de resultados.....	208
VIII. Discusión.....	230
IX. Conclusiones.....	239
X. Recomendaciones.....	241
XI. Referencias bibliográficas.....	242
XII. Anexos.....	

EVALUACIÓN Y COMPARACIÓN IN VITRO DE LAS CARACTERÍSTICAS ULTRAESTRUCTURALES DE FIBRINA RICA EN PLAQUETAS (FRP) BAJO MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO EN PACIENTES TRATADOS EN EL POSTGRADO DE CIRUGÍA BUCAL DE LA UCV.

I. RESUMEN

Los últimos avances en la ingeniería tisular nos han permitido desarrollar nuevas teorías en cuanto a la cicatrización y regeneración, siendo la fibrina rica en plaquetas (FRP) una alternativa de tratamiento para tal fin. Sabiendo que la FRP es una segunda generación de concentrados plaquetarios, nos proporciona los tres elementos básicos en el proceso de cicatrización y regeneración, los andamios, moléculas de señalización y componente celular. En el presente estudio se planteó evaluar *in vitro* las características ultraestructurales de FRP y compararlo con pacientes sanos con hipertensión arterial y diabetes mellitus tipo 2 tratados en el postgrado de Cirugía Bucal de la UCV. Al total de muestras obtenidas se le aplicó estadísticas descriptivas, análisis de varianza por rango de Kruskal-Wallis, prueba de Fligner-Killeen, test de Shapiro-Wilks, análisis de correlación por rangos de Spearman, análisis de correlación, análisis de agrupamientos Cluster Analysis e índice de similitud de Gower; con valor de significancia de $p= 0,05$ y valores de correlación entre 0,5230 y 0,6034. Al aplicar a los tres grupos de

muestra el análisis de agrupamiento surgen cuatro grupos de estudio donde en el primer grupo los pacientes del grupo control tienden a ser parecidos, pero no son tan homogéneos, el segundo grupo, HTA son parecidos entre sí y pareciera corresponder a pacientes controlados cercanos a la normalidad, el tercer grupo se desdobra en dos, conformando un subgrupo de pacientes con DII que tienden a parecerse entre sí y al grupo control y producto de ese desdoblamiento se origina un cuarto grupo, cuyas muestras DII tienden a parecerse entre sí, pero a diferenciarse del resto del grupo. Los resultados señalan tendencias de diferenciación entre las fibrinas y plaquetas en los tres grupos de estudio, variables que se ajustan a los niveles de normalidad.

PALABRAS CLAVES: Cicatrización y Regeneración, Fibrina Rica en Plaquetas, Factores de Crecimiento, Características ultraestructurales.

**IN VITRO EVALUATION AND COMPARISON OF
ULTRASTRUCTURAL CHARACTERISTICS OF PLATELET-RICH
FIBRIN (PRF) BY SEM IN PATIENTS TREATED AT THE
DEPARTMENT OF ORAL SURGERY OF THE UCV.**

ABSTRACT

Recent advances in tissue engineering have enabled us to develop new theories about the healing and regeneration, with platelet-rich fibrin (PRF) a treatment alternative for this purpose. Knowing that the FRP is a second generation of platelet concentrates, provides the three basic elements in the process of healing and regeneration, scaffolds (collagen, bone mineral), two signaling molecules (growth factors), and cells (osteoblasts, fibroblasts). The aim of this study is to evaluate in vitro the ultrastructural features of the component and in turn to compare with patients treated at the department of Oral Surgery of the UCV, ie patients with controlled systemic disease (hypertension, diabetes)

KEY WORDS: Healing and regeneration, platelet-rich fibrin, growth factors, ultrastructural features.

II. INTRODUCCIÓN

La agresión a los tejidos tiene como resultado su alteración, respondiendo el organismo con un proceso de restauración del tejido afectado. Dicho proceso siempre comienza con la aparición de un coágulo sanguíneo que rellena el defecto y aporta las proteínas necesarias para generar un tejido fibroso que termina en cicatricial, que no respeta la arquitectura ni funciones originales ni preexistentes. Este proceso se conoce como reparación. ⁽¹⁾

En ocasiones el proceso no lleva a una reparación sino a la creación de un tejido similar al original con una arquitectura y función exactamente iguales. En este caso se habla de regeneración. El premio Nobel de medicina en 1990 Joseph Murray citado por Pérez-Sierra (2010) ⁽¹⁾ habla de las cuatro “R”; retirar, reparar, reemplazar y regenerar.

Desde el principio de los tiempos éste ha sido el objetivo, buscándose la forma de cumplir con esta misión. Aportar de forma natural los factores que intervienen en la cicatrización no es algo novedoso, existiendo en la historia diferentes formas, algunas pintorescas incluso en su momento, como son las que describen los trabajos de Thomas citado por Pérez-Sierra (2010) ⁽¹⁾ ; utilizaba gusanos para la curación de las heridas. Ya en las batallas

napoleónicas los utilizaban para evitar la sobreinfección al remover el tejido necrótico y promover la cicatrización de las heridas provocadas en la batalla. ⁽¹⁾

Más recientemente y en referencia con el tema que se va a tratar aparece como antecedente la utilización de una malla de fibrina por parte de los traumatólogos. En el coágulo sanguíneo formado en las heridas existen los componentes estratégicos, como ya se ha comentado, que desencadenan cualquiera de los dos procesos que se pueden producir, reparación o regeneración. En la cascada de la coagulación se desencadenan reacciones en las que las células sanguíneas quedan atrapadas en dicha malla. Entre estas células se encuentran las plaquetas, que no sólo tienen como función el taponamiento de los vasos sanguíneos ya que en su interior se almacenan proteínas que catalizan los procesos de la cicatrización. Estas proteínas son los factores de crecimiento que producen señales peptídicas moleculares que cambian el comportamiento de las diferentes células que intervienen en la reparación y desarrollo de los tejidos, mediando en el proceso biológico de la migración, proliferación, diferenciación y metabolismo celular. ⁽¹⁾

El término Ingeniería Tisular fue utilizado, originalmente, para designar la construcción, en el laboratorio, de un dispositivo que contenía células viables y mediadores biológicos (por ejemplo,

factores de crecimiento y adhesinas) en una matriz sintética o biológica, para ser implantado en pacientes, para facilitar la regeneración de los tejidos. El papel de la oxigenación de los tejidos, en la curación de heridas, se convirtió en el centro de investigación en la década de los 80. Mejorar la oxigenación de los tejidos de fagocitosis y la capacidad bactericida de células inmunes ayuda al colágeno también como la misma síntesis de proteínas. La importancia de los factores de crecimiento en la mejoría de la cicatrización de las heridas, se ha convertido en el foco de investigación en la actualidad. Además, se ha establecido un enlace entre la oxigenación tisular y los factores de crecimiento. La estimulación de macrófagos provoca la liberación de factores angiogénicos y otros factores de crecimiento que ayudan a la curación y resistencia a la infección de las heridas. ⁽²⁾

En general, la Ingeniería Tisular combina tres elementos claves, uno, los andamios (colágeno, mineral de los huesos), dos, moléculas de señalización (factores de crecimiento), y las células (osteoblastos, fibroblastos). La ingeniería de tejidos ha sido redefinida en la actualidad como algo relativamente nuevo, muy prometedor en el campo de la biología de reconstrucción, basado en los recientes avances en medicina y cirugía, biología molecular y celular, química de polímeros, y en la fisiología. ⁽²⁾

Los materiales comúnmente utilizados como injerto óseo para estos procedimientos son injertos óseo liofilizado desmineralizado (DFDBA) e injertos óseo liofilizado (FDBA). Las propiedades osteoinductivas de DFDBA han convertido al injerto en el material de elección, en comparación con FDBA, xenoinjertos y aloplásticos. Sin embargo, el potencial de osteoinductividad de DFDBA obtenidas en diferentes bancos de huesos o, de diferentes lotes del mismo banco, puede variar mucho. La bioactividad de DFDBA parece depender de la edad del donante, mientras más joven es el donante, mayor propiedad osteoinductiva tiene el injerto. Esto ha traído como controversia, preocupaciones acerca de la transmisión de enfermedades, lo cual ha llevado a los médicos hacia el uso de xenoinjertos y materiales aloplásticos. Aunque estos materiales son biocompatibles y osteoconductores de naturaleza, los resultados clínicos son impredecibles. El problema que se plantea es cómo mejorar los resultados clínicos mediante la mejora de las propiedades de estos injertos. ⁽²⁾

Las plaquetas aisladas de sangre periférica son una fuente autóloga de factores de crecimiento. Entre las más estudiadas están el factor de crecimiento derivado de las plaquetas, el factor de crecimiento parecido a la insulina, el factor de crecimiento beta transformador de la familia de la proteína morfogenética, con una gran intervención en la formación de hueso, el factor de crecimiento

vascular que interviene en la neovascularización, el factor de crecimiento epidérmico, el factor de crecimiento de los fibroblastos, etc. De todos éstos, el factor de crecimiento beta transformador, el factor de crecimiento derivado de las plaquetas, además del factor de crecimiento vascular, son los que mayor concentración tienen en las plaquetas. Cuando las plaquetas en forma concentrada, se añaden a los materiales de injerto, se obtiene un resultado más previsible. ⁽¹⁾

Pérez-Sierra (2010) ⁽¹⁾ cita a Tayapongsak, quien descubrió en cirugía maxilofacial la fibrina autóloga en 1994. El primer término, acuñado en la literatura científica como fibrina autóloga adhesiva (AFA), describía la adaptación de la fibrina que forma parte del suero para vehicular al injerto en cirugía. Tras la extracción de sangre al paciente añadiendo anticoagulantes, ésta se centrifugaba depositándose los elementos sanguíneos en el fondo del recipiente, formándose así el suero con la fibrina. Al ser las plaquetas el elemento menos pesado de todas las células sanguíneas se depositaban por encima del resto y por tanto quedaba embebido en dicha fibrina. La combinación de fibrina más plaquetas conseguía unos resultados óptimos en cirugía. ⁽¹⁾

Posteriormente, en 1998, Robert Marx citado por Pérez-Sierra (2010) ⁽¹⁾ aportó otro término a la bibliografía científica, plasma rico en plaquetas (PRP). El procedimiento para su obtención consiste en

la adaptación del mismo compuesto de fibrina autóloga en la que se engloba el mayor número posible de plaquetas pensando en el aporte de las proteínas que en su interior existían. Estas proteínas, como ya se ha comentado aportan señales importantes en el proceso de la cicatrización. Conociendo el comportamiento de los elementos sanguíneos y de los fluidos, como es la sangre, se pueden acotar unos parámetros en la centrifugación para decantar las células sanguíneas con mayor peso en el fondo y las de menor peso justo por encima. De esta forma, se consigue que los hematíes que son los de mayor peso se depositen en el fondo del recipiente, a continuación la serie blanca, e inmediatamente por encima, las plaquetas, justo antes del suero con la fibrina. ⁽¹⁾

Hasta este momento todos los métodos utilizados para la obtención de este concentrado precisaron gran cantidad de sangre, fundamentalmente el método de plasmaféresis, que necesitaba de una aparatología complicada y de uso exclusivamente hospitalario, haciendo que este fuera poco operativo y solo útil en la cirugía reconstructiva. Otros métodos más al alcance del clínico precisaban de centrífugas específicas y de un volumen de sangre que, aunque menor que el necesario para la plasmaféresis, sigue considerándose un volumen excesivo. ⁽¹⁾

La última aportación científica con respecto al plasma fue hecha por Anitua en 2001, nombrado por Pérez-Sierra (2010) ⁽¹⁾ quien describió el plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) como un método ambulatorio que no necesitaba de una complicada instalación, ni una gran cantidad de sangre para tener un coágulo rico en plaquetas y por tanto rico en factores de crecimiento. De forma ambulatoria y con una centrifugadora de laboratorio convencional obtenía resultados clínicos muy llamativos. Este método, por su simplicidad, se hizo muy popular. Consiste en la extracción de sangre mediante venopunción en la flexura del brazo; dicha sangre, que se mezcla en un tubo de ensayo con citrato sódico para evitar su coagulación, se centrifuga a una velocidad y tiempos determinados, de forma que se separan, como en los procedimientos anteriores, los elementos formes más pesados de los más ligeros, para su posterior decantación. Una vez conseguida la decantación de los elementos formes, con la ayuda de unas pipetas de laboratorio, se extraen del tubo original las fracciones de plasma con menor concentración en plaquetas, aspirando desde la superficie, hasta llegar a la zona del plasma con mayor concentración de plaquetas, inmediatamente por encima de la serie roja. ⁽¹⁾

Los usos del plasma con plaquetas son muchos y variados, aunque para algunos autores claramente discutidos. Existen varios trabajos que hablan de la utilidad del plasma en regeneración ósea,

cicatrización de heridas cutáneas y en traumatología, tanto en aceleración de la curación de lesiones musculares, como en tendinosas y articulares. También se utilizan en cirugía oftalmológica en las intervenciones del limbo o de la córnea, en cirugía cardiopulmonar para evitar el sangrado y la pérdida de aire en lobotomías pulmonares, en Cirugía maxilofacial y en Odontología. ⁽¹⁾

Una de las últimas formas de aprovechar las cualidades del concentrado en plaquetas, es su aplicación al campo de las células madre, una de las líneas de la regeneración con más futuro. Se está utilizando como vehículo y alimento de las mismas, de forma que aumente la supervivencia a la hora de utilizar las colonias celulares. ⁽¹⁾

El Plasma Rico en Plaquetas (PRP) es una fuente fácilmente accesible de factores de crecimiento, con el fin de coadyuvar a la curación de los tejidos duros y blandos. Esto se da por los métodos en el cual se concentran las plaquetas autólogas y se añaden a las heridas quirúrgicas o a los injertos y otras lesiones con la necesidad de acelerar la curación. El coágulo de sangre es el enfoque central de inicio hacia la curación de los tejidos blandos y la regeneración ósea. En todas las heridas físicas, se forma un coágulo de sangre y se inicia el proceso de cicatrización. El PRP es una simple estrategia para concentrar las plaquetas o enriquecer al coágulo de sangre natural, que se forma de manera normal en las heridas quirúrgicas,

para iniciar un proceso de cicatrización más rápida y completa. Un coágulo de sangre natural contiene 95% de células rojas, 5% de plaquetas, menos del 1% de células blancas y los importes numerosos de filamentos de fibrina. Un coágulo de sangre con PRP contiene un 4% de glóbulos rojos, 95% de plaquetas y el 1% de células blancas. ⁽²⁾

El uso de PRP, en lugar de los factores de crecimiento recombinantes, teniendo varias ventajas, es que los factores de crecimiento obtenidos de las plaquetas no sólo tienen su acción específica sobre los tejidos, sino también interactúa con otros factores de crecimiento, lo que resulta en la activación de la expresión génica y la producción de proteínas. Por lo tanto, las propiedades del PRP se basan en la producción y liberación de múltiples factores de crecimiento diferenciados y de la activación de las plaquetas. Estos factores son fundamentales en la regulación del proceso de cicatrización de heridas y juegan un papel importante en la regulación de procesos celulares, tales como mitogénesis, la quimiotaxis, la diferenciación y el metabolismo. ⁽²⁾

Los concentrados de plaquetas son los productos derivados de la sangre, utilizados para la prevención y el tratamiento de hemorragias, debido a la trombocitopenia de origen central. El desarrollo de concentrados de plaquetas como aditivos bioactivos

quirúrgicos que se aplican a nivel local para promover la cicatrización de las heridas viene dado de la utilización de adhesivos de fibrina. Desde 1990, la ciencia médica ha reconocido a varios componentes de la sangre, que son parte del proceso natural de cicatrización, cuando se añade a los tejidos heridos o las zonas quirúrgicas, tienen el potencial de acelerar la cicatrización. Los adhesivos de fibrina fueron descritos en 1970 y está formada por la polimerización de fibrinógeno con la trombina y calcio. Originalmente fue preparado con plasma de los donantes, sin embargo, debido a la baja concentración de fibrinógeno en plasma, la estabilidad y la calidad del adhesivo de fibrina fueron bajas. ⁽²⁾

Estos adhesivos se pueden obtener de forma autóloga del paciente o pueden obtenerse de casas comerciales (Tisseel, Baxter Healthcare). Estos productos son tratados por calor, reduciendo así enormemente sin eliminar por completo, el riesgo de transmisión de enfermedades. Por lo tanto, los adhesivos disponibles en el mercado constituyen un riesgo infinitamente pequeño de transmisión de enfermedades. El PRP autólogo es una modificación de los adhesivos de fibrina, que ha sido descrito y utilizado en diversas aplicaciones con aparente éxito clínico. El PRP obtenido de sangre autóloga se utiliza para llevar los factores de crecimiento, en altas concentraciones, al sitio de defecto óseo o de una región que requiere aumento. ⁽²⁾

La preparación y elaboración del PRP es bastante similar en la mayoría de los sistemas de concentrados de plaquetas, aunque el anticoagulante empleado y la velocidad y la duración de la centrifugación pueden ser diferentes con diferentes sistemas. La técnica es la siguiente ⁽²⁾

1. Se extrae la sangre venosa por medio de venopunción en la flexura del brazo en un tubo que contiene un anticoagulante para evitar la activación plaquetaria y degranulación.

2. La primera centrifugación se llama "spin suave", que permite la separación de sangre en tres capas, es decir, en la capa inferior se encuentran más glóbulos rojos (55% del volumen total), en la capa superior, plasma acelular llamada PPP (40% del volumen total), y el PRP en la capa intermedia (5% del volumen total) denominado "costra".

3. Con una jeringa estéril se transfiere el PPP, PRP y algunos glóbulos rojos en otro tubo sin anticoagulante.

4. Este tubo que ahora se someterá a una segunda centrifugación, que es más larga y más rápida que el primero, llamado "spin fuerte". Esto permite que las plaquetas (PRP), se ubiquen en la parte inferior del tubo con muy pocos glóbulos rojos, lo que explica el tinte rojo de la preparación del PRP final. El plasma acelular, PPP (80% del volumen), en la parte superior.

5. La mayoría de los PPP se extrae con una jeringa y se desecha y el PRP restantes se agita bien.

6. Este PRP se mezcla con la trombina bovina y de cloruro de calcio en el momento de la aplicación. Esto da lugar a la gelificación de los concentrados de plaquetas. Cloruro de calcio anula el efecto del anticoagulante del citrato utilizado y ayuda a la trombina en la activación del fibrinógeno, que se convierte en fibrina y enlaces cruzados. ⁽²⁾

Un novedoso concentrado, de segunda generación de plaquetas ha invadido el mercado debido a su simplicidad y mejoría de las propiedades en comparación con el PRP, llamado Fibrina Rica en Plaquetas (FRP). El FRP fue desarrollado en Francia por Choukroun, y cols. en el 2001 ⁽²⁾. Esta segunda generación de concentrado de plaquetas elimina los riesgos asociados con el uso de trombina bovina. Un informe de los ensayos clínicos que comparan el contenido del factor de crecimiento de la FRP y PRP fue presentado por Wiltfang y cols. en el 2005 ⁽²⁾ en el Segundo Simposio Internacional de Factores de Crecimiento.

Las ventajas del FRP sobre las del PRP es que su preparación es más simple y no necesita de manejo bioquímicos de la sangre. La cantidad necesaria de sangre es de 10ml que se extrae en tubos de ensayo, sin anticoagulante y se centrifuga inmediatamente. La sangre

se centrifuga mediante una centrifugadora de mesa, realizando una sola centrifugación a una velocidad y tiempo específico referidos por el investigador. El producto resultante se compone de los siguientes tres capas:

- Capa de PPP acelular
- Coagulo de FRP, capa media
- Capa inferior de glóbulos rojos

Debido a la ausencia de un anticoagulante, la sangre comienza a coagularse tan pronto como entra en contacto con la superficie del vidrio. Por lo tanto, para la correcta preparación del FRP, la toma de sangre rápida y centrifugación inmediata, antes de iniciarse la cascada de la coagulación, es absolutamente esencial. FRP se puede obtener en la forma de una membrana y exprimir los fluidos en el coágulo de fibrina. ⁽²⁾

El FRP está en la forma de un gel de plaquetas y puede ser utilizado en combinación con los injertos óseos, que ofrece varias ventajas, incluida la promoción de la cicatrización de heridas, el crecimiento y la maduración ósea, la estabilización del injerto, el cierre de la herida y de la hemostasia y la mejora de las propiedades de manejo de materiales de injerto. El FRP también puede ser utilizado como una membrana. Los ensayos clínicos sugieren que la

combinación de injertos óseos y los factores de crecimiento que figura en el PRP y FRP pueden ser adecuados para mejorar la densidad ósea. En un ensayo experimental, el contenido del factor de crecimiento en el PRP y alícuotas de FRP se midió utilizando prueba de Elisa. Los resultados sugieren que el contenido del factor de crecimiento (PDGF y TGF- β) fue similar en ambos. Otro estudio experimental utilizando cultivos de células osteoblásticas para investigar la influencia del PRP y FRP en la proliferación y la diferenciación de los osteoblastos. Obteniendo que la afinidad de los osteoblastos a la membrana FRP era superior. ⁽²⁾

El FRP tiene muchas ventajas sobre PRP. Se elimina el proceso de adición de anticoagulantes, así como la necesidad de neutralizarlo. Se elimina la adición de trombina de origen bovino para promover la conversión del fibrinógeno en fibrina en la obtención de PRP. La eliminación de estos pasos reduce considerablemente la manipulación bioquímica de la sangre, así como los riesgos asociados con el uso de la trombina de origen bovino. La conversión del fibrinógeno en fibrina, se lleva a cabo lentamente con pequeñas cantidades de trombina presente fisiológicamente en la muestra de sangre. Así, una arquitectura fisiológica que es muy favorable para el proceso de curación se obtiene debido a este lento proceso de polimerización. ⁽²⁾

Sabiendo que la fibrina rica en plaquetas (FRP) es un efectivo y novedoso regenerador tisular, se ha decidido estudiar las características ultraestructurales y compararlas entre grupos etarios, género, pacientes con enfermedades sistémicas controladas, con la finalidad de establecer diferencias entre ellas y determinar si estas diferencias inherentes al paciente modifican el proceso de regeneración y cicatrización.

III. REVISIÓN DE LA LITERATURA

I. FIBRINA RICA EN PLAQUETAS

Previos estudios clínicos tanto en humanos como en animales han demostrado que la combinación de plasma rico en plaquetas (PRP) e injerto de hueso autólogo puede aumentar la tasa de osteogénesis y mejorar la formación de hueso cualitativamente. Sin embargo, los resultados se contradicen con un reciente estudio en animales presentado por Choi y cols. en el 2004 ⁽³⁾ quienes investigaron el efecto del PRP sobre la regeneración ósea en un injerto de hueso autógeno en un canino mandibular, demostraron que la adición de PRP en un injerto de hueso retarda la neoformación ósea en dicho injerto. La inconsistencia de estos resultados puede ser la diferencia en el uso de las concentraciones de PRP.

Si esta hipótesis es correcta, debe haber alguna evidencia *in vitro* que avale que las variaciones en las concentraciones de PRP influyan en la formación de hueso tratado con injerto óseo y PRP. El efecto biológico de las plaquetas puede ser un reflejo de la interacción y los posibles efectos sinérgicos de múltiples factores de crecimiento. ⁽³⁾

Estudios previos han demostrado claramente que las plaquetas contienen muchos factores de crecimiento tales como PDGF, TGF, IGF-I, IGF-II, y EGF. Estos factores de crecimiento son liberados por las plaquetas y pueden activar la proliferación celular osteoprogenitoras y preosteoblastos que residen en los tejidos adyacentes (periostio, endostio) o en el autoinjerto implantado (hueso esponjoso o médula ósea) ⁽³⁾

Los efectos biológicos de las plaquetas son considerados en la viabilidad y proliferación de células alveolares en el tejido óseo, es posible que la pega de fibrina que no contiene plasma, pero sí concentrados plaquetarios, sea una alternativa para capitalizar adecuadamente la capacidad de los factores de crecimiento plaquetarios en el PRP. ⁽³⁾

1. FIBRINA

La fibrina es la forma activa de la molécula plasmática denominada fibrinógeno. Esta molécula soluble presente de forma masiva tanto en el plasma como en los gránulos de las plaquetas y desempeña un papel determinante en la agregación plaquetaria en la hemostasia. Se transforma en una especie de pegamento biológico capaz de consolidar el grupo inicial de plaquetas, lo que constituye un muro de protección a lo largo de las pérdidas de continuidad vascular

durante la coagulación. De hecho, el fibrinógeno es el sustrato final de todas las reacciones de la coagulación. ^(4,5)

El fibrinógeno se transforma en fibrina insoluble por la trombina y calcio en la cascada de coagulación siendo el que estabiliza el tapón plaquetario, mientras que el gel de fibrina polimerizado constituye la primera matriz cicatricial de la herida. ^(6, 7, 8)

1.2 FIBRINA Y LOS ADITIVOS QUIRÚRGICOS

A pesar de los avances logrados en técnicas efectivas para el control hemorrágico, la búsqueda de agentes hemostáticos sigue siendo un problema persistente. Hay una gran variedad de agentes hemostáticos, como las esponjas de colágeno, celulosa oxidada, y adhesivos sintéticos de cianoacrilato. Dentro de nuestro arsenal terapéutico, los adhesivos de fibrina están bien documentados, corresponden a un mecanismo biológico natural (polimerización de fibrina en la hemostasia) mejorados de forma artificial. ⁽⁹⁾

Estos adhesivos son descritos en cirugía oral y maxilofacial. Además de su capacidad para acelerar la curación también es conocido que el sellado con adhesivo de fibrina convencional es utilizado para reducir hematoma postoperatorio. ⁽⁹⁾

Sin embargo, durante un largo período de tiempo, los adhesivos de fibrina han sido criticados por el hecho de que son productos derivados de sangre, producidos por las industrias farmacéutica (por ejemplo, Tisseel de Baxter Healthcare) lo que constituye un pequeño riesgo de contaminación viral, actualmente se siguen comercializando y produciendo en países como los Estados Unidos. Formas más simplificadas para la producción de materiales a base de fibrina autóloga se han desarrollado en la actualidad con modificaciones de sistemas parecidos al antes expuesto como lo es el Concentrado Plasma Rico en Plaquetas (CPRP) ^(9, 10)

El modo de funcionamiento de los adhesivos de fibrina reproduce las últimas etapas de la cascada de la coagulación enzimática durante el cual se convierte el fibrinógeno en fibrina en presencia de trombina, factor XIII, fibronectina y calcio, siendo el kit de Tisseel de Baxter Healthcare es un ejemplo perfecto. Se compone de:

- Un concentrado de fibrinógeno liofilizado, asociada con la fibronectina y factor XIII.
- Una solución de aprotinina bovina (para la inhibición de la proteasa), actuando como un antifibrinolítico para aumentar la vida útil de la fibrina de sellado.
- Un concentrado de trombina bovina.

- Una solución de cloruro de calcio.

El fibrinógeno se mezcla primero con la aprotinina para constituir la Solución A, que a su vez se calienta a 37 ° C. Solución B se obtiene de la mezcla de trombina bovina con una solución de cloruro de calcio. Soluciones A y B se mezclan justo antes de su uso con una automezcla de la jeringa. Es de destacar que la velocidad de la polimerización de adhesivo depende de la concentración de trombina a utilizarse para reconstituir la solución B. En términos generales, la actividad hemostática se basa en el rápido endurecimiento del adhesivo y el alta tasa de trombina. Sin embargo, la polimerización lenta siempre queda como opción. ⁽⁵⁾

A pesar de las considerables diferencias existentes entre los protocolos descritos en la literatura, la mayoría de los estudios muestran la eficacia de los adhesivos de fibrina para controlar el sangrado lento y difuso, así como exudados linfáticos, colecciones serosas, y hemorragia difusa del parénquima. Sin embargo, estos adhesivos no garantizan la hemostasia de graves hemorragias vasculares y no debe ser utilizado como sustituto a técnicas quirúrgicas. ⁽⁵⁾

1.3 ADHESIVOS DE FIBRINA

Los adhesivos de fibrina son de uso frecuente en la cirugía cardiotorácica y vascular. Estos adhesivos se utilizan con éxito en el sellado de la hemorragia microvascular a través de la aplicación en aerosol.

Los adhesivos de fibrina son sobre todo conocidos por su uso en el sellado de los bordes de la herida y su fácil aplicación cutánea además de sus propiedades mecánicas como adhesivo, así como las propiedades biológicas para promover la cicatrización en cirugía general y plástica. Estos adhesivos son descritos en cirugía oral y maxilofacial. Además de su capacidad para acelerar la curación también es conocido que el sellado con adhesivo de fibrina es utilizado para reducir hematomas postoperatorios. ^(11, 12,13)

En muchas otras disciplinas se ha experimentado con el uso de estos adhesivos partiendo siempre de la prueba en animales, viéndose resultados controversiales en varias oportunidades, como lo son en los casos de cirugía ortopédica y neurocirugía donde procedimientos como el cierre de duramadre o la cirugía reconstructiva neural siguen estando poco documentados. ^(14, 15)

En conclusión, estos aditivos permanecen en uso más que nada como un pegamento de fibrina autóloga, cuyas propiedades principales son la adherencia del tejido biológico y ser biodegradables. ^(16, 17)

Debido al riesgo de transmisión de la hepatitis, muchos adhesivos de fibrina comercializados han sido prohibidos en los EE.UU. desde 1978. En consecuencia, los intentos de desarrollo de adhesivos de fibrina autóloga han aumentado, pero con un éxito mitigado. De hecho, es difícil de obtener utilizando las técnicas no industriales, tales como altas tasas de fibrinógeno en un producto industrial similar a la Tisseel. Y cuando la tecnología permitió la producción de un adhesivo autólogo aceptable, los médicos encontraron muy largos y complejos los protocolos: cuando Tayapongsak describió su adhesivo de fibrina autóloga, en 1994, que fue útil para mantener los fragmentos de un injerto de hueso en una masa coherente (para evitar el secuestro óseo postoperatorio), la sangre se recogió 1 a 3 semanas antes de la intervención y requería 2 días de tratamiento antes de ser listo para usar. ^(10, 18, 19, 20)

Estos esfuerzos podrían haber sido en vano, pero el desarrollo de un nuevo concepto terapéutico induce el repentino despertar de estas tecnologías en reposo. El uso de concentrados de plaquetas, basado en el concepto de la terapia celular por factores de

crecimiento, reabre la investigación tecnológica sobre la fibrina autóloga como adhesivo. Sin embargo queda la duda si siguen siendo solo productos simples de la pega de fibrina o nos encontramos en presencia de nuevos aditivos de uso quirúrgico. (10, 18, 19, 20)

En un sentido estricto, el PRP es un concentrados de plaquetas y de los productos derivados obtenidos de la sangre utilizados para la prevención y el tratamiento de la hemorragia por trombopenia grave de origen central, como la aplasia medular, leucemia aguda, etc. Así que siguen siendo de uso muy limitado. (10, 18, 19, 20)

1.4 CONCENTRADOS DE PLAQUETAS

Los concentrados de plaquetas para la cirugía, como los concentrados de plaquetas estándar de hematología y transfusión, se les llama arbitrariamente PRP. Por otra parte, los protocolos descritos suelen utilizar una doble centrifugación para aumentar la concentración de plaquetas recogidas. Para corregir este mal uso del lenguaje, muchos nombres fueron sugeridos: CPRP, de plasma de factores de crecimiento rico PRGF, etc. No obstante, parece que CPRP es el término más simple y más adecuado a largo plazo. (21, 22, 23)

Estos protocolos se basan en una idea simple, la extracción de sangre se hace justo antes de la intervención y la muestra se

transforma de inmediato en concentrado de plaquetas mediante un separador celular del laboratorio de hematología (en los primeros años) y, posteriormente, cada vez más máquinas específicas simples y automatizadas han sido usadas (el ejemplo más impresionante es la SmartPReP) ^(24, 25, 26)

El concentrado de plaquetas se mezcla con la trombina y el cloruro de calcio con el fin de inducir la activación masiva de concentrado de plaquetas y la gelificación de la preparación. Es en esta fase que las citocinas plaquetarias son normalmente liberadas. Las propiedades cicatriciales de estas moléculas solubles ya están bien documentadas. La idea es lograr una terapia celular autóloga de factores de crecimiento, buscando mejorar la cicatrización de las heridas. ^(24, 25, 26, 27)

Diferentes protocolos se puede aplicar para obtener CPRP. Pero esquemáticamente puede dividirse en 2 familias:

- Las técnicas complejas utilizando los separadores de células de hematología y
- Las técnicas simplificadas con uso de kits disponibles comercialmente y 2 pasos de centrifugación para concentrar las plaquetas. ⁽²⁸⁾

Estos sistemas comerciales son cada vez más automatizados para simplificar el uso clínico. Por lo tanto, vamos a describir un concepto general, más que cualquier sistema en particular:

a) La sangre venosa se toma con anticoagulante para evitar la activación plaquetaria y degranulación.

b) La primera centrifugación "suave" permite la separación de sangre en 3 capas distintas (fig. 1): En la parte inferior del tubo, los glóbulos rojos constituyen el 55% del volumen total.

En la parte superior del tubo, la capa de plasma acelular está compuesta principalmente de moléculas que circulan plasmáticos (en particular, el fibrinógeno) y baja en las plaquetas. Es designado plasma pobre en plaquetas (PPP) y constituye el 40% del volumen total. Entre las 2 capas, se forma una donde la concentración de plaquetas es mucho mayor. Constituye sólo el 5% del volumen total y presenta un aspecto característico de más llamado coágulo ("buffy coat"). Se componen la mayor parte de CPRP futuro, pero en este momento, todavía no existe un proceso científico que permita su fácil separación de las otras capas. ⁽²⁸⁾

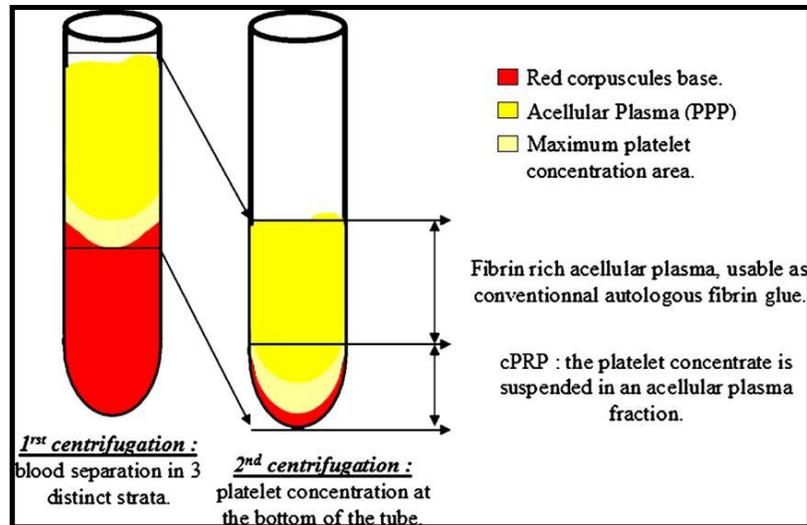


Figura 1. Concepto Tecnológico de procesamiento de CPRP.

c) Con una jeringa estéril, es aspirado el Plasma pobre en Plaquetas (PPP), el Plasma rico en Plaquetas (PRP), y algunos glóbulos rojos (que sistemáticamente son atraídos durante la operación). Luego, el material se transfiere a otro tubo, sin anticoagulante.

d) Este segundo tubo después se someterá a otra centrifugación, más larga y más rápida que la primera "fuerte". Esto hace posible concentrar las plaquetas en la parte inferior del tubo y, posteriormente, una vez más para obtener 3 capas distintas (fig. 1):

- Algunos glóbulos rojos residuales atrapados en la parte inferior del tubo
- Plasma acelular (PPP) para el 80% del volumen total

- Entre los 2, una capa blanca, o PRP.

e) En esta etapa, se hace fácil recoger el CPRP. Con una jeringa, el médico puede descartar la mayor parte del PPP, dejando sólo lo suficiente para colocar el suero concentrado de plaquetas en la suspensión. La unidad entonces se agita suavemente para obtener CPRP. Tenga en cuenta que los glóbulos rojos atrapados en la parte inferior del tubo se encuentran suspendidos en plasma también por esta última operación, lo que explica el aspecto rosado de la CPRP final.

f) CPRP se mezcla con la trombina bovina y de cloruro de calcio en el momento de la solicitud, con la ayuda de una jeringa de mezcla. Se da la gelificación del concentrado de plaquetas de forma rápida, el fibrinógeno también se concentra en la preparación CPRP, y su polimerización constituyen una matriz de fibrina con propiedades hemostáticas y adhesivas particularmente interesante.

Además, la aplicación CPRP se puede lograr en forma de gel o aerosol (de acuerdo con la boquilla de la jeringa usada). En ambos casos, la polimerización de fibrina se completa en unos pocos minutos. Tenga en cuenta que para obtener un gel más denso, o incluso una membrana CPRP, es posible añadir adhesivos de fibrina tipo Tisseel a la mezcla.

Los concentrados de plaquetas CPRP constituyen una tecnología reciente, pero bien documentado. (29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48) Desafortunadamente, los primeros resultados indican que sus efectos clínicos son muy cercanos a los observados con los adhesivos de fibrina convencionales. (49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65) En efecto, el efecto potencial de las citocinas de plaquetas, liberados de forma masiva durante la activación plaquetaria y la gelificación de fibrina, parece ser muy limitado. (66, 67, 68, 69, 70, 71) A pesar de que el gel de fibrina debe ser una perfecta matriz para el apoyo a la acción de citocinas, estas pequeñas moléculas solubles son liberadas con demasiada rapidez por no estar estrechamente integradas en el interior de la matriz de fibrina durante la polimerización. Esta última teoría podría explicar los efectos de mitigar estos preparados, sin embargo, todavía queda mucho por hacer para validar este concepto.

2. FIBRINA RICA EN PLAQUETAS. MATRIZ DE FIBRINA NATURAL. TÉCNICA Y MÉTODO DE PREPARACIÓN.

La FRP fue desarrollada en Francia por Choukroun (2001) ⁽⁷²⁾ para uso específico en cirugía oral y maxilofacial. Esta técnica no requiere la trombina bovina ni anticoagulante (ni ningún otro agente gelificante). No es nada más que la sangre centrifugada sin ningún añadido. Esta tecnología requiere de una centrífuga de mesa

graduable en velocidad y tiempo y un equipo de recolección (Proceso Niza, Francia).

El protocolo es muy simple: una toma de sangre sin anticoagulante en tubos de 10 ml y que inmediatamente se centrifuga a 3000 rpm (aproximadamente 400 gramos) durante 10 minutos. La ausencia del anticoagulante implica la activación en unos pocos minutos de la mayoría de las plaquetas de la muestra de sangre en contacto con las paredes del tubo y la liberación de la cascada de la coagulación. El fibrinógeno se concentra inicialmente en la parte alta del tubo, antes de que la trombina circulante lo transforme en fibrina. Un coágulo de fibrina se obtiene en el centro del tubo, justo entre los glóbulos rojos en la parte inferior y el plasma acelular en la parte superior (Fig. 2 y fig. 3). Las plaquetas son atrapadas en teoría de forma masiva en las mallas de fibrina. ⁽⁷²⁾

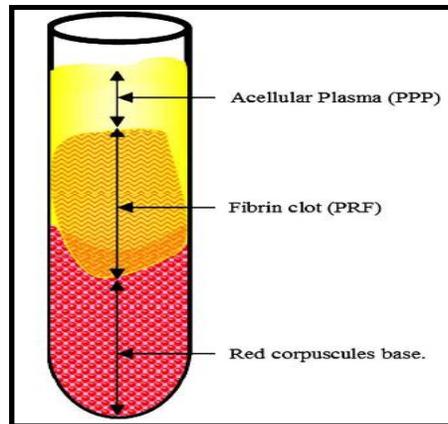


Figura 2. Centrifugación de sangre inmediatamente después de la colección permite la composición de un coágulo de fibrina estructurado y resistentes en el medio del tubo, justo entre los glóbulos rojos en la parte inferior y el plasma acelular en la parte superior.

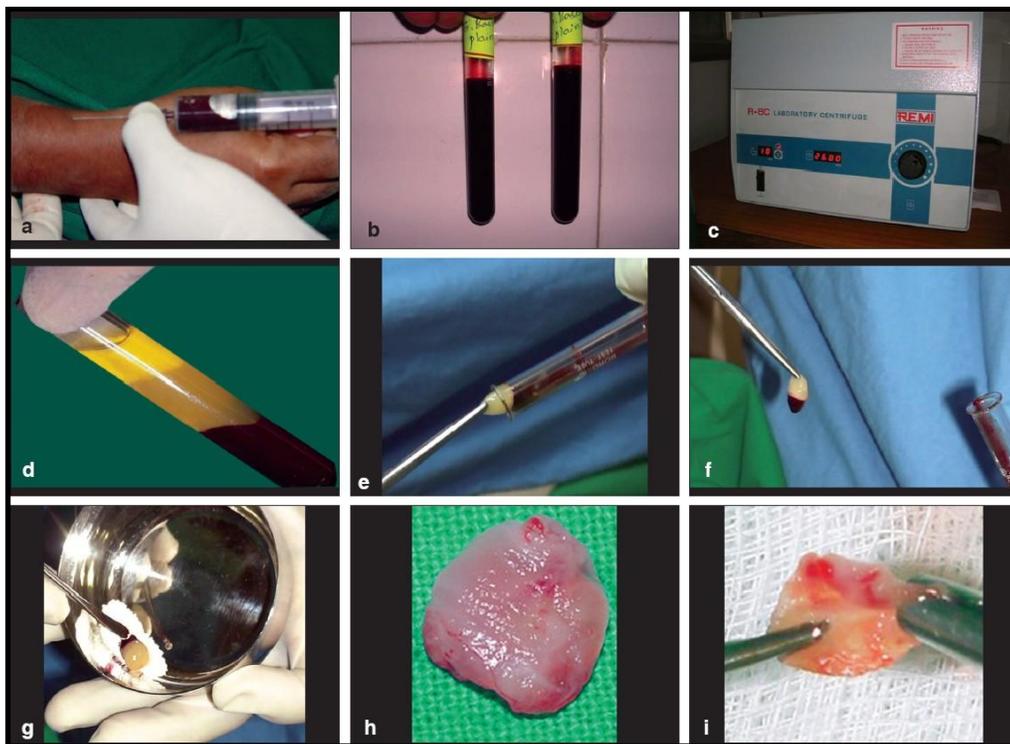


Figura 3. Preparación de FRP. (a) y (b) toma de la sangre en tubos de ensayo. (c) Centrifuga utilizado para la preparación de la FRP. (d) FRP preparado. (e) y (f) coágulo de FRP recuperado, (g) FRP se mezcla con injerto óseo. (h) y (i) membrana de FRP.

El éxito de esta técnica depende enteramente de la velocidad de extracción de sangre y la transferencia a la centrífuga. De hecho, sin anticoagulante, las muestras de sangre empiezan a coagular casi de inmediato al estar en contacto con el cristal del tubo, y se requiere un mínimo de unos minutos de centrifugación para concentrar fibrinógeno en la parte media y superior del tubo.

La manipulación rápida es la única manera de obtener un coágulo de FRP clínicamente útil. Si la duración necesaria para recoger la sangre y la centrifugación de lanzamiento es demasiado larga, el fracaso se producirá: La fibrina se polimeriza de forma difusa en el tubo y sólo un pequeño coágulo de sangre sin consistencia se obtiene.

En conclusión, el protocolo de FRP permite recoger un coágulo de fibrina acusado de suero y plaquetas y por la expulsión de los fluidos atrapados en la matriz de fibrina, los profesionales obtendrán membranas de fibrina autóloga muy resistentes. ⁽⁷²⁾

La característica principal de este método es la ausencia de anticoagulante en su preparación, esto permite la activación de las plaquetas, cuyas citocinas serán atrapadas en la matriz de fibrina y liberadas gradualmente, lo cual aumenta el tiempo en que podrán

encontrarse en la zona aplicada, sin embargo son necesarios más estudios para apoyar esta premisa. ⁽⁷²⁾

Una de las principales diferencias entre los adhesivos de fibrina, CPRP y FRP se encuentra en su forma de gelificación. ^(73, 74, 75,76) Los adhesivos de fibrina y CPRP utilizan una de las especies trombina bovina y lo asociación a cloruro de calcio para iniciar la última etapa de la coagulación y la polimerización de la fibrina de forma súbita. La velocidad de esta reacción y gelificación es dictada por el uso de estos aditivos, y su función hemostática, además de su asentamiento va a estar en relación a grandes cantidades de trombina. Este modo de polimerización tiene una influencia considerable en las propiedades mecánicas y biológicas de la matriz final de fibrina. ⁽⁵⁾

La FRP polimeriza de manera natural y poco a poco durante la centrifugación. Las concentraciones de trombina que actúan sobre el fibrinógeno autólogo recogidas son casi fisiológicas, porque no hay ninguna adición de trombina bovina. Este aspecto es crucial para determinar la organización de tridimensional de una red de fibrina. De hecho, durante gelificación, las fibrillas de fibrina pueden verse en dos arquitecturas bioquímicas diferentes: condensadas uniones tetra molecular o bilaterales y conexiones trimoleculares o equiláteras. ⁽⁵⁾

Las uniones bilaterales se constituyen con fuertes concentraciones de trombina y permiten el engrosamiento de los polímeros de fibrina, lo que lleva a la constitución de una red rígida, no muy favorable a las citocinas y su depósito en el entramado y la migración celular (Fig. 4). Sin embargo, la gran resistencia de este tipo de gel es útil por firme sellado de tejidos: Por lo tanto, habrá un adhesivo de fibrina y, por extensión, un CPRP. ⁽⁵⁾

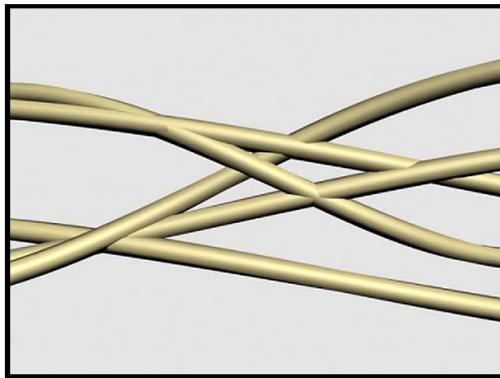


Figura 4. Equipo de modelos teóricos computarizados de condensados de derivación tetra molecular o bilaterales de fibrina.

En contraste, las concentraciones bajas trombina implican un porcentaje muy significativo de conseguir las uniones equiláteras. Estas uniones permiten el establecimiento de una fina y flexible red de fibrina, capaz de retener en su entramado mayor cantidad de citocinas y permitirá una migración celular más controlada (Fig. 5). Además, esta organización tridimensional dará una gran elasticidad a

la matriz de fibrina: esto le da a las membranas de fibrina la capacidad de ser flexibles, elásticas, muy fuertes. ⁽⁵⁾

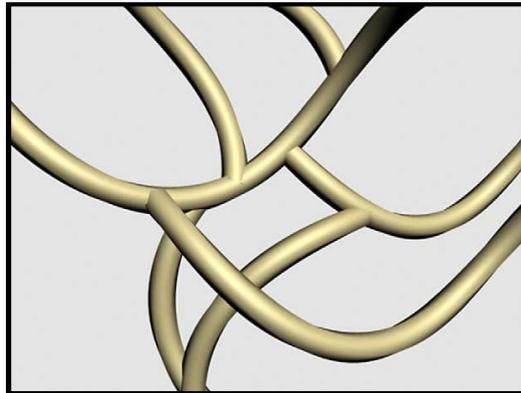


Figura 5. Equipo de modelos teóricos computarizados de derivación trimolecular o equilátera de fibrina. Nótese la flexibilidad de esta arquitectura de red.

Estos tres tipos de concentrados plaquetarios, utilizan diferentes modos de polimerización que implican diferentes mecanismos de integración biológica. ⁽⁵⁾ Aunque la FRP pertenece a una nueva generación de concentrados de plaquetas, es en primer lugar, tecnología basada en el uso de fibrina. De hecho, la actividad biológica de la molécula de fibrina es suficiente en sí misma para dar cuenta de la capacidad cicatricial significativa del FRP. Y el modo de polimerización lenta confiere a la membrana FRP una arquitectura fisiológica particularmente favorable para apoyar el proceso de

cicatrización. Sin embargo, ahora es necesario mirar más allá en las plaquetas y las características inflamatorias de este biomaterial. Sólo una comprensión perfecta de sus componentes y su significación nos permitirá comprender los resultados clínicos y, posteriormente, ampliar los campos de aplicación terapéutica de este protocolo.

2.1 ACTIVIDAD CELULAR DE FIBRINA RICA EN PLAQUETAS RELACIÓN DE LAS PLAQUETAS Y SUS CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS ASOCIADAS AL FRP

A pesar de que la fibrina rica en plaquetas (FRP), se asemeja a un gel de fibrina autóloga con propiedades cicatrizales, es en realidad un nuevo concepto de concentrado plaquetario. Su protocolo de obtención busca la acumulación de las plaquetas y la liberación de citocinas en un coágulo de fibrina. Estos datos ya están documentados para concentrados de plaquetas de las generaciones anteriores, es decir, diferentes tipos de concentrados como el Plasma Rico en Plaquetas (CPRP). La cuantificación de citocinas de plaquetas en FRP por consiguiente, constituye un paso significativo en la comprensión de este biomaterial, ya que estas moléculas solubles o mediadores químicos son clave de la inflamación y cicatrización. Sin embargo, más que la cuantificación, la incorporación de estos mediadores a la matriz de fibrina es más significativa de estudiar. ^(77, 78, 79)

PLAQUETAS, HEMOSTASIA Y LA CICATRIZACIÓN

MECANISMOS BIOLÓGICOS

Las plaquetas son células formadas en la médula ósea a partir de megacariocitos, son discoidales y anucleares. Su esperanza de vida es de 8 a 10 días, y el citoplasma contiene numerosos gránulos cuyo contenido se secretan en el momento de la activación. ⁽¹⁾

Estos gránulos contienen muchas proteínas específicas de las plaquetas (como los β -tromboglobulina) o las no específicas de plaquetas (fibronectina, el fibrinógeno y otros factores de la coagulación, factores de crecimiento, inhibidores de la fibrinólisis, inmunoglobulinas, etc.) Los gránulos densos contienen calcio, serotonina, etc. Además, la membrana de las plaquetas es una doble capa de fosfolípidos en la que los receptores de muchas moléculas se insertan (colágeno, trombina, etc.) ⁽¹⁾

La activación es fundamental para iniciar y apoyar la hemostasia, debido a la agregación en el sitio de la lesión y la interacción con los mecanismos de la coagulación. Sin embargo, la degranulación implica también la liberación de citocinas capaces de estimular la migración celular y la proliferación dentro de la matriz de fibrina, el inicio de las primeras etapas de la cicatrización. ⁽¹⁾

CITOCINAS PLAQUETARIAS

TGF β -1: AGENTE DE LA FIBROSIS

El factor de crecimiento de transformación β (TGF β) es una gran superfamilia de más de 30 miembros. La molécula de referencia al hablar de TGF β , realmente se debe hablar de TGF β -1. Esta es la isoforma masivamente más producida, no sólo en los gránulos de las plaquetas, sino también en general durante los intercambios intercelulares. ⁽⁸⁰⁾

In vitro, sus efectos son muy variados según la cantidad usada, el medio ambiente de la matriz y tipo de célula. Por ejemplo, se ha demostrado que puede estimular la proliferación de osteoblastos con la misma facilidad, con la que puede causar su inhibición. ⁽⁸¹⁾

Constituye el agente más poderoso de fibrosis entre las citocinas, aunque sus efectos en cuanto a la proliferación celular son muy variables y dependientes del tipo de célula. En otras palabras, es un inductor masivo de las moléculas de la matriz como lo es el colágeno tipo I y la fibronectina, afectando osteoblastos y fibroblastos. ⁽⁸²⁾

Así pues, aunque sus mecanismos de regulación son particularmente complejos, TGF β -1 puede ser considerada como un

regulador de la inflamación a través de su capacidad de inducir la cicatrización fibrosa.

PDGFS: FACTOR DE CRECIMIENTO DERIVADO DE PLAQUETAS

El PDGFs son reguladores esenciales para la migración, proliferación y supervivencia de los linajes de células mesenquimatosas. ^(83,84) De acuerdo con la distribución de sus receptores específicos, son capaces de inducir el estímulo de proliferación tan fácilmente como la inhibición del desarrollo de estas células. ⁽⁸⁵⁾

Esta posición de nodo de la regulación juega un papel fundamental durante el desarrollo embrionario y en los mecanismos de la remodelación tisular. Por esta razón, PDGFs desempeña funciones importantes en los mecanismos fisiológicos de la cicatrización y la patogénesis de la aterosclerosis y muchas otras enfermedades fibroproliferativas (por ejemplo, la neoplasia pulmonar y fibrosis renal) ⁽⁸⁶⁾

EL EJE DE IGF: AGENTE DE PROTECCIÓN CELULAR

El factor de crecimiento tipo insulina (IGF) I y II son reguladores positivos de la proliferación y diferenciación de casi todos los tipos celulares, aunque también incluye las células tumorales (que utilizan el sistema de IGF para aumentar su potencial de supervivencia) ⁽⁸⁷⁾ A pesar de estas citocinas son mediadores de proliferación celular, en general constituyen el eje principal de muerte celular programada (apoptosis) y su regulación, mediante la inducción de señales de supervivencia protege las células de estímulos apoptóticos. ⁽⁸⁸⁾ Además, aunque los IGF se liberan durante la degranulación plaquetaria, inicialmente están masivamente presentes en la circulación sanguínea.

2.2 LAS PLAQUETAS Y SU RELACIÓN DIRECTA CON FRP DISTRIBUCIÓN DE PLAQUETAS EN LA ARQUITECTURA DE LA FRP.

Los estudios hematológicos preliminares revelan que las plaquetas en el sobrenadante acelular (plasma pobre en plaquetas (PPP) o en los glóbulos rojos de base, no son localizables. Algunos análisis histológicos fueron suficientes para determinar la distribución de plaquetas en las distintas capas del tubo de recogida de centrifugado: Se acumulan en la parte inferior del coágulo de fibrina,

principalmente en la unión entre los glóbulos rojos (trombo rojo) y el propio coágulo de FRP (Fig. 6). Esta última observación pone de relieve la idea de que la extremidad FRP rojo sería de interés para su uso clínico, e incluso más eficaz que la parte superior del coágulo de fibrina (Fig. 7)

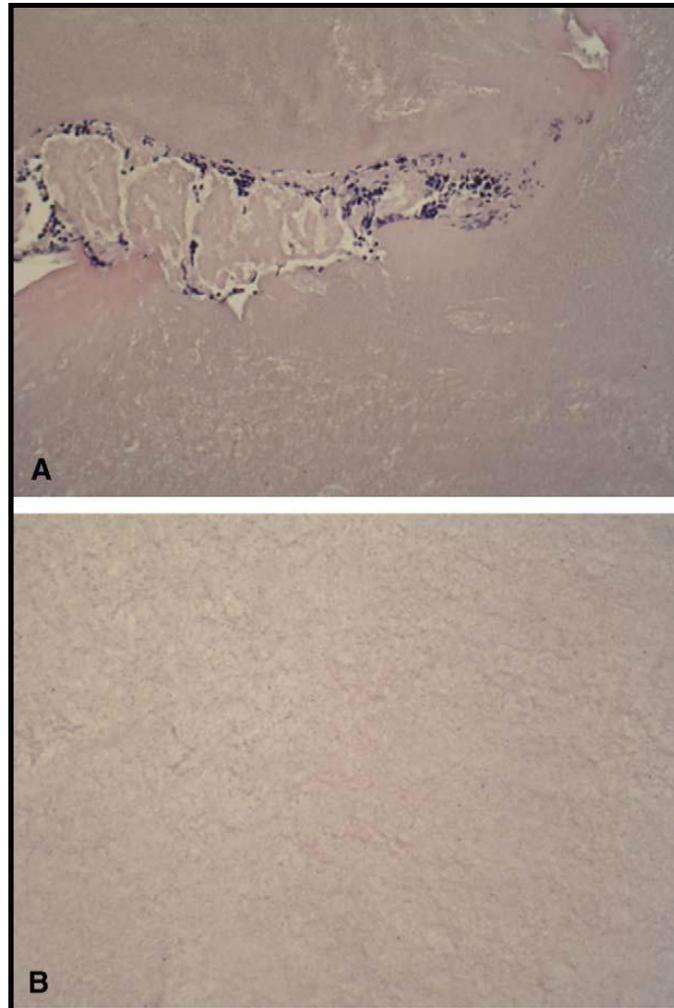


Figura 6. La parte inferior de la matriz de fibrina FRP está ocupada por rayas blanquecinas que parecían agregados fragmento de células en cortes histológicos. Estas son las acumulaciones de plaquetas y constituyen una "coagulo" (A). (B) Pero no hay plaquetas o de cualquier otro cuerpo celular en la parte superior del coágulo de fibrina FRP. Corte con Hematoxilina y eosina, de 52 X de aumento.

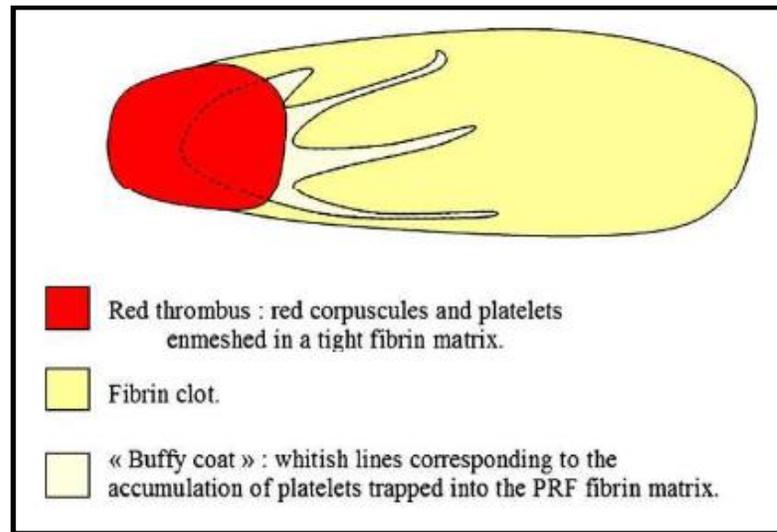


Figura 7. El coágulo de fibrina FRP obtenido se divide en 3 partes: un trombo rojo en contacto con la sangre de glóbulos rojos de base (rojo), un gel de fibrina acelular (amarillo) y una red de columnas correspondiente a la acumulación de plaquetas (blanco).

Por último, es de gran interés señalar que la matriz de FRP contiene una malla de glicosaminoglicanos (heparina, ácido hialurónico) de la sangre y plaquetas. Su aspecto histológico después de la tinción azul de Alcian (Fig. 8) sigue la arquitectura fibrilar de fibrina, lo que significa que estos vínculos se incorporan dentro de los polímeros de fibrina. Los glicosaminoglicanos tienen una fuerte afinidad con los pequeños péptidos circulantes (como las citocinas de plaquetas) y una gran capacidad para apoyar la migración celular y los procesos cicatrízales. (89, 90, 91, 92, 93, 94, 95)

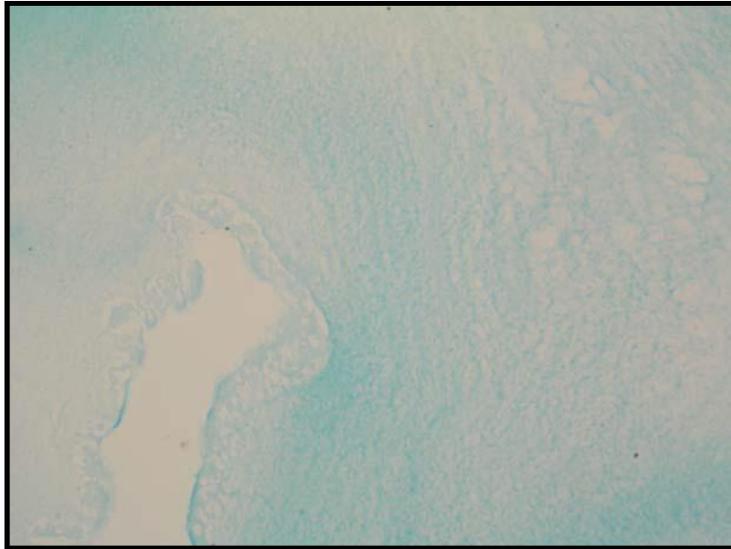


Figura 8. Distribución de la cadena de glicanos dentro del coágulo de fibrina FRP (pH 1 Alcian manchas azules, 52 X de aumento)

CANTIDAD DE CITOCINAS PLAQUETARIAS EN LOS CONCENTRADOS PLAQUETARIOS.

Las citocinas plaquetarias desempeñan un papel fundamental en los mecanismos de cicatrización inicial, debido a su capacidad para estimular la migración y la proliferación celular (especialmente por PDGFs) e inducir la remodelación de la matriz de fibrina, así como la secreción de una matriz de colágeno cicatrizal (en particular por TGF β). Su cuantificación debe primero determinar si estas moléculas se acumulan: ¿Están concentrados en el sobrenadante acelular o atrapadas en el coágulo FRP? Y, más significativamente, ¿están en

solución en el coágulo de fibrina o incorporadas a la red de polímero de fibrina?

Estas preguntas son respondidas por Choukroun (2001) ^(95, 96) en su trabajo “fibrina rica en plaquetas (FRP)” como una segunda generación de concentrado de plaquetas. Parte II: Plaquetas relacionadas con las características biológicas.

En este estudio se analizó el perfil de secreción de tres isoformas de estas citocinas (PDGF-BB, TGF β -1, y el IGF-I) dentro de las diferentes partes del tubo de FRP y estos valores fueron comparados con los obtenidos en los protocolos CPRP.

Este análisis comparativo buscó aclarar las relaciones entre la matriz de fibrina y de plaquetas, las citocinas liberadas durante la centrifugación y la arquitectura biológica principal de FRP.

Las muestras de sangre fueron tratadas según el protocolo FRP (Niza, Francia). ⁽¹⁹⁾. Después de procesar FRP, dos muestras distintas fueron recogidos (Fig. 9):

- El sobrenadante de plasma representado acelular o PPP.
- El exudado resultante de coágulo FRP correspondía a la solución atrapada en las mallas de fibrina. Para la

recogida, es necesario dejar a nuestros coágulos FRP en una taza de metal estéril durante aproximadamente 10 minutos para dejar que ellos liberan lentamente el suero que contiene.

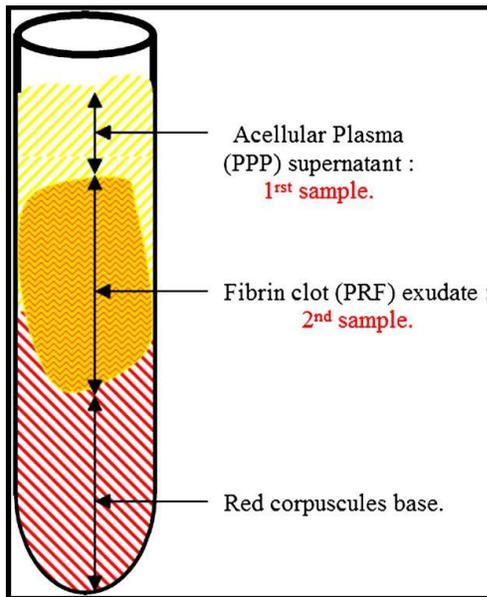


Figura. 9. Representación esquemática de los 3 estratos de centrifugación resultantes de la transformación FRP de acuerdo al protocolo de Choukroun.

El tipo 2 de la muestra se almacenó en 2 tubos de recogida de Eppendorf ml a -80°C . Las tazas de PDGF-BB, IGF-1, y TGF β -1 fueron cuantificadas en estas muestras por ELISA (Quantikine, R & D Systems, Minneapolis, Minn). Los valores medios fueron diferidos en

histogramas y analizados estadísticamente. Estos valores fueron comparados con los obtenidos en sangre total de acuerdo a 2 protocolos:

1. La muestra de sangre fue tomada en un tubo seco e inmóvil durante 30 minutos, para dejar tiempo suficiente para coagular completamente. Luego, el tubo se sometió a una centrifugación de 15 minutos a 1000 g, por lo que es posible recuperar un suero de representante de los tipos de citocinas de la sangre y completamente activado.

2. La muestra de sangre fue tomada con anticoagulante (EDTA, citrato o heparina) e inmediatamente se centrifuga durante 15 minutos a 1000g.

Los resultados experimentales se correlacionaron con un test de Student unilateral, con umbral de 5% de significancia. Estas pruebas se llevaron a cabo en 2 formas diferentes:

- Entre los sobrenadantes PPP y los exudados coágulo FRP.
- Entre los exudados coágulos FRP y respectivamente los tipos medios plasmáticos y serológicos establecidos por el laboratorio.

Por último, un estudio comparativo que se llevó a cabo entre las cuantificaciones de citocinas en los exudados coágulo FRP y estableció los valores CPRP originarios de 5 protocolos diferentes. Estos últimos valores fueron recogidos en la literatura:

- CPRP por separador celular: los valores de Weibrich y cols.⁽⁹⁰⁾
- CPRP por el protocolo 3I PCCS los valores de Weibrich y cols.⁽⁹¹⁾
- CPRP por el protocolo Curasan: los valores de de IGF-I y TGF β -1 de Weibrich y cols.⁽⁹²⁾ y de PDGF-BB de Zimmermann y cols.⁽⁹³⁾
- CPRP por Friadent-Schütze y cosecha protocolos SmartPrep: los valores de Weibrich y cols.⁽⁹⁴⁾

Después de la comparación de los valores del FRP con los obtenidos por otros autores en una amplia gama de protocolos de CPRP,^(90, 91, 92, 93) es posible considerar que, en conjunto, las citocinas plaquetarias de FRP permanecen atrapadas en las mallas de fibrina, y probablemente incluso en el polímero fibrina.⁽²⁶⁾

De hecho, durante el procesamiento de FRP, la ausencia del anticoagulante en el tubo induce la activación masiva de las plaquetas, respaldado por la presencia de una capa de minerales en

las paredes del tubo (partículas de vidrio residual). Estas citocinas son pequeñas moléculas solubles que en una centrifugación natural podrían concentrarse en la parte superior del tubo, es decir, en el sobrenadante. Sin embargo, esto claramente no es el caso. La mayoría de dichas citocinas no se encuentran ni en el sobrenadante, ni en el exudado. De este modo, quedaron atrapadas en la matriz de fibrina FRP, incluso después de la exudación del suero, lo que implica necesariamente la incorporación íntima de estas moléculas en el polímero de fibrina y en su arquitectura molecular.

La citocina IGF-I no es una excepción. Sin embargo, el IGF-I es una molécula que circula principalmente: En las primeras etapas de la centrifugación, esta citocina se concentra inicialmente en la parte superior del tubo, lo que explica las altas concentraciones medidas en ese lugar. Por otra parte, el IGF-I como consecuencia de la degranulación plaquetaria sufre el mismo proceso de incorporación matricial como $TGF\beta$ -1 y PDGF-BB. Las tasas de IGF-I resultantes de las tecnologías de CPRP son bajas, esto ya publicado por varios autores que al cuantificarse en el concentrado de plaquetas propiamente dicho de CPRP son escasas más la mayor parte de la IGF-I circulante se ve en el PPP (sobrenadante) que convencionalmente se desechan durante los primeros pasos de la producción CPRP.

FRP Y CPRP: POLIMERIZACIONES DIFERENTES Y PRODUCTOS BIOLÓGICOS.

A diferencia de adhesivos de fibrina simples (Fig. 10), o concentrados de plaquetas CPRP (Fig. 11), el FRP es el resultado de una polimerización natural y progresiva que ocurren durante la centrifugación. La red de fibrina presenta una organización homogénea tridimensional, aún más coherente que los coágulos de fibrina naturales. Esto es confirmado por tinción con azul de Alcian: observándose cadenas de glicanos siguiendo escrupulosamente la arquitectura fibrilar de las mallas de fibrina y estos resultados se observan con las principales glicoproteínas estructurales, como la fibronectina (Fig. 12).

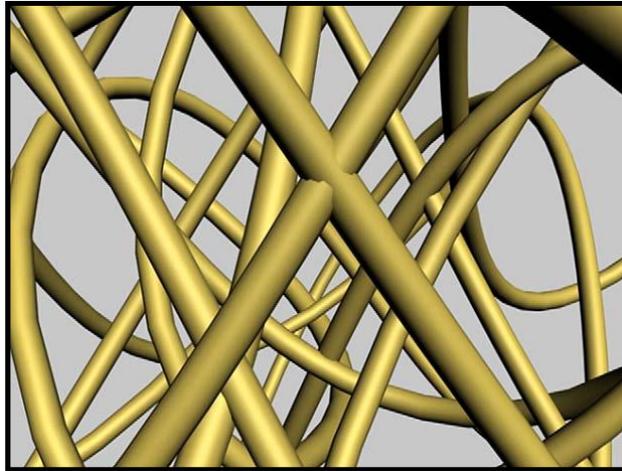


Figura 10. Modelos computadorizados de una red de fibrina resultantes de la polimerización de los adhesivos de fibrina. En estos adhesivos como Tisseel, la fibronectina está atrapado en las mallas (no representada aquí).

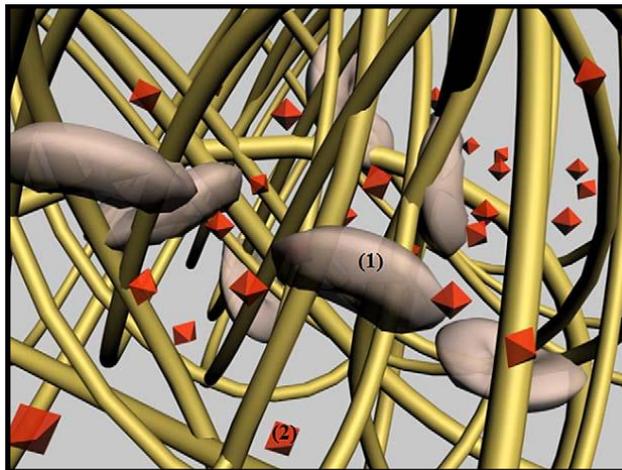


Figura 11. Modelo computarizado de una red de fibrina como consecuencia de una polimerización de CPRP. Las plaquetas activadas se encuentran atrapadas en las mallas de fibrina y la liberación de una cantidad significativa de las citocinas extrínsecamente retenidas en la arquitectura de la fibrina. (1) plaquetas atrapadas en el gel de fibrina. (2) citocinas de plaquetas en la solución (extrínsecas).

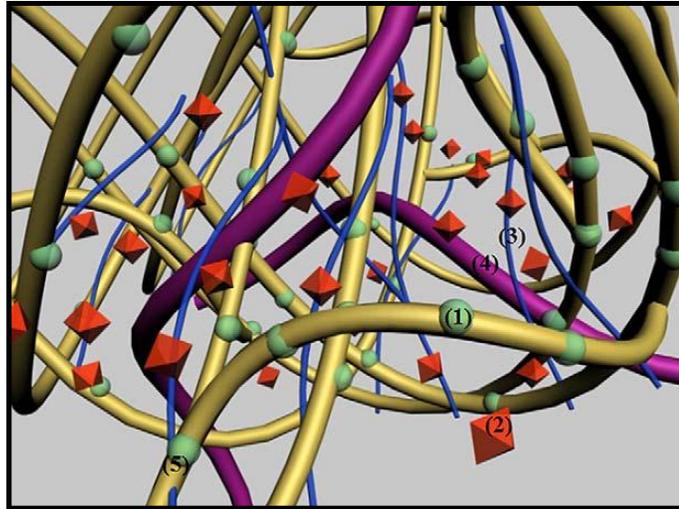


Figura. 12. Modelado computarizado de un coágulo de FRP. Nótese la presencia de glicoproteínas estructurales (fibronectina) y las citocinas extrínsecas (en disolución) atrapados en la matriz de fibrina. El proceso de polimerización lenta FRP también permitiría mantener el valor intrínseco de las cadenas de glicanos y citocinas en polímeros de fibrina, pareciéndose así a un trombo de fibrina natural. (1) Citocinas intrínsecamente retenidas dentro de fibrillas de fibrina. (2) citocinas de plaquetas en la solución (extrínsecamente asociadas con los polímeros de fibrina). (3) fibrina asociada a las cadenas de glicanos. (4) glicoproteínas circulantes (fibronectina). (5) fibrillas de fibrina asociados con las cadenas de glicanos y citocinas intrínseca.

Por otra parte, un modo de polimerización progresiva significa un incremento de la incorporación de las citocinas circulantes en las mallas de fibrina (citocinas intrínseca). Esta configuración implica una vida útil mayor de estas citocinas, porque van a ser liberados y utilizados únicamente en el momento inicial de la remodelación de la matriz cicatricial (efecto a largo plazo). Las citocinas se mantienen disponibles in situ durante un período conveniente, cuando las células empiezan la remodelación de la matriz cicatricial, es decir, cuando

tienen que ser estimuladas para iniciar la reconstrucción en el sitio de la lesión.

Por último, la polimerización lenta con concentraciones fisiológicas de trombina implica una arquitectura muy elástica (uniones equiláteras entre fibrillas de fibrina particularmente favorable a la migración celular y la retención de la molécula soluble. En cambio, el modo de polimerización de CPRP (y adhesivos de fibrina) hace de la incorporación íntima de las citocinas a la matriz de fibrina difícil. Debido a las altas tasas de trombina necesarias para la creación rápida del adhesivo de fibrina se polimeriza de forma rígida (uniones bilaterales condensadas). Las citocinas plaquetarias en libertad serán, pues, extrínsecas, es decir, atrapados en la suspensión coloidal entre la fibrina mallas de red durante la gelificación (Fig. 10 y fig. 11).

Su eliminación fisiológica será rápida y una gran porción de las citocinas se perderán a diferencia de las de FRP que se usaran en liberación prolongada controlada (Fig. 12).

Todos estos parámetros comparativos permiten considerar al FRP como un biomaterial de cicatrización mas como un nuevo tipo de adhesivo de fibrina biológico a pesar de presentar sus ventajas. ^(73, 76)

Este análisis bioquímico de la composición FRP indica que este biomaterial consiste en un conjunto íntimo de las citocinas, las cadenas de glicanos, y glicoproteínas estructurales atrapados dentro de una red de fibrina lentamente polimerizada. Estos componentes presentan efectos sinérgicos en los procesos de cicatrización, como por ejemplo, la fibronectina, en la proliferación celular y la guía de migración y la potencia los efectos estimulantes de PDGF-BB.

2.3 ACTIVIDAD LEUCOCITARIA EN EL FRP

Los concentrados plaquetarios son biomateriales que proveen de una matriz que favorece el proceso cicatrizal ^(17, 20, 74, 75), así como intervienen en la disminución de la inflamación. Por tanto es importante identificar en el coágulo FRP todas las moléculas de la regulación homeostática, capaces de controlar la inflamación postquirúrgica. Aunque obviamente, las secreciones de plaquetas desempeñan un papel significativo ^(19, 23, 78, 93), otros elementos de la sangre son capaces de liberar citocinas, con propiedades que pueden intervenir en la regulación de las reacciones inflamatorias como es el caso de los leucocitos. ⁽⁹⁷⁾

LAS CITOCINAS, LA HOMEOSTASIS, Y LA INFLAMACIÓN

INFLAMACIÓN

Se trata de una respuesta inespecífica frente a las agresiones del medio, y está generada por los agentes inflamatorios. La respuesta inflamatoria ocurre sólo en tejidos conectivos vascularizados y surge con el fin defensivo de aislar y destruir al agente dañino, así como reparar el tejido u órgano dañado. Se considera por tanto un mecanismo de inmunidad innata, estereotipado, en contraste con la reacción inmune adaptativa, específica para cada tipo de agentes infeccioso. ⁽⁹⁷⁾

La inflamación es definida por todos los fenómenos iniciados en reacción o respuesta a una agresión concreta. El proceso inflamatorio puede diferenciarse en tres fases sucesivas: fase vascular, fase celular, y la fase de cicatrización.

La fase vascular se caracteriza por el desarrollo de la hemostasia (la constitución de una matriz de fibrina cicatricial) y la instalación de un nodo leucocitario (es decir, células con propiedades antiinflamatorias capaces de producir una barrera anti infecciosa en las primeras etapas de la cicatrización) ⁽⁹⁷⁾

El fenómeno inicial vasoexudativo permite la migración de leucocitos al sitio de la inflamación. El primero en el lugar son los leucocitos polimorfonucleares, que son sustituidos por los monocitos / macrófagos, elementos con alta capacidad de fagocitosis. Los linfocitos y plasmocitos toman parte en la reacción antígeno específico. ⁽⁹⁷⁾

Todas estas células se activan en los sitios de inflamación y secretan citocinas y factores de crecimiento. Estos mediadores de la inflamación actúan sobre los fibroblastos, inducen la proliferación, y estimulan la biosíntesis, lo que lleva a la secreción de las proteasas (metaloproteasas de la matriz, la plasmina), así como la neo síntesis de matrices de macromoléculas. ⁽⁹⁷⁾

Como los procesos inflamatorios son inherentes al propio acto quirúrgico, la adición FRP es capaz de reducir muchos efectos nocivos, principalmente mediante las citocinas concentradas en el material y su liberación prolongada. ⁽⁹⁷⁾

CITOCINAS INFLAMATORIAS

El número de mediadores implicados en los procesos inflamatorios es alto y variado, sin embargo es importante resaltar la acción de 3 citocinas inflamatorias principales: IL-1 β , IL-6 y TNF-a.

Es importante tener en cuenta que durante un fenómeno inflamatorio, los picos de secreción de estas citocinas se sincronizan en tiempo y espacio. De hecho, estas tres moléculas en conjunto, constituyen un eslabón clave en la inflamación. ⁽⁹⁷⁾

LA INTERLEUCINA-1B (IL-1B)

IL-1 es producida por los macrófagos activados, neutrófilos, células endoteliales, fibroblastos, los queratinocitos, y células de Langerhans. Es un mediador clave en el control de la inflamación. ^(98, 99, 100, 101, 102) Existe en dos isoformas, α y β , que corresponde a dos genes diferentes, pero conserva el 27% de homología proteica. IL-1 β sigue siendo la forma predominante.

La síntesis de IL-1 está mediada por el TNF- α , interferones (IFN), β y γ , y endotoxinas bacterianas. Su actividad principal es la estimulación de los linfocitos T helper. ⁽¹⁰¹⁾

La combinación de TNF- α , IL-1 estaría implicado en la osteólisis. De hecho, se activa e inhibe los osteoclastos por tanto afecta la formación de hueso. ⁽¹⁰¹⁾

LA INTERLEUCINA 6 (IL-6)

La IL-6 es una citocina inflamatoria asociada a la IL-1 β y TNF- α .
(103, 104) Su fuente principal es la de monocitos estimulados, fibroblastos y células endoteliales. Macrófagos, linfocitos T y B, granulocitos, mastocitos, condrocitos y osteoblastos también producen IL-6 después de ser estimulados.

Fisiológicamente, la secreción de IL-6 es estimulada por la IL-1, endotoxinas bacterianas, TNF- α , y PDGF. IL-6 también pueden estimular o inhibir su propia síntesis. (105)

IL-6 es un factor de diferenciación de los linfocitos B y un activador de los linfocitos T. En presencia de IL-2, induce la diferenciación de los linfocitos T maduros e inmaduros en los linfocitos T citotóxicos. Por otra parte, después de pretratamiento de la célula y la activación por IL-4, la IL-6 es capaz de inducir la diferenciación final de los linfocitos B y la secreción de plasmocitos, además la IL-6 estimula la secreción de anticuerpos. Esta tasa puede aumentar desde 120 hasta 400 veces. En conjunto con la IL-3 actúan de forma sinérgica para promover la proliferación de células madre hematopoyéticas *in vitro*.

IL-6, por tanto, constituye una vía importante para la amplificación de las señales transmitidas a las células inmunológicas. ^(97, 105) Así, IL-6 participa en la reacción en cadena que lleva a la inflamación, destrucción, y la remodelación.

FACTOR DE NECROSIS TUMORAL A (TNF-A)

TNF-a es una de las primeras citocinas liberadas durante la respuesta inflamatoria a la agresión de la endotoxina bacteriana. Después de la estimulación de los antígenos bacterianos, el TNF-a es secretada por los monocitos / macrófagos, neutrófilos, los leucocitos polimorfonucleares y los linfocitos T. Su producción está regulada por la IL-6 y TGF- β . ⁽¹⁰⁶⁾

El TNF-a activa los monocitos y estimula la capacidad de remodelación de los fibroblastos. Además, aumenta la fagocitosis y la citotoxicidad de los neutrófilos y modula la expresión de mediadores claves, tales como la IL-1 e IL-6. ^(107, 108)

CITOCINAS CICATRIZALES

Las propiedades cicatrizales de las citocinas pueden ser de dos tipos:

- Inhiben la señal de las vías inflamatorias y neutraliza su amplificación. Este es el caso de IL-4.
- Apoyan y coordinan el desarrollo de las estructuras iniciales cicatriciales, tales como tubos vasculares. Este es el caso de VEGF. ⁽⁹⁷⁾

LA INTERLEUCINA 4 (IL-4)

La IL-4 se produce principalmente por una subpoblación de células T activadas (TH2, CD4+), que también secretan IL-6. ⁽¹⁰⁹⁾ Esta citocina convencionalmente apoya la proliferación y diferenciación de las células B activadas. ^(110, 111)

Durante los fenómenos inflamatorios, su función principal es apoyar la cicatrización al actuar como un modulador de la inflamación. Por ejemplo, aumenta la síntesis de colágeno fibrilar por los fibroblastos ⁽¹¹²⁾ e inhibe la estimulación de la MMP-1 y MMP-3 por la IL-1 β . De hecho, se neutraliza todas las vías de transducción mediadas por las señales producidas por la IL-1 β , como la estimulación de la síntesis de PGE2. ⁽¹¹³⁾ La IL-4 actúa sobre los macrófagos puede prevenir la producción de IL-1 β , TNF- α , al igual que puede actuar sobre las prostaglandinas en respuesta a la activación de las células por endotoxinas bacterianas o IFN- γ . ^(114, 115)

FACTOR DE CRECIMIENTO VASCULAR ENDOTELIAL (VEGF)

El VEGF es el más poderoso promotor de crecimiento vascular conocido.⁽¹¹⁶⁾ Desempeña un papel directo en el control de los comportamientos de las células endoteliales, como la proliferación, la migración, la especialización, o simplemente su supervivencia.^(117, 118) De hecho, la simple presencia de estas citocinas será suficiente para iniciar la angiogénesis y la combinación de sus diferentes isoformas hará posible dirigir y perfeccionar el plan de desarrollo de crecimiento de la red endotelial.⁽¹¹⁹⁾

CITOCINAS LEUCOCITARIAS EN EL COÁGULO DE FRP

Al haber desglosado las funciones y características de las citocinas antes mencionadas es importante señalar su presencia en la formación del coágulo de FRP, y que su presencia da a este material propiedades de estimulación inmunológica y el control de la inflamación.

Es por ellos que Dohan y Choukroun (2006)⁽⁹⁷⁾ señalan a través del estudio que citamos a continuación la presencia de estas citocinas en las diferentes partes del tubo durante el procesado del FRP.

Se busco cuantificar tres citocinas moduladoras de la inflamación (IL-1 β , IL-6 y TNF-a), una citocina cicatrizal (IL-4), y un promotor de la angiogénesis (VEGF), en los diferentes estratos del tubo centrifugado de FRP, es decir en el plasma pobre en plaquetas y en el FRP propiamente dicho.

El estudio consto del procesamiento de las muestras de 15 voluntarios hombres no fumadores entre 20 y 28 años de edad, practicándole a la muestra el protocolo expuesto por Joseph Choukroun. ^(72, 95)

Las tazas de IL-1 β , IL-4, IL-6, TNF-, y el VEGF se cuantificaron en estas muestras por pruebas ELISA (Quantikine, R&D Systems, Minneapolis, Minn). Los valores medios fueron diferidos en histogramas y analizados estadísticamente.

Estos valores fueron comparados con los obtenidos en sangre total de acuerdo a 2 protocolos:

- La toma de sangre en un tubo seco y mantenido inmóvil durante 30 minutos, para dejar tiempo suficiente para coagular completamente. Luego, el tubo se somete a una centrifugación de 15 minutos a 1000 g, por lo que es posible recuperar suero

donde se evaluara las citocinas en sangre completamente activado.

- La toma de sangre con anticoagulante (EDTA, citrato o heparina) e inmediatamente se centrifuga durante 15 minutos a 1000g. El análisis del plasma a continuación indicó los tipos de citocinas libres circulantes en la sangre no activada.

Los resultados se correlacionaron con una prueba de Student unilateral, con un umbral del 5% de significancia. Estas pruebas se llevaron a cabo en 2 formas diferentes:

- Entre los sobrenadantes PPP y los exudados coágulo FRP
- Entre los exudados coágulo PRF y el promedio de las tasas medias plasmáticas y serológicos establecidos por el laboratorio.

En los resultados obtenidos del análisis estadístico de los datos, se destacan principalmente dos ideas principales. En primer lugar, no existen diferencias significativas entre las concentraciones de citocinas medido en PPP sobrenadante y los de la coagulación del FRP real.

En segundo lugar, los valores obtenidos en exudados del coágulo de FRP (o el sobrenadante PPP) son significativamente superiores a los medidos en muestras de plasma y suero.

Estos resultados son idénticos independientemente de la citocina estudiada, mediadores inflamatorios, como la IL-1 β , IL-6 y el TNF ó las citocinas cicatrizales, como la IL-4. Sólo el VEGF fue una excepción, con concentraciones serológicas especialmente elevadas.

En la discusión los autores señalan que consiguieron concentraciones significativas de todas las citocinas estudiadas, y aseveran su origen a la presencia de leucocitos durante el lento procesamiento del FRP donde hay la degranulación de los mismos y la comparación con las otras muestras del estudio revelan muy claramente un fenómeno de activación durante la centrifugación de procesamiento del PRF. ⁽⁹⁷⁾

Además, si relacionamos estos resultados con las conclusiones de sus investigaciones anteriores ⁽⁹⁶⁾ donde se cuantificaron citocinas plaquetarias, implicaría que las citocinas probadas en este trabajo quedan progresivamente atrapadas en las redes de fibrina durante la centrifugación: Al igual que las moléculas de plaquetas, estas citocinas leucocitarias serán sin duda atrapados en las mallas de

fibrina y liberadas lentamente. Lo que lleva a los autores a considerar el coágulo FRP como un nodo de la organización inmune.

Su capacidad de defensa contra las infecciones puede ser muy significativa, por las propiedades quimiotácticas de estas citocinas, así como por su capacidad para facilitar el acceso al sitio de la lesión (neovascularización). Por último, es muy interesante notar la presencia de citocinas inflamatorias de control cicatrizal, particularmente IL-4.⁽⁹⁷⁾

Dentro de sus conclusiones mencionan el papel de las citocinas que juegan en el delicado equilibrio de la homeostasis del tejido. Aunque CPRP y ahora FRP presentan características relativas a las plaquetas ya bien documentadas.^(90, 91,92) Este definitivamente no es el caso en los aspectos inflamatorios. Los resultados obtenidos por lo tanto abren una nueva oportunidad de investigación para la comprensión de estas tecnologías, porque FRP no sólo es un concentrado de plaquetas, sino también puede un nodo inmunitario capaz de estimular los mecanismos de defensa. Es incluso probable observar una modulación importante del proceso inflamatorio en los sitios quirúrgicos tratados con FRP, resultante de los efectos de las citocinas atrapadas en la red de fibrina y su liberación durante la remodelación de esta matriz inicial.⁽⁹⁷⁾

3. GENERALIDADES ACERCA DEL EFECTO DEL FRP EN LA CICATRIZACIÓN Y REGENERACIÓN DE LOS TEJIDOS.

Aunque las plaquetas y leucocitos desempeñan un papel importante en la biología de este biomaterial, la matriz de fibrina sin duda constituye el elemento determinante y responsable del potencial terapéutico real del FRP. (53, 73, 74, 75, 76, 93, 94, 95, 96, 97) Para comprender el efecto biológico de esta matriz de fibrina, es importante dividir las observaciones clínicas en 4 aspectos muy específicos de cicatrización: la angiogénesis, el control inmunológico, el aprovechamiento de las células madre en circulación, y el recubrimiento epitelial de la herida.

LA ANGIOGÉNESIS, LA INMUNIDAD, Y EL RECUBRIMIENTO EPITELIAL

Estas son las 3 claves de la cicatrización y maduración de los tejidos blandos. Las membranas de FRP son capaces de soportar simultáneamente el desarrollo de estos 3 fenómenos.

LA FIBRINA COMO GUÍA NATURAL DE LA ANGIOGÉNESIS

La angiogénesis consiste en la formación de nuevos vasos sanguíneos dentro de la herida. Se requiere una matriz extracelular

para permitir la migración, la división y el cambio de fenotipo de las células endoteliales. Se ha demostrado claramente que la matriz de fibrina conduce directamente la angiogénesis. ⁽¹²⁰⁾

La propiedad angiogénica de la matriz de fibrina ⁽⁸⁾ se explica por la estructura 3-dimensional del gel de fibrina y por la acción simultánea de las citocinas atrapados en las mallas. Por otra parte, los factores de angiogénesis solubles como el factor principal de crecimiento de fibroblastos-básico (FGFb), factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), de la angiopoyetina derivado de las plaquetas y el factor de crecimiento (PDGF) se incluyen en el gel de fibrina. Algunos estudios ^(121, 122) indican que FGFb y PDGF pueden unirse a la fibrina con alta afinidad. Por lo tanto, la inducción directa de la angiogénesis de fibrina podría explicarse por los numerosos factores de crecimiento unidos a la fibrina.

En los modelos *in vitro* desarrollados por Nehl y Hermann (1996) ⁽¹²³⁾ han demostrado que la estructura y propiedades mecánicas del coágulo de fibrina son también factores importantes. La rigidez de la matriz influye considerablemente en la formación de capilares por las células endoteliales en respuesta a FGFb o la estimulación de VEGF. Estas diferencias en la configuración de la matriz de fibrina son cruciales para la comprensión de las diferencias

biológicas entre la cinética de la cola de fibrina, los concentrados de plasma rico en plaquetas CPRP y FRP.

Una fase importante de la angiogénesis es la expresión de la $v\beta 3$ integrina por las células endoteliales, lo que permite que las células se unan a la fibrina, la fibronectina y la vitronectina. En cultivos de células endoteliales humanas se ha podido evidenciar la relación entre la fibrina y la expresión de esta integrina ⁽¹²¹⁾

LA FIBRINA Y SU ACCIÓN COMO AGENTE INMUNITARIO

La fibrina y los productos de degradación del fibrinógeno (FDP) estimulan la migración de neutrófilos y aumentan la expresión en las membranas de los receptores de CD11c/CD18. Este receptor permite la adhesión de los neutrófilos al endotelio y la relación con el fibrinógeno, así como la trans migración de los neutrófilos. ⁽¹²⁴⁾ Por otra parte, la fagocitosis de los neutrófilos y el proceso de degradación enzimática son modulados por FDP. ⁽¹²⁵⁾

Los monocitos llegan a la zona de la lesión después de los neutrófilos. Se ha demostrado que la colonización de la herida por los macrófagos está controlada por la fibronectina a través de las propiedades químicas y físicas de la fibrina y por agentes quimiotácticos atrapados en el entrelazado de sus fibras. ⁽¹²⁶⁾

Por ejemplo, añadir FDP dímero D al medio de cultivo de líneas de células promonocítica aumenta la secreción de interleuquina (IL) -1 y activador del plasminógeno (uPA). ⁽¹²⁷⁾ Esto implica una retroalimentación positiva de la fibrina en los eventos inflamatorios.

LA FIBRINA Y EL RECUBRIMIENTO DE LA HERIDA

La matriz de fibrina guía la cobertura de los tejidos dañados, afectando el metabolismo de las células epiteliales y fibroblastos. Alrededor de los márgenes de la herida, las células epiteliales pierden su polaridad basal y apical y producen extensiones basales y laterales hacia los lados de la herida. Posteriormente, las células migran en la matriz transitoria creada por el fibrinógeno, la fibronectina, tenascina, y vitronectina. Esta migración es más como una degradación de la matriz real que una simple traducción. ⁽⁹⁸⁾

La Fibrina, la fibronectina, PDGF y factores de crecimiento transformante beta (TGF- β) son esenciales para modular la expresión de la integrina, la proliferación de fibroblastos, y su migración dentro de la herida. Estos pueden ser vinculados directamente con la fibrina por las integrinas diferentes, de los cuales es el principal $v\beta 3$ integrina. Gracias a la expresión de dos activadores del plasminógeno, los fibroblastos desarrollan una actividad proteolítica importante para moverse dentro del coágulo de fibrina.

Además, se ha demostrado que la migración *in vitro* de fibroblastos de ratas en gel de fibrina es óptimo cuando hay un número máximo de conexiones cruzadas tipo α .⁽¹²⁹⁾ Este hecho representa una de las diferencias más importantes entre la polimerización rápida de las colas de fibrina (y por extensión, CPRP) y gelificación lenta y efectiva del FRP. Después de la migración y la degradación de la fibrina, los fibroblastos inician la síntesis de colágeno.⁽¹³⁰⁾

Basados en estas consideraciones, el FRP puede ser considerada como una fibrina natural, un biomaterial favorable para el desarrollo de una microvascularización y capaz de orientar a la migración de células epiteliales de su superficie. El interés de la membrana de este tipo es evidente, a saber, para proteger las heridas abiertas y acelerar la cicatrización. Además, esta matriz contiene leucocitos y favorece la migración. Su uso en el control de infecciones en heridas también representa un punto de interés.⁽⁹⁸⁾

LA ANGIOGÉNESIS Y EL APROVECHAMIENTO DE LAS CÉLULAS MADRE

En cualquier fenómeno de la hemostasia y cicatrización, el coágulo de fibrina atrapa las células madre circulantes que llegan a la zona lesionada gracias a la neovascularización inicial. Ya situadas en

la matriz de fibrina, convergen en un fenotipo de células secretoras, y permiten una restauración más rápida del tejido y la vascularidad. (20, 130)

La FRP funciona como una matriz de fibrina fisiológica, lo que se traduce en funcionar a especie de red de células madre, especialmente durante la angiogénesis en la membrana de fibrina. (8) Este aspecto es de particular interés en el caso de defectos óseos amplios. De hecho, la cicatrización de ese tipo de defectos requiere la acumulación de las células madre medulares y su conversión hacia el fenotipo de los osteoblastos.

FIBRINA Y CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES

Las células madre mesenquimales de la médula ósea contribuyen a la regeneración de todo tipo de células óseas y muchos otros tejidos.

Estas células indiferenciadas son reclutadas de la sangre a los tejidos lesionados, (131, 132) en los que son capaces de diferenciarse en varios tipos de células diferentes. Esta diferenciación inicial se produce necesariamente en una matriz de cicatriz transitoria formada por fibrina y fibronectina. Esa es la razón por la que la fibrina es

preferentemente usada como matriz de soporte para el trasplante de estas células.

Varios autores han demostrado que una matriz de fibrina es un apoyo óptimo a trasplantar las células madre mesenquimales para la regeneración de defectos óseos.^(133, 134, 135, 136)

Una matriz de fibrina experimental creada de 18 mg / ml de fibrinógeno y activadas por 100 UI / mL de trombina parece óptimo, *in vitro*, para la proliferación y migración de células.⁽¹³³⁾ Esta matriz artificial parece muy similar a un coágulo de fibrina natural como el FRP.

FIBRINA Y EL TEJIDO ÓSEO

Por otro lado, numerosos estudios *in vitro* y en animales tratan de explicar los efectos de fibrina en la regeneración ósea. Los resultados son contradictorios, teniendo resultados donde la cicatrización ósea se mejoró o se mantiene igual.⁽¹³⁶⁾ Estas divergencias pueden ser causadas por las diferencias entre los modelos utilizados: tipo de animal, defecto óseo, y el gel de fibrina utilizado.

Sin embargo, la fibrina es una matriz de soporte reconocida para los trasplantes de proteína morfogenética ósea (BMP). Por lo tanto, la matriz de fibrina que se ha asociado con BMPs posee propiedades angiogénicas, hemostáticas, y osteoconductoras ⁽¹³⁷⁾ El BMPs enredado en la matriz de fibrina es progresivamente liberado, y cuando se trasplantan por vía intramuscular son capaces de inducir la formación de hueso. Esta liberación progresiva de las citocinas es una característica común de coágulo de fibrina en vivo natural y previsible de FRP.

El FRP tiene que ser considerado como un biomaterial de fibrina. Su estructura molecular con baja concentración de trombina es una matriz óptima para la migración de células endoteliales y fibroblastos. Permite una rápida angiogénesis y más fácil de remodelación de la fibrina en un tejido conjuntivo más resistente. Por lo tanto, estas membranas de FRP se pueden utilizar para todo tipo de cicatrización cutánea y mucosa superficial. ⁽⁹⁸⁾

No es sólo una membrana de fibrina simple. También es una matriz que contiene todos los elementos moleculares y celulares que permiten la cicatrización óptima. La matriz lleva todos los componentes favorables presentes en una muestra de sangre. Por eso, este biomaterial se puede considerar un concentrado fisiológico.

Se obtiene sin ningún tipo de adición o la manipulación. Numerosas aplicaciones extraorales se pueden imaginar. ⁽⁹⁸⁾

La experiencia clínica referida por su creador, ^(95, 96, 97) confirma que la FRP puede ser considerado como un biomaterial de cicatrización. Cuenta con todos los parámetros necesarios que permitan una regeneración óptima. Estas consisten en una matriz de fibrina polimerizada en una estructura tetramolecular, la incorporación de las plaquetas, leucocitos y citocinas, y la presencia de células madre en circulación.

A pesar de que las citocinas atrapadas en el PRF se liberan gradualmente, son capaces de acelerar los fenómenos celulares, la estructura de la red de fibrina es el elemento clave de todos los procesos de cicatrización donde se ve involucrado el FRP. ⁽⁹⁸⁾

4. APLICACIONES EN CIRUGÍA BUCAL Y MAXILOFACIAL DE LA FRP

El uso y aplicaciones de los concentrados plaquetarios son bien conocidos y respaldados por diversos autores en el área de la Cirugía Bucal y Maxilofacial. Sus características osteogénicas, reducción de tiempos de trabajo los siguen colocando hoy en día entre los biomateriales más utilizados. ^(20, 22, 75, 75, 76, 95, 96, 97, 98, 99)

Sin embargo, la FRP por ser un material de relativa novedad no poseen una cantidad tan extensa de estudios clínicos como puede encontrarse del CPRP, sin embargo la literatura existente del material ha buscado comprobar la efectividad del mismo contra los demás concentrados plaquetarios existentes lo que lleva a los autores a pensar que cualquiera que fuese la aplicación clínica quirúrgica donde se aplique se lograrían mejores resultados que con otros biomateriales derivados de plaquetas.

Entre los estudios clínicos existentes se pueden resaltar la serie de casos publicados por Ballester y cols. (2004) ⁽¹³⁸⁾ donde dividen las aplicaciones posibles de la FRP de la siguiente forma:

- Exodoncias Simples y complejas
- Confección de membranas de colágeno
- Cirugía pre-protésica
- Levantamiento de Seno Maxilar
- Implantología e Injertos óseos
- Relleno de cavidades quísticas
- Traumatología
- Otras Aplicaciones

EXODONCIAS SIMPLES Y COMPLEJAS

Estos procedimientos son los más frecuentes en la cirugía bucal, son en los que mas pueden encontrarse alternativas de tratamiento en la literatura, ya que hoy día se busca durante y posterior a este acto quirúrgico disminuir el tiempo de espera en la cicatrización, una correcta estética gingival posterior a la cicatrización del alvéolo el mantenimiento de la altura ósea y una mejora significativa de la calidad de ese nuevo hueso cicatrizado, esto sin dejar por fuera el correcto control infeccioso e inflamatorio, buscado tanto por el cirujano como por el paciente.

En esta línea son muchos los trabajos publicados acerca del uso de injertos y biomateriales para obtener las características mencionadas anteriormente, este es el caso por ejemplo del uso de injertos óseos de diversos tipos sean autólogos, aloinjertos o xenoinjertos siendo más frecuente el uso de los dos últimos. Esto conlleva a tener características osteoconductoras u osteoinductoras, logrando regeneración de hueso en la zona.

El problema de este tipo de injertos es no poseer el componente celular osteogénico que modula y mejora la cicatrización de los injertos. Esto podemos ilustrarlo con trabajos como el de Carmagnola en Suecia, ⁽¹³⁹⁾ donde realiza una serie de casos que posterior a

procedimientos de exodoncia simple rellena el alveolo con un material osteoconductor (Bio-Oss), otro grupo simplemente lo recubre con una membrana de colágeno y los compara con un grupo control donde no se usa ningún tipo de biomaterial, posterior al período de cicatrización y previo a la colocación de implantes, se tomó una muestra del hueso formado en la zona y la misma fue analizada.

En los resultados se observó que los alvéolos mejor cicatrizados fueron donde se usó la membrana de colágeno seguido del grupo control, en cuanto, al grupo donde se uso el material osteoconductor pudo observarse que mientras más lejana la muestra de los bordes del alvéolo más zonas de material eran encontradas, también se observaron zonas grandes de tejido fibroso y zonas de hueso intercaladas. ⁽¹³⁹⁾

Dentro de las conclusiones plantean la carencia y necesidad de células sanguíneas en la zona más central de la muestra del segundo grupo, razón por la cual se recomienda la combinación del material con elementos osteogénicos. También cabe destacar que en los resultados con el uso de membrana se expone lo explicado por otros autores acerca del uso de materiales de recubrimiento para la cicatrización de las heridas. ⁽¹³⁹⁾

Basándose entonces en estas necesidades y el uso de materiales osteogénicos, Ballester ⁽¹³⁸⁾ publica una serie de 100 casos de procedimientos de cirugía bucal a los cuales aplica FRP obteniendo resultados, según expresa, satisfactorios.

Una de estas aplicaciones fue en exodoncias simples y complejas (dientes en posiciones poco usuales o retenidos) donde posterior a la realización de la Exodoncia el alvéolo es rellenado con FRP y se realizaron evaluaciones clínicas y radiográficas cualitativas posteriores obteniendo resultados satisfactorios en un período no mayor al mes Fig. (13 y 14)

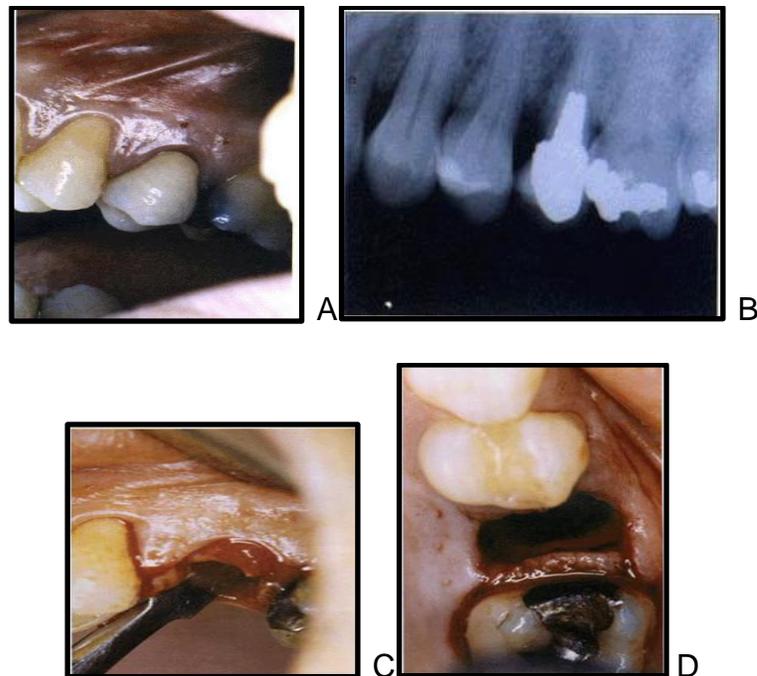


Figura 13 A y B: foto y radiografía inicial de diente a extraer a razón de fractura vertical por perno mal adaptado. C y D Fotografías de la extracción del diente y el alvéolo vacío.

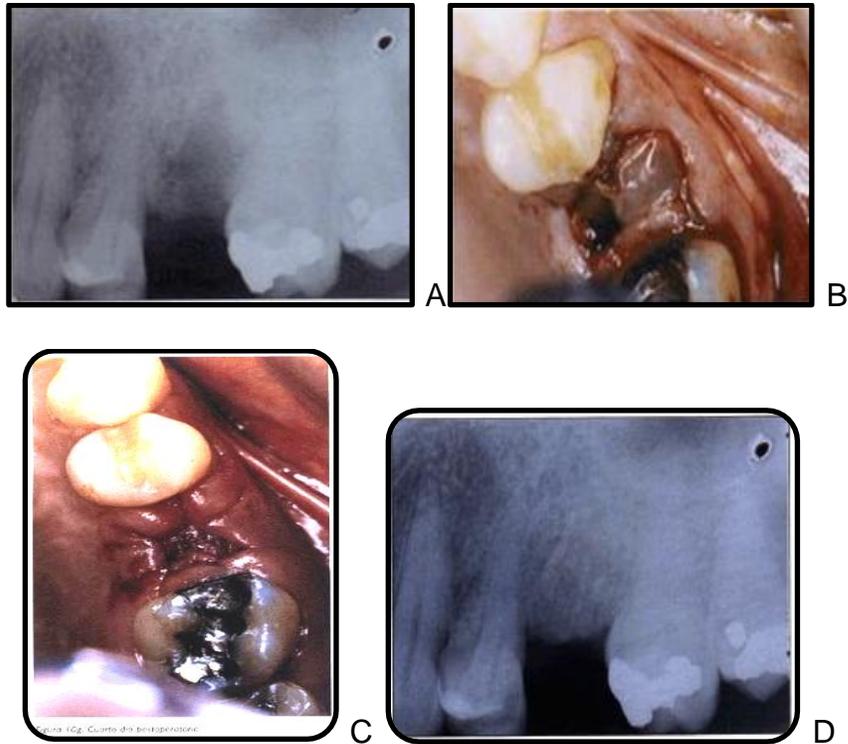


Figura 14 A: radiografía inmediata postextracción. B Alvéolo relleno con FRP. C: fotografía al cuarto día de postoperatorio D: Radiografía al mes de la cirugía.

PREPARACIÓN DE MEMBRANAS

El coágulo de FRP presenta la particularidad que debido a su entramado de fibras colágenas y al eliminar el suero de su contenido puede transformarse en una muy estable y resistente membrana, la cual posee el mismo tipo de colágeno encontrado en las sintéticas que se encuentran en venta para procedimientos de cirugía bucal, con la ventaja que ésta va ser autóloga y tendrá un componente celular en

su entramado además de un costo mucho menor. Esto se logra fácilmente al presionar el coágulo de FRP entre dos gasas embebidas en solución fisiológica estéril. ^(95, 98, 99, 138) (Fig. 15)

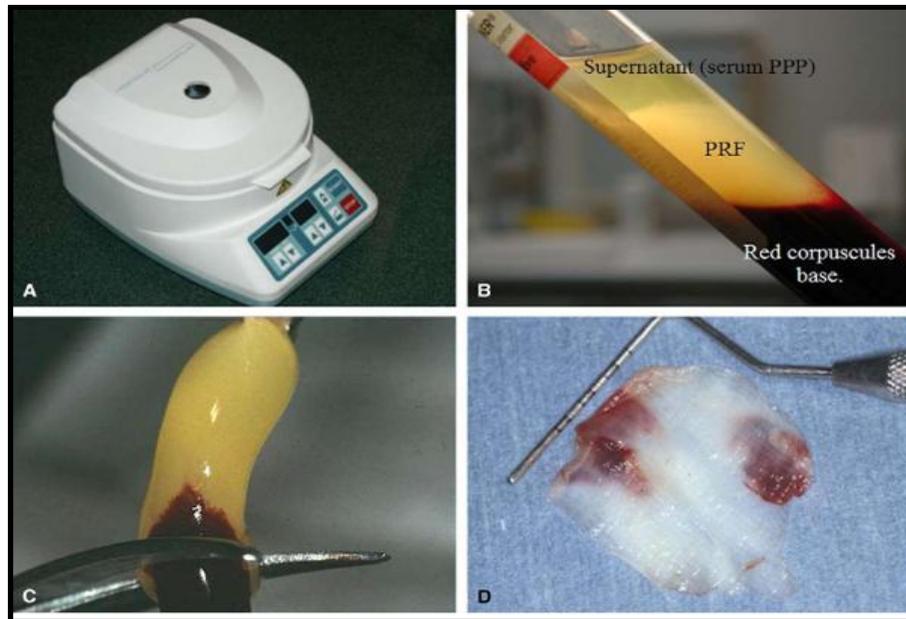


Figura 15: Preparación de la membrana: (A y B) Posterior a la preparación del FRP a través del centrifugado y se extrae el coágulo. (C) Se elimina la porción roja que le acompaña. (D) Posterior a presionarse entre gasas en solución fisiológica adquiere características de membrana.

El interés de esta membrana es evidente pues a un bajo costo nos permitirá utilizarla para proteger heridas abiertas, acelerar la cicatrización, además de todas las ventajas que presenta el uso de

material como microvascularización, acción inmunitaria y modulación de la inflamación y cicatrización. ^(95, 138)

CIRUGÍA PRE-PROTÉSICA

Es también útil en este tipo de cirugías, por ejemplo cuando se deben realizar extracciones múltiples y regularizar los rebordes, el relleno de estos alveolos puede ser hecho con FRP o en combinaciones con otro injerto y cubrirlo con membranas preparadas del mismo material. Esto en vías de mejorar las condiciones de la cicatrización del tejido y la velocidad de la misma. ⁽¹³⁸⁾ (Fig. 16)

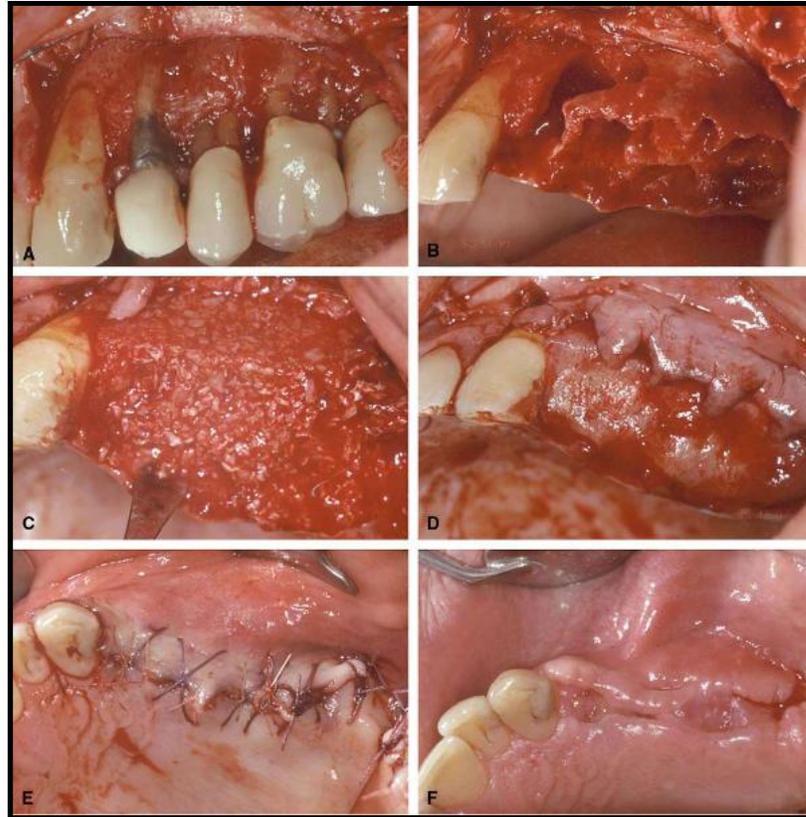


Figura 16: Extracciones dentales y regularización ósea con relleno de los alvéolos en el caso de la periodontitis (A y B) son intervenciones delicadas debido a la dificultad para obtener cobertura de tejido blando en la superficie de la lesión ósea. Los alvéolos están rellenos de hueso alogénico combinado con FRP, (C). El uso de FRP como membranas de cubierta para el injerto (D y E) permite una rápida epitelización de la superficie del sitio, la neutralización de los fenómenos infecciosos. Cuarenta y ocho horas postoperatorias, la herida está totalmente cerrada y las suturas se retiran (F).

PATOLOGÍA

Después de la eliminación completa de un quiste, la cavidad es rellenada rápidamente de sangre. Este coágulo de sangre no es nada más que una versión "ligera" (versión fisiológica) de FRP. La matriz

de fibrina es una trampa para las células madre en circulación. En condiciones normales o fisiológicas la cicatrización de estas cavidades quísticas se ubica entre 6 meses y 1 año dependiendo del tamaño. ^(97, 138) Cuando la cavidad quística está llena de FRP, la cicatrización fisiológica se acelera. Debido a que la matriz de fibrina FRP está mejor organizada, es capaz y de manera más eficiente el aprovechamiento directo de células madre y la programación de la cicatrización. Una cavidad llena de PRF estará totalmente cicatrizada en 2 meses en lugar de los 6 a 12 meses necesarios para la acción fisiológica. ^(97, 138) (Fig. 17).

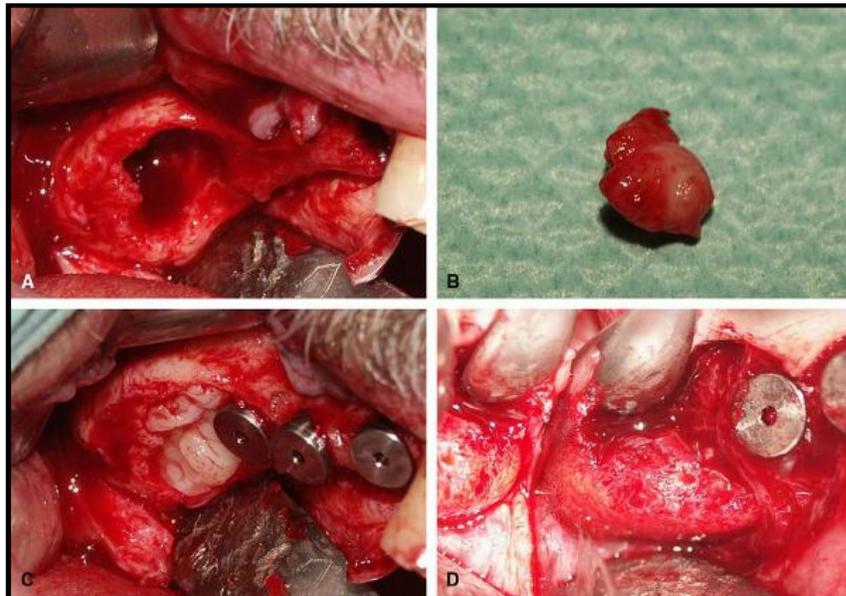


Figura 17. Durante la eliminación de una masa quística maxilar (A y B), la cavidad residual se llenó de FRP (C). Dos meses y medio después, el defecto óseo se sustituye por un hueso denso y cortical (D) en lugar de la media de 10 meses de forma natural. El uso de FRP permite la aceleración de los fenómenos fisiológicos y la posibilidad de restauraciones protésicas en el área.

ELEVACIÓN DE SENO MAXILAR

Al realizar procedimientos para el levantamiento del seno maxilar ya sea con el uso de la técnica transalveolar o con la clásica Técnica de Tatum de abordaje por ventana lateral al seno maxilar, la necesidad de rellenar ese espacio ganado es obvia. Es por ello que múltiples injertos y mezclas de los mismos se han propuesto conforme a los años llegando a la conclusión siempre que el uso de material osteogénico ya sea solo o en combinación con otros huesos o injertos de características diferentes es necesario para tener una mejor condición de la zona para la posterior colocación de implantes. ^(99,140)

Choukroun nos explica y demuestra a través de dos publicaciones las ventajas del uso del FRP a la hora de realizar un levantamiento sinusal. En el primer artículo preparan dos grupos uno donde se rellenó con un aloinjerto combinado con FRP y el otro solo el aloinjerto. Describe en sus resultados que en el grupo donde se usó FRP se veían en el estudio histológico en 4 meses las mismas características observadas en el grupo control en un periodo de 8 meses. Esto le lleva a concluir que el uso de este material reduce significativamente el tiempo de cicatrización. ⁽⁹⁹⁾ (Fig.18)

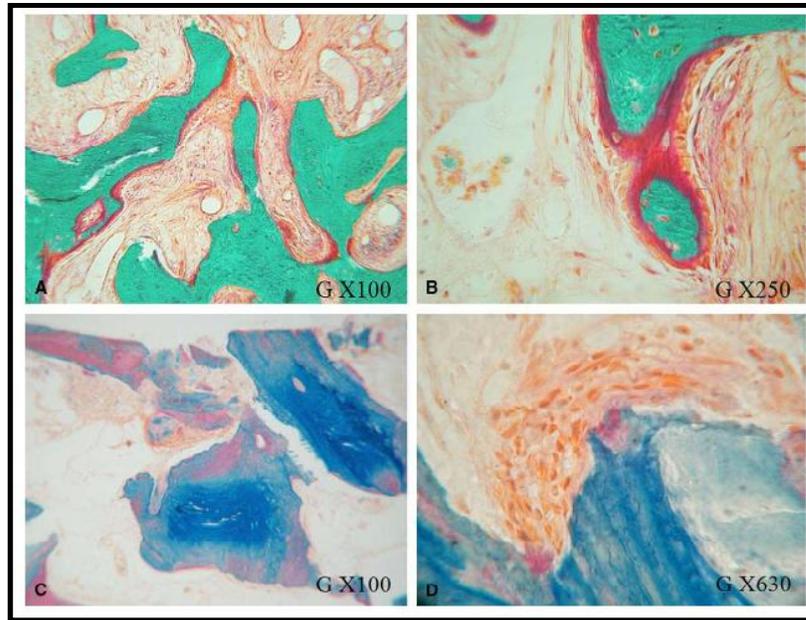


Figura 18: Los análisis preliminares de relieve de hueso trabecular mineralizado rico en osteocitos en injertos de seno maxilar, que aparece en color verde (A y B) o azul (C y D) de acuerdo a la tinción. Los bordes de tejido osteoide se tiñen de rojo (B y D) y están en contacto con densas zonas osteoblásticas.

En un segundo trabajo relacionado a elevación de seno maxilar, ⁽¹⁴⁰⁾ el autor describe las ventajas del uso del FRP a través de un estudio prospectivo donde se hace también la evaluación a nivel radiográfico. Se utilizó en esta oportunidad de elevación transalveolar con el uso de osteotomos. En las conclusiones de la evaluación observaron más y mejor calidad de hueso dentro del seno maxilar en el lado que se uso el FRP. También concluyen igual que en el artículo anterior que con el uso del material disminuyen los tiempos de espera a tres meses.

IMPLANTOLOGÍA

En esta categoría es importante mencionar el uso de las membranas preparadas con el material al igual que la mezcla del FRP con otros materiales de injerto y el relleno e alvéolos postextracciones dentales. Todos estos procedimientos con el uso de FRP son en vías de mejorar las condiciones del lecho receptor a la hora de colocar el implante buscando como mencionamos anteriormente proteger heridas abiertas, acelerar la cicatrización , además de todas las ventajas que presenta el uso de material como la microvascularización, acción inmunitaria y modulación de la inflamación y cicatrización. ^(95, 138)

Ballester también menciona la aplicación con éxito a la hora de colocar implantes inmediatos postextracción, ya que de tener discrepancias entre la distancia del implante a alguna de las tablas esta puede compensarse rellenando el lecho receptor con FRP. ⁽¹³⁸⁾

Fig. (19, 20)

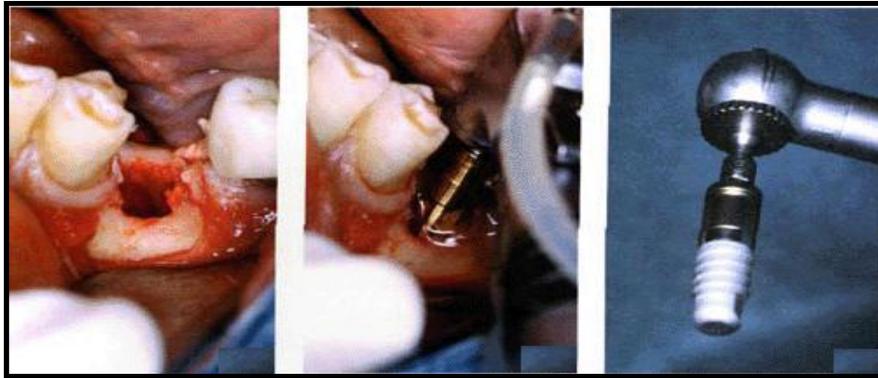


Figura 19. Alvéolo post-extracción dentaria en el que se coloca un pin de paralelismo previo a la colocación del implante esto en vías de probar discrepancias entre el ancho del implante y el lecho receptor.

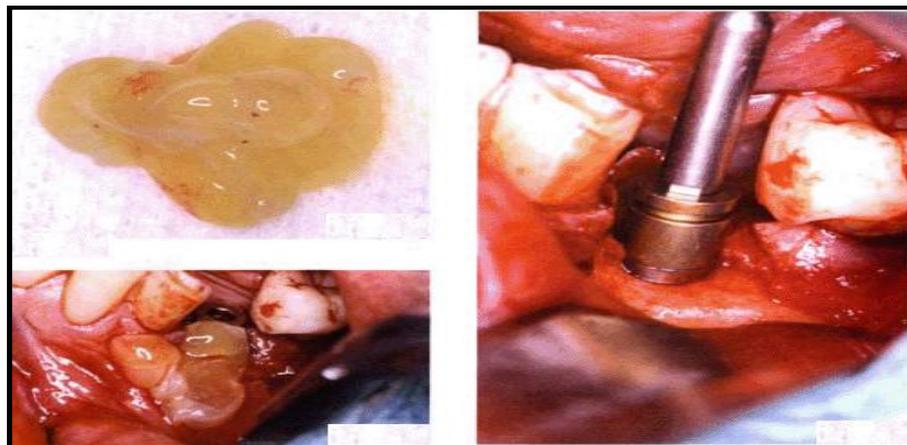


Figura 20. Posterior a la preparación del FRP el alvéolo es rellenado con el mismo, y posteriormente se coloca el implante el cual quedara embebido en el material.

OTRAS APLICACIONES

La cantidad de aplicaciones de este material se limita solo por las decisiones del cirujano, múltiples son los usos que podría darse a este material, como colocarlos posterior al reposicionamiento de una fractura maxilar o mandibular ⁽³³⁾, o bien en los espacios que quedan después de los movimientos maxilares o mandibulares en cirugía ortognática. ^(95, 138)

Casos como trasplantes dentarios donde la necesidad de diferenciación de los tejidos es inminente justifican el uso de este material por su alto contenido de citocinas y mediadores inmunológicos, que controlarán así el proceso inflamatorio que podría traducirse en resorciones radiculares. ⁽⁹⁷⁾

También sería el caso su uso en pacientes con alto riesgo de Necrosis asociada a bisfósfonatos o cuando la entidad está ya instaurada. Ya que partiendo del punto que en estos casos la actividad celular ósea esta disminuida, el uso del FRP acarreará un añadido importante de factores promotores de crecimiento óseo a la zona afectada.

5. APLICACIONES DE LA FRP EN DIFERENTES ÁREAS DE LA MEDICINA

Al igual que los tratamientos odontológicos, muchas son las áreas de la medicina que se ven en la necesidad de utilizar biomateriales que provean a los pacientes de ventajas a la hora de ser intervenidos quirúrgicamente o al recibir algún tratamiento curativo o paliativo a alguna anomalía o patología. ^(95, 96, 97, 98) Es por eso que tras lo expuesto anteriormente, la FRP podría ser considerado un material óptimo para diversas áreas de la medicina como lo son fracturas y reconstrucciones faciales, cirugías cardíacas y craneales (sellado de fugas de líquido cefalorraquídeo) y sellado en la superficie pulmonar de fugas de aire y sangrado tras resección entre otras. ⁽¹⁴¹⁾

Áreas como la cirugía plástica pueden verse beneficiadas con el uso del FRP como lo expuesto Quintana y Saucedo (2007) ⁽¹⁴²⁾ donde exponen el uso de concentrados plaquetarios en colgajos cutáneos.

Este estudio de la regeneración tisular se realizó utilizando plasma rico en factores de crecimiento (PRFC) en los colgajos cutáneos al azar, para evaluar así su viabilidad, efectos sobre la celularidad y neovascularidad por medio de un análisis histológico.

Se realizaron colgajos dérmicos dorsales con relación 1:5 en 16 cobayos divididos en 2 grupos de 8. A un grupo se le aplicó de forma aleatoria PRFC sobre el lecho y al otro grupo se le aplicó solución salina (SS), al término de 14 días se determinó clínicamente la viabilidad del colgajo, se resecó y analizó bajo microscopia. El porcentaje de mayor viabilidad en el grupo de PRFC (69%) contra el de SS (41%) fue significativo $p = 0.04$. En el grupo de PRFC hubo una disminución significativa en los macrófagos ($p = 0.03$), linfocitos ($p = 0.001$), y células plasmáticas ($p = 0.02$), elevación significativa de fibroblastos ($p = 0.001$) y colágeno ($p = 0.038$), lo cual no se presentó en el grupo de SS. No hubo cambios significativos en inflamación o neovascularización. Lo que lleva a los autores a concluir que el estudio demostró al PRFC como un biomaterial que mejora la sobrevida de los colgajos cutáneos al azar, así como la migración de fibroblastos y producción de colágeno. ⁽¹⁴²⁾

La Doctora Mary Ann Poruznick (2007) ⁽¹⁴³⁾ reporta lo expuesto por el Dr. Nicholas A. Sgaglione, en el Congreso de La Asociación Norte Americana de Artroscopía, donde señala las múltiples herramientas que se tienen hoy en día para los tratamientos de defectos articulares y entre ellos el uso de FRP dentro de los tratamientos de defectos articulares donde muestra tratamientos hechos en defectos osteocondrales con la técnica de microfracturas combinada con el uso de FRP. Fig. (21)



A.- Defecto osteocondral tratado con perforaciones tipo microfracturas, para obtener contacto con la médula ósea y la salida de sangre promoviendo la regeneración del tejido



B.- Matriz de FRP preparada vía centrifugación en la zona de los defectos para obtener factores de crecimiento concentrados en el lugar.

Figura 21: Fotografías del procedimiento vía artroscopía de colocación de FRP.

Entre las conclusiones del autor se establece las múltiples herramientas que posee el cirujano ortopédico para la búsqueda del mejor tratamiento del paciente haciendo especial énfasis en el uso de terapias de regeneración tisular y factores de crecimiento ambos obtenidos a través del uso de FRP. ⁽¹⁴³⁾

Estudios en el área de tratamiento de heridas difíciles de cicatrizar son llevados a cabo mundialmente. En un análisis retrospectivo publicado por Steenvoorde y Van Doorn (2008) ⁽¹⁴⁴⁾ señalan que el uso de FRP en heridas de difícil cicatrización se ha obtenido resultados de cicatrización total o reducción del diámetro de la herida sin efectos adversos.

También es reportado en la literatura su uso exitoso en el tratamiento de úlceras en los pies a razón de Diabetes, esto expuesto por Gosh (2006) ⁽¹⁴⁵⁾ en el encuentro anual de la Sociedad de Cicatrización de Heridas De América, este estudio reportó una tasa de éxito de 4 de cada 5 pacientes en un período de 7 semanas.

Esto es expuesto con tasas similares por Danielsen (2006) ⁽¹⁴⁶⁾ quien lleva estudios en el área en la Universidad de Copenhague, donde tratan los injertos con FRP obteniendo mejor cicatrización que en los grupos control.

También es importante destacar su uso en la medicina deportiva donde ha sido usado para el desgarramiento del tendón de Aquiles. Este estudio muestra que en pacientes donde se usaron matrices de PRF los tiempos de cicatrización y movimiento del pie se redujeron de 12 a 7 semanas, y el regreso a actividades deportivas en periodos de 14 semanas. Esto, sustentado también con la medición de múltiples citocinas y factores de crecimiento en las muestras realizadas. ⁽¹⁴⁷⁾

6. ÚLTIMAS INVESTIGACIONES EN EL USO DE FRP

No todas las evaluaciones o investigaciones son positivas hacia este material como en cualquier discusión de nuevas tecnologías de aplicación odontológica. Bahadir y cols. (2010) ⁽¹⁴⁸⁾ evaluaron a través del uso de cintografías la actividad osteoblástica postextracción de terceros molares retenidos tratados con FRP. A 14 pacientes que presentaban terceros molares retenidos solo con traba mucosa se les colocó de forma aleatoria a la postextracción de los dientes FRP en uno de los alvéolos y el otro se dejó sin material para ser usado como grupo control. Entre sus resultados refieren que al evaluar ambos alvéolos a las 4 semanas postoperatorias y posterior a la aplicación del medio de contraste, no observaron diferencia significativa entre los dos grupos, sin embargo, al análisis en microscopía electrónica del lado tratado con FRP presentaba mayor

cantidad de células sanguíneas y redes de fibrina lo cual consideraban positivo pero debían realizar más investigaciones.

Estudios como el de Chen (2009) ⁽¹⁴⁹⁾ y su equipo en Taipei buscan la optimización del uso de este material. Esto lo hace a través de la medición de los factores de crecimiento en el coagulo de FRP y el Plasma restante en varias mediciones durante 300 minutos.

En sus resultados señalan que mientras el tiempo transcurría mayor era la liberación de factores de crecimiento en ambas muestras, por lo cual recomendaban usar el FRP lo más pronto posible. También hacen referencia al uso de las membranas preparadas con el material, donde sugieren el uso de materiales no absorbentes en vez de gasas para la compresión del FRP y con ello aprovechar el suero o plasma que se libera para colocarse sobre el lecho preparado o mezclarlo con algún injerto. ⁽¹⁴⁹⁾

En el estudio realizado por Ling, (2009) ⁽¹⁵⁰⁾ donde se evalúa la diferenciación de osteoblastos en ratas, su proliferación y la presencia de factores de crecimiento esto comparado con el uso de FRP Vs CPRP. Ellos después de obtener 14 muestras de sujetos humanos, fueron tratados con protocolos estándar de FRP y PRP. El exudado de ambas preparaciones fue tomado a los 1, 7, 14, 21 y 28 días, se midió en cada uno los niveles de factores de crecimiento y se

usaron para realizar cultivos en ratas. Las mediciones más altas obtenidas en las muestras con PRP fueron obtenidas en las primeras 24 horas y un descenso significativo en las siguientes mediciones, las muestras tratadas con FRP alcanzaron mineralización en el día 14. Concluyen que la liberación prolongada del FRP logró una mayor proliferación y diferenciación de osteoblastos que las muestras tratadas con PRP.

Dohan y su equipo (2009) ⁽¹⁵¹⁾ realizaron un análisis del efecto de FRP en fibroblastos de origen gingival, fibroblastos, pre-queratinocitos de origen dérmico y osteoblastos del área maxilofacial. El FRP y las muestras celulares eran preparadas con material del mismo individuo, pruebas de citotoxicidad y proliferación fueron hechas a los 3, 7, 14 y 21 días y a los 28 días también en los cultivos de osteoblastos. Fue observada una significativa y continua proliferación de todos los tipos celulares estudiados, de entre las células se observó una diferenciación muy marcada en los cultivos de osteoblastos, incluso, al análisis por microscopio electrónica se observó que el proceso de mineralización había empezado a darse en la membrana de FRP, además hubo proliferación sostenida de los leucocitos contenidos en el FRP e interacción con los osteoblastos. Estos resultados llevan a los autores a concluir que estos leucocitos “chaperones” como los denominan, pueden ser la razón de la diferenciación y regulación por zonas de los osteoblastos, además de

altas tasas de diferenciación y proliferación en todos los grupos celulares.

Otro estudio en animales fue realizado por Lee y cols. en el 2010 ⁽¹⁵²⁾ en la Universidad de Halym Korea. Donde combinaron el FRP con fibras de seda de bajo peso molecular en cavidades hechas artificialmente en calotas de conejos de Nueva Zelanda. Se realizaron dos cavidades en cada espécimen, una se rellenó con la muestra y la otra se dejó sin material como control, los animales fueron sacrificados a las 6 y 12 semanas y se les practicó una evaluación micro-tomográfica y un análisis histológico. En los resultados se observó correlación en ambas evaluaciones observándose mayor densidad y formación ósea en el grupo que se aplicó el material. Fig. (22)

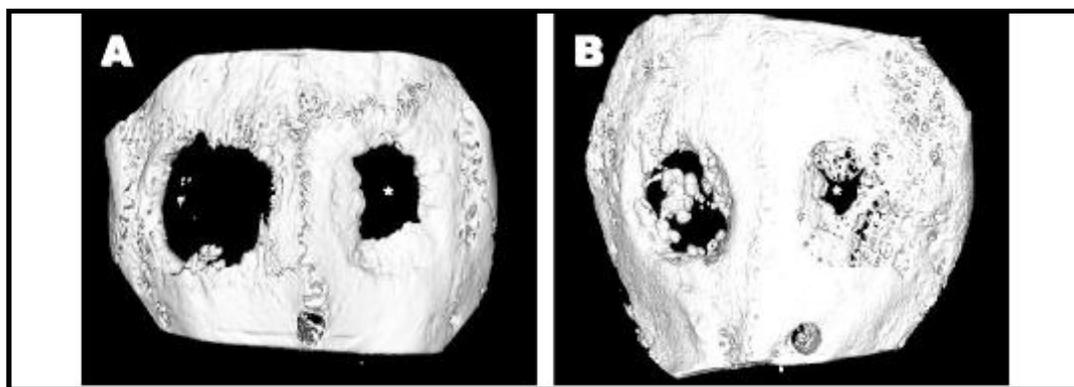


Figura (22): Estudio micro-tomográfico. A: Evaluación a las 6 semanas, se observa de menor diámetro cavidad con FRP (asterisco). B: Evaluación a las 12 semanas, se observa casi completo el cierre de la cavidad con FRP (asterisco).

Jang también en Corea (2010) ⁽¹⁵³⁾ realiza pruebas para corregir defectos periimplantarios con la mezcla de fibras de seda y FRP. Este estudio también se realizó en conejos de nueva Zelanda, a los que se colocaron dos implantes, a uno se relleno el defecto peri implantar con los materiales mencionados y el otro se uso como grupo control, los animales fueron sacrificados a las 8 semanas y se les realizaron pruebas de torque para el desalojo del implante y una análisis histológico.

En las pruebas de torque se observó que la cantidad de fuerza necesaria en el grupo experimental superaba en 10 newton la necesaria para desalojar el implante en el grupo control. En el análisis histológico, mayor formación de hueso y mayor porcentaje de corrección del defecto peri implantar fue observado en el grupo con PRF y seda, lo que lleva al autor a concluir que la mezcla de estos materiales puede corregir de forma efectiva los defectos peri implantares. ⁽¹⁵³⁾

En el 2010, Dohan y cols. ⁽¹⁵⁴⁾ Realizaron un estudio a 10 pacientes sanos, entre 20 y 55 años de edad, en donde tomaron 11 tubos de 9ml de sangre a cada paciente; 1 con anticoagulante (control) y 5 de cada brazo, 5 de esos tubos eran de plástico y los otros 5 de vidrio. Una vez obtenido los coágulos de FRP, la mitad de la muestra era comprimida en gazas y la otra no, se llevaron bajo

microscopía óptica y microscopía electrónica, observando que la mayor cantidad de células (glóbulos rojos, blancos y plaquetas) se encontraban en la interfase roja y blanca del coágulo de FRP (fig.22), en la porción amarilla identificaron una red de fibrina y plaquetas embebidas en una matriz madura.

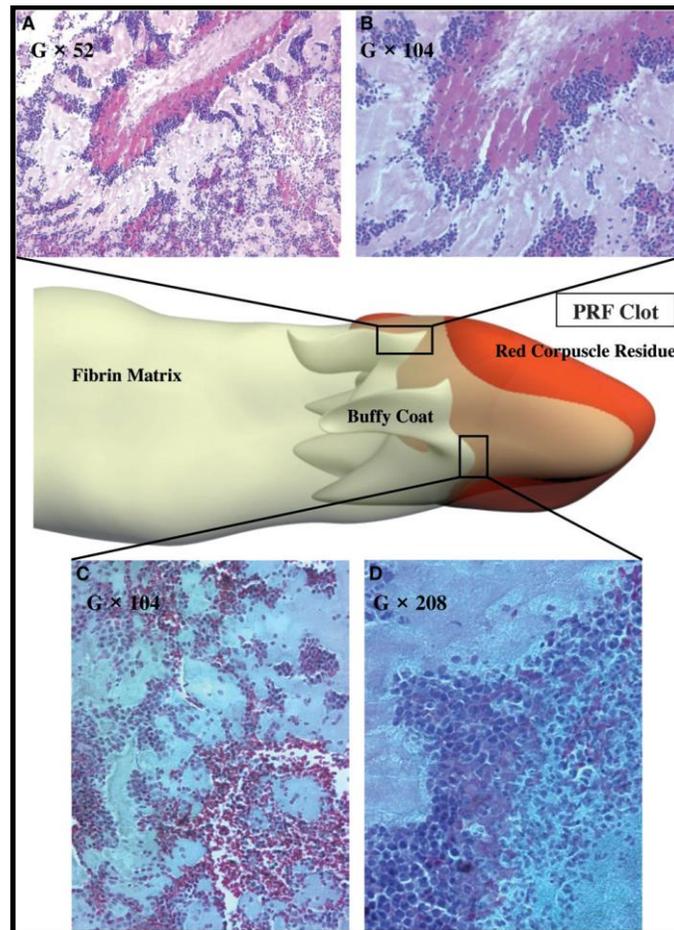


Figura. 22 Análisis en microscopía óptico (A) y (B) de FRP. La hematoxilina y eosina no fue suficiente para distinguir correctamente los diferentes cuerpos celulares atrapados en la matriz de fibrina. (C) y (D), usando tricrómico de Masson fue posible separar más fácilmente los agregados de plaquetas y leucocitos (azul oscuro) de los glóbulos rojos (rojo). Aumentos (G) se indican en cada panel.

Aproximadamente el 97% de las plaquetas y más del 50% de los leucocitos se concentraron en el coágulo de FRP y mostró una distribución tridimensional (Fig. 23), dependiendo de las fuerzas de centrifugación. Las plaquetas y la fibrina se encontraron formando grandes grupos de coagulación en los primeros milímetros de la membrana más allá de la sangre roja de base celular. La red de fibrina era madura y densa. ⁽¹⁵⁴⁾

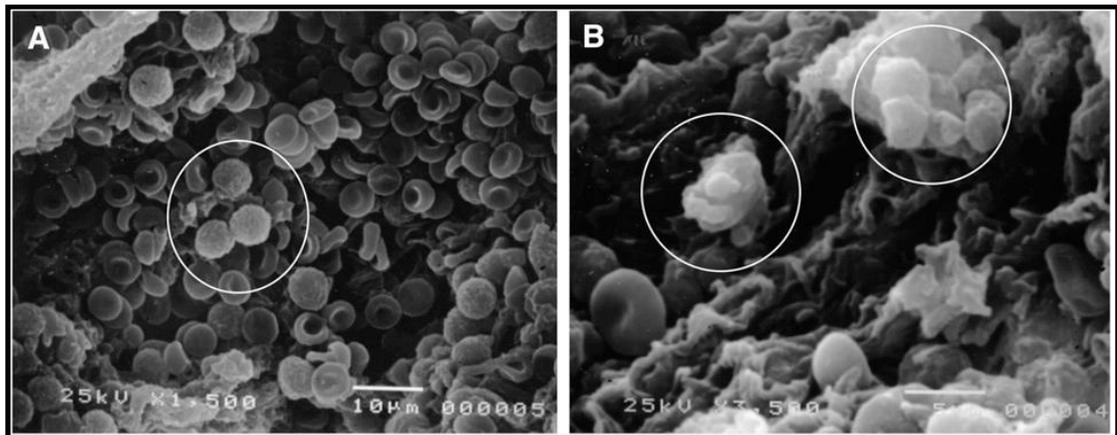


Figura. 23 (A) En el límite entre la zona roja y el coágulo de color amarillo, se observa las agrupaciones de glóbulos rojos y leucocitos como estructuras esféricas con una superficie irregular (círculos blancos). (B) Las plaquetas fueron atrapados con frecuencia en la red de fibrina, pero a veces aparecieron como agregados (círculos blancos) que fueron identificados fácilmente. (Ampliación original: A x1500; B x 3.500).

Además, no hubo diferencia significativa en la arquitectura de FRP entre los grupos de estudio, como las muestras tomadas con diferentes tubos de recolección y las técnicas de compresión, incluso

si estos dos parámetros podrían haber influido en el contenido del factor de crecimiento y las propiedades biológicas de la matriz, así como los resultados obtenidos en las imágenes generadas por microscopía electrónica. ⁽¹⁵⁴⁾

Se concluye que este protocolo de FRP concentraba la mayoría de plaquetas y glóbulos blanco en una matriz autóloga, madura y densa, que ofrecería resultados reproducibles para el paciente. ⁽¹⁵⁴⁾

II. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

1. HISTORIA

El primer microscopio óptico fue diseñado por Anton Van Leeuwenhock en el año 1675 y fue considerado como un juguete científico al que se le dio el nombre de "vidrio de mosca" ya que primariamente se usaba para observar insectos. Posteriormente el microscopio óptico fue recibiendo notables mejoras.

El microscopio electrónico es el resultado de diversos experimentos y concepciones teóricas. Tiene su origen en los experimentos de Sir J. J. Thomson, quien estudió los rayos catódicos en tubos con gases enrarecidos. ⁽¹⁵⁵⁾ En el año 1924 de Broglie ⁽¹⁵⁶⁾ propuso su teoría de la naturaleza ondulatoria de las partículas materiales. Después de unos años Busch ⁽¹⁵⁷⁾ demostró que un rayo de electrones atravesando un campo magnético o eléctrico converge al foco y basándose en esto construyó la primera lente magnética en 1926. Davisson y Thomson ⁽¹⁵⁸⁾ compartieron el premio Nobel por el descubrimiento de la difracción del electrón. Padre e hijo J. J. Thomson y G. P. Thomson ⁽¹⁵⁹⁾ jugaron un papel fundamental en la historia del desarrollo del microscopio electrónico.

Las propiedades de una partícula cargada con electrones fueron explotadas por Knoll y Ruska ⁽¹⁶⁰⁾ y construyeron el primer microscopio electrónico de lente magnética, utilizando un rayo de 60.000 voltios y obteniendo imágenes sobre una pantalla fluorescente. Las primeras microfotografías de materiales biológicos fueron conseguidas por Marton ⁽¹⁶¹⁾ en 1934. El primer microscopio electrónico de transmisión que operó en Estados Unidos en 1939 fue construido en la Universidad de Toronto por A. Prebus y J. Hiller bajo la dirección de E. Burton. Este microscopio era muy similar al tipo desarrollado por Van Borries y Ruska ⁽¹⁶²⁾ como instrumento comercial.

En la actualidad, se dispone de un número considerable de microscopios, que pueden clasificarse fundamentalmente en dos grupos:

- Microscopios ópticos.
- Microscopios electrónicos de transmisión y de barrido.

2. MICROSCOPIO ELECTRÓNICO

Debido al limitado poder de resolución del microscopio óptico, se probaron varias fuentes de iluminación tales como rayos X de muy pequeña longitud de onda (0,5 nm) sin tener éxito ya que no pudieron enfocar estos rayos. Sin embargo, las investigaciones que

comenzaron en 1923 sobre difracción electrónica, sentaron las bases para la construcción del primer microscopio electrónico. ⁽¹⁶³⁾

La distancia de enfoque del objetivo en el microscopio electrónico de 100 kV es de 1,1 mm. Este factor mejora la profundidad del campo y es cien veces mayor que la conseguida por el microscopio óptico. El microscopio electrónico moderno está basado en los principios generales de la lente electromagnética. ⁽¹⁶³⁾

MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO (MEB)

El primer microscopio electrónico de barrido (MEB ó SEM por sus siglas en inglés) fue desarrollado en 1930 en Alemania y en 1949 en Estados Unidos y finalmente en Inglaterra en 1950. El primer modelo comercial fue presentado en 1964 por "The Cambridge Scientific Instrument Company"; posteriormente muchos otros fabricantes han desarrollado nuevos modelos. ⁽¹⁶⁴⁾

El principio del sistema MEB consiste en que si se hace incidir sobre la muestra un haz de electrones finamente enfocado, emite una señal que puede registrarse en una pantalla mediante un tubo de rayos catódicos. ⁽¹⁶⁵⁾

El microscopio electrónico de barrido MEB, es un instrumento que permite la observación y caracterización superficial de materiales inorgánicos y orgánicos, entregando información morfológica del material analizado. A partir de él se producen distintos tipos de señal que se generan desde la muestra y se utilizan para examinar muchas de sus características. Con él se pueden realizar estudios de los aspectos morfológicos de zonas microscópicas de los distintos materiales con los que trabajan los investigadores de la comunidad científica y las empresas privadas, además del procesamiento y análisis de las imágenes obtenidas. Las principales utilidades del MEB son la alta resolución, la gran profundidad de campo que le da apariencia tridimensional a las imágenes y la sencilla preparación de las muestras. ⁽¹⁶⁶⁾

El microscopio electrónico de barrido puede estar equipado con diversos detectores, entre los que se pueden mencionar: un detector de electrones secundarios para obtener imágenes de alta resolución SEI (Secondary Electron Image), un detector de electrones retrodispersados que permite la obtención de imágenes de composición y topografía de la superficie BEI (Backscattered Electron Image), y un detector de energía dispersiva EDS (Energy Dispersive Spectrometer) permite coleccionar los Rayos X generados por la muestra y realizar diversos análisis e imágenes de distribución de elementos en superficies pulidas. ⁽¹⁶⁷⁾

Según Hayat (1981) y López (2003) ⁽¹⁶⁸⁾ el microscopio electrónico de barrido (MEB) es un instrumento para obtener fotografías tridimensionales debido a que tiene una alta resolución y una gran profundidad de campo. En las fotografías se puede apreciar la ultraestructura de muestras microscópicas detallando de manera extraordinaria, sus características morfológicas y topográficas. También se puede observar cualquier tipo de espécimen o de materiales orgánicos (crustáceos, plantas, parásitos, hongos, invertebrados, plancton, protozoarios, bacterias, tejidos, músculo, células, neuronas, cabello y pelo) y materiales inorgánicos (industria petroquímica, biodeterioro de obras y artes, pintura, papel, enlatados, balística, material geológico, material de electrónica y computación, metales, aleaciones, plásticos, vidrios, etc) ⁽¹⁶⁸⁾

Un instrumento que se ha desarrollado para el análisis de muestras a través del microscopio electrónico de barrido es el analizador EDS (espectrómetro de dispersión de energía) de rayos X el cual identifica la distribución cuantitativa y cualitativa de elementos químicos que se encuentran presentes en la muestra, mostrando gráficas e imágenes relacionadas con esa distribución. Es pertinente señalar que el analizador EDS de Rayos X identifica y evalúa el contenido de elementos químicos desde el carbono al uranio en superficies planas o secciones finas de las muestras en todo tipo de material biológico e inerte. Además de la obtención de un espectro

químico en un punto concreto de la muestra, existen dos formas gráficas de obtener información de la señal de Rayos X: a) los perfiles de línea que permiten identificar gráficamente la variación de la concentración de uno o varios elementos entre dos puntos; y b) los mapas de RX que sirven para ver gráficamente la distribución de los elementos en la zona seleccionada, asignando un color diferente a cada uno. Los mapas de RX también ofrecen imágenes semicuantitativas de la concentración de los elementos mediante la densidad de puntos de un determinado color en la zona. (Oxford Instrument microanalysis group 1997). ⁽¹⁶⁹⁾

3. COMPONENTES PRINCIPALES DEL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO FUENTE DE ENERGÍA

La fuente de energía del microscopio electrónico de barrido depende de varios factores, siendo los más importantes el voltaje de aceleración, la intensidad de la corriente y el diámetro de haz. Para usos prácticos debe asegurarse una alta estabilidad de la corriente. ⁽¹⁷⁰⁾

En unos puntos el haz de electrones es desviado 1, 2, 3 ... n veces por los campos magnéticos controlados por el generador de barrido. Como consecuencia el haz es movido sobre la superficie de

la muestra y la señal es detectada por el colector de electrones. Se puede ajustar el colector para detectar cualquier emisión como Rayos X, luz infrarroja, ultravioleta, etc. ⁽¹⁷⁰⁾

PORTAMUESTRAS

La muestra montada sobre un soporte puede moverse en tres direcciones, ser calentada, enfriada, estirada, etc. dentro del instrumento. Para el estudio de ciertos tipos de muestras tales como, metales, minerales, semiconductores, etc. Se requiere calefacción de la muestra. La calefacción puede conseguirse por medio de un hilo incandescente o calentando la muestra en un crisol aplicando directamente a la muestra una corriente eléctrica ⁽¹⁷⁰⁾. Los métodos de enfriamiento se usan principalmente en la preparación de muestras biológicas. ⁽¹⁷¹⁾

Para la deformación mecánica en el estudio de muestras tales como metales, polímeros o fibras, es necesario determinar una escala de fuerzas, ya que la fuerza requerida varía considerablemente según el tipo de material. ⁽¹⁷²⁾

SISTEMA DE AMPLIFICACIÓN

El sistema de amplificación recoge las señales y procesa la información procedente de la muestra, al mismo tiempo que el haz de electrones barre la muestra. El generador de barrido está conectado al tubo de rayos catódicos (CRT) para que el haz de electrones en este tubo sea barrido en la misma forma que el haz principal. Sin embargo, la potencia de la corriente suministrada a la columna principal para el barrido puede ser atenuada mientras que el tubo de la pantalla es barrido sobre un área constante. Como consecuencia de ello, cualquier reducción en el área de la muestra barrida da lugar a un aumento de la imagen. Este aumento viene determinado por la relación del área de la pantalla del tubo (constante) respecto al área de la muestra barrida (variable). ⁽¹⁷⁰⁾

4. CARACTERÍSTICAS DE MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO

PODER DE RESOLUCIÓN

El poder de resolución en el microscopio electrónico de barrido MEB depende de varios factores, tales como la dimensión del haz de electrones, la difusión del mismo en la muestra antes de la emisión de los electrones secundarios, y la corriente estabilizada del lente. La dimensión del haz puede reducirse de muchas formas. Se pueden

ampliar filamentos apuntados o usando un elevado potencial de kV. Por ejemplo a potencia de 1 kV, la resolución es 140 nm, mientras que a 30 kV, la resolución es 20 nm (200 A). ⁽¹⁷³⁾

Se puede prevenir la difusión del haz de electrones en la muestra, aumentando la potencia de la corriente. Finalmente, la alimentación de corriente debe ser muy estable, del orden de 1 parte en 100.000, para conseguir alta resolución. ⁽¹⁷⁴⁾

PROFUNDIDAD DE CAMPO

Se utilizan lentes magnéticas con simetría axial con el fin de producir un fino haz de electrones. De todos modos hay que considerar que la aberración esférica de las lentes magnética no puede conseguirse con ningún tipo de lente de simetría axial. Si se quiere obtener un fino haz de electrones, el ángulo de abertura de la lente del objetivo (2°) debe reducirse con el fin de permitir sólo los haces paraxiales. ⁽¹⁷³⁾

El haz de electrones mide solamente 30 mm y se mueve en forma de líneas paralelas a través de la muestra. Se puede cambiar la amplificación en escalones de 20 X la 100.000 X aunque la resolución de 25nm es restringida a aumentos de 10.000 X a 30.000 X. La gran profundidad de campo permite observaciones especiales de la

muestra. ⁽¹⁷⁵⁾ En general la profundidad del campo es tan grande como la mitad de una cara del área bajo observación.

CONTRASTE

El contraste en MEB es logrado por el sistema colector. La muestra recibe los electrones del haz de barrido y genera electrones secundarios. Estos electrones emitidos son recogidos por el colector. Los electrones se desplazan en línea recta cuando la muestra es uniforme. Se consigue el contraste óptimo cuando el colector puede recoger el máximo de electrones secundarios. La eficiencia de la emisión de los electrones es máxima cuando el plano de la muestra está inclinado con respecto al haz primario. Por este motivo las micrografías obtenidas por MEB parecen muy naturales. ⁽¹⁷⁰⁾

El microscopio electrónico de barrido MEB es el mejor método adaptado al estudio de la morfología de las superficies. A diferencia de un microscopio óptico que utiliza fotones del espectro visible, la imagen entregada por el MEB se genera por la interacción de un haz de electrones que "barre" un área determinada sobre la superficie de la muestra. ⁽¹⁷⁰⁾

5. CONSTRUCCIÓN DE UN MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO

La parte principal de un microscopio electrónico de barrido es la denominada columna de electrones la cual lleva alojados en su interior los siguientes elementos:

- Un cañón de electrones con un filamento que actúa como emisor o fuente de iluminación, por analogía con un sistema óptico.
- Un sistema de lentes electromagnéticas encargado de focalizar y reducir a un diámetro muy pequeño el haz de electrones producido por el filamento.
- Un sistema de barrido que hace recorrer el haz de electrones ya focalizado por la superficie de la muestra.
- Uno o varios sistemas de detección que permiten captar el resultado de la interacción del haz de electrones con la muestra y transformarlo en una señal eléctrica.
- Una salida conectada a una o varias bombas que producen el vacío necesario para que el conjunto funcione adecuadamente.

Además, el microscopio posee diversos sistemas que permiten observar las señales eléctricas procedentes de los detectores, en

forma de imágenes en un monitor de TV, fotografía, espectro de elementos, etc.

Por último, en la figura 24 se han dibujado dos detectores. Uno, el de electrones secundarios, que son los electrones arrancados a la propia muestra por la acción del haz incidente. Con esta señal obtenemos en un monitor una imagen de la muestra, muy parecida a la visión del ojo humano debido a la gran profundidad de foco de esta señal. El otro detector, de rayos X, captura este tipo de señal, con la que obtenemos un espectro de elementos, es decir un análisis químico elemental de la muestra. (174)

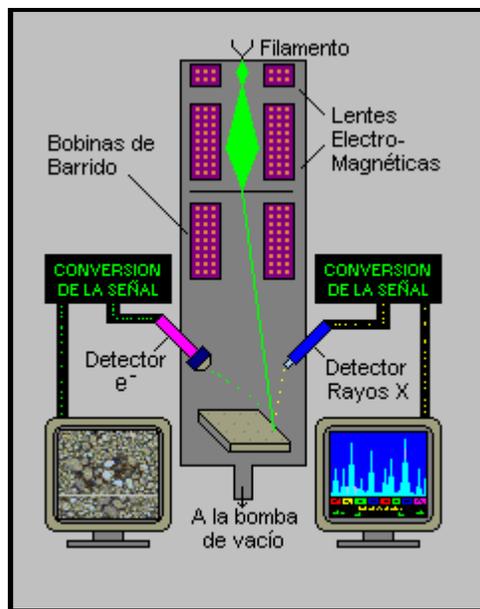


Figura. 24 La técnica esencialmente consiste en hacer incidir en la muestra un haz de electrones. Este bombardeo de electrones provoca la aparición de diferentes señales que, captadas con detectores adecuados, nos proporcionan información acerca de la naturaleza de la muestra.

La señal de electrones secundarios proporciona una imagen de la morfología superficial de la muestra. La señal de retrodispersados una imagen cualitativa de zonas con distinto número atómico y la señal de Rayos X espectros e imágenes acerca de la composición de elementos químicos en la muestra. ⁽¹⁷⁵⁾

ELECTRONES SECUNDARIOS

La señal de electrones secundarios es la que se emplea normalmente para obtener una imagen de la muestra. Es la señal que nos proporciona una imagen más real de la superficie que estemos estudiando, se considera un electrón secundario aquel que emerge de la superficie de la muestra con una energía inferior a 50 eV (electronvoltios), y un electrón retrodispersado el que lo hace con una energía mayor. ⁽¹⁷⁵⁾ (Fig. 25)

ELECTRONES RETRODISPERSADOS

La señal de electrones retrodispersados está compuesta por aquellos electrones que emergen de la muestra con una energía superior a 50 eV (electronvoltios). Estos electrones proceden en su mayoría del haz incidente que rebota en el material después de diferentes interacciones. ⁽¹⁷⁵⁾

La intensidad de la señal de retrodispersados, para una energía dada del haz, depende del número atómico del material (a mayor número atómico mayor intensidad). Este hecho permite distinguir fases de un material de diferente composición química. Las zonas con menor Z se verán más oscuras que las zonas que tienen mayor número atómico. Esta es la aplicación principal de la señal de retrodispersados. ⁽¹⁷⁵⁾ (Fig. 26)

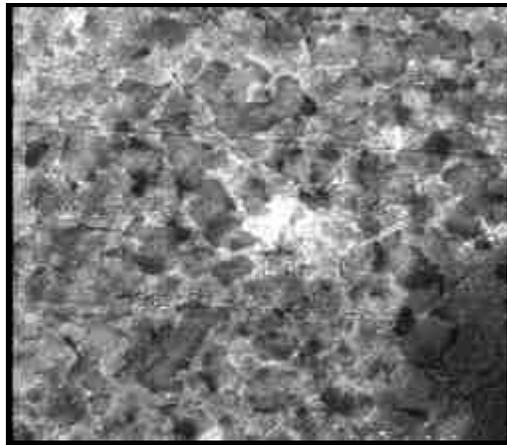


Figura 25. Imagen de electrones secundarios

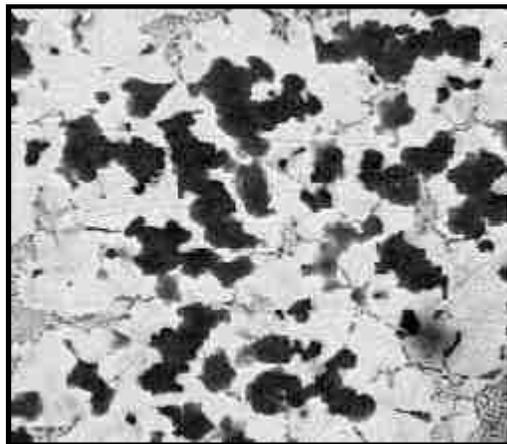


Figura 26. Imagen de electrones retrodispersados.

Las micrografías anteriores corresponden a la misma zona de una soldadura de un objeto de cubertería compuesta de una aleación Plata-Cobre-Níquel. En la imagen de secundarios no se aprecian con claridad las fases de la aleación, mientras que en la imagen de retrodispersados vemos con claridad estas fases. Un análisis de rayos X puntual de cada fase mostraría que las zonas claras están compuestas por Plata y las oscuras por una aleación Cobre-Níquel. (175)

6. MICROANÁLISIS DE RAYOS X POR DISPERSIÓN DE ENERGÍAS

La resolución espacial de los electrones secundarios es mucho mejor que la de los RX. Como resultado de esto, una característica de la muestra lo suficientemente grande para ser observada con la señal de secundarios puede no ser suficientemente grande como para contener todo el volumen de interacción del que emanan los RX. Con frecuencia, el haz de electrones al penetrar en la muestra causa la emisión de RX desde regiones de la superficie o de regiones cercanas, que tienen diferente composición que las del punto de incidencia del haz. (175)

En la figura 27 se observa las diferentes formas que puede tomar el volumen de interacción dependiendo de los valores del

número atómico y de la energía del haz. Existen métodos para calcular aproximadamente el diámetro de este volumen, pero se puede asegurar que en el mejor de los casos este diámetro no es menor de un micrómetro. ⁽¹⁷⁵⁾

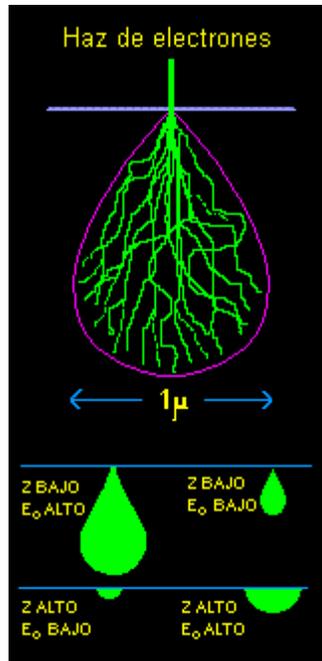


Figura 27. Forma que puede tomar el volumen de interacción dependiendo del número atómico cuando se hace incidir un haz de electrones.

La adquisición de un espectro de RX consiste en recoger durante un determinado tiempo, normalmente del orden de minutos, los fotones de RX que proceden de la muestra, clasificándolos según su energía.

Como puede verse en la figura 28, un espectro de dispersión de energías se presenta usualmente como un histograma en donde el eje horizontal son unidades de energía, en Kiloelectronvoltios (keV), en este caso de 0.00 a 10.240, y el eje vertical número de cuentas o intensidad, en este caso 65536 cuentas la altura total de la escala, que se va autoajustando a medida que crece el número de cuentas de la energía del pico más alto. ⁽¹⁷⁵⁾

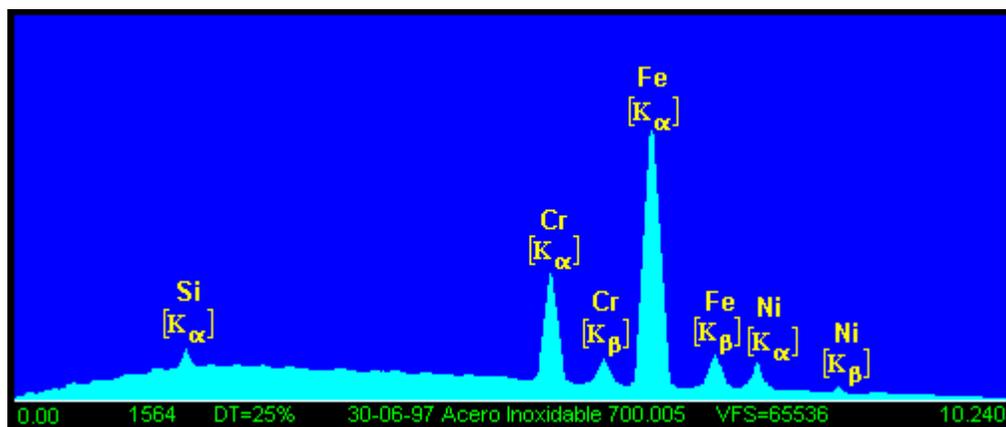


Figura 28. Representación de espectro de dispersión de energía.

Por último, una vez adquirido el espectro, con la ayuda de patrones o sin ellos y mediante el software adecuado se puede realizar de forma automática el análisis cualitativo, es decir, la

identificación de picos y el análisis cuantitativo o calculo de la concentración de los diferentes elementos.

La preparación de muestras es, en general, sencilla. Los requisitos indispensables que deben cumplir son ausencia de líquidos, es decir, la muestra tiene que estar seca y además debe ser conductora de la corriente eléctrica. Este último requisito se cumple en los metales pero no así en otro tipo de materiales, por lo que para hacer a la muestra conductora se la recubre de una capa de algún material conductor tal como el carbón o el oro. Este recubrimiento ha de ser suficientemente grueso como para que circule la corriente eléctrica que se deposita en la muestra y suficientemente delgado para que no enmascare o tape las características superficiales de interés. ⁽¹⁷⁵⁾

7. PRINCIPALES APLICACIONES

Las aplicaciones del microscopio electrónico de barrido son muy variadas, y van desde la industria petroquímica o la metalurgia hasta la medicina forense. Sus análisis proporcionan datos como textura, tamaño y forma de la muestra.

Entre las áreas de aplicación de esta técnica, se pueden mencionar:

- Geología: Investigaciones geomineras, cristalográficas, mineralógicas y petrológicas. Estudio morfológico y estructural de las muestras.
- Estudio de materiales: Caracterización microestructural de materiales. Identificación, análisis de fases cristalinas y transiciones de fases en diversos materiales tales como metales, cerámicos, materiales compuestos, semiconductores, polímeros y minerales. Composición de superficies y tamaño de grano. Valoración del deterioro de materiales, determinación del grado de cristalinidad y presencia de defectos. Identificación del tipo de degradación: fatiga, corrosión, fragilización, etc.
- Metalurgia: Control de calidad y estudio de fatiga de materiales, características texturales. Análisis de fractura (fractomecánica) en materiales (Figura 29), un ejemplo concreto de este tipo de aplicación se expone en la parte de trabajo práctico.

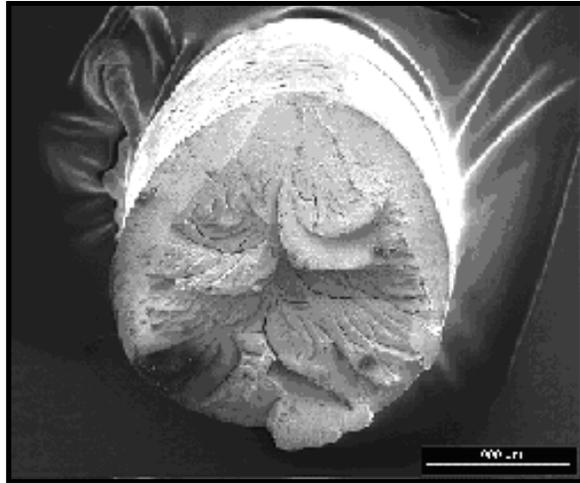


Figura 29. Imagen de la rotura de una varilla de acero obtenida mediante un Microscopio Electrónico de Barrido.

- Odontología: En este campo son muchas las aplicaciones de las caracterizaciones morfológicas que se pueden realizar con el microscopio electrónico de barrido. Una aplicación específica de este microscopio se obtiene al estudiar la direccionalidad de las varillas del esmalte dental ⁽¹⁷⁶⁾. El esmalte dental posee varias fases de formación, en las cuales se van depositando elementos minerales que llegan al lugar por los vasos sanguíneos circundantes, produciéndose la mineralización total en la última fase de su formación. En esta etapa se forman cristales, que al depositarse toman una disposición en todo el tejido formado, creando las varillas del esmalte, estructura principalmente inorgánica (98%), adquiriendo una disposición muy particular de

acuerdo al sector que se estudie de la pieza dentaria. Estas varillas son observadas con un microscopio electrónico de barrido, notando que estas se disponen en diferentes direcciones con un sólo sentido desde el límite amelodentinario a la superficie, entrecruzándose en las cúspides y en ciertos sectores de las caras libres y proximales, lo que se denomina multidireccionalidad de las varillas. Para ello se extraen piezas dentarias humanas (con indicación quirúrgica), las que son metalizadas con oro-paladio y luego son estudiadas en el MEB. De este modo se puede observar la disposición de las varillas, analizar los cambios de direcciones en el espesor del esmalte y comparar la disposición en los distintos sectores del esmalte (oclusal, 1/3 medio y 1/3 cervical). Además se pueden analizar a través del MEB las alteraciones que producen los ácidos producidos por la entrada de microorganismos y restos alimenticios en las superficies vestibulares de los dientes anteriores, ya que sobre ellos se produce la retención de los materiales odontológicos en fracturas, fisuras, ferulizaciones, etc. ⁽¹⁷⁷⁾ La entrada de los microorganismos se produce, ya que para la retención del material de restauración, desde los comienzos de la odontología, se han realizado tallados en forma de retención mecánica en las piezas dentarias, formándose estos en la interfase restauración-diente.

- Paleontología y Arqueología: Caracterización de aspectos morfológicos.
- Control de Calidad: En este campo, el microscopio electrónico de barrido es de gran utilidad para el seguimiento morfológico de procesos y su aplicación en el control de calidad de productos de uso y consumo. Algunas industrias que lo utilizan son:

Fibras: en fibras textiles el Microscopio Electrónico de Barrido se utiliza para examinar:

- Detalles superficiales de fibras
- Modificaciones en las formas de las fibras o en detalles superficiales
- Dañado de fibras
- Construcción de hilos y tejidos
- Fractografía de fibras rotas por diferentes causas
- Urdimbre
- Dimensiones de características de fibras desde diferentes ángulos

Un ejemplo de aplicación de la MEB en fibras textiles es el caso de la diferenciación entre la fibra de lana y las fibras denominadas especiales, tales como el mohair y el Kashmir. El precio de las fibras especiales es mayor que el de la lana, por lo que el fraude se puede

presentar por etiquetar prendas de lana como compuestas por fibras especiales. La identificación, es decir, comprobar si una fibra es lana o fibra especial se realiza en el MEB midiendo la altura de los bordes distales de las células cuticulares. Se admite que si estos bordes tienen una altura superior a $0,7 \mu\text{m}$ la fibra es lana y si es inferior a $0,5 \mu\text{m}$ se trata de una fibra especial. ⁽¹⁷⁶⁾ Figura 30.

Otra utilidad es la detección de productos nocivos en ciertas fibras. La fibra de vidrio y la fibra mineral de amianto tienen algunas aplicaciones comunes en la industria. Por ejemplo ambas se utilizan como aislantes térmicos y eléctricos. El interés principal es detectar la enfermedad denominada asbestosis, lo que hace que este altamente restringida su presencia de amianto, ya que el polvo de esta fibra es nocivo por inhalación. Mediante el MEB se pueden distinguir estas fibras, ya que poseen una diferencia en diámetro, tal como se muestra en la figura 30. ⁽¹⁷⁶⁾

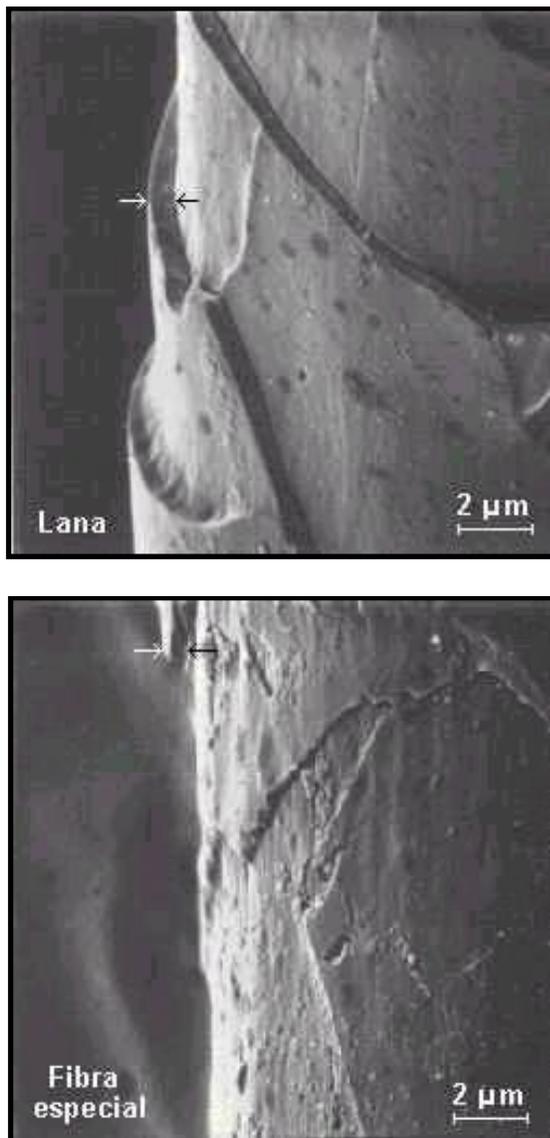


Figura 30. Comparación entre una fibra de lana y una fibra especial, señalando con flechas las medidas de los bordes distales de las células cuticulares

Curtidos: esta es una técnica de fabricación de cueros, mediante la cual se somete la piel de ciertos animales a una

preparación y tratamientos adecuados para transformarla en cuero, a fin de preservarla de la putrefacción natural y de que conserve su flexibilidad y elasticidad al secarse, sin adquirir consistencia córnea. Por lo general, el cuero se somete a un proceso denominado aserrado, mediante el cual se divide en dos hojas, quedando así desdoblado en la parte correspondiente al pelo o exterior (forma de flor), de espesor uniforme, y la parte correspondiente al lado de la carne que conserva las irregularidades de espesor o grosor del cuero antes del aserrado. Por diferentes razones, la parte denominada flor está considerada de mayor calidad y por tanto es más cara. Ver figura 31. ⁽¹⁷⁶⁾

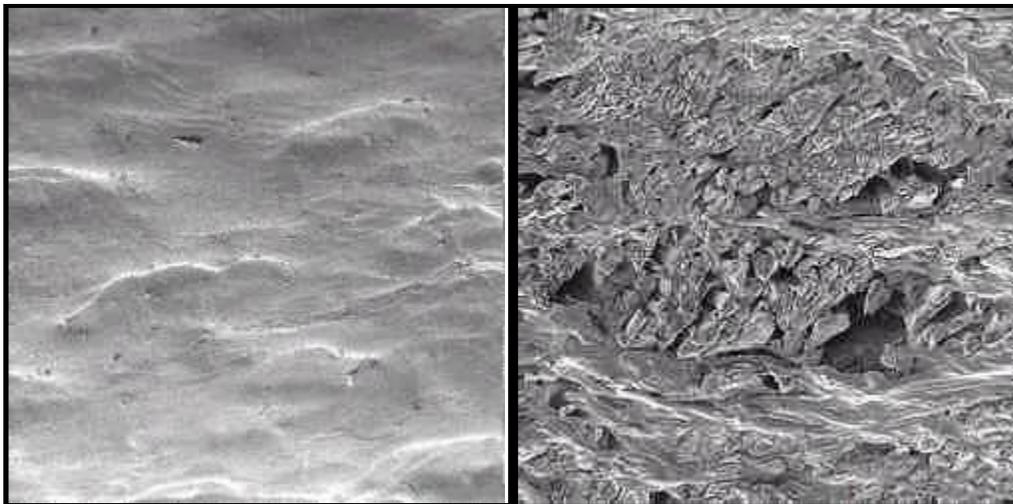


Figura 31. En la figura de la izquierda se muestra la superficie exterior, que al estar formada por células apretadas entre sí, le dan un aspecto continuo (lo que le confiere una protección impermeable). En la derecha revela fibras de tejido conjuntivo que aplastadas y alisadas imitan macroscópicamente la autentica superficie de la piel.

- Peritajes: Estudios de muestras de cualquiera de las áreas antes mencionadas.
- Medicina Forense: Análisis morfológico de pruebas.
- Botánica, Biomedicina y Medicina: Estudio morfológico.
- Estudio químico y estructural de obras de arte, alteración de monumentos, control de calidad, identificación de pigmentos (restauración, autenticación)

Como ejemplo práctico de este tipo de aplicación, se puede ver la figura 32, donde se aprecia una muestra pictórica observada con un Microscopio Electrónico de Barrido. A partir de esta interpretación se puede aportar una información especialmente valiosa para proceder a establecer la época del cuadro, escuela pictórica y posibles intervenciones a las que ha sido sometida, tales como aplicación de repintes, o tratamientos de restauración anteriores.

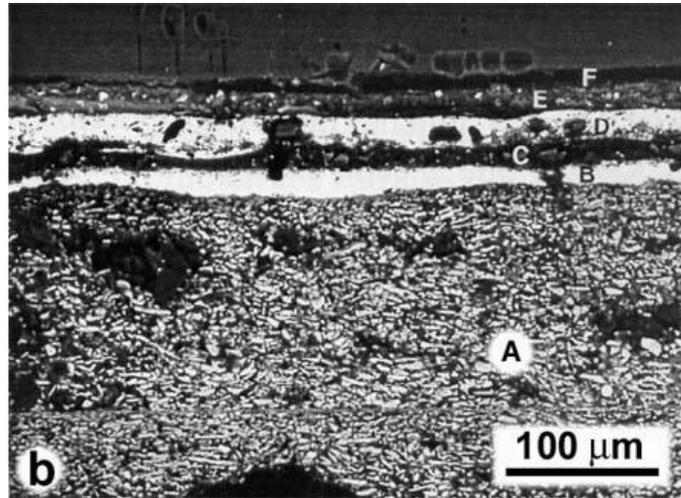


Figura 32. Muestra pictórica observada con un Microscopio Electrónico de Barrido

- Peritaciones Caligráficas: Estudio de trazos.
- Electrónica: Control y calidad de partes electrónicas. ⁽¹⁷⁶⁾

8. TÉCNICA DE PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.

En general, la preparación de las muestras es sencilla y los requisitos que deben cumplirse son: fijación, deshidratación y secado; además, la superficie debe ser conductora de la corriente eléctrica. Este último requisito se cumple en los metales pero no en las muestras biológicas, por lo que éstas se recubren con una capa de carbón o de oro, según las condiciones en las que se trabaje la muestra y el objetivo del estudio, es decir, para ser vistas al

microscopio. Antes de tratar las muestras se debe tomar en cuenta el material a ser observado y guiarse por los parámetros específicos para cada muestra. ⁽¹⁷⁷⁾

PROTOCOLO DE FIJACIÓN DE LA MUESTRA

Protocolo de fijación de muestras orgánicas según el Centro de Microscopía Electrónica “Dr. Mitsuo Ogura” de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela y el Laboratorio de Ciencias Materiales y Nanomateriales de Ingeniería III del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC)

Fijación con Glutaraldehido (2-4%): la concentración utilizada fue de 2,5%. Para ello se recomienda preparar una solución stock de 5% que se diluye en volúmenes iguales de solución buffer de preferencia, se utiliza una solución 0,2 M buffer fosfato salino pH 7,2-7,4 (PBS de su siglas en inglés). De esta forma se produce una solución de 2,5% de glutaraldehido en 0,1 M PBS. Es recomendable no sumergir las muestras por un período mínimo de 45 y máximo de 3 horas.

Lavado con solución buffer: se debe realizar 3 veces con cada muestra con PBS, por períodos de 5 minutos cada una.

Lavado con agua destilada: se debe realizar dos lavados a cada muestra, por períodos de 15 minutos cada una.

Post-Fijación con tetróxido de osmio al 1%: Se mezclaron 2 ml de solución de tetróxido de osmio a 2% con 2 ml de 0,2M PBS pH 7,2 - 7,4 para producir una solución postoxidativa de 1% de tetróxido de osmio con 0,1 M de buffer fosfato pH 7,2 - 7,4. Las muestras se deben sumergir por 1 hora a temperatura ambiente. (T.A.)

Deshidratación con etanol: Posteriormente se debe realizar lavados de las muestras con PBS y a deshidratarlas en una batería ascendente de concentraciones de etanol: 50%, 70%, 80%, 95% y 100%. 2 veces cada muestra, por períodos de 15 minutos cada una.

Desecación con Hexametil dexil: ((CH₃)₆ SiN (CH₃)₃). Se debe sumergir la muestra por 3 minutos.

Recubrimiento de fina capa de oro: Cuando el propósito del análisis de una muestra no incluye la obtención de un espectro de RX, un elemento que se utiliza frecuentemente para recubrir la superficie es el oro.

La figura 33 muestra esquemáticamente lo que se conoce como se realiza el recubrimiento. Consiste en una fuente de alimentación en

corriente continua regulable de 1 a 3 kV conectada por una parte a una tarjeta de oro u oro-paladio y por otra parte al portamuestras. El conjunto va acoplado a una bomba de vacío. La introducción de un gas tal como el argón en la campana de vacío provoca que los átomos de argón impacten en la tarjeta de oro y se desprendan átomos de dicha tarjeta que son atraídos hacia la muestra en la cual quedan depositados proporcionando un espesor de recubrimiento que depende del tiempo de exposición. ⁽¹⁷⁸⁾

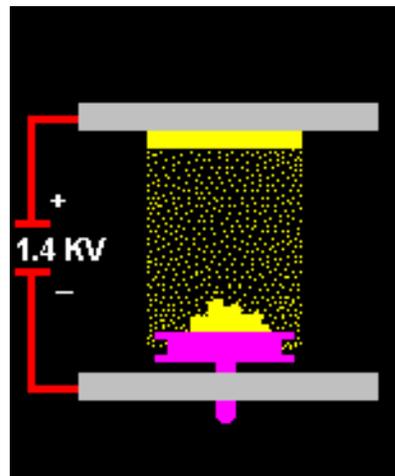


Figura 33. Esquema de técnica de recubrimiento con oro.

Recubrimiento con carbono-platino: En el caso de precisarse un análisis elemental en una muestra no conductora es necesario

recubrir la superficie de un elemento lo más transparente posible a los RX. Este elemento es el carbón o grafito.

Uno de los tipos de metalizadores de carbono se muestra esquemáticamente en la figura 34. Consiste en dos electrodos conectados a una fuente de corriente alterna de bajo voltaje y alta intensidad entre los que se intercala una barra de grafito terminada en una punta afilada. Al pasar la corriente, la punta de la barra se va evaporando, de forma que rocía la muestra con una fina capa de carbón. La punta va acoplada a un muelle que la mantiene en todo momento en contacto con el otro electrodo. Todo el conjunto está encerrado en vacío con el fin de facilitar la deposición de la película de carbón sobre la muestra. ⁽¹⁷⁸⁾

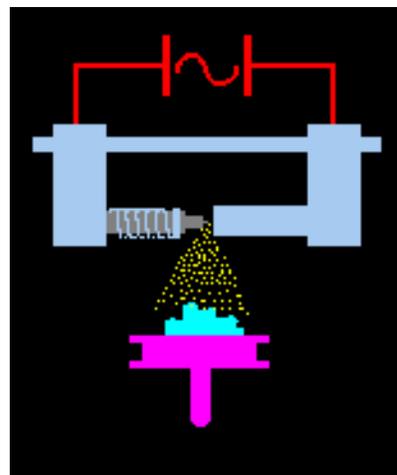


Figura 34. Esquema de técnica de recubrimiento con carbón.

Cámara de vacío: se utiliza una cámara de vacío, con la finalidad de desecar la muestra por completo por un período máximo de 1 día. ⁽¹⁷⁸⁾

9. ULTRAESTRUCTURA DE LA PLAQUETA

El calcio procedente del líquido extracelular junto al liberado del retículo endoplásmico al citosol actúa como mensajero promoviendo señales eléctricas que inician la secuencia de las acciones trombocíticas:

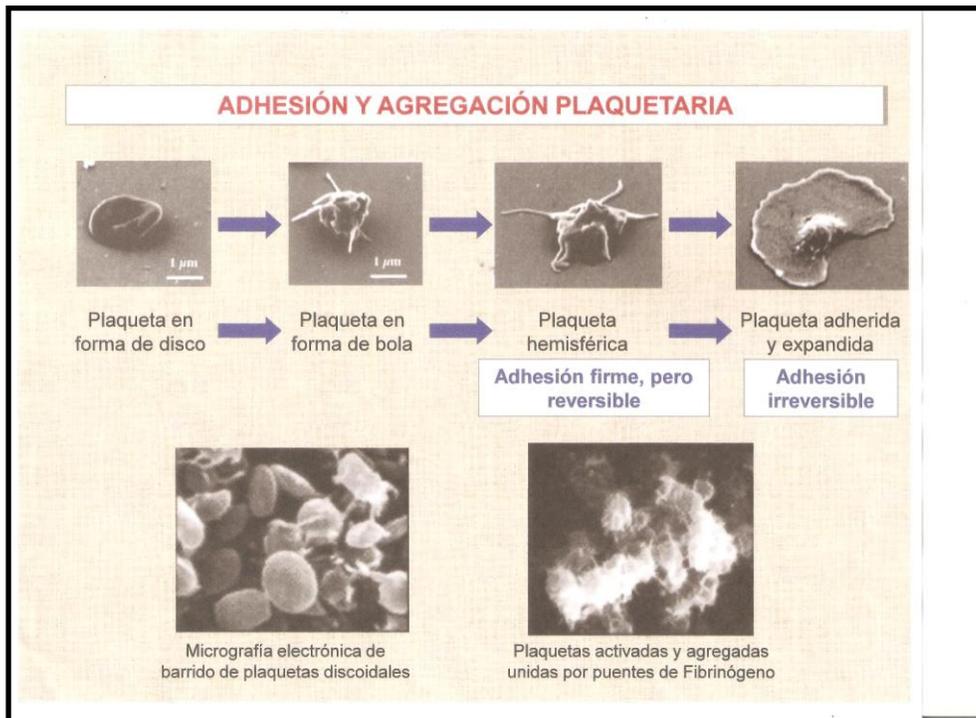
- Cambio de forma. La plaqueta activada conlleva a un cambio morfológico, es decir, se esteriliza y emite pseudópodos, los cuales facilitan la interacción con otras plaquetas.
- Agregación plaquetaria. El complejo de GPIIb/IIIa cambia de forma dejando al descubierto el lugar de fijación que interacciona con proteínas adhesivas, en especial el fibrinógeno que se encuentran en la atmósfera periplaquetaria propiciando puentes de unión interplaquetarios, lo que da lugar al fenómeno físico de la agregación plaquetaria. El calcio sostiene a estos receptores unidos y es necesario en la unión del fibrinógeno al receptor. Las plaquetas se van uniendo unas a otras utilizando la molécula de fibrinógeno como cemento intercelular al unirse

por el receptor plaquetario, la glicoproteína IIb-IIIa. La trombospondina está involucrada con la unión del fibrinógeno al complejo glicoproteico.

- Contracción del citoesqueleto. El Ca^{++} promueve la activación de la miosina quinasa y fosforila la cadena ligera de la miosina, de 20 kilodaltons de PM, a su vez se activan por acción del calcio las enzimas de la vía glucolítica promoviendo la formación de ATP, importante en la biosíntesis y en la contracción; el Ca^{++} disocia aquellas proteínas que cubren los extremos de la actina impidiendo su polimerización y el resultado es un incremento de actina filamentosa. La fosforilación de las cadenas ligeras de 20 kilodaltons de la miosina hace que los monómeros de miosina polimericen y adquieran una alta afinidad por la actina formándose la nueva molécula de actomiosina que provoca la contracción del citoesqueleto plaquetario. El Ca^{++} interviene en la activación de diversas enzimas que actúan sobre la materia filamentosa y retractil de la plaqueta.
- Secreción. Los filamentos retraídos centran los gránulos citoplasmáticos y al contactar las membranas de los gránulos con las invaginaciones de la membrana éstas se fusionan y posteriormente se lisan vertiéndose el contenido granular al

exterior. Este fenómeno no bien conocido en lo que respecta a su mecanismo químico, se denomina exocitosis.

Las plaquetas aparecen entonces totalmente degranuladas, simulando un saco vacío recubierto por su membrana. Al principio los agregados plaquetarios son laxos, pero las contracciones en la zona del citoesqueleto plaquetario producen masas compactas de plaquetas que dan lugar a la formación del tapón hemostático contribuyendo así a la hemostasia primaria. ⁽²⁰⁵⁾

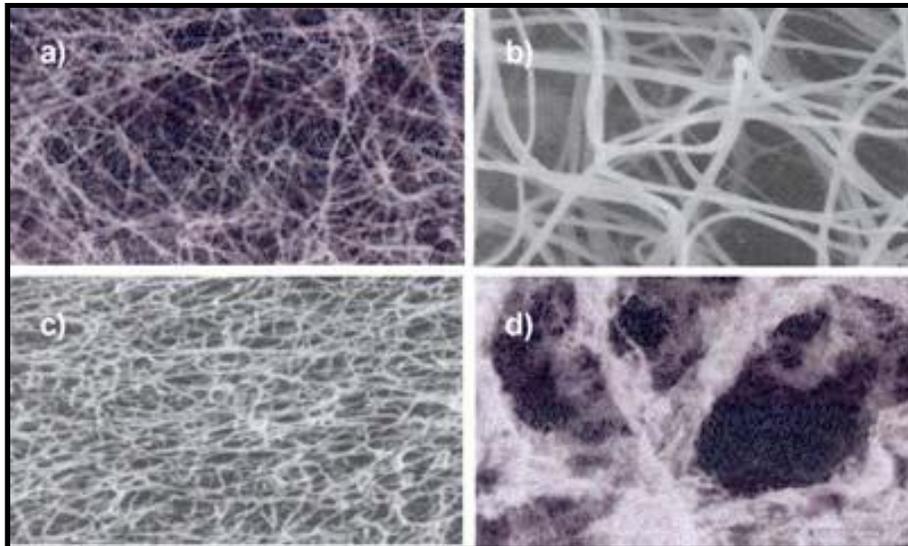


Pleomorfismo plaquetario por acción del calcio extracelular

Es importante resaltar las medidas ultraestructurales de los elementos sanguíneos, así bien, tenemos que un glóbulo rojo mide de 7.5 a 8 micrómetros de diámetro, un linfocitos de 8 a 10 micrómetros de diámetro y una plaqueta de 2 a 4 micrómetros de diámetro aproximadamente. ⁽²¹⁵⁾

10. ULTRAESTRUCTURA DE LA FIBRINA

Lauricella (2007) ⁽²⁰⁶⁾ estudió la ultraestructura de la fibrina, evaluándola por microscopía electrónica de barrido (MEB), observó que era muy variada. La arquitectura global puede ser homogénea (ya sea compacta o abierta) o heterogénea (si posee poros o nudos). Puede cuantificarse el número de ramificaciones por área y diferenciarse las uniones bilaterales o equilaterales, descritas anteriormente. Usualmente una arquitectura compacta de porosidad disminuida se asocia con fibras delgadas, muy ramificadas, mientras que una estructura abierta generalmente se vincula con fibras gruesas. La diferente estructura de la fibrina es un factor determinante de su velocidad de lisis.



Arquitectura global de las redes de fibrina: a) homogénea, b) homogénea abierta, c) homogénea compacta, d) heterogénea compacta con grandes poros.

III. HIPERTENSIÓN ARTERIAL

Actualmente, las enfermedades cardiovasculares se han convertido en la primera causa de muerte en todos los países del mundo industrializado, y el análisis epidemiológico de este fenómeno ha permitido reconocer la existencia de unas variables biológicas denominadas factores de riesgo de enfermedad cardiovascular, capaces de influenciar la probabilidad del padecimiento de accidentes cerebrovasculares, enfermedad coronaria, insuficiencia cardíaca o arteriopatía periférica. La hipertensión arterial es uno de estos factores de riesgo modificables y es considerado, en la actualidad, como uno de los mayores problemas de Salud Pública. ⁽¹⁸⁰⁾

1. CONCEPTO Y CLASIFICACIÓN

La hipertensión arterial (HTA) es un síndrome caracterizado por elevación de la presión arterial (PA) y sus consecuencias. Sólo en un 5% de casos se encuentra una causa (HTA secundaria); en el resto, no se puede demostrar una etiología (HTA primaria); pero se cree, cada día más, que son varios procesos aún no identificados, y con base genética, los que dan lugar a elevación de la PA. ⁽¹⁸⁰⁾ La HTA es un factor de riesgo muy importante para el desarrollo futuro de enfermedad vascular (enfermedad cerebrovascular, cardiopatía coronaria, insuficiencia cardíaca ó renal). La relación entre las cifras

de PA y el riesgo cardiovascular es continua (a mayor nivel, mayor morbimortalidad), no existiendo una línea divisoria entre presión arterial normal o patológica. La definición de hipertensión arterial es arbitraria. El umbral elegido es aquel a partir del cual los beneficios obtenidos con la intervención, sobrepasan a los de la no actuación. A lo largo de los años, los valores de corte han ido reduciéndose a medida que se han ido obteniendo más datos referentes al valor pronóstico de la HTA y los efectos beneficiosos de su tratamiento. Actualmente, se siguen las recomendaciones de la OMS-SIH, que con objeto de reducir la confusión y proporcionar a los clínicos de todo el mundo unas recomendaciones más uniformes, ha acordado adoptar en principio la definición y la clasificación establecidas por el Joint National Committee de Estados Unidos en su sexto informe (JNC VI). ^(180, 181)

Así pues, la hipertensión se define como una presión arterial sistólica de 140 mmHg ó superior y/o una presión arterial diastólica de 90 mmHg ó superior, en personas que no están tomando medicación antihipertensiva. En el siguiente cuadro, se presenta la clasificación de los valores de la presión arterial en adultos de más de 18 años, que no estén tomando medicación antihipertensiva y que no sufran enfermedades agudas simultáneas a la toma de presión arterial. ⁽¹⁸⁰⁾

Cuadro 1: DEFINICIONES Y CLASIFICACIÓN DE LOS VALORES DE PRESIÓN ARTERIAL (180)		
CATEGORIA	SISTÓLICA (mmHg)	DIASTÓLICA (mmHg)
Óptima	< 120	<80
Normal	<130	<85
Normal-alta	130-139	85-89
Hipertensión de Grado 1 (ligera)	140-159	90-99
Hipertensión de Grado 2 (moderada)	160-179	100-109
Hipertensión de Grado 3 (grave)	>179	>109
Hipertensión sistólica aislada	>139	<90

Quando la presión arterial sistólica o diastólica está en categorías distintas, debe seleccionarse la más alta para clasificar al hipertenso. ⁽¹⁸²⁾

Los términos “ligera”, “moderada” y “grave”, utilizados en recomendaciones previas de la OMS-SIH, corresponderían a los Grados 1, 2 y 3 respectivamente. La denominación ampliamente utilizada de “Hipertensión limítrofe” pasa a ser un subgrupo de la hipertensión Grado 1. Debe resaltarse que el término “hipertensión ligera” no implica un pronóstico uniformemente benigno, sino que se utiliza simplemente para contrastarlo con las elevaciones más

intensas de la presión arterial. A diferencia de lo que sucedía en recomendaciones previas, en este informe no se tratan por separado la hipertensión sistólica aislada ni la hipertensión del anciano. Estos dos trastornos se analizan ahora dentro del texto principal, puesto que su tratamiento es, como mínimo, igual de eficaz que el tratamiento de la hipertensión esencial clásica en individuos de mediana edad para reducir el riesgo cardiovascular. ^(180, 183)

2. HIPERTENSIÓN PRIMARIA (ESENCIAL) Y SECUNDARIA

En la mayoría de los pacientes con presión arterial alta, no se puede identificar ninguna causa, esta situación se denomina hipertensión primaria. Se calcula que el 95% aproximadamente de los pacientes con hipertensión tienen hipertensión primaria. El término alternativo, hipertensión esencial, es menos adecuado desde un punto de vista lingüístico, ya que la palabra esencial suele denotar algo que es beneficioso para el individuo. El término “hipertensión benigna” también debe evitarse, porque la hipertensión siempre conlleva riesgo de enfermedad cardiovascular prematura. El término hipertensión secundaria se utiliza cuando la hipertensión está producida por un mecanismo subyacente, detectable. Existen numerosos estados fisiopatológicos como estenosis de la arteria renal, feocromocitoma y coartación aórtica, que pueden producir hipertensión arterial. En alguno de estos casos, la elevación de la presión arterial es

reversible cuando la enfermedad subyacente se trata con éxito. Es importante identificar la pequeña cantidad de pacientes con una forma secundaria de hipertensión, porque en algunos casos existe una clara posibilidad de curación del cuadro hipertensivo. ⁽¹⁸⁴⁾

3. ASOCIACIÓN DE LA HTA CON OTROS FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR

La importancia de la hipertensión arterial como factor de riesgo cardiovascular (CV), es bien conocida desde los primeros estudios epidemiológicos sobre el tema. Un hecho fundamental a tener en cuenta es que el riesgo asociado a la HTA depende no solamente de la elevación de las cifras de presión arterial, sino también, y fundamentalmente, de la presencia de otros factores de riesgo CV y/o de lesiones en los órganos diana. ^(185, 186)

FACTORES DE RIESGO VASCULAR

Se define factor de riesgo vascular como aquella situación o circunstancia que se asocia, estadísticamente, con una mayor incidencia de enfermedades cardiovasculares. Un factor de riesgo puede estar implicado en la etiopatogenia de la enfermedad, o asociarse con la misma. Para que se le pueda atribuir un papel etiológico son necesarias varias premisas: que sea anterior al

comienzo de la enfermedad; que exista una relación entre la intensidad del factor de riesgo y la patología cardiovascular; que dicha relación persista en las diferentes poblaciones estudiadas; y que se demuestre una reducción en la prevalencia de la enfermedad al disminuir o eliminar dicho factor de riesgo. ⁽¹⁸⁷⁾

Los factores de riesgo cardiovascular principales, de interés en la evaluación del riesgo global del paciente hipertenso son:

- **Edad y sexo:** El riesgo de padecer enfermedad cardiovascular aumenta de manera constante a medida que avanza la edad y es mayor en los hombres que en las mujeres, aunque esta diferencia disminuye al aumentar la edad, y es mayor para la cardiopatía isquémica que para el accidente cerebrovascular. La relación de la edad y el sexo con la prevalencia de HTA es evidente. La prevalencia de HTA en el varón aumenta, progresivamente, hasta la década de los 70 que se mantiene o aún se reduce ligeramente. En mujeres, el incremento mayor se produce en la década de los 50, aumentando progresivamente hasta la década de los 80. La prevalencia es muy elevada para ambos sexos en la década de los 70 y 80 debido, especialmente, al componente sistólico.
- **Tabaquismo:** El consumo de cigarrillos aumenta el riesgo de cardiopatía isquémica (CI) y de accidente cerebrovascular (ACV) a todas las edades, pero tiene especial importancia en las personas

más jóvenes. En los varones de menos de 65 años, se ha observado que el tabaquismo aumenta el riesgo de muerte cardiovascular al doble, mientras que en los hombres de edad igual o superior a 85 años, se observó que el riesgo aumentaba tan solo en un 20 por ciento.

- **Obesidad:** El aumento del índice de masa corporal se asocia a un incremento del riesgo de CI. Es probable que el riesgo asociado con la obesidad se deba en parte a una elevación de la presión arterial, aunque también es posible que intervenga la reducción de colesterol HDL y el aumento en los niveles de glucosa e insulina.
- **Lípidos y lipoproteínas:** Las concentraciones crecientes de colesterol total y de colesterol LDL se asocian a incrementos del riesgo de CI. El riesgo relativo parece disminuir a medida que avanza la edad, aunque es característico que el riesgo absoluto aumente.
- **Diabetes, hiperinsulinemia e hiperglucemia:** Globalmente, la diabetes eleva de forma característica el riesgo relativo de muerte por CI y de muerte por ACV en unas 3 veces. Además, en los individuos sin diabetes, se ha observado que el riesgo de CI está relacionado de manera directa y continua con las concentraciones plasmáticas de glucosa e insulina.
- **Alcohol:** Un grado elevado de consumo de alcohol puede causar otros trastornos cardíacos y se asocia a un aumento del riesgo de

ACV, en especial después de un consumo puntual excesivo, así como a unas cifras más altas de presión arterial y a un mayor riesgo de varias enfermedades y lesiones no vasculares. El riesgo de CI parece reducirse en los consumidores regulares de cantidades moderadas de alcohol.

- **Actividad física:** El ejercicio físico aeróbico regular reduce el riesgo de CI. Este beneficio puede deberse en parte a los efectos de reducción de la presión arterial que tiene el ejercicio físico, aunque también es posible que el ejercicio active otros factores metabólicos, entre los que se encuentran un aumento del colesterol HDL.
- **Enfermedad cardiovascular preexistente:** Los antecedentes de enfermedad cardiovascular, clínicamente manifiesta, constituyen un factor predecible específicamente importante para el futuro riesgo de desarrollo de episodios cardiovasculares graves. Los pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva presentan de forma característica una tasa de mortalidad de un 10 por ciento o más al año. Los pacientes con antecedentes de ACV presentan un riesgo de nuevo ACV de un 3% a un 5% ó más al año, y el riesgo de otros accidentes cardiovasculares graves es, como mínimo, de algunas unidades porcentuales mayor. En los pacientes con antecedente de infarto de miocardio o angor inestable, la incidencia anual de recidivas de infartos o de muerte por CI es

igual o superior a un 4 por ciento, y el riesgo de otros episodios cardiovasculares graves suponen un 1 ó 2 por ciento adicional.

- Nefropatía y microalbuminuria: La nefropatía manifestada por una elevación de la creatinina sérica y proteinuria constituyen también un factor predecible importante, no sólo de la insuficiencia renal, sino también de episodios cardiovasculares graves. Aunque la mayoría de enfermedades renales se asocian a un aumento del riesgo, la nefropatía diabética parece ser la que confiere el máximo riesgo. En los diabéticos sin una nefropatía franca, se ha observado que la microalbuminuria se asocia a un aumento del riesgo de episodios cardiovasculares graves de 2-3 veces.
- Fibrinógeno: Las concentraciones plasmáticas de fibrinógeno presentan una asociación positiva con el riesgo de CI y ACVA isquémico.
- Tratamiento de reposición hormonal (TRH): En estudios realizados en poblaciones occidentales, se ha observado que, en las mujeres postmenopáusicas, el empleo de TRH se asocia a un riesgo de CI un 30-50 por ciento más bajo. No está claro si esta asociación refleja un verdadero efecto protector del TRH, o corresponde a un sesgo en la selección previa de mujeres de bajo riesgo subsidiarias de la aplicación de este tipo de tratamiento.
- Origen étnico: El origen étnico tiene también una intensa asociación con el riesgo de las enfermedades cardiovasculares

más frecuentes. En muchos países los grupos de minorías étnicas, como los maoríes de Nueva Zelanda, y los indígenas de los Estados Unidos, presentan un riesgo de CI considerablemente superior al de la mayoría de la raza blanca. (187,188)

IV. DIABETES MELLITUS

1. DEFINICIÓN

La Diabetes Mellitus es un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por hiperglicemia, consecuencia de defectos en la secreción y/o en la acción de la insulina. La hiperglicemia crónica se asocia, en el largo plazo, con daño, disfunción e insuficiencia de diferentes órganos especialmente de los ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos. ⁽¹⁸⁸⁾

“La Diabetes Mellitus es un disturbio metabólico crónico caracterizado por la mayor o menor capacidad del organismo de utilizar a la glucosa.” Estas alteraciones metabólicas se producen por un desequilibrio endocrino como consecuencia de la carencia de insulina efectiva disponible, que interfiere a su vez con la actividad de otras hormonas. ⁽¹⁸⁹⁾

La insulina es segregada por las células B de los islotes de Langerhans del páncreas. Es la hormona anabólica más importante del organismo e interviene en el almacenamiento de los carbohidratos, ya sea en hígado y músculo como glucógeno, o en tejido adiposo como grasa. ^(188, 189)

El páncreas del paciente diabético no produce insulina, o la produce en cantidad insuficiente, y además el organismo es incapaz de utilizarla del modo adecuado, permaneciendo en el torrente sanguíneo. ⁽¹⁸⁹⁾

En el desarrollo de la Diabetes están involucrados varios procesos patogénicos, que van desde la destrucción autoinmune de las células B del páncreas, resistencia periférica a la Insulina, hasta anomalías en el metabolismo de hidratos de carbono, proteínas y grasas, por la acción deficiente de Insulina sobre los tejidos. ⁽¹⁸⁹⁾

2. CLASIFICACIÓN

En 1997 la Asociación Americana de Diabetes (ADA) ⁽¹⁹⁰⁾, propuso una clasificación que está vigente. Se incluyen 4 categorías de pacientes y un 5º grupo de individuos que tienen glicemias anormales con alto riesgo de desarrollar diabetes (también tienen mayor riesgo cardiovascular):

1. Diabetes Mellitus tipo 1
2. Diabetes Mellitus tipo 2
3. Otros tipos específicos de Diabetes
4. Diabetes Gestacional
5. Intolerancia a la glucosa y glicemia de ayunas alterada

Diabetes Mellitus tipo 1: Caracterizada por una destrucción de las células beta pancreáticas, deficiencia absoluta de insulina, tendencia a la cetoacidosis y necesidad de tratamiento con insulina para vivir (insulinodependientes).

Se distinguen dos sub-grupos:

- Diabetes autoinmune: con marcadores positivos en un 85-95% de los casos, anticuerpos antiislotes (ICAs), antiGADs (descarboxilasa del ac. glutámico) y anti tirosina fosfatasas IA2 e IA2 β . Esta forma también se asocia a genes HLA.
- Diabetes idiopática: Con igual comportamiento metabólico, pero sin asociación con marcadores de autoinmunidad ni de HLA. ⁽¹⁹⁰⁾

Diabetes Mellitus tipo 2: Caracterizada por insulino-resistencia y deficiencia (no absoluta) de insulina. Es un grupo heterogéneo de pacientes, la mayoría obesos y/o con distribución de grasa predominantemente abdominal, con fuerte predisposición genética no bien definida (multigénica). Con niveles de insulina plasmática normal o elevada, sin tendencia a la acidosis, responden a dieta e hipoglicemiantes orales, aunque muchos con el tiempo requieren de insulina para su control, pero ella no es indispensable para preservar la vida (insulino-requiere). ⁽¹⁹⁰⁾

Otros tipos específicos de diabetes: Incluyen pacientes con defectos genéticos en la función de la célula beta como las formas llamadas MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young); otros con defectos genéticos de la acción de la insulina; otros con patologías pancreáticas (pancreatectomía, pancreatitis aguda, pancreatitis crónica, neoplasia del páncreas, hemocromatosis); endocrinopatías (Cushing, acromegalia, glucagonoma, feocromocitoma). También algunos fármacos o tóxicos pueden producir diabetes secundaria (corticoides, ácido nicotínico, Lasparagina, interferón alfa, pentamidina); agentes infecciosos (rubeola congénita, coxsachie B, citomegalovirus, parotiditis) y por último, algunas otras enfermedades como los Síndromes de Down, Klinefelter, Turner, enfermedad de Stiff-man y Lipoatrofias. En estos casos se habla de diabetes secundaria, mientras los tipo 1 y 2 son primarias. (190, 192, 193)

Diabetes gestacional: Se caracteriza por hiperglicemia, que aparece en el curso del embarazo. Se asocia a mayor riesgo en el embarazo y parto y de presentar diabetes clínica (60% después de 15 años). La diabetes gestacional puede desaparecer al término del embarazo o persistir como intolerancia a la glucosa o diabetes clínica. (190)

Intolerancia a la glucosa y glicemia de ayuna alterada: La Intolerancia a la glucosa se caracteriza por una respuesta anormal a

una sobrecarga de glucosa suministrada por vía oral. Este estado se asocia a mayor prevalencia de patología cardiovascular y a riesgo de desarrollar diabetes clínica (5-15% por año) ⁽¹⁹⁰⁾

Glicemia de ayuno alterada se caracteriza por el hallazgo de una glicemia de ayuno entre 100 y 125 mg/dl. Su identificación sugiere el realizar una prueba de sobrecarga de glucosa oral, para la clasificación definitiva. ^(190, 191, 193)

CLASIFICACIÓN DE DIABETES MELLITUS (ADA 2012)

I. Diabetes tipo 1 (destrucción de las células, por lo general conduce a una deficiencia absoluta de insulina)

- Mediada por inmunidad
- Idiopática

II. Diabetes tipo 2 (rango posible de resistencia a la insulina predominante con deficiencia relativa de insulina a un defecto secretor predominante con resistencia a la insulina)

III. Otros tipos específicos

- Defectos genéticos de la función de células β
- Defectos genéticos en la acción de la insulina
- Enfermedades del páncreas exocrino
- Endocrinopatías

- Inducida por fármacos o sustancias químicas
- Infecciones
- Formas poco frecuentes de diabetes mediada por inmunidad
- Otros síndromes genéticos algunas veces asociados con la diabetes

IV. Diabetes Mellitus Gestacional ^(189,190)

3. DIAGNÓSTICO

Para el diagnóstico definitivo de diabetes mellitus y otras categorías de la regulación de la glucosa, se usa la determinación de glucosa en plasma o suero. En ayunas de 10 a 12 horas, las glicemias normales son < 100 mg/dl. ⁽¹⁹⁴⁾

En un test de sobrecarga oral a la glucosa (75 g), las glicemias normales son: Basal < 100, a los 30, 60 y 90 minutos < 200 y los 120 minutos post sobrecarga < 140 mg/dl. ⁽¹⁹⁵⁾

Diabetes Mellitus: El paciente debe cumplir con alguno de estos 3 criterios lo que debe ser confirmado en otra oportunidad para asegurar el diagnóstico.

1. Glicemia (en cualquier momento) 200 mg/dl, asociada a síntomas clásicos (poliuria, polidipsia, baja de peso)
2. Dos o más glicemias 126 mg/ dl.
3. Respuesta a la sobrecarga a la glucosa alterada con una glicemia a los 120 minutos post sobrecarga 200 mg/dl.

Intolerancia a la glucosa: Se diagnostica cuando el sujeto presenta una glicemia de ayuno < 126 mg/dl y a los 120 minutos post sobrecarga oral de glucosa entre 140 y 199 mg/dl. ⁽¹⁹⁵⁾

Glicemia de ayuna alterada: Una persona tiene una glicemia de ayunas alterada si tiene valores entre 100 y 125 mg/dl. Será conveniente estudiarla con una sobrecarga oral a la glucosa. ⁽¹⁹⁵⁾

4. PATOGENIA

El síndrome diabético, aunque tiene hechos comunes (la hiperglicemia y sus consecuencias) es heterogéneo en su patogenia. Más aún, hay diferencias dentro de sus categorías primarias del tipo 1 y 2 en cuanto a factores hereditarios y ambientales que desencadenan el trastorno metabólico. ⁽¹⁹⁶⁾

ETIOPATOGENIA DE LA DIABETES TIPO 1

Se ha observado una mayor prevalencia de esta forma clínica en sujetos que presentan ciertos antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad HLA (Human Leucocyte Antigen) que se encuentran en el cromosoma 6 y que controlan la respuesta inmune. La asociación de la Diabetes Mellitus tipo 1 con antígenos HLA DR3, DR 4, DQA Arg 50 y DBQ No Asp 57, estaría reflejando una mayor susceptibilidad a desarrollar la enfermedad. Para que ello ocurra se requiere de otros factores ambientales como virus, tóxicos u otros inmunogénicos. Esto explica el porqué sólo el 50% de los gemelos idénticos son concordantes en la aparición de este tipo de diabetes. ⁽¹⁹⁶⁾

Los individuos susceptibles, frente a condiciones ambientales, expresan en las células beta del páncreas antígenos del tipo II de histocompatibilidad anormales, que son desconocidos por el sistema de inmunocompetencia del sujeto. Ello inicia un proceso de autoinmunoagresión, de velocidad variable, que lleva en meses o años a una reducción crítica de la masa de células beta y a la expresión de la enfermedad. ⁽¹⁹⁶⁾

En la actualidad, es posible detectar el proceso en su fase pre-clínica (Prediabetes) a través de la detección de anticuerpos

antiislotes (ICA) y antiGAD, los cuales en concentraciones elevadas y persistentes, junto a un deterioro de la respuesta de la fase rápida de secreción de insulina permiten predecir la aparición de la enfermedad. ⁽¹⁹⁶⁾

Si bien el fenómeno de la autoinmunoagresión es progresivo y termina con la destrucción casi total de las células β , la enfermedad puede expresarse antes que ello ocurra, al asociarse a una situación de estrés que inhibe en forma transitoria la capacidad secretora de insulina de las células residuales. ⁽¹⁹⁶⁾

En la etapa clínica puede haber una recuperación parcial de la secreción insulínica que dura algunos meses (“luna de miel”), para luego tener una evolución irreversible con insulinopenia que se puede demostrar por bajos niveles de péptido C (< 1 ng/ml). Los pacientes van entonces a depender de la administración exógena de insulina para mantener la vida y no desarrollar una cetoacidosis. ⁽¹⁹⁶⁾

ETIOPATOGENIA DE LA DIABETES TIPO 2

Su naturaleza genética ha sido sugerida por la altísima concordancia de esta forma clínica en gemelos idénticos y por su transmisión familiar. Si bien se ha reconocido errores genéticos puntuales que explican la etiopatogenia de algunos casos, en la gran

mayoría se desconoce el defecto, siendo lo más probable que existan alteraciones genéticas múltiples (poligénicas) ⁽¹⁹⁶⁾

El primer evento en la secuencia que conduce a esta Diabetes es una resistencia insulínica que lleva a un incremento de la síntesis y secreción insulínica, e hiperinsulinismo compensatorio, capaz de mantener la homeostasia metabólica por años. Una vez que se quiebra el equilibrio entre resistencia insulínica y secreción, se inicia la expresión bioquímica (intolerancia a la glucosa) y posteriormente la diabetes clínica. Los individuos con intolerancia a la glucosa y los diabéticos de corta evolución son hiperinsulinémicos y esta enfermedad es un componente frecuente en el llamado Síndrome de Resistencia a la Insulina o Síndrome Metabólico. Otros componentes de este cuadro y relacionados con la insulina-resistencia y/o hiperinsulinemia son hipertensión arterial, dislipidemias, obesidad tóraco-abdominal (visceral), gota, aumento de factores protrombóticos, defectos de la fibrinólisis y aterosclerosis. Por ello, estos sujetos tienen aumentado su riesgo cardiovascular. La obesidad y el sedentarismo son factores que acentúan la insulina-resistencia. La obesidad predominantemente visceral, a través de una mayor secreción de ácidos grasos libres y de adipocitoquinas (factor de necrosis tumoral alfa, interleuquinas 1 y 6) y disminución de adiponectina, induce resistencia insulínica. Si coexiste con una resistencia genética, produce una mayor exigencia al páncreas y

explica la mayor precocidad en la aparición de DM tipo 2 que se observa incluso en niños. ⁽¹⁹⁶⁾

Para que se inicie la enfermedad que tiene un carácter irreversible en la mayoría de los casos, debe asociarse a la insulina-resistencia un defecto en las células beta. Se han postulado varias hipótesis como el agotamiento de la capacidad de secreción de insulina en función del tiempo, coexistencia de un defecto genético que interfiere con la síntesis y secreción de insulina, interferencia de la secreción de insulina por efecto de fármacos e incluso por el incremento relativo de los niveles de glucosa y ácidos grasos en la sangre (glucolipototoxicidad). ⁽¹⁹⁶⁾

La Diabetes tipo 2 es una enfermedad progresiva en que a medida que transcurren los años su control metabólico de va empeorando producto de la resistencia a la insulina y a mayor deterioro de su secreción. ⁽¹⁹⁶⁾

Características generales de las Diabetes Mellitus Primarias		
	DM (Tipo 1)	DM (Tipo 2)
Edad de inicio años	Generalmente < 30 años	Generalmente > 40 años
Estado nutricional	Normal o bajo peso	Obesos o normales
Síntomas clínicos	Inicio agudo	Inicio insidioso
Tendencia a acidosis	Alta	Solo en estrés
Nivel insulinemia	Bajo	Normal o alta
Respuesta terapéutica	Insulino dependencia	Dieta hipo Glicemiantes orales Insulina

Cuadro 2: Cuadro comparativo entre Diabetes Mellitus tipo 1 y 2.

5. EPIDEMIOLOGÍA

En este tipo de Diabetes la alteración básica reside en la resistencia a la acción de la Insulina a nivel de los tejidos, fundamentalmente en el hígado y músculos. Generalmente, cursa con déficit relativo de Insulina y no siempre se requiere de su aporte exógeno para sobrevivir. ⁽¹⁹⁷⁾

Afecta al 85 a 90 % de los Diabéticos, presentándose con mayor frecuencia entre los 30 y 40 años. Mientras el número de casos de Diabetes tipo 1 ha aumentando lentamente, la forma tipo 2 que como vemos es la más predominante, aumenta en proporciones epidémicas. La mayoría son obesos y esta condición en sí misma, produce algún grado de resistencia a la Insulina. ⁽¹⁹⁷⁾

Es asintomática, y la hiperglucemia se va desarrollando muy lentamente, sin ser al inicio de la enfermedad lo suficientemente grave para que el paciente perciba los síntomas clásicos. Debido a esto, aproximadamente el 50 % de estos pacientes, ignoran su situación. No se conoce la etiología, pero sí que existen factores desencadenantes, tales como la obesidad y el embarazo. Existe un fuerte factor genético, más que en la Diabetes tipo 1, si bien aún no han sido completamente definidos. ⁽¹⁹⁸⁾

El número de enfermos de diabetes casi se multiplicó por ocho en las últimas dos décadas, según datos de la Federación Internacional de Diabetes (FDI). Este organismo calcula que hay más de 230 millones de personas en el mundo con diabetes. Se estima que esta cifra aumentará para alcanzar los 350 millones para el año 2025, debido en gran medida al crecimiento de la población, el envejecimiento, la urbanización y la vida sedentaria. ⁽¹⁹⁸⁾

La mayor población con diabetes es China y países asiáticos, pero se ha detectado un aumento progresivo en Estados Unidos, el Caribe y Sudamérica, con el gran inconveniente del costo socio-económico que la misma enfermedad y sus complicaciones representa para el ciudadano, para la sociedad, para los servicios de salud y para el Estado. ⁽¹⁹⁹⁾

Al menos, el 50 % de todas las personas con diabetes no es consciente de tener la afección. En algunos países esta cifra podría llegar a alcanzar el 80 %. ⁽¹⁹⁹⁾

La diabetes es la cuarta causa de muerte en la mayoría de los países desarrollados. Las cifras más recientes dadas por la Organización Mundial de la Salud indican que, cada año, 3,2 millones de muertes en todo el mundo son atribuibles a la diabetes, es decir, 6 muertes por minuto. ⁽²⁰⁰⁾

Para el año 2025, se espera que el número de personas con diabetes se duplique con creces en África, el Mediterráneo Oriental y el Oriente Medio y en el Sudeste Asiático. ⁽²⁰⁰⁾

Las personas con diabetes tienen una probabilidad tres veces mayor de necesitar hospitalización que quienes no tienen la afección. ⁽²⁰⁰⁾

En la actualidad, entre el 5 y el 10 % del presupuesto sanitario mundial se gasta en diabetes. Esta cifra podría alcanzar el 40 % para el año 2025 en algunos países si las predicciones actuales sobre prevalencia de diabetes se cumplieren. ⁽²⁰⁰⁾

La diabetes es la principal causa de muerte por infarto de miocardio y derrame cerebral, y la principal causa de ceguera e insuficiencia renal en países desarrollados. Las personas con diabetes tienen una probabilidad entre 15 y 40 veces mayor de necesitar la amputación de una extremidad inferior que la población en general. ^(196, 200)

En Latinoamérica el número de personas que padecen diabetes en las Américas se estimó en 35 millones para el 2000, de los cuales 19 millones (54 %) vivían en América Latina y el Caribe.⁷ Las proyecciones indican que esta cifra ascenderá a 64 millones, de los cuales 40 millones (62 %) corresponderán a América Latina. ^(196, 200)

Debido a que la mayoría de los países de América Latina y el Caribe no realizan vigilancia epidemiológica de diabetes en adultos, no hay demasiada información sobre la prevalencia de esta enfermedad. ^(196, 200)

V. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar y comparar *in vitro* las características ultraestructurales de fibrina rica en plaquetas (FRP) bajo microscopía electrónica de barrido en pacientes tratados en el Postgrado de Cirugía Bucal de la UCV.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar y comparar las características ultraestructurales de FRP entre los grupos de estudio.
- Determinar y comparar las características ultraestructurales de las plaquetas entre los grupos de estudio.
- Determinar y comparar las características ultraestructurales de FRP y plaquetas con exámenes de laboratorio entre los grupos de estudio.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

El diseño del estudio precisó de lo siguiente:

1. Recursos humanos.
2. Material descartable
3. Material físico o aparatología.

1. RECURSOS HUMANOS

18 pacientes comprendidos entre 20 y 78 años de edad, 6 pacientes sanos, 6 pacientes con hipertensión arterial controlada y 6 pacientes con diabetes mellitus tipo 2 controlada.

2. MATERIAL DESCARTABLE

Agujas para muestras Vacuum Diagnostics, un solo uso, descartable, estéril, apirógeno, atóxico. Ver figura 35.



Figura 35

Tubos colectores de sangre de 10ml de plástico, con etiqueta para rotular marca BD Vacutainer. Ver figura 36



Figura 36

Sistema de vacío y sostén de aguja BD Vacutanier Band. Figura 38



Figura 38

MATERIAL COMPLEMENTARIO

- Gasas estériles.
- Alcohol isopropílico 70%.
- Fichas para recolección datos.
- Material fotográfico.
- Material bibliográfico.

MATERIAL PARA FIJACIÓN Y TRANSPORTE DE LA MUESTRA

- Gluteraldehído al 2.5%.
- Colector eppendorf.
- Cava portátil con hielo.
- Material para desecación de la muestra
- Agua destilada
- Solución salina
- Etanol al 50, 70, 80, 95 y 100%
- Hexametil dexil
- Recubrimiento de oro.

3. MATERIAL FÍSICO O APARATOLOGÍA

Máquina centrifugadora de mesa graduable de 8 tubos Digital System Laboratory Instruments Inc. Modelo DSC-200A-1 de 6000rpm como máxima velocidad. Ver figura 39



Figura 39

Campana de flujo laminar. Se utilizó para manipular las muestras sin riesgo de contaminación ya que mantiene un flujo de aire ascendente que impide que se depositen partículas o microorganismos en ninguna de las muestras. Ver figura 40.



Figura 40

Portamuestra para microscopio electrónico de barrido. Ver figura 41.



Figura 41

Cámara de vacío Balzers modelo BAE 301. Se utilizó para terminar de desecar la muestra después del protocolo de desecación por 24 horas. Ver figura 42.



Figura 42

Microscopio electrónico de barrido Phillips XL Series XL 30 25kV. Ver figura 43

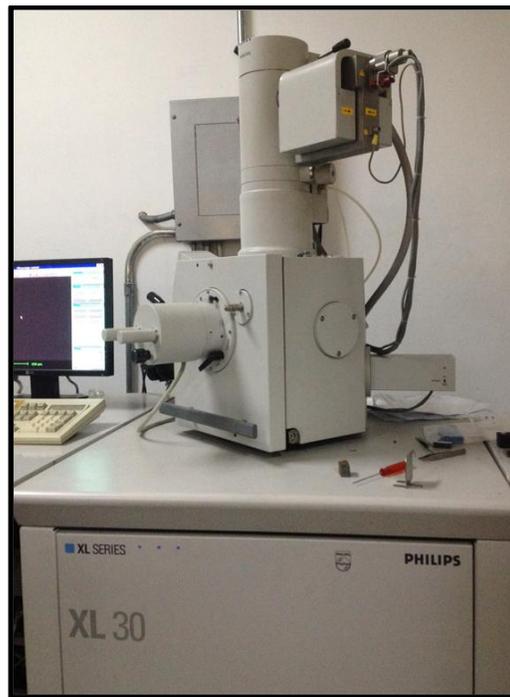


Figura 43

4. METODOLOGÍA

1. Tipo de investigación
2. Tamaño de la muestra
3. Definición de la población
4. Pacientes
5. Rutina ultraestructural
6. Observación bajo microscopía electrónica

1. TIPO DE INVESTIGACIÓN

El presente trabajo de investigación basándose en criterios como la estrategia de investigación, el diseño, el tipo de datos y la forma de obtenerlos, el muestreo y otros componentes del proceso de investigación, planteado por autores como Riegelman y Hirsch (1992)⁽²⁰¹⁾, Polit y Hungler (1997)⁽²⁰²⁾ y Namakforoosh (2005)⁽²⁰³⁾, se puede clasificar de acuerdo a varios puntos de vista. En tal sentido, se considera un estudio Transversal, dado que se realiza en un lapso de tiempo corto y no en espera de resultados que van evolucionando en el tiempo. Tenemos además que de acuerdo al proceso formal que se emplea, el estudio se basa en el Método Inductivo, analizándose la muestra de casos particulares, para estimar el comportamiento de la población y cuyos resultados permitirán tomar conclusiones de carácter general. Polit y Hungler (1997)⁽²⁰²⁾ y Namakforoosh (2005)⁽²⁰³⁾.

De acuerdo la naturaleza de los datos, se trata de una investigación que combina la toma de datos cuantitativos y cualitativos, lo que permite realizar mediciones sistemáticas, así como análisis subjetivos e individuales, otorgándole carácter interpretativo, referido a lo particular y empleando análisis estadísticos apropiados para variables a considerar en el análisis de eventos ya ocurridos de manera natural, lo que permite aplicar análisis descriptivos o experimentales según se requiera. Hernández, Fernández y Baptista (2003) ⁽²⁰⁴⁾.

De acuerdo a la naturaleza de los objetivos, la presente investigación puede clasificarse como correlacional explicativa, ya que intenta medir el grado de relación existente entre los conceptos o variables en estudio y así evaluar la relación causal del mismo según Polit y Hungler (1997)⁽²⁰²⁾ y Namakforoosh (2005)⁽²⁰³⁾

2.- TAMAÑO DE LA MUESTRA

El tamaño de la muestra se conformó de acuerdo al número de pacientes que ingresaron al postgrado de cirugía bucal de la Facultad de Odontología de la Universidad Central de Venezuela y en base al número de muestras con impresión clínica de HTA y DMII de estos pacientes.

ASPECTOS ÉTICOS

Esta investigación cumple con los criterios bioéticos, ya que se realizó bajo la supervisión del comité de bioética de la Facultad de Odontología de la Universidad Central de Venezuela, razón por la cual fue avalada por el mismo para evaluar un total 18 pacientes, al presente estudio mediante oficio # 0240-2012 de fecha 01 de marzo de 2012. (Anexo 1)

2.1 CONTROLES

Se conformó un grupo control (GC) de características ultraestructurales de las plaquetas y fibrina de 9 sujetos aparentemente sanos que acudieron al servicio de cirugía bucal, se seleccionó de acuerdo a las variables de edad, sexo y raza, con previa autorización y por escrito. Se le orientó que participarían en un proyecto de investigación y en el cual se requirió tomar muestra de su sangre para así poder hacer inferencias sobre la significancia de los hallazgos obtenidos.

3.- DEFINICIÓN DE LA POBLACIÓN

Las muestras fueron constituidas por pacientes entre la tercera y la séptima década de la vida, sin predilección por sexo, raza o

género, de demanda espontánea que acudieron al postgrado de Cirugía Bucal de la Facultad de Odontología de la Universidad Central de Venezuela y Hospital Ortopédico Infantil con necesidad de tratamiento quirúrgico y que previa explicación y firma de consentimiento informado accedieron a participar en este estudio.

3.1.- CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Se tomaron en cuenta para el presente estudio a todo paciente con necesidad de procedimiento de cirugía bucal que acudieran al post-grado de Cirugía Bucal, con edades comprendidas entre 20 a 78 años, 6 sujetos sanos (Grupo Control), 6 pacientes con hipertensión controlada (Grupo 1) y 6 pacientes con diabetes tipo 2 controlada (Grupo 2) que estén de acuerdo con la investigación y firma del consentimiento informado.

3.2.- CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

1. Pacientes menores de 18 años de edad.
2. Pacientes con enfermedad sistémica no controlada.
3. Pacientes que estuviesen en tratamiento con antiagregantes plaquetarios.
4. Pacientes no dispuestos a realizar el protocolo de estudio y que no hayan firmado el consentimiento informado.

4.- PACIENTES

Para la realización de la presente investigación se utilizaron muestras de sangre provenientes de sujetos sanos y de pacientes con diagnóstico médico de HTA controlado y DMII controlado, a quienes se les indicó, tratamiento de cirugía bucal, que asistieron a la consulta del postgrado de Cirugía Bucal de la Facultad de Odontología.

Todos los pacientes recibieron tratamiento quirúrgico indicado, las indicaciones post-quirúrgicas y se realizó el procesamiento ultraestructural para Microscopía Electrónica de Barrido.

4.1.- ASPECTOS CLÍNICOS

El estudio clínico comprendió los siguientes aspectos:

- a) Datos del paciente (nombre, edad, sexo, hábitos psicobiológicos y evolución de la enfermedad)
- b) Descripción clínica de la enfermedad, con necesidades quirúrgicas.

4.1.2.- EXÁMENES DE LABORATORIO

Las pruebas de laboratorio incluyeron, exámenes de rutina (hematológicos y química sanguínea), estudios de coagulación (tiempo de protrombina y tiempo parcial de tromboplastina),

determinación del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y Venereal Disease Research Laboratory (V.D.R.L.).

4.1.3.- EXÁMENES COMPLEMENTARIOS

Otros exámenes específicos realizados fueron electrocardiogramas y RX de tórax en aquellos pacientes que ameritaron evaluación cardiovascular e informe médico.

4.2. TOMA DE MUESTRAS

4.2.1 EXTRACCIÓN DE SANGRE Y CENTRIFUGACIÓN

Las muestras provenientes de sujetos control, pacientes HTA controlados y pacientes DMII controlados fueron obtenidas previo a la intervención quirúrgica en el servicio antes mencionado. De cada sujeto sano y de cada paciente con HTA y DII controlados se obtuvo un tubo de ensayo de 10ml de sangre aprox. Ver figura 44



Figura 44

Para la realización de éste paso se hizo previa asepsia de la zona con gasas estériles y alcohol isopropílico 70% e identificación de la vía a tomar, antes de la venopunción.

Después de extraer a cada paciente 10ml de sangre aprox., se realizó la centrifugación de la muestra en una centrifugadora de mesa variable a una velocidad de 3000rpm por 10 minutos, con lo cual se obtuvo la FRP. Ver figura 45.



Figura 45. Nótese las tres capas luego de la centrifugación, capa inferior (roja) conformada por glóbulos rojos, capa intermedia FRP (amarillo) y capa acelular en la porción superior.

4.2.2 FIJACIÓN DE LA MUESTRA

Mediante la conformación del equipo de trabajo integrado por un cirujano bucal, un ayudante del cirujano, el ayudante para microscopía electrónica, se realizaron la toma y manipulación de la muestra previo al acto quirúrgico.

El personal que se encargó de enviar las muestras al Centro de Microscopía Electrónica "Mitsuo Ogura" de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela y al Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) en el Laboratorio de Ciencia e Ingeniería de Materiales fue realizado por el autor del trabajo.

Luego de obtenido la FRP, este fue extraído del tubo colector por medio de una pinza de disección sin dientes y se colocó sobre una gasa estéril para su manipulación. Ver figura 46.



Figura 46

Se realizó un corte con un bisturí número 3 con una hoja número 15 estéril en la interfase entre el coagulo de sangre y la FRP.

Se llevó la muestra obtenida a un colector eppendorf con glutaraldehído (la concentración utilizada fue de 2,5%). Ver figura 47.

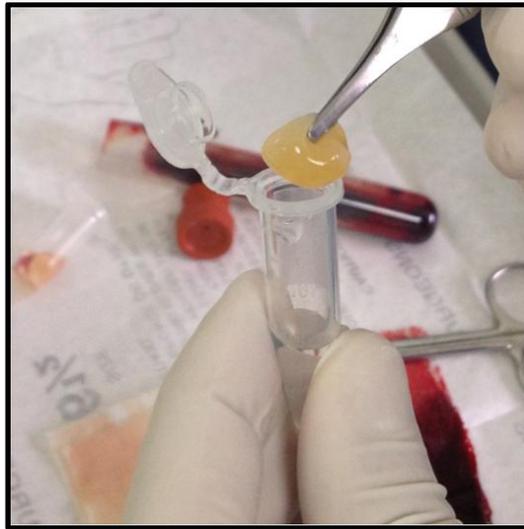


Figura 47

5.- RUTINA ULTRAESTRUCTURAL

A cada muestra obtenida de cada paciente se le realizó el siguiente protocolo en el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas I.V.I.C. Ingeniería III, Centro de Microscopía Electrónica:

- Lavado con solución buffer, esto se realizó 3 veces con cada muestra con PBS, por períodos de 5 minutos cada una.

- Luego lavado con agua destilada, se realizó dos lavados a cada muestra, por períodos de 15 minutos cada una.
- Se hizo una post-fijación con tetróxido de osmio al 1%. Se mezclaron 2 ml de solución de tetróxido de osmio a 2% con 2 ml de 0,2M PBS pH 7,2 - 7,4 para producir una solución postoxidativa de 1% de tetróxido de osmio con 0,1 M de buffer fosfato pH 7,2 - 7,4. Las muestras se sumergieron por 1 hora a T.A.
- Posteriormente se realizó lavados de las muestras con PBS y a deshidratarlas con series ascendentes de concentraciones de etanol: 50%, 70%, 80%, 95% y 100%. 2 veces cada muestra, por períodos de 15 minutos cada una. Ver figura 48.
- Seguidamente se efectuó una desecación con Hexametil dexil por un período de 3 minutos. Ver figura 49.

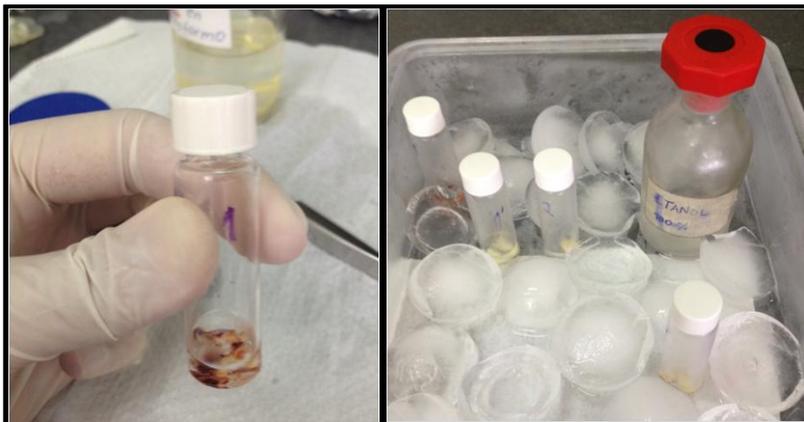


Figura 48.

Todos estos pasos fueron constituidos bajo una campana de flujo laminar y con refrigeración permanente.



Figura 49

Luego se hizo el recubrimiento con una delgada capa de oro, de 600 A, por un tiempo de 1.5 minutos, a una distancia de 30mm con gas Argón, en una cámara de vacío a 0,1Torr.

Por último se utilizó una cámara de vacío, con la finalidad de desecar la muestra por completo por un periodo máximo de 1 día. Ver figura 50.



Figura 50

6.- OBSERVACIÓN BAJO MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Por medio de un microscopio electrónico de barrido se observó las características ultraestructurales de los componentes de las muestras obtenidas (glóbulos rojos, glóbulos blancos, plaquetas y fibrina) a diferentes aumentos y distancias realizado en el Instituto Universitario de Tecnología I.U.T. Dr. Federico Rivero Palacio, Centro de Microscopía Electrónica.

Mediante la utilización de variables dicótomas, se registró la apariencia de la fibrina, el nivel de compactación y la formación de poros, así como la forma de las plaquetas, su adhesión y expansión.

También se consideraron los contajes de células hemáticas (N° de células x106): Eritrocitos (GRx10E6), Linfocitos (GBx10E6) y Plaquetas (Plaqx10E6). Las variables cuantitativas se unieron a las dicótomas para conformar tablas de datos, usadas posteriormente para su interpretación y análisis.

VI. RESULTADOS

7.1.- DISTRIBUCIÓN SEGÚN EL TIPO DE POBLACIÓN

En la presente investigación se procesaron 18 muestras para su estudio de las cuales se distribuyeron de la siguiente manera: de un total de 54 micrografías obtenidas de 6 muestras (33.3%) denominados para efecto de la investigación grupo control, 6 muestras (33,3%) con pacientes tipo HTA controlado y del total de muestras 6 correspondieron al diagnóstico de pacientes con DII controlado (33,3%). (Ver tabla 1)

7.2.- DISTRIBUCIÓN DE LA POBLACIÓN POR EDAD

De acuerdo a la distribución de la población por edad tenemos que para el grupo control la edad mínima fue de 20 años y una edad máxima de 60 años que representa un promedio de 31 años de edad. Así también para los pacientes con diagnóstico de HTA tenemos una edad mínima de 46 años y una máxima de 72 años que representa un promedio de 60 años de edad. Finalmente para los pacientes con diagnóstico clínico de DII la edad mínima fue de 32 y la máxima de 78 con un promedio de 62 años de edad. (Ver tabla 1)

7.3.- DISTRIBUCIÓN DE LA POBLACIÓN POR GÉNERO

Según la distribución por género el grupo control mostró de un total 6 sujetos 3 corresponden al género femenino (50,0%) y 3 sujetos al género masculino (50,0%). De igual manera, del total de 6 pacientes con diagnóstico de HTA 3 pacientes corresponden al género femenino (50,0%) y 3 sujetos al género masculino (50,0%). En relación a los pacientes con diagnóstico de DII del total de 6 pacientes 4 corresponden al género masculino (60,0%) y 2 al género femenino (40,0%). (Ver tabla 1)

Tabla 1: Pacientes con sus respectivos datos, valores de exámenes de laboratorio (glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas) y número de microfotografías en microscopio electrónico de barrido por paciente.

Paciente	Edad	Género	Código	G.Rojos	G.Blancos	Plaquetas	Nº MEB
A.B.	20	F	1C	4,7	7,3	356	2
F.N.	24	F	2C	4,8	8,7	433	2
P.P.	64	M	AD	6	5,1	183	7
M.C.	64	F	BH	3,74	9,3	274	2
J.V.	43	M	CH	4,88	11,7	379	5
T.M.	72	M	DH	5,45	6,9	224	4
W.W.	68	M	EH	5,17	7,4	243	5
D.R.	29	M	FC	4,98	6,6	211	1
G.P.	69	M	GD	5,56	6,2	203	3
J.R.	32	F	HD	4,08	5,6	293	4
J.A.	62	M	ID	5,12	10,6	187	1
G.K.	78	M	JD	4,99	7,5	210	3
G.R.	60	M	KC	4,71	5,1	217	3
M.O.	46	F	LH	4,39	4,3	285	3
E.G.	24	M	MC	5,1	4	268	1
N.C.	27	M	NC	5,22	9,1	218	3
M.M	64	F	OH	4,54	6,7	300	2
P.F.	69	M	PD	5,88	8,5	275	3

Tabla 1. Leyenda: F. Femenino, M. Masculino, C. Control, H. Hipertenso controlado, D. Diabético tipo 2 controlado.

7.4.- RESULTADOS ULTRESTRUCTURALES

Los resultados ultraestructurales mediante Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) mostraron plaquetas con características morfológicas de aspecto discoidal, oval o redondas.

El grupo control del presente estudio se caracterizó por la presencia de células sanguíneas y de ellos motivo de este estudio, 5 aspectos ultraestructurales de las plaquetas: fue evidente la presencia de plaquetas tipo discoidal (ver fig. 51), plaquetas en forma de bola (ver fig. 52), plaquetas hemisféricas (ver figs. 53 y 54), plaquetas adheridas y expandidas (ver figs. 55, 56, 57) así como formación de filopodios (ver figs. 52 y 58). Fue frecuente observar la interacción con otras plaquetas (ver figs. 53 y 57) y el cambio de forma dentro de un mismo grupo control (ver figs. 58, 51 y 59). En algunas micrografías se puede apreciar agregados plaquetarios laxos (ver fig. 54) y en otras masas compactas de plaquetas (ver fig. 53).

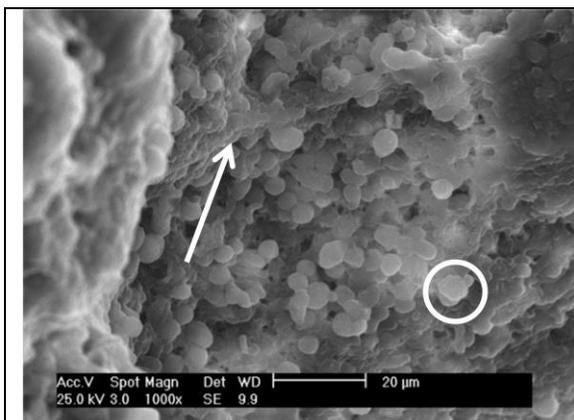


Fig. 51 Nótese en el círculo plaqueta discoidal, fibrina homogénea abierta (flecha) 20 (um)

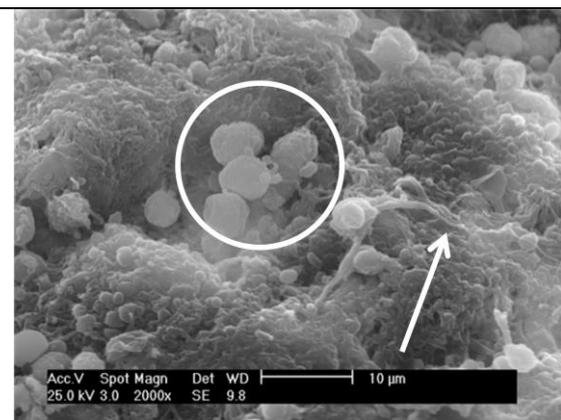


Fig. 52 Nótese en el círculo plaquetas en forma de bola, fibrina homogénea abierta (flecha) 10 (um)

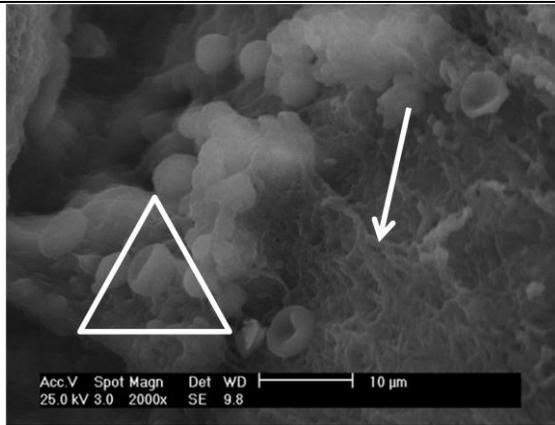


Fig. 53 Nótese dentro del triángulo plaqueta hemisférica, fibrina homogénea abierta (flecha) 10 (um)

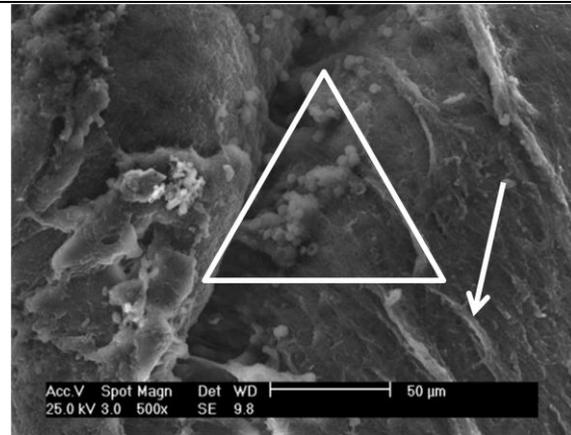


Fig.54 Nótese dentro del triángulo plaqueta hemisférica, fibrina homogénea abierta (flecha) 50 (um)

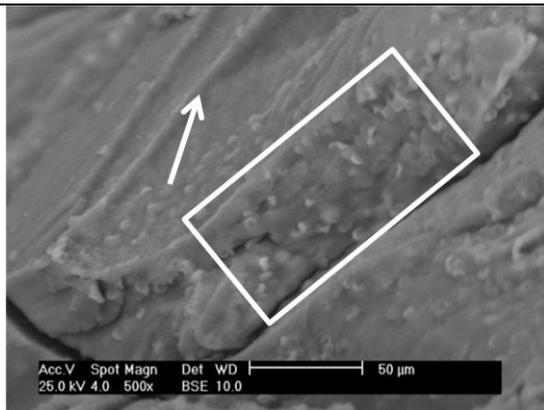


Fig. 55 Nótese plaquetas adheridas-expandidas dentro del rectángulo, fibrina homogénea abierta (flecha) 50 (um)

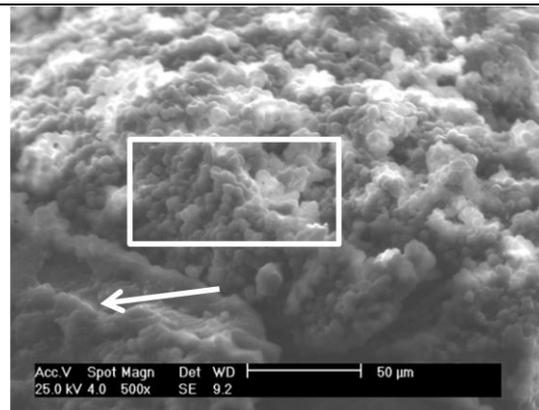


Fig. 56 Nótese plaquetas adheridas-expandidas dentro del rectángulo, fibrina homogénea compacta (flecha) 50 (um)

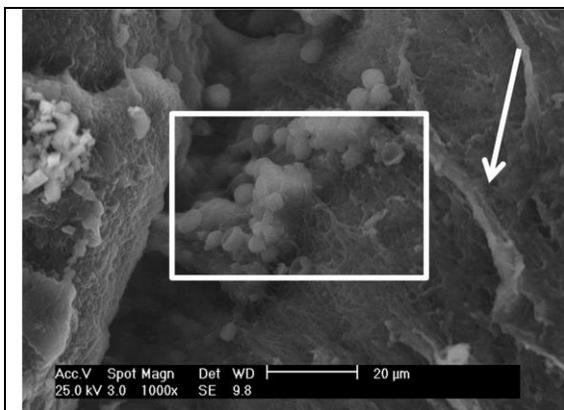


Fig. 57 Nótese plaquetas adheridas-expandidas dentro del rectángulo, fibrina homogénea abierta (flecha) 20 (um)

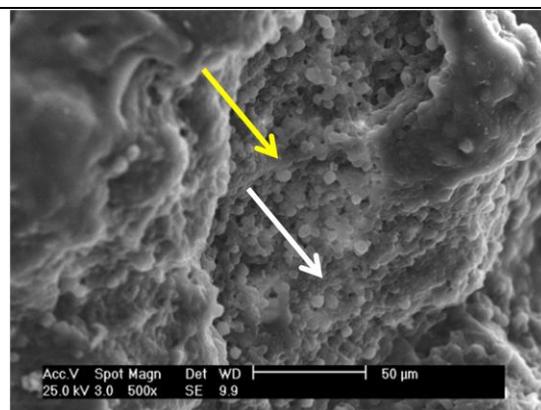


Fig. 58 Plaquetas formadoras de filopodios (flecha), fibrina homogénea abierta (flecha amarilla) 50 (um)

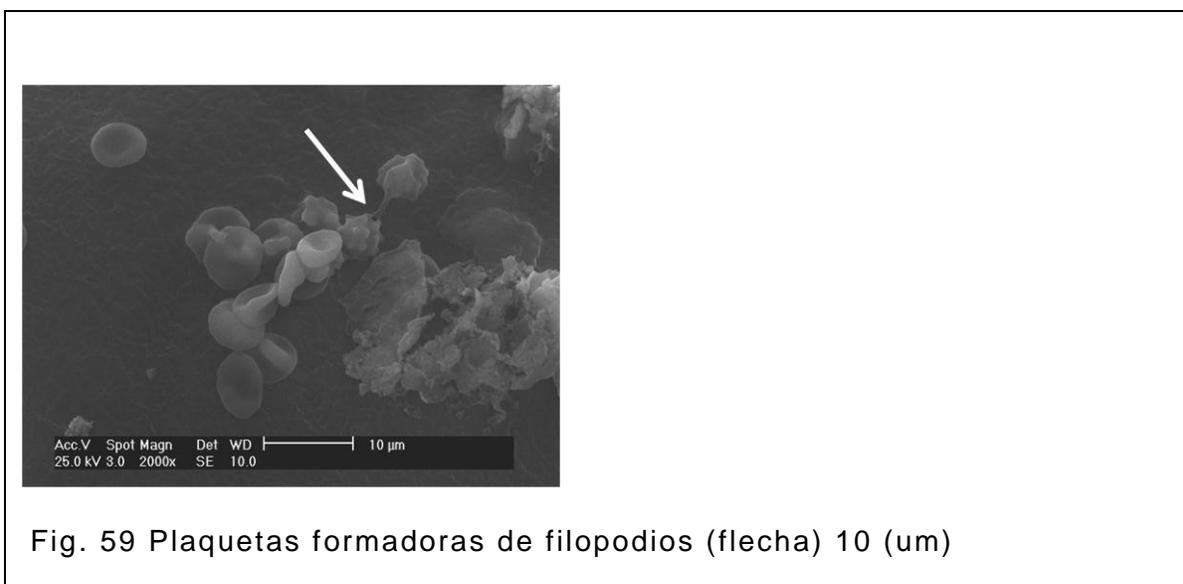


Fig. 59 Plaquetas formadoras de filopodios (flecha) 10 (um)

El grupo de pacientes con diagnóstico de HTA se caracterizó por la presencia de plaquetas en forma de bola con formación de filopodios (Ver figs. 60, 61, 62 y 63) y en menor proporción plaquetas adheridas y expandidas (ver fig. 64 y 65)

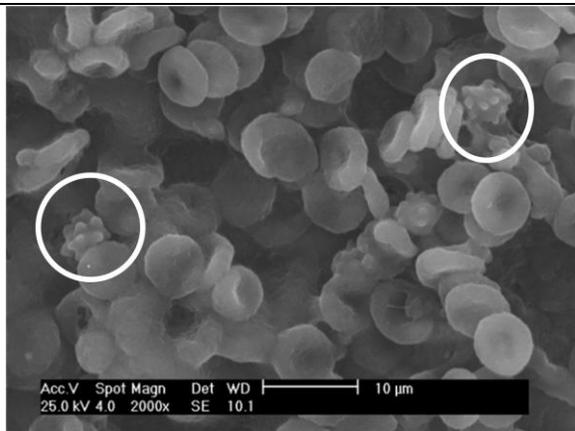


Fig. 60 Plaquetas en forma de bola con formación de filopodios (círculo) 10 (um)

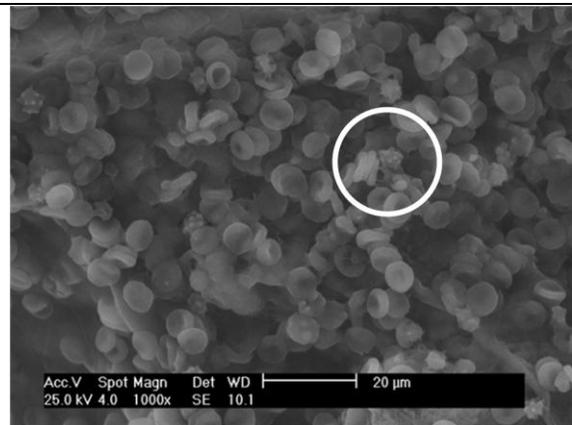


Fig. 60 Plaquetas en forma de bola con formación de filopodios (círculo) 20 (um)

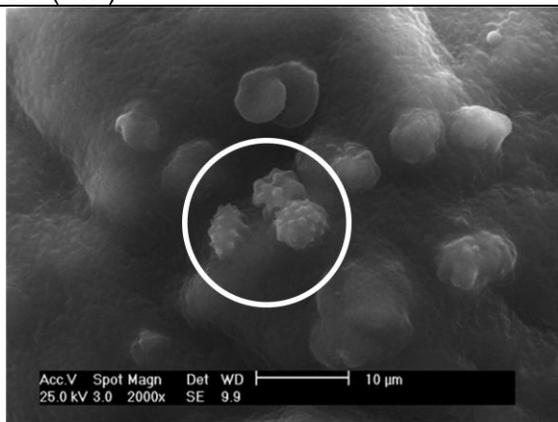


Fig. 62 Plaquetas en forma de bola con formación de filopodios (círculo) 10 (um)

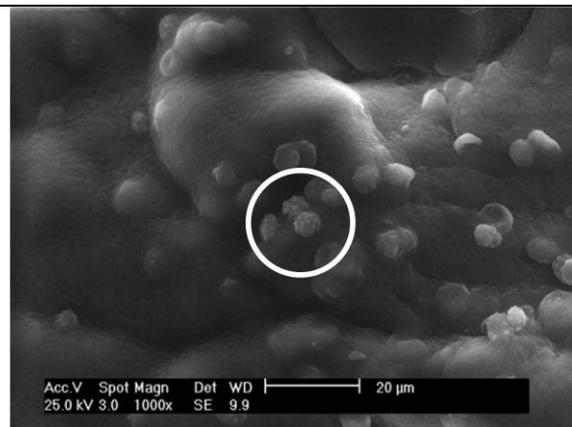


Fig. 63 Plaquetas en forma de bola con formación de filopodios (círculo) 20 (um)

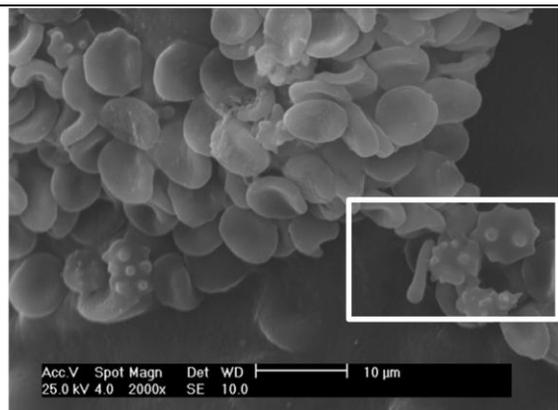


Fig. 64 Plaquetas adheridas-exoandidas (rectángulo) 10 (um)

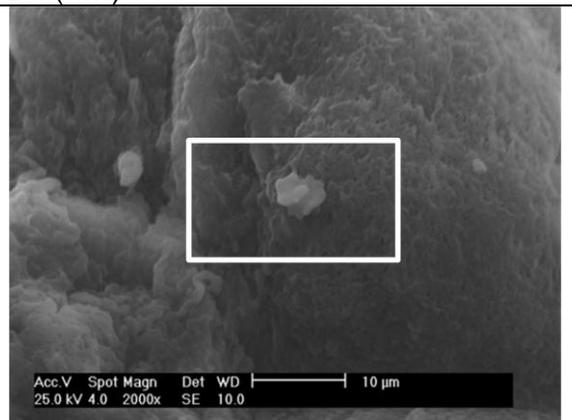


Fig. 65 Plaquetas adheridas-exoandidas (rectángulo) 10 (um)

En este grupo de pacientes pudo apreciarse plaquetas gigantes ocasionales. (Ver fig. 66) en un solo caso con áreas de plaquetas dispersas del tipo discoide.

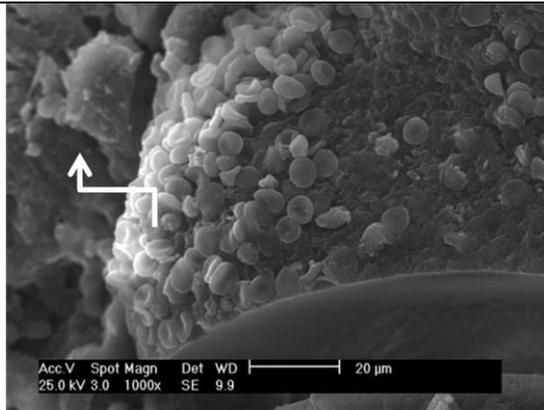


Fig. 66 Plaqueta gigante (flecha) 20 (um)

En las muestras de pacientes con diagnóstico DII se observaron plaquetas con grado variable de su morfología a predominio del tipo discoidal (ver figs. 67 y 68), en forma de bola (ver figs. 69 y 70) y con formación de filopodios (ver figs. 71 y 72) y en menor proporción plaquetas hemisféricas, adheridas y expandidas.

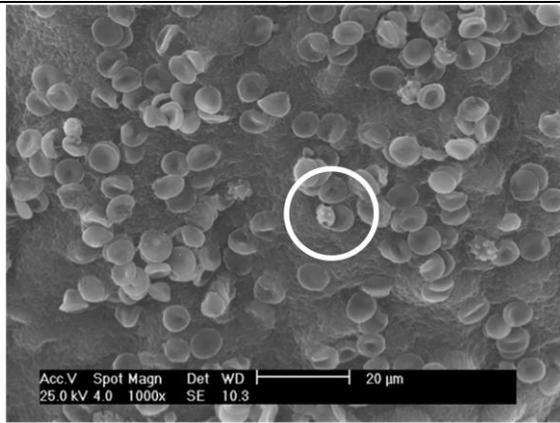


Fig. 67 Plaqueta discoidal (círculo) 20 (um)

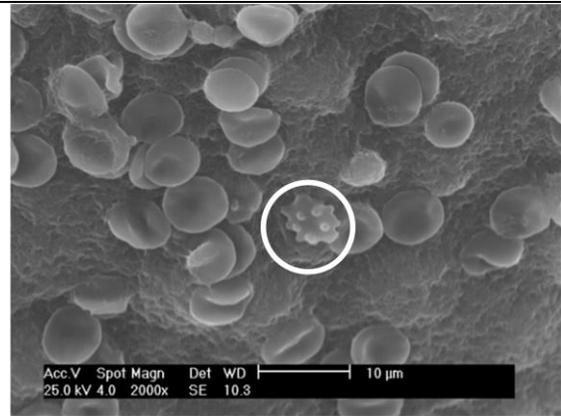


Fig. 68 Plaqueta discoidal (círculo) 10 (um)

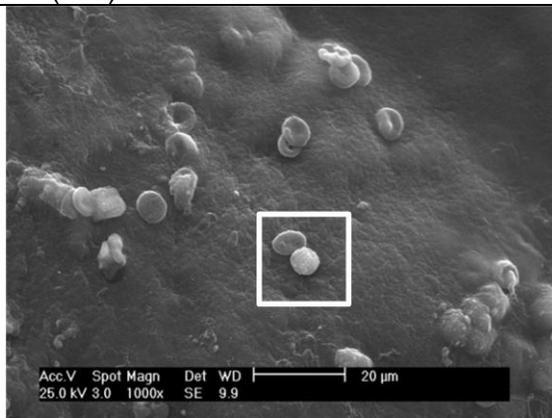


Fig. 69 Plaquetas en forma de bola dentro del cuadrado 20 (um)

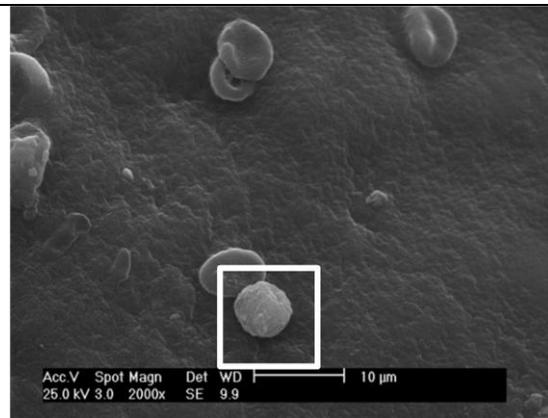


Fig. 70 Plaquetas en forma de bola dentro del cuadrado 10 (um)

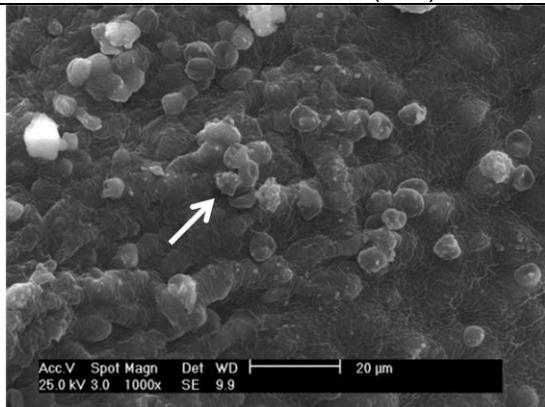


Fig. 71 Plaquetas con formación de filopodios (flecha) 20 (um)

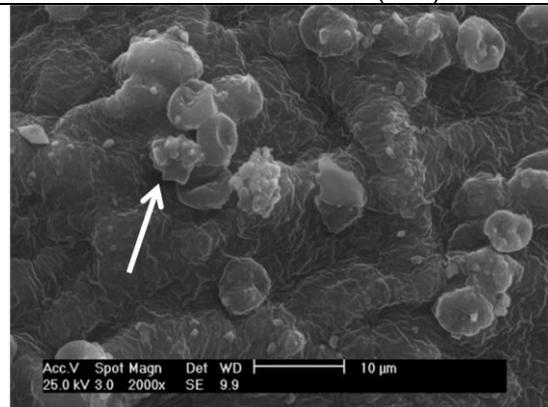


Fig. 72 Plaquetas con formación de filopodios (flecha) 10 (um)

Otro aspecto en el presente estudio fue considerar el tipo de fibrina, basada en la arquitectura global y ultraestructural de las redes de fibrina.

El patrón de fibrina de acuerdo a los sujetos que conformaban el grupo control correspondió a una fibrina tipo homogénea abierta (ver fig. 55) en la mayoría de los casos. En menor proporción se apreció una fibrina homogénea más bien compacta (ver fig. 56).

Se pudo apreciar en la arquitectura global de este patrón de fibrina “homogénea abierta” entre las ramificaciones que conforma cada abertura, un nido de plaquetas discoidales, ovals y redondas delimitados por redes de fibras gruesas (ver figs. 51, 52, 58 y 59) y otro grupo de plaquetas sobre las redes (columnas) de fibrinas y eritrocitos (ver figs. 53, 54 y 57)

En los pacientes con diagnóstico de HTA, el patrón de fibrina correspondió en igual proporción a dos tipos arquitectónicos: un grupo mostró una arquitectura global homogénea abierta (Ver figs. 73, 74 y 75) y el otro grupo mostró una arquitectura de fibras homogéneas más bien compacta (ver figs. 76, 77 y 78). Las plaquetas en estos grupos se encontraron dispersas a lo largo de las redes de fibrina compactas con porosidad disminuida y en las áreas de estructuras abiertas (ver figs. 79 y 80)

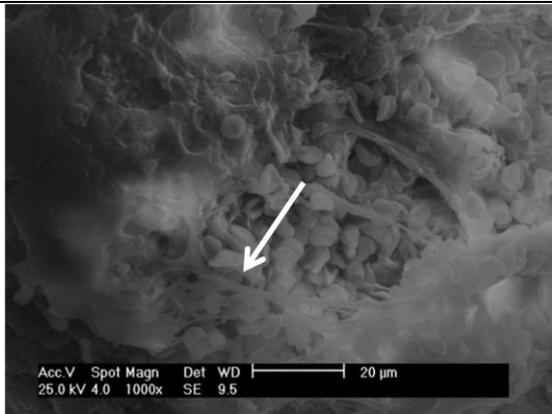


Fig. 73 Fibrina homogénea abierta (flecha) 20 (um)

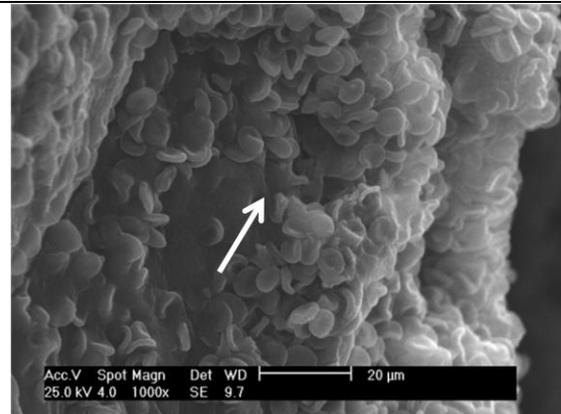


Fig. 74 Fibrina homogénea abierta (flecha) 20 (um)

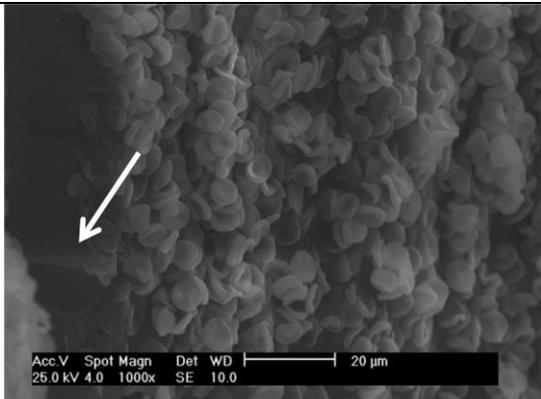


Fig. 75 Fibrina homogénea abierta (flecha) 20 (um)

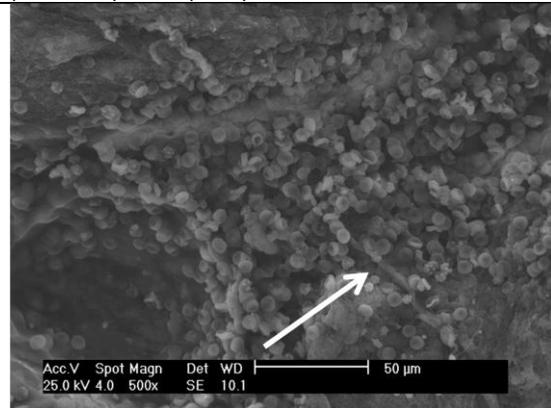


Fig. 76 Fibrina homogénea compacta (flecha) 50 (um)

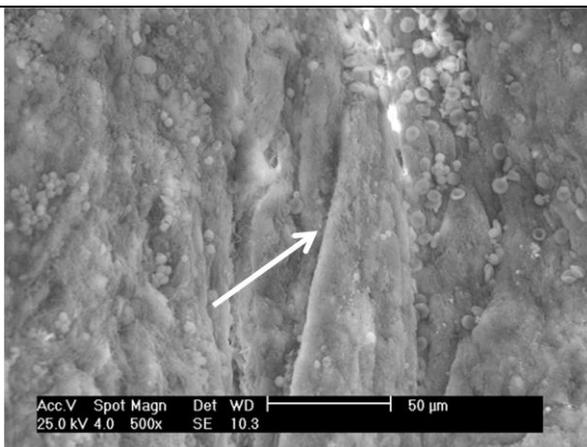


Fig. 77 Fibrina homogénea compacta (flecha) 50 (um)

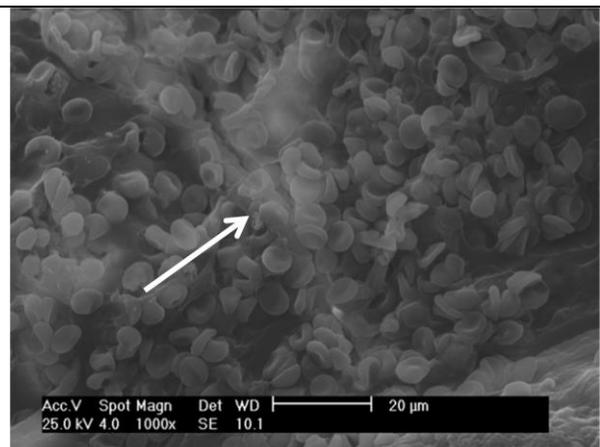


Fig. 78 Fibrina homogénea compacta (flecha) 20 (um)

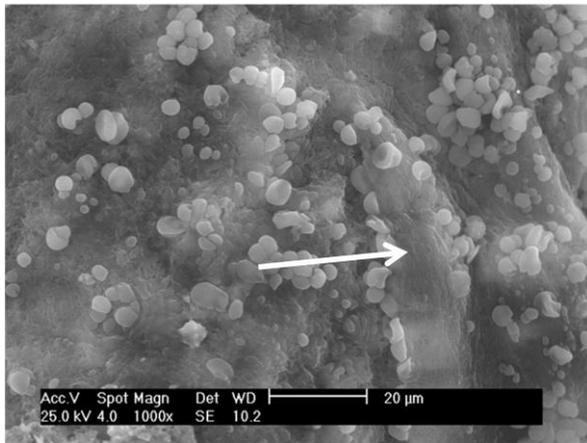


Fig. 79 Fibrina homogénea compacta (flecha) 20 (um)

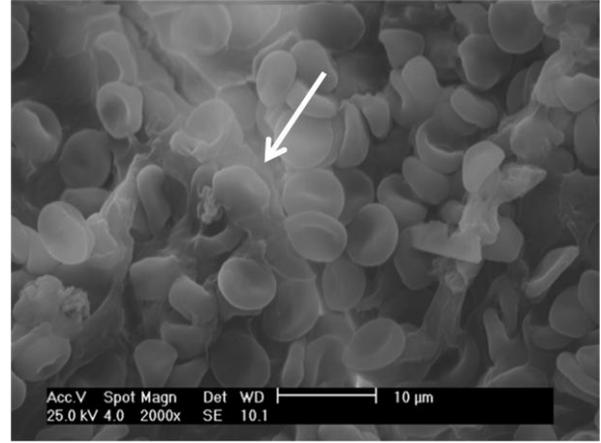


Fig. 80 Fibrina homogénea compacta (flecha) 20 (um)

Los pacientes objeto de este estudio con diagnóstico DII, mostraron un patrón arquitectónico del tipo homogéneo y heterogéneo con grandes poros respectivamente. Las muestras homogéneas presentaron plaquetas entremezcladas con eritrocitos dentro de la matriz de fibrina a lo largo de toda la red (ver figs. 81, 82, 83 y 84).

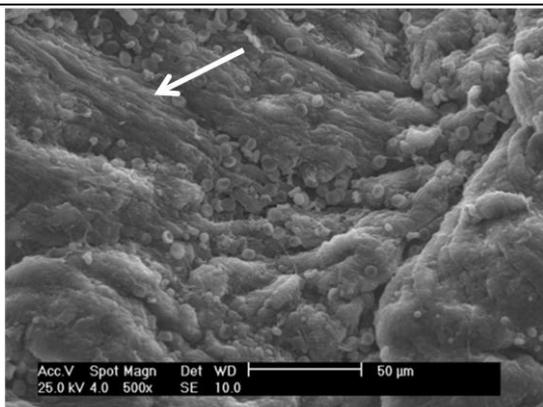


Fig. 81 Fibrina homogénea (flecha) 50 (um)

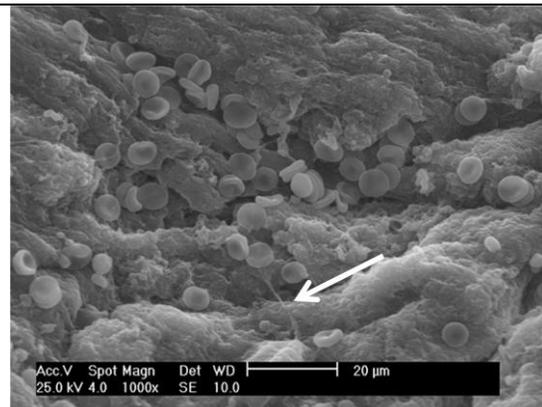


Fig. 82 Fibrina homogénea (flecha) 20 (um)

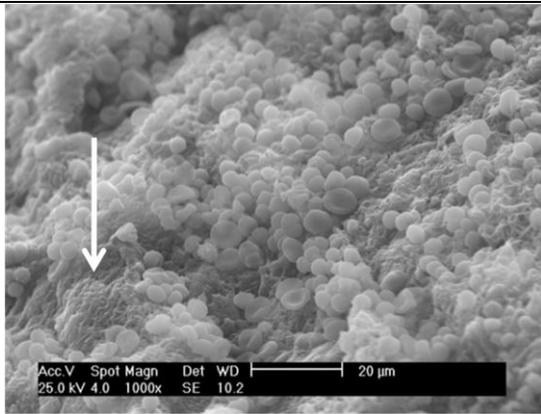


Fig. 83 Fibrina homogénea (flecha) 20 (um)

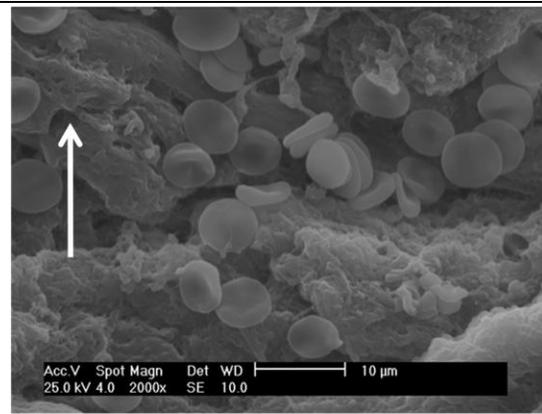


Fig. 84 Fibrina homogénea (flecha) 10 (um)

Las muestras heterogéneas compactas con grandes poros evidenciaban plaquetas a lo largo de la matriz siendo escasas en los poros o casi nula (ver figs. 85, 86, 87 y 88).

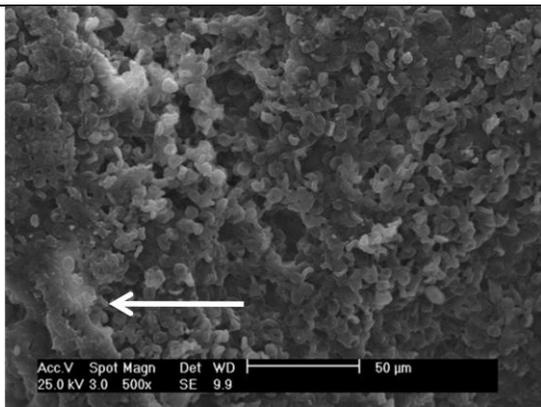


Fig. 85 Fibrina heterogénea (flecha) 50 (um)

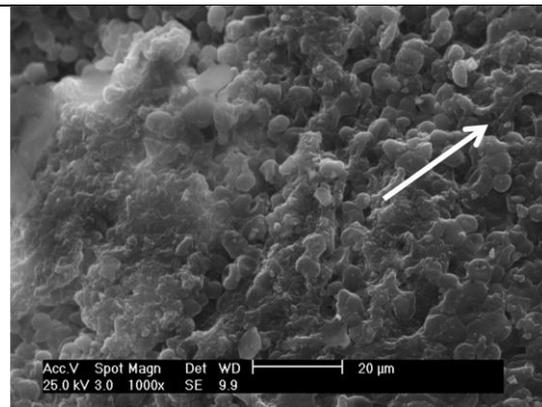
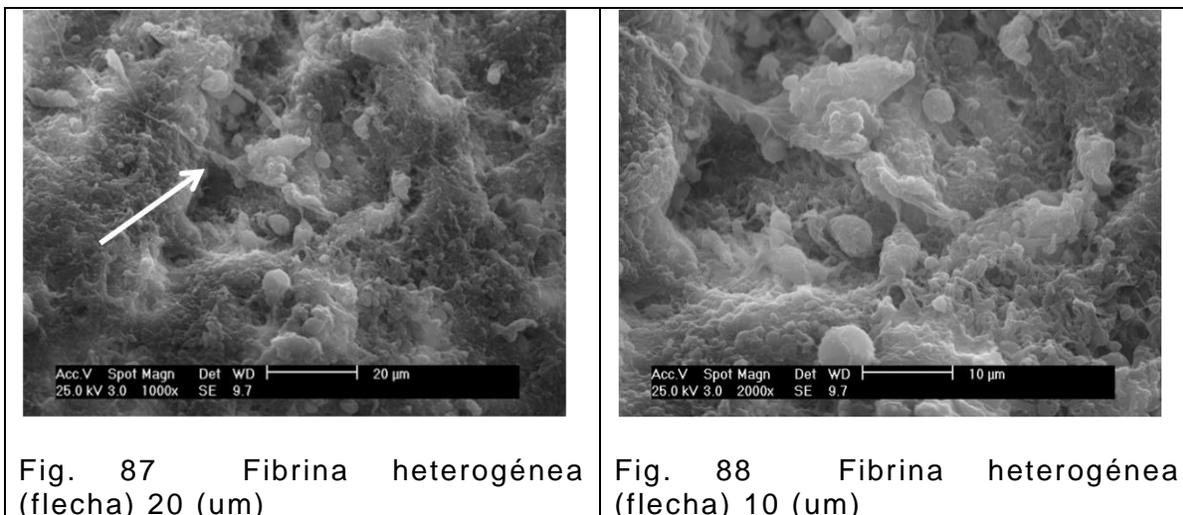


Fig. Fibrina heterogénea (flecha) 20 (um)



Como se especificó, las variables a evaluar fueron tanto cualitativas como cuantitativas. Los resultados obtenidos permitieron generar tablas de datos correspondientes a sujetos control, HTA y DII de las muestras. De esta forma fue posible evaluar mediante estadísticas descriptivas las características clínicas y ultraestructurales de la FRP en cada condición.

Una vez caracterizada cada muestra en su condición, se realizó un análisis exploratorio multivariado del tipo Análisis de Correspondencia, para evaluar el comportamiento estadístico de las variables en estudio, tratando de determinar así las características ultraestructurales del PRF a partir de sujetos sanos y correlacionando con pacientes HTA y DII compensados.

Los datos obtenidos se registraron mediante cuadros y gráficos relacionados con las variables. El análisis de los mismos se llevo a

cabo a través de cifras absolutas y relativas. Además, al analizar los resultados, se utilizaron medidas de tendencia central, frecuencias, promedios y porcentajes.

Tabla 2. RESULTADOS DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LAS PLAQUETAS EN GRUPO CONTROL, DIABÉTICO COMPENSADO E HIPERTENSO CONTROLADO

CARACTERÍSTICAS *	C 1	C 2	C 3	C 4	C 5	C 6	D II 1	D II 2	D II 3	D II 4	D II 5	D II 6	HT A1	HT A2	HT A3	HT A4	HT A5	HT A6
a) Plaquetas discoidales	X		X		X	X	X	X		X	X							
b) Plaqueta en forma de bola		X	X	X	X		X	X		X	X		X	X	X	X	X	X
c) Plaqueta hemisférica				X	X	X			X			X						
d) Plaqueta adherida y expandida		X				X	X	X	X								X	X
e) Formación de filopodios			X	X			X	X	X			X	X	X	X	X	X	X

*Características de la plaqueta basada en su aspecto ultraestructural ⁽²⁰⁵⁾

Nomenclatura: C (control), DII (Diabetes tipo II compensado) y HTA (Hipertenso controlado).

Tabla 3. RESULTADOS DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LA FIBRINA EN GRUPO CONTROL, DIABÉTICO COMPENSADO E HIPERTENSO CONTROLADO

Características*	C 1	C 2	C 3	C 4	C 5	C 6	D II 1	D II 2	D II 3	D II 4	D II 5	D II 6	H TA 1	H TA 2	H TA 3	H TA 4	H TA 5	H TA 6	
a) Homogénea		X					X	X	X	X									
b) Homogénea abierta	X		X	X	X	X											X	X	X
c) Homogénea compacta													X	X	X				
d) Heterogénea compacta con grandes poros							X	X	X		X	X							

*Características de la Fibrina basada en la arquitectura global de las redes de fibrina. ⁽²⁰⁶⁾

ENFOQUE ESTADÍSTICO

La normalidad de cada variable estudiada en el trabajo se probó mediante el test de Shapiro-Wilks, mientras que la normalidad del sistema de variables (multinormalidad) se evaluó a través de la prueba ómnibus de Doornik y Hansen.

La existencia de correlación entre variables fue evaluado usando la prueba por rangos de Spearman, como alternativa a ser aplicada a las variables no normales.

Para dar un enfoque multivariado al análisis independientemente del origen de las variables en la investigación, se aplicó un Análisis de Correspondencia, el cual resulta muy adecuado cuando se trabaja con variables dicótomas y cuando hay mezcla de variables, ya que propone una normalización automática de los datos para desarrollar un estudio multivariado basado en la distribución Ji-cuadrado (Lévy y Varela, 2003) ⁽²⁰⁷⁾. Mediante este análisis se evaluó los niveles de heterogeneidad entre las tres categorías de pacientes evaluados, así como la participación de cada variable evaluada en el caso de evidenciarse este proceso de separación entre grupos.

Durante el análisis no se consideró el orden de magnificación de los componentes sanguíneos, como una transformación sencilla que permitiera incluir el conjunto total de variables evitándose

incrementos innecesarios de la varianza explicada, atribuibles al uso de valores con un orden de magnificación de 10^6 .

Por otra parte, se evaluó la validez de las variables seleccionadas para justificar la separación preconcebida de los grupos en estudio, usando para esto un Análisis de Agrupamientos (Cluster Analysis), el cual basado en exploración multivariada, permite la formación de agrupamientos naturales sin supervisión, a partir de los atributos estadísticos de los sujetos evaluados (Peña 2002) ⁽²⁰⁸⁾. El criterio de agrupamiento fue el promedio no ponderado (Unweightedpair-groupaverage o UPGMA), mientras que el criterio de cercanía usado fue el índice de similitud de Gower, el cual es usado muy frecuentemente dado su carácter robusto ante el uso combinado de variables de diferentes tipos (desde ordinales hasta continuas) (Cuadras 1991, Hairet al 1999) ⁽²⁰⁹⁾

Se emplearon diferentes programas estadísticos: MVSP versión 3.21, PAST versión 2.16 y Estadísticafor Windows versión 7.0

Se empleó el Análisis de Varianza por rangos de Kruskal-Wallis para determinar diferencias en el número de células sanguíneas evaluadas en el laboratorio (Eritrocitos, Leucocitos y Plaquetas) entre las categorías evaluadas (Controles, Pacientes con hipertensión controlada y pacientes con diabetes tipo II controlada)

Para probar la existencia de diferencias en los coeficientes de variación porcentual respectivos, se empleó la prueba de Fligner-Killeen, comparando las muestras por pares.

VII. ANÁLISIS DE RESULTADOS

RESULTADOS DE CORRELACIÓN DE LOS ASPECTOS CLÍNICO Y ULTRAESTRUCTURAL DE LA FIBRINA RICA EN PLAQUETAS *IN VITRO* CORRESPONDIENTE A SUJETOS DEL GRUPO CONTROL Y EN PACIENTES CON DIAGNÓSTICO DE HIPERTENSIÓN ARTERIAL Y DIABETES TIPO 2 CONTROLADOS.

Las variables ultraestructurales consideradas para los análisis estadísticos correspondieron a dos aspectos fundamentales: la fibrina y la plaqueta. La primera se estudió según la arquitectura global de las redes de fibrina y fueron del tipo: Homogénea, Homogénea abierta, Homogénea compacta y Heterogénea compacta con grandes poros. De la segunda, debido al pleomorfismo de la plaqueta, se estudió de acuerdo a su aspecto ultraestructural y correspondió al tipo: plaquetas discoidales, en forma de bola, hemisféricas, adheridas-expandidas y con formación de filopodios. La aparición de cambios en su estructura de acuerdo a grupos de muestras procedentes de HTA y DII se correlacionaron con el grupo control.

El análisis de las micrografías usando el microscopio electrónico de barrido, dio como resultado una tabla de datos dicotómicos, en los que la apariencia de la fibrina, el nivel de

compactación y la formación de poros resultaron bastante particulares para cada grupo de pacientes estudiado (Anexo 2).

Las variables cuantitativas se unieron a las dicótomas para conformar tablas de datos, usadas posteriormente para su interpretación y análisis. Así, el grupo control no mostró en ningún caso micrografías con fibrina homogénea compacta, ni heterogénea compacta con grandes poros, esta última exclusivamente presente en el grupo de pacientes con diabetes tipo 2 (83,33%). Estos últimos también mostraron un 66,67% de presencia de fibrina homogénea en sus muestras, seguido por el grupo control (16,67%) y sin registros de la misma para los pacientes con hipertensión controlada. La aparición de fibrina homogénea abierta fue característica del grupo control (83,33%), aunque el grupo con hipertensión mostró una frecuencia del 50% para esta característica. En este último grupo además se presentó en forma exclusiva la configuración de fibrina homogénea compacta, aunque solo en la mitad de las muestras (50%). Este último aspecto resulta llamativo, ya que aún cuando la muestra puede considerarse pequeña, es claro que los sujetos con fibrina homogénea abierta no mostraron la configuración compacta y viceversa.

Anexo 2. Frecuencia porcentual y estadísticos descriptivos de las variables estudiadas para cada grupo evaluado.

Variable		Control	Diabetes tipo II	Hipertensión Arterial
Fibrina homogenea (%)		16,67	66,67	0
Fibrina homogenea abierta (%)		83,33	0	50
Fibrina homogenea compacta (%)		0	0	50
Fibrina heterogenea compacta con grandes poros (%)		0	83,33	0
Plaquetas discoidales (%)		66,67	66,67	0
Plaquetas en forma de bola (%)		66,67	66,67	100
Plaquetas hemisfericas (%)		50	33,33	0
Plaquetas adheridas y expandidas (%)		33,33	50	33,33
Formacion de filopodios (%)		33,33	66,67	100
Eritrocitos(x10 ⁶)	\bar{X}	4,9183	5,2717	4,6950
	S_x	0,2158	0,7080	0,6097
	CV%	4,3880	13,4297	12,9871
Leucocitos(x10 ⁶)	\bar{X}	6,8000	7,2500	7,7167
	S_x	1,9960	2,0637	2,5238
	CV%	29,3529	28,4653	32,7061
Plaquetas(x10 ⁶)	\bar{X}	2,8383	2,2517	2,8417
	S_x	0,9145	0,4699	0,5415
	CV%	32,2194	20,8695	19,0568

La forma de las plaquetas, su adhesión y expansión se mostró menos exclusiva en general para todos los grupos en estudio. Al respecto, al grupo hipertenso no mostró plaquetas discoidales ni hemisféricas, solo el 33,33% tuvo presencia de plaquetas adheridas y expandidas pero la totalidad de los pacientes tenían simultáneamente plaquetas en forma de bola y formación de filopodios en sus muestras. Por su parte, tanto el grupo control como los pacientes con diabetes tipo 2 se caracterizaron por la aparición mezclada de todas las formas que tomaron las plaquetas en este estudio, así como la formación de filopodios.

El número de elementos sanguíneos cuantificado en cada grupo no mostró diferencias significativas ($p > 0,05$ en todos los casos), con promedios que oscilaron entre 4,70 y 5,27x10⁶ eritrocitos, 6,80 a 7,72x10⁶ linfocitos y entre 2,25 y 2,84x10⁶ plaquetas. La Figura 89 muestra los amplios niveles de superposición entre las distribuciones de datos para los grupos correspondientes. Por su parte las desviaciones estándar no presentan tampoco diferencias estadísticamente demostrables ($p > 0,05$ en todas las comparaciones). Sin embargo, al considerar el coeficiente de variación porcentual de cada componente sanguíneo en cada grupo, se observó como el grupo control posee apenas una variabilidad del 4,39% para el número de eritrocitos, significativamente menor que 12,99% para los hipertensos ($p = 0,0305$) y que 13,43% observado en el grupo de los

pacientes diabéticos ($p=0,0232$), de acuerdo a la prueba de Fligner-Killeen. Para el resto de los componentes no se observó significación estadística.

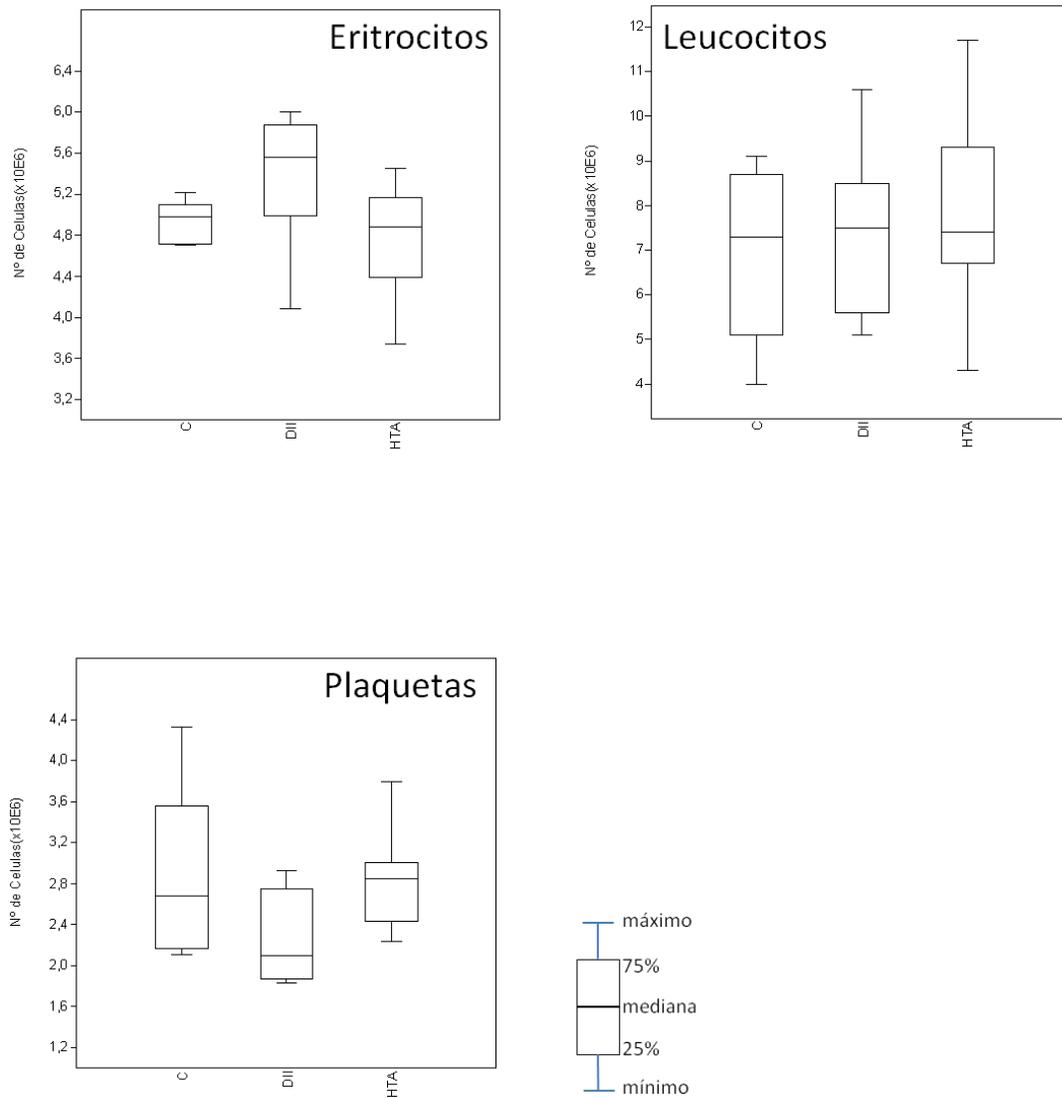


Figura 89. Gráficos de cajas correspondientes a los elementos sanguíneos evaluados en las pruebas de laboratorio. C: Controles, HTA: Pacientes con hipertensión controlada, DII: Pacientes con diabetes tipo 2 controlada.

Al evaluar la normalidad de cada variable estudiada, resultaron no normales las dicotómicas, coincidiendo así con lo esperado. Sin embargo, al probar la existencia de multinormalidad en el sistema de variables, esta resultó positiva. Esta característica es deseable para la aplicación de métodos multivariados de análisis. Por otra parte, al evaluar la correlación mediante la prueba no paramétrica de Spearman, la única asociación directa significativa fue observada entre la fibrina homogénea y las plaquetas adheridas y expandidas, mientras que se demostró la existencia de asociaciones negativas entre fibrina homogénea y fibrina homogénea abierta, esta última con la fibrina heterogénea compacta con grandes poros, la observación de plaquetas discoidales con su número y la formación de filopodios, plaquetas en forma de bola con plaquetas hemisféricas y finalmente el número de eritrocitos con el de plaquetas (Anexo 3). Es de destacar que los valores de correlación (R_s) observados oscilaron entre 0,5230 y 0,6034, independientemente del signo, lo cual podría considerarse acertadamente niveles de asociación bastante bajos.

Anexo 3. Resultados del Análisis de correlación por rangos de Spearman aplicado a las variables consideradas en el estudio. Resaltados los coeficientes de correlación (Rs) significativos con $\alpha=0,05$.

Análisis de correlación por rangos de Spearman

	Fho	Fhoab	Fhoco	Fhecogp	Pladis	Plabol	Plahem	Plaadhexp	Forfil	GR(x10E6)	GB(x10E6)	Plaq(x10E6)
Fhoab	-0,5547											
Fhoco	-0,2773	-0,4000										
Fhecogp	0,4461	-0,5547	-0,2773									
Pladis	0,1941	0,1000	-0,4000	0,1941								
Plabol	0,0331	-0,0597	0,2390	-0,2651	-0,0597							
Plahem	-0,1076	0,1941	-0,2773	0,1692	-0,0554	-0,5635						
Plaadhexp	0,5230	-0,0254	-0,3567	0,2685	-0,0254	-0,1218	0,0141					
Forfil	-0,0877	-0,0790	0,3162	0,1754	-0,5534	0,1889	-0,087	0,0805				
GR(x10E6)	0,1793	-0,2370	-0,1292	0,3705	0,4094	0,0000	0,0597	-0,0549	-0,045			
GB(x10E6)	-0,0478	-0,3988	0,4168	-0,1913	-0,0970	-0,1288	-0,239	-0,2857	-0,272	0,0382		
Plaq(x10E6)	-0,2271	0,1077	0,2154	-0,3227	-0,6033	-0,2833	0,0358	0,0988	0,0000	-0,5872	0,1796	

 Significativo /alfa=0,05

El Análisis de Correspondencia aplicado señaló una inercia (varianza) total explicada del 50,95% con dos ejes, lo cual podría considerarse bajo (Anexo 4). Sin embargo, desde el punto de vista del tipo de variable empleado en el análisis y las distancias ji-cuadrado que lo definen, la representación gráfica y la participación de las variables en el funcionamiento del sistema estarían bien representadas. La representación de los casos en los ejes resultantes, señalan una buena separación de las nubes de puntos correspondientes a cada grupo evaluado (Fig. 90). Los polígonos convexos mínimos (Convex Hulls) trazados en la gráfica así lo corroboran, mostrando al grupo control en la zona central, mientras el grupo con Diabetes Mellitus tipo 2 se desplaza fuertemente hacia el cuadrante superior izquierdo y los pacientes hipertensos ocupan los dos cuadrantes de la derecha. Resulta importante hacer notar la existencia de zonas de superposición entre la condición sana y los dos grupos que presentan enfermedad, aunque estos últimos no se tocan. Los pacientes Diabéticos ubicados en la zona de superposición con el control, no entran en el polígono, por lo que su semejanza en este trabajo resulta solo teórica y posible, compartiendo tres miembros DII4, DII5 y DII6 con el Control número 2 solamente, el cual tampoco queda dentro del polígono del grupo diabético. Por el contrario, HTA5 y HTA6 entran en el polígono control, lo que señala que ambos casos se comportan como normales desde el punto de vista de las variables evaluadas en este estudio, resulta interesante

el hecho de que los casos de los grupos con enfermedad que se alejan del centro de la gráfica, se encuentran sumamente lejanos dentro de sus polígonos correspondientes, lo cual representa un comportamiento muy diferente al control, tanto en lo observado en la micrografías como en las cuantificaciones de los elementos sanguíneos. Los valores reportados en la Tabla 3 del Anexo 4 muestran como los casos 1,2 y 3 de los grupos con enfermedad se asocian fuertemente al eje de mayor inercia (Eje 1), mientras que solo los controles 2 y 3 no se encuentran asociados al segundo eje, implicando que el comportamiento del 66,67% de los componentes de la nube control, está regido por una dirección de dispersión diferente a los otros dos grupos.

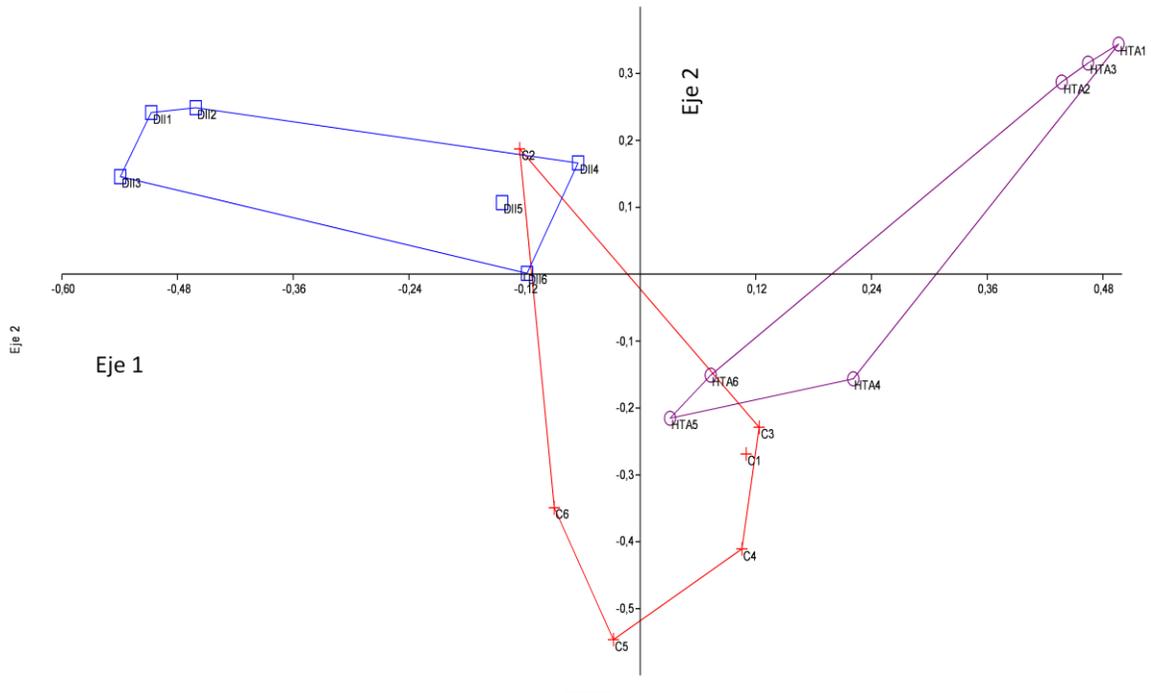


Figura 90. Esquema de dispersión de los puntos correspondientes a los casos, de acuerdo al Análisis de Correspondencia. C1-C6: Controles, HTA1-HTA6: Pacientes con hipertensión controlada, DII1-DII6: Pacientes con diabetes tipo 2 controlada.

Anexo 4. Resultados del Análisis de Correspondencia (Reportados solo hasta el Eje 6)
Resaltados los valores de mayor influencia en la inercia del sistema.

Tabla 1 Eigenvalues

	Axis 1	Axis 2	Axis 3	Axis 4	Axis 5	Axis 6
Eigenvalues	0,09	0,071	0,044	0,041	0,027	0,015
Percentage	28,402	22,549	14,094	12,91	8,425	4,686
Cum. Percentage	28,402	50,951	65,045	77,955	86,38	91,066

CA
Tabla 2 variable scores

	Axis 1	Axis 2	Axis 3	Axis 4	Axis 5	Axis 6
Fho	-3,789	2,784	-0,786	1,27	-2,38	-3,593
Fhoab	0,763	-4,089	-0,172	1,818	0,718	0,175
Fhoco	5,202	4,438	1,927	-1,137	0,699	-4,248
Fhecogp	-3,948	2,095	1,407	-2,509	3,556	3,075
Pladis	-1,479	-1,106	-3,958	-1,545	1,339	-1,686
Plabol	0,497	0,19	-0,596	1,215	1,58	-1,873
Plahem	-1,491	-3,259	4,463	-4,074	-1,792	-3,181
Plaadhexp	-2,58	0,218	1,337	3,831	-1,585	0,113
Forfil	0,304	0,495	2,146	1,241	2,478	0,031
GR(x10E6)	-0,124	-0,198	-0,04	-0,059	0,506	-0,202
GB(x10E6)	0,352	0,27	-0,261	-0,328	-0,553	0,502
Plaq(x10E6)	0,184	-0,159	0,268	0,362	-0,615	0,438

Tabla 3 CA case scores

	Groups	Axis 1	Axis 2	Axis 3	Axis 4	Axis 5	Axis 6
1	C	0,367	-1,008	-1,423	-0,314	-0,624	1,295
2	C	-0,418	0,703	-0,307	1,129	-2,187	-0,023
3	C	0,412	-0,858	-1,056	0,289	1,28	-0,056
4	C	0,353	-1,54	1,455	-0,3	0,466	-1,178
5	C	-0,093	-2,048	-0,238	-1,015	0,221	-2,3
6	C	-0,298	-1,309	-0,077	-0,599	-1,51	-0,044
7	DII	-1,695	0,906	-0,384	0,559	1,323	-0,774
8	DII	-1,54	0,933	-0,419	0,469	0,97	-0,438
9	DII	-1,802	0,547	2,081	-0,354	-0,89	-0,133
10	DII	-0,215	0,623	-1,8	-0,521	-1,155	-0,817
11	DII	-0,478	0,401	-1,279	-1,362	1,243	1,494
12	DII	-0,392	0,005	1,484	-1,843	0,253	1,72
13	HTA	1,658	1,29	0,412	-0,254	-0,057	-0,427
14	HTA	1,461	1,077	0,252	-0,305	-0,412	0,162
15	HTA	1,552	1,184	0,555	-0,129	0,811	-1,284
16	HTA	0,738	-0,586	-0,029	0,666	0,616	0,946
17	HTA	0,103	-0,808	0,665	2,381	0,507	0,512
18	HTA	0,245	-0,566	0,413	1,827	-0,02	0,995

La Figura 91 señala la dispersión de las variables empleadas en el estudio. De acuerdo a la longitud de vectores imaginarios trazados desde el origen hasta cada punto mostrado en el plano, se observa que las variables con mayor influencia en la disposición de las nubes de puntos sobre el Primer eje, resultaron en orden decreciente: fibrina homogénea compacta, casi de forma pareja fibrina heterogénea compacta con grandes poros y fibrina homogénea, luego plaquetas adheridas y expandidas y plaquetas discoidales, mientras que fibrina homogénea abierta y la presencia de plaquetas hemisféricas resultaron determinantes en el movimiento de los puntos a lo largo del segundo eje. Por su parte, el resto de las variables no resultó sobresaliente en cuanto a su influencia sobre la proyección de las nubes de puntos en el plano.

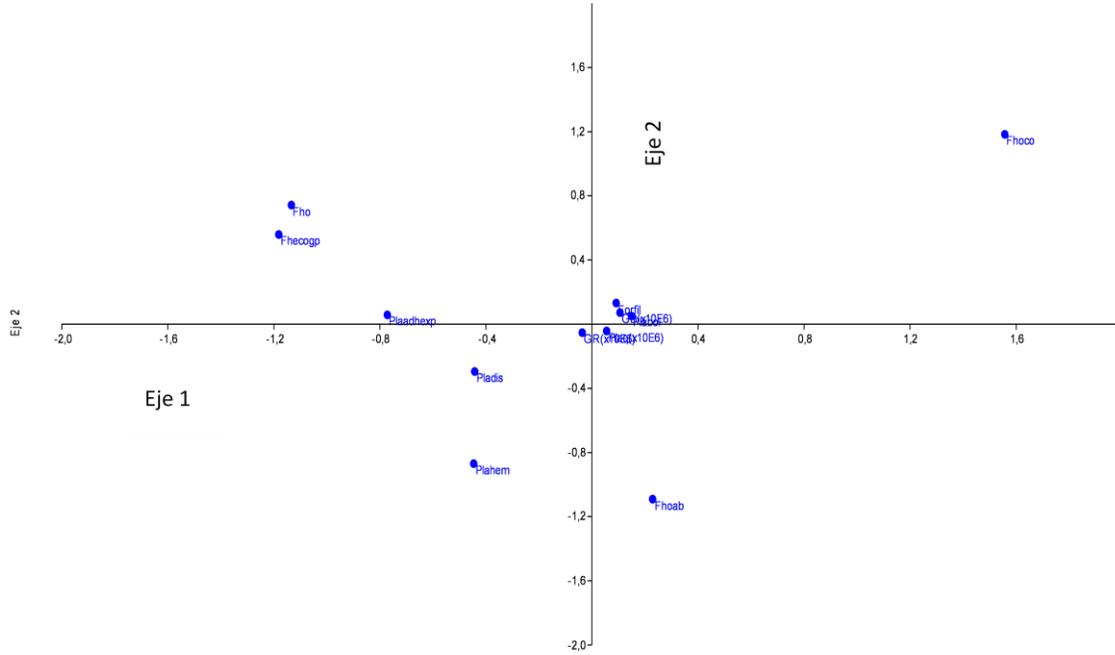


Figura 91. Esquema de dispersión de los puntos correspondientes a las variables, de acuerdo al Análisis de Correspondencia. Fho: Fibrina homogénea, Fhoab: Fibrina homogénea abierta, Fhoco: Fibrina homogénea compacta, Fhecogp: Fibrina heterogénea compacta con grandes poros, Pladis: Plaquetas discoidales, Plabol: Plaquetas en forma de bola, Plahem: Plaquetas hemisféricas, Plaadhexp: Plaquetas adheridas y expandidas, Forfil: Formación de filopodios, GR(x10E6): Eritrocitos(x10E6), GB(x10E6): Leucocitos(x10E6), Plaq(x10E6): Plaquetas(x10E6).

Al analizar la figura 92, el biplot resultante señala de forma clara que los miembros del grupo control se mantienen cerca de valores promedios de las variables estudiadas, además de ser bastante influidos por variables de poca influencia en los otros dos grupos, como son plaquetas en forma de bola, formación de filopodios y las tres variables métricas del análisis. Por su parte, el polígono de los pacientes diabéticos presentó mayores frecuencias en fibrina heterogénea compacta con grandes poros y fibrina homogénea, mientras que el polígono de hipertensos, alta frecuencia de fibrina homogénea compacta.

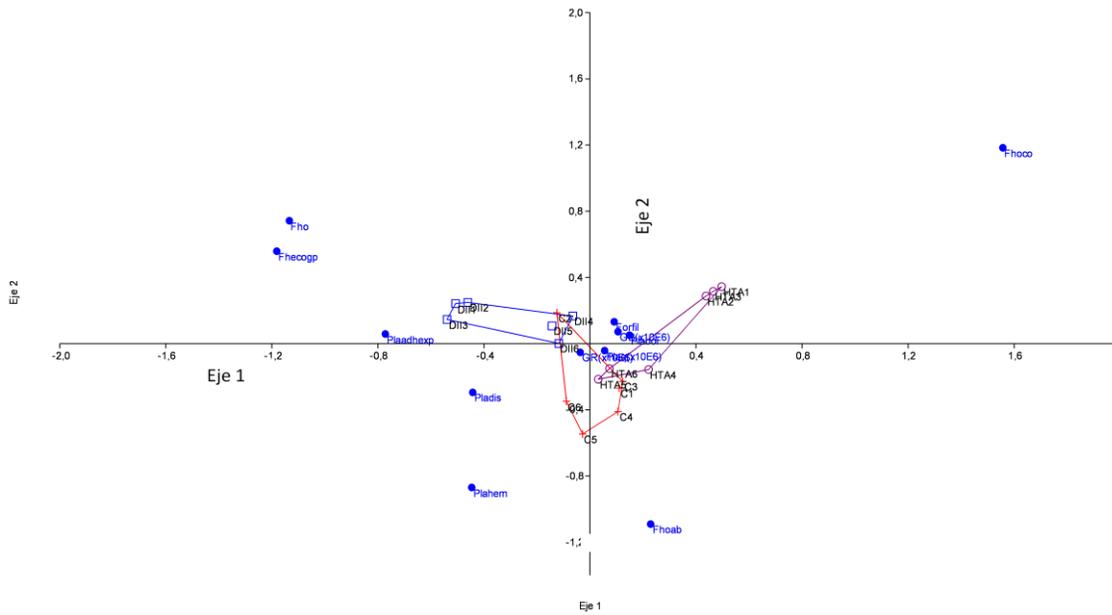


Figura 92. Biplot de casos y variables, de acuerdo al Análisis de Correspondencia. C1-C6: Controles, HTA1-HTA6: Pacientes con hipertensión controlada, DII1-DII6: Pacientes con diabetes tipo 2 controlada. Fho: Fibrina homogénea, Fhoab: Fibrina homogénea abierta, Fhoco: Fibrina homogénea compacta, Fhecogp: Fibrina heterogénea compacta con grandes poros, Pladis: Plaquetas discoidales, Plabol: Plaquetas en forma de bola, Plahem: Plaquetas hemisféricas, Plaadhexp: Plaquetas adheridas y expandidas, Forfil: Formación de filopodios, GR(x10E6): Eritrocitos(x10E6), GB(x10E6): Leucocitos(x10E6), Plaq(x10E6): Plaquetas(x10E6).

Por último, resulta importante señalar en el biplot, que la extrema reducción que ocurre en la dispersión de los casos al graficarlos simultáneamente con las variables, indica en primer lugar que las nubes son bastante homogéneas dentro de sí, con una inercia baja dentro de cada polígono, es decir, poca diferenciación entre sujetos dentro de cada grupo evaluado. En segundo lugar, resulta claro que las variables empleadas no separan a los grupos de forma completa, y más aún, la diferenciación observada podría no llegar a ser muy clara en la práctica.

El dendrograma resultante al aplicar el análisis de agrupamientos (Cluster Analysis) basado en la distancia promedio no ponderada como criterio de agrupamiento y el índice de Gower como criterio de diferenciación, señaló la formación de al menos cuatro grupos intrínsecamente poco homogéneos y de disimilitud variable importante (Fig. 93). La máxima similitud general en el sistema se observó entre los casos DII1 y DII2, con apenas 3,48% de diferenciación, mientras que la mayor discrepancia estuvo alrededor del 50%. De derecha a izquierda, el primer grupo identificable incluye una mayoría de pacientes del grupo con diabetes, diferentes entre 3 y 30% aproximadamente. Sin embargo, este agrupamiento pierde homogeneidad al incluir al sujeto control número 2, que vale destacar es el menos parecido al resto de los componentes del agrupamiento, con la máxima diferenciación del grupo. El segundo conjunto de

casos resultó compuesto solo por elementos control, pero que se diferencian alrededor de un 24% entre sí. Si bien tampoco resultó homogéneo, el tercer agrupamiento incluyó a todos los pacientes con hipertensión, con diferencias que van desde un 3,65% hasta 31,10%. Es interesante el caso HTA4, el cual resultó más parecido a los controles 3 y 4 que a los de su propia categoría (11 y 13,4% de diferencia respectivamente). Este agrupamiento mayormente de pacientes hipertensos mostró una disimilitud máxima de alrededor del 33%. El último agrupamiento formado estuvo constituido por los dos elementos del grupo diabético no incluidos en el primer conjunto. DII3 y DII6 son más parecidos entre si que a cualquier otro sujeto en estudio, diferenciándose sin embargo un 27% entre ellos y 50% del resto de la nube de casos.

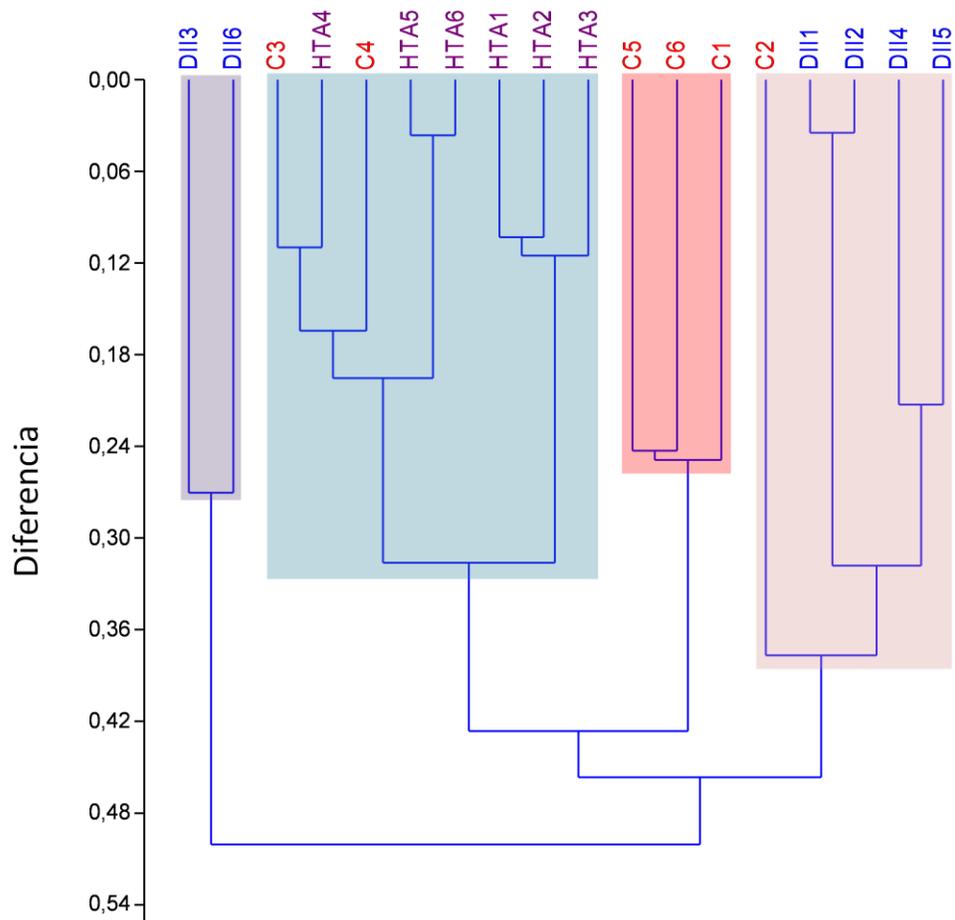


Figura 93. Dendrograma representando en escala creciente, la disimilitud entre los casos, de acuerdo al Análisis de Agrupamientos. Los rectángulos translúcidos señalan los agrupamientos obtenidos durante el análisis. C1-C6: Controles, HTA1-HTA6: Pacientes con hipertensión controlada, DII1-DII6: Pacientes con diabetes tipo 2 controlada.

Los resultados de los análisis multivariados ⁽²¹⁰⁾ claramente señalan tendencias de diferenciación en los tres grupos de estudio, mostrando además que tales diferencias no resultaron tan marcadas. La figura 94 muestra una composición multivariable, en la que todos los sujetos de estudio muestran tendencias hacia la diferenciación respecto a las variables cuantitativas, independientemente de su falta de significación. Igualmente puede verse por comparación directa, el significado gráfico de la frecuencia en las variables dicotómicas, que son las que causan las mayores discrepancias entre los casos. Al combinar la graficación multivariable con el dendrograma ya estudiado en la Fig. 93, permite detallar en forma cualitativa las semejanzas y diferencias de los sujetos que componen cada agrupamiento obtenido en el análisis.

Icon Plot (Spreadsheet en Matriz ultima 13v*18c)

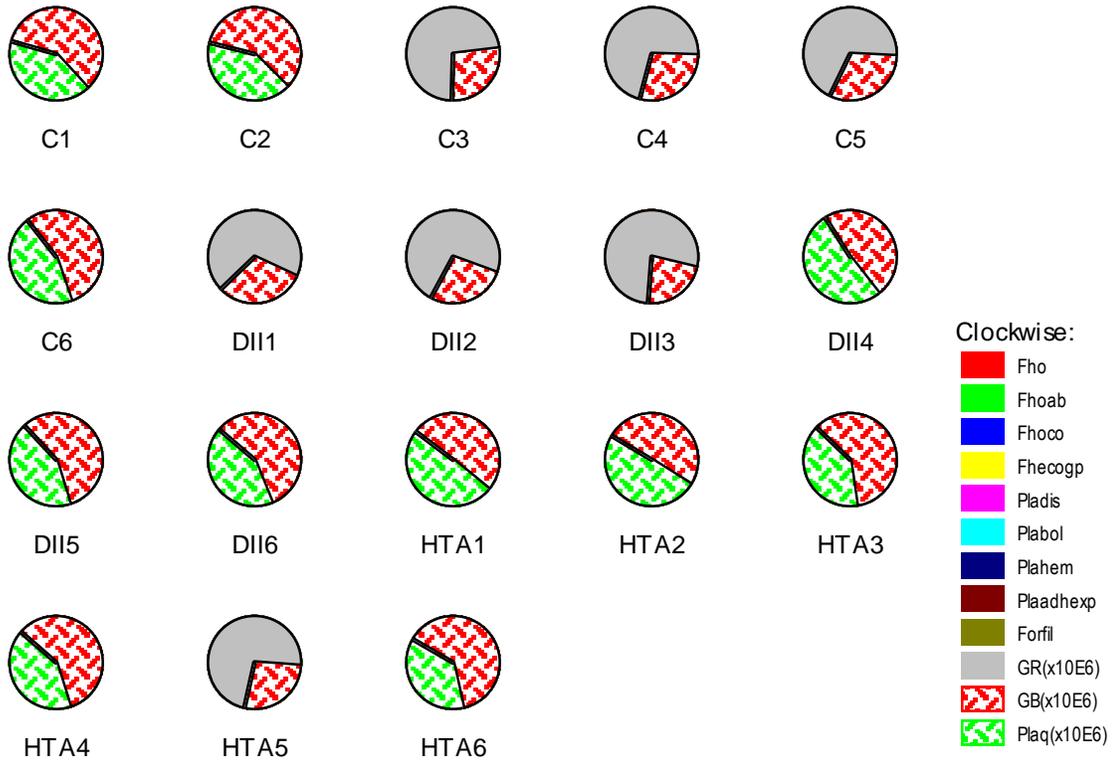


Figura 94. Graficación multivariable. C1-C6: Controles, HTA1-HTA6: Pacientes con hipertensión controlada, DII1-DII6: Pacientes con diabetes tipo 2 controlada. Fho: Fibrina homogénea, Fhoab: Fibrina homogénea abierta, Fhoco: Fibrina homogénea compacta, Fhecogp: Fibrina heterogénea compacta con grandes poros, Pladis: Plaquetas discoidales, Plabol: Plaquetas en forma de bola, Plahem: Plaquetas hemisféricas, Plaadhexp: Plaquetas adheridas y expandidas, Forfil: Formación de filopodios, GR(x10E6): Eritrocitos(x10E6), GB(x10E6): Leucocitos(x10E6), Pla(x10E6): Plaquetas(x10E6).

La figura 95 muestra como los componentes sanguíneos cuantificados no resultan muy importantes en la diferenciación entre sujetos experimentales, aún cuando se observan claramente las tendencias hacia la heterogeneidad ya evaluadas. Al mismo tiempo, esta gráfica señala que la diferenciación entre grupos no depende de una única ni de unas pocas variables, sino por el contrario, del comportamiento conjunto simultáneo en cada sujeto, e incluso en cada grupo. Así, El primer agrupamiento natural engloba a los pacientes caracterizados principalmente por una interacción estrecha entre la presencia de plaquetas en forma de bola o adheridas y expandidas, números altos de eritrocitos y medios de leucocitos y fibrina frecuentemente de apariencia homogénea. Podría concluirse sin lugar a dudas que el segundo grupo está compuesto por individuos sanos, con pacientes en los que interactuó estrechamente la presencia de plaquetas discoidales o también eventualmente hemisféricas, en forma de bola o incluso adheridas y expandidas, fibrina homogénea abierta y un número generalmente alto de eritrocitos y plaquetas. El tercer agrupamiento caracteriza a un grupo un poco más heterogéneo que incluye la presencia común de plaquetas en forma de bola y formación de filopodios o eventualmente discoidales o hemisféricas, en interacción con fibrina homogénea abierta o compacta y abundancia de eritrocitos, leucocitos y plaquetas. El cuarto conjunto sería claramente reconocido como formado por diabéticos, caracterizados en este estudio por presentar

micrografías principalmente con plaquetas hemisféricas, fibrina heterogénea compacta con grandes poros o incluso eventualmente homogénea, con valores importantes de plaquetas y fluctuantes de eritrocitos y leucocitos. Este último modelo cualitativo define bastante bien los resultados de la investigación realizada en el presente estudio.

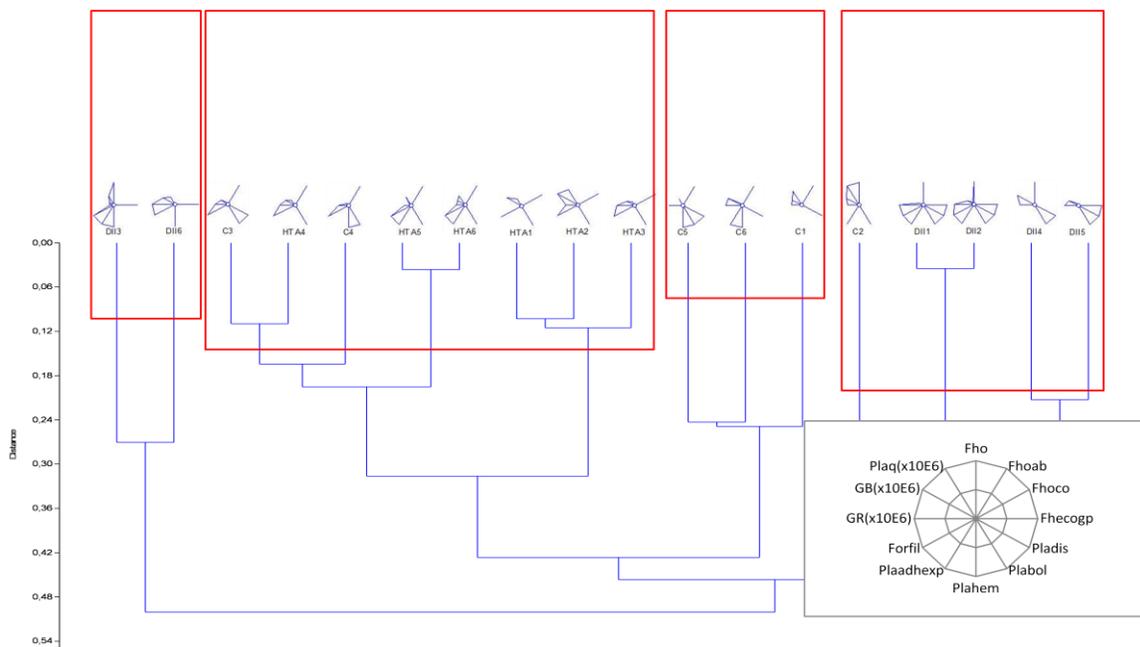


Figura 95. Combinación del Dendrograma resultante del Análisis de Agrupamientos y la graficación multivariable de los casos. C1-C6: Controles, HTA1-HTA6: Pacientes con hipertensión controlada, DII1-DII6: Pacientes con diabetes tipo 2 controlada. En cada esquema y de izquierda a derecha se señalan las magnitudes cualitativas de las variables analizadas: Fho: Fibrina homogénea, Fhoab: Fibrina homogénea abierta, Fhoco: Fibrina homogénea compacta, Fhecogp: Fibrina heterogénea compacta con grandes poros, Pladis: Plaquetas discoidales, Plabol: Plaquetas en forma de bola, Plahem: Plaquetas hemisféricas, Plaadhexp: Plaquetas adheridas y expandidas, Forfil: Formación de filopodios, GR(x10E6): Eritrocitos(x10E6), GB(x10E6): Leucocitos(x10E6), Plaq(x10E6): Plaquetas(x10E6).

VIII. Discusión

La literatura clásica reporta que el efecto biológico de las plaquetas puede ser un reflejo de la interacción y los posibles efectos sinérgicos de múltiples factores de crecimiento. Estos factores de crecimiento son liberados por las plaquetas y pueden activar la proliferación celular osteoprogenitoras y preosteoblastos que residen en los tejidos adyacentes (periostio, endostio) o en el autoinjerto implantado (hueso esponjoso o médula ósea). Los efectos biológicos de las plaquetas son considerados en la viabilidad y proliferación de células alveolares en el tejido óseo, es posible que la “pega de fibrina” que no contiene plasma, pero si concentrados plaquetarios, sea una alternativa para capitalizar adecuadamente la capacidad de los factores de crecimiento plaquetarios. ⁽¹³⁾

En el presente estudio se evaluó las características ultraestructurales de la Fibrina Rica en Plaquetas mediante Microscopía Electrónica de Barrido, en sujetos pertenecientes al grupo control (GC), en un grupo de pacientes con diagnóstico de Hipertensión Arterial controlados (HTA) y en un grupo de pacientes diagnosticados con Diabetes Mellitus tipo 2 compensados (DII), en edades comprendidas entre 20 y 78 años de edad, en ambos géneros y tratados en el Postgrado de Cirugía bucal de la Universidad Central de Venezuela.

Las pruebas de laboratorio para la población a estudiar incluyeron, exámenes de rutina (hematológicos y química sanguínea), con el fin de evaluar a partir de los rangos de normalidad alguna información general y de la función plaquetaria solicitados como parte de los requisitos para conformar los criterios de inclusión y exclusión en estos casos. Datos similares han sido reportados ⁽¹⁵⁴⁾

Los voluntarios proveyeron su consentimiento en concordancia con la Declaración de Helsinki de 1975 y última revisión en el año 2000, como ha sido aplicado en otros estudios similares ⁽¹⁵⁴⁾

La obtención del PRF se obtuvo mediante el procedimiento de una sola centrifugación. Otros estudios han utilizado la técnica de doble centrifugación, sin embargo, esta última ha mostrado daños irreversibles en la plaqueta. ⁽⁷⁶⁾

Resulta innovador en el presente estudio conocer la morfología no solamente de las plaquetas sino del tipo de fibrina en los grupos de pacientes con HTA y DII, a tal efecto se estudió basada en la arquitectura global de las redes de fibrina. Las plaquetas, a diferencia de otras técnicas no requirió anticoagulantes o cualquier otro agente gelificante. Este protocolo abierto es muy simple y económico basado en los estudios iniciales de Dohan y cols, 2010, en el que se recoge la sangre y se centrifuga suavemente conformando tres capas: glóbulos rojos (GR) en la parte inferior,

plasma pobre en plaquetas (PPP) como un sobrenadante y un plasma rico en fibrina (FRP) de coágulos en el medio, cuyas posibles indicaciones clínicas en el campo de la cirugía bucal y maxilofacial han sido utilizadas y reportadas ⁽¹⁵⁴⁾.

La mayoría de los estudios en concentrados de plaquetas destacan concentraciones de factores de crecimiento, raramente evalúan el contenido de leucocitos y casi nunca analizan la estructura de la fibrina, sin embargo la arquitectura de la fibrina influye directamente en los biomateriales ⁽⁹⁹⁾. A tal efecto se consideró conocer en el presente estudio, las características ultraestructurales de la plaqueta rica en fibrina, el cual ha tenido un auge muy positivo en el campo odontológico.

El coágulo PRF parece ser responsable de una liberación de factores de crecimiento, pero tal liberación es imposible señalar en la mayoría de las técnicas de PRF, debido a la activación tan rápida de las plaquetas, inclusive otros autores la describen como una activación brutal ⁽¹⁵⁴⁾ y en consecuencia, ocurre la liberación inmediata de los factores de crecimiento y la red de fibrina es muy liviana para sostenerla.

En nuestra población de pacientes que acuden al Postgrado de Cirugía Bucal, es frecuente observar la presencia de pacientes HTA y DII, por tal motivo forma parte de este estudio comparar las

características de la red de fibrina y plaquetas junto a los sujetos del grupo control, sin embargo; para nuestro conocimiento, ningún estudio ha sido realizado para un análisis estructural del gel PRF para uso quirúrgico.

Las plaquetas de los pacientes con HTA y DII y del grupo control fueron procesadas mediante el protocolo de procesamiento ultraestructural del Centro de Microscopía Electrónica “Mitsuo Ogura” de la Facultad de Ciencias de la UCV y del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) en el Lab. Ciencia e Ingeniería de Materiales. Las muestras fueron procesadas en presencia de glutaraldehído para disminuir al máximo la activación plaquetaria provocada por los procesos de obtención y centrifugación, como en otros estudios, sin embargo las plaquetas mostraron diferentes morfologías y en otros presentó algunos signos indicativos de una ligera activación como son la extensión de filopodios. Estos hallazgos, fueron reportados. ⁽²¹²⁾

La frecuencia en términos de porcentaje de aparición de las características de la fibrina, mostró diferencias en GC, HTA y DII que al ser analizados mediante la correlación por rangos de Spearman fue significativo con un nivel de significancia de $p=0,05$. Estos coeficientes de correlación miden la fuerza de relación entre dos variables debido al tamaño de la muestra, lo cual permite ser objeto de estudios posteriores.

En el estudio realizado por Castaño y cols (2004) ⁽²¹¹⁾ observaron *in vivo* la organización de la fibrillas bajo microscopía electrónica de barrido, pero en plasma rico en plaquetas, esta red de fibrillas se pudo evidenciar en nuestro estudio procedente del plasma rico en fibrina.

Al evaluar los resultados mediante un Análisis de Correspondencia, del 100% de los sistemas, los 2 ejes de variables explican el 50% de las características de las plaquetas y fibrinas, las otras variables conducen a que las plaquetas tienen sus características propias como ya han sido reportadas.

Del paquete de variables, de acuerdo al Análisis de Correspondencia, los casos procedentes del GC se parecen más en el eje vertical tanto hacia arriba como hacia abajo lo cual verifica sus características de normalidad, similar a lo encontrado por Dohan y cols. (2010) ⁽¹⁵⁴⁾ donde de los 11 pacientes tomados para la muestra no presentaron diferencias significativas a la hora del estudio por microscopía electrónica de barrido, sin embargo; muestras procedentes de HTA y DII orientadas en ese mismo eje parecieran comportarse como normales, probablemente por el adecuado control que tienen los pacientes ante su enfermedad. Ambas enfermedades, HTA y DII también se manifiestan muy lejanas al eje central y en consecuencia, distantes al GC, notándose bien diferenciados

inclusive entre HTA y DII, lo cual verifica de dos enfermedades completamente diferentes.

De todas las variables estudiadas, el Análisis de correspondencia mostró las que tienen más influencia en cada grupo estudiado, la tendencia en el grupo control fue fibrina homogénea abierta, plaquetas hemisféricas y plaquetas discoidales. Para HTA las variables que proyectaron más influencia dentro de su grupo correspondió a una fibrina homogénea compacta y para el grupo DII la tendencia fue de una fibrina homogénea, fibrina heterogénea compacta con grandes poros y plaquetas adheridas y expandidas, lo cual mostró niveles de heterogeneidad entre las tres categorías de los casos evaluados, los cuales muestran que son diferentes los comportamientos fisiológicos.

Se pudo evidenciar las diferentes formas halladas en la fibrina, como fibrina homogénea y heterogénea, abierta o cerrada similar a lo encontrado por Lauricella y la Variabilidad de las redes de fibrina. ⁽²⁰⁶⁾

El mismo caso sucedió con la forma de las plaquetas, encontrando plaquetas ovaladas, redondeadas o con proyecciones de filopodios, similar a las descritas por White J. G. y cols. (1993) ⁽²⁰⁵⁾ en su estudio de la Anatomía y organización estructural de la plaqueta.

Adicionalmente, aun cuando existen observaciones que ayudan a entender el comportamiento alterado de las plaquetas en la diabetes mellitus, se deben tener reservas al momento de interpretar tales hallazgos, pues se ha reconocido que los fenómenos *in vitro* de adhesividad y agregación plaquetaria aumentada, no reflejan necesariamente el comportamiento plaquetario *in vivo*. A su vez, debido a la heterogeneidad de la diabetes, se debe ser cauteloso y no aplicar los resultados encontrados en un grupo de pacientes, a la población diabética general; sin embargo, los cambios en el sistema hemostático se deben tener en cuenta en el abordaje terapéutico para un control completo de la diabetes ⁽²¹³⁾. En este caso solo fue aplicado el estudio a los pacientes DII compensados.

Al evaluar todas las variables, GC, HTA y DII tienden a ser parecidos, porque las variables que se usaron no dan una diferencia tan marcada en la obtención de FRP, sin embargo no llegan a compactarse sus características, de hecho al aplicar el Análisis de Agrupamientos, se obtienen más bien cuatro grupos definidos: el primero que corresponde al grupo control, tienden a ser parecidos pero no son tan homogéneos, un segundo grupo, HTA que son parecidos entre ellos y deriva a que están controlados, un tercer grupo en donde DII presenta un subgrupo que tienden a parecerse entre sí y al GC y un cuarto grupo de muestras de DII que tienden a parecerse entre sí pero a diferenciarse del resto del grupo.

En el presente estudio se reportó la presencia de unas proyecciones citoplasmáticas correspondiente a la formación de filopodios en las plaquetas. Los filopodios (en algunos reportes denominados microespículas) son proyecciones citoplasmáticas delgadas que se extienden desde el extremo directriz de células en migración. Contienen filamentos de actina entrecruzados en haces mediante proteínas de unión. Los Filopodios forman adhesiones locales con el sustrato. Los factores de crecimiento se unen a receptores de tirosín-quinasa, lo que produce la polimerización de los filamentos de actina, los cuales, cuando se entrecruzan, constituyen los elementos del citoesqueleto que soportan los filopodios. En la cicatrización de las heridas, los factores de crecimiento estimulan la formación de filopodios, esencial para la cicatrización. ⁽²¹⁴⁾

Adicionalmente se observó la presencia de un solo caso de “plaqueta grande” que podría orientarnos a continuar en estudios posteriores, dado la relación de esta morfología plaquetaria en los procesos inmunes. Caso contrario a las plaquetas pequeñas asociadas al síndrome de Wiskott – Aldrich. ⁽²¹⁴⁾

Como se expuso a lo largo de la discusión de este trabajo, hasta el presente no se cuenta con estudios que comparen *in vitro* las características ultraestructurales del plasma rico en fibrina, sino que únicamente en escasas investigaciones se ha considerado dilucidar y

diferenciar las características del PRP versus FRP mediante microscopía electrónica de transmisión. Por ello se intenta realizar una contribución sobre el conocimiento de sus características ultraestructurales sobre los pacientes diagnosticados con HTA y DII y controlados, sobre lo cual hay escaso conocimiento, pudiendo contribuir a una mejor comprensión de la biología hematológica en estos pacientes con necesidades quirúrgicas y mejor cicatrización de las heridas. Así mismo, las características poco homogéneas observadas de acuerdo a las variables estudiadas constituyen una red dinámica y compleja de numerosas señales y factores por lo que la actividad celular requiere de un sistema de gran complejidad.

IX. Conclusiones

Las características ultraestructurales del presente estudio, a pesar de pertenecer a tres grupos, el análisis obtenido da cuatro grupos definidos, en el primer grupo los pacientes del grupo control tienden a ser parecidos, pero no son tan homogéneos, el segundo grupo, HTA son parecidos entre sí y pareciera corresponder a pacientes controlados cercanos a la normalidad, el tercer grupo se desdobra en dos, conformando un subgrupo de pacientes con DII que tienden a parecerse entre sí y al grupo control y producto de ese desdoblamiento se origina un cuarto grupo, cuyas muestras DII tienden a parecerse entre sí, pero a diferenciarse del resto del grupo.

Los resultados claramente señalan tendencias de diferenciación entre las fibrinas y plaquetas en los tres grupos de estudio, estas variables se ajustan a los márgenes de normalidad. Esta diferenciación entre grupos no depende de una variable única, ni de unas pocas variables, sino del comportamiento simultáneo en cada sujeto e incluso en cada grupo.

Hay diferencia significativa en cuanto a las variables estudiadas en las fibrinas homogénea abierta, fibrina homogénea, fibrina heterogénea compacta con grandes poros y en las plaquetas hemisféricas, bola, adheridas-expandidas y formación de filopodios,

al correlacionarlo con los datos obtenidos de los exámenes de laboratorio, pareciera indicar que si bien es cierto que la relación es inversa en sus variables, prevalecerá en el protocolo quirúrgico del uso de FRP la necesidad de mantener compensado al paciente y estar atentos a los valores hematológicos en cada caso. Estos resultados afirman el adecuado criterio de inclusión aplicado en este estudio.

X. Recomendaciones

Abarcar otros tipos de enfermedades como Osteonecrosis Maxilar por Bifosfonatos, Cáncer, Nefropatías y Tabaquismo, entre otras.

Ampliar estos estudios bajo microscopía electrónica de transmisión para evaluar organelas celulares de estos pacientes con Hipertensión Arterial, Diabetes Mellitus tipo 2 y otras enfermedades sistémicas.

Aumentar el número de muestras de la población a estudiar para precisar la tendencia en las muestras.

Realizar este mismo tipo de estudio in vivo con seguimiento a largo plazo.

XI. Referencias bibliográficas

1. Perez-Sierra A: Estudio de microscopía electrónica y cuantificación de los factores de crecimiento mediante un nuevo procedimiento de obtención de plasma rico en plaquetas. Tesis Doctoral, Madrid, España. 2010.
2. Raja S. Naidu E: Platelet-Rich Fibrin: Evolution of a Second-Generation Platelet Concentrate. Indian, Indian Journal of Dental Research, 2008.
3. Choi B, Zhu S, Kim B, Huh J, Lee S, Jung J: Effect of Platelet-Rich Plasma (PRP) Concentration on the Viability and Proliferation of Alveolar Bone Cells: An In Vitro Study. Seoul, South Korea, IAOMS, 2004.
4. Matras H, Wirkungen D: Fibrinpräparate Auf Kontinuitätsstörungen der Rattenhaut, Osterr Z Stomatol, p. 338. Germany. 1970.
5. Gible J, Ness P: Fibrin Glue: The Perfect Operative Sealant, Transfusion, p. 741. 1990.
6. Clark R: Fibrin and Wound Healing. Ann N Y Acad Sci, p. 355. 2001.
7. Collen A, Koolwijk P, Kroon M, Hinsbergh V: Influence of Fibrin Structure on the Formation and Maintenance of Capillary-like Tubules

by Human Microvascular Endothelial Cells. *Angiogenesis*2, p. 153. 1998.

8. Hinsbergh V, Collen A, Koolwijk P: Role of Fibrin Matrix in Angiogenesis. *Ann N Y Acad Sci*936, p. 426. 2001.

9. Vinazzer H: Fibrin Sealing: Physiologic and Biochemical Background, *Facial Plast Surg*2, p. 291.1985.

10. Whitman D, Berry R and Green D: Platelet Gel: An Autologous Alternative to Fibrin Glue with Applications in Oral and Maxillofacial Surgery. *J Oral Maxillofac Surg*55, p. 1294. 1997.

11. Saltz R, Sierra D, Feldman D, Saltz M, Dimick A, Vasconez L: Experimental and Clinical Applications of Fibrin Glue, *Plast Reconstr Surg*88, pp. 1005–1015. Discussion pp 1016-7. 1991.

12. Hotz G: Alveolar Ridge Augmentation with Hydroxylapatite using Fibrin Sealant for Fixation. Part I: An Experimental Study, *Int J Oral Maxillofac Surg*20, p. 204. 1991.

13. Hotz G: Alveolar Ridge Augmentation with Hydroxylapatite using Fibrin Sealant for Fixation. Part II: Clinical application, *Int J Oral Maxillofac Surg*20 p. 208. 1991.

14. Bonucci E, Marini E, Valdinucci F and Fortunato G: Osteogenic Response to Hydroxyapatite-Fibrin Mmplants in Maxillofacial Bone Defects, *Eur J Oral Sci*105 p. 557. 1997.

15. Matras H: Fibrin Sealant in Maxillofacial Surgery. Development and indications. A Review of the Past 12 years, Facial Plast Surg2, p. 297. 1985.
16. Matras H: Fibrin Seal: The State of The Art, J Oral Maxillofac Surg43, p. 605. 1985.
17. Soffer E, Ouhayoun J, Anagnostou F: Fibrin Sealants and Platelet Preparations in Bone and Periodontal Healing, Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod95, p. 521. 2003.
18. Tayapongsak P, O'Brien D, Monteiro C. and Arceo-Diaz L: Autologous Fibrin Adhesive in Mandibular Reconstruction with Particulate Cancellous Bone and Marrow, J Oral Maxillofac Surg52, p. 161. Discussion 166. 1994.
19. Giannobile W: Periodontal Tissue Engineering by Growth Factors, Bone19 (1 Suppl), p. 23S. 1996.
20. Marx R, Carlson E, Eichstaedt, R. Schimmele, S. Strauss, J. and Georgeff, K: Platelet-Rich Plasma: Growth Factor Enhancement for Bone Grafts, Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod85, p. 638. 1998.
21. Dugrillon, A. Eichler, H. Kern, S. and Kluter, H: Autologous Concentrated Platelet-Rich Plasma (cPRP) for Local Application in Bone Regeneration, Int J Oral Maxillofac Surg31, p. 615. 2002.

22. Anitua E: The Use of Plasma-Rich Growth Factors (PRGF) in Oral Surgery, *Pract Proced Aesthet Dent*13, p. 487. 2001.
23. Weibrich G, Kleis W, Hafner G, Hitzler W and Wagner W: Comparison of Platelet, Leukocyte, and Growth Factor Levels in Point-Of-Care Platelet-Enriched Plasma, Prepared Using a Modified Curasan Kit, with Preparations Received From a Local Blood Bank, *Clin Oral Implants Res*14, p. 357. 2003.
24. Arpornmaeklong, P. Kochel, M. Depprich, R. Kubler, N. and Wurzler, K: Influence of Platelet-Rich Plasma (PRP) on Osteogenic Differentiation of Rat Bone Marrow Stromal Cells. An In Vitro Study, *Int J Oral Maxillofac Surg*33, p. 60. 2004.
25. Carter, C. Jolly, D. Worden, C. Hendren, D. and Kane, C: Platelet-Rich Plasma Gel Promotes Differentiation And Regeneration During Equine Wound Healing, *Exp Mol Pathol*74, p. 244. 2003.
26. Yamada, Y. Ueda, M. Hibi, H. and Nagasaka, T: Translational Research for Injectable Tissue-Engineered Bone Regeneration Using Mesenchymal Stem Cells and Platelet-Rich Plasma: From Basic Research to Clinical Case Study, *Cell Transplant*13, p. 343. 2004.
27. Yamada, Y. Ueda, M. Naiki, T. Takahashi, M. Hata, K. Nagasaka, T. Autogenous Injectable Bone for Regeneration with Mesenchymal Stem Cells and Platelet-Rich Plasma: Tissue-Engineered Bone Regeneration. *Tissue Eng*10(5-6): p. 955. 2004.

28. Sonnleitner, D. Huemer, P. and Sullivan, D: A Simplified Technique for Producing Platelet-Rich Plasma and Platelet Concentrate for Intraoral Bone Grafting Techniques: A Technical Note, *Int J Oral Maxillofac Implants*15, p. 879. 2000.
29. Demiralp, B. Keceli, H. Muhtarogullar, M. Serper , A. and Eratalay, K: Treatment of Periapical Inflammatory Lesion with The Combination of Platelet-Rich Plasma and Tricalcium Phosphate: A Case Report, *J Endod*30, p. 796. 2004.
30. Efeoglu, C. Akcay, Y. and Erturk, S: A Modified Method for Preparing Platelet-Rich Plasma: An Experimental Study, *J Oral Maxillofac Surg*62, p. 1403. 2004.
31. Fennis, J. Stoelinga, P. and Jansen, J: Mandibular Reconstruction: A Clinical and Radiographic Animal Study on The Use of Autogenous Scaffolds and Platelet-Rich Plasma, *Int J Oral Maxillofac Surg*31, p. 281. 2002.
32. Fennis, J. Stoelinga, P. and Jansen, J: Mandibular Reconstruction: a Histological and Histomorphometric Study on The Use of Autogenous Scaffolds, Particulate Cortico-Cancellous Bone Grafts and Platelet Rich Plasma in Goats, *Int J Oral Maxillofac Surg*33, p. 48. 2004.
33. Fennis, J. Stoelinga, P. and Jansen, J: Reconstruction of The Mandible with An Autogenous Irradiated Cortical Scaffold,

Autogenous Corticocancellous Bone-Graft and Autogenous Platelet-Rich-Plasma: An Animal Experiment, *Int J Oral Maxillofac Surg*34, p. 158. 2005.

34. Floryan, K. and Berghoff, W: Intraoperative Use of Autologous Platelet-Rich and Platelet-Poor Plasma for Orthopedic Surgery Patients, *Aorn J*80, p. 668. Quiz 675-8. 2004.

35. Fontana, S. Olmedo, D. Linares, J. Guglielmotti, M. and Crossa, M: Effect of Platelet-Rich Plasma on The Peri-Implant Bone Response: An Experimental Study, *Implant Dent*13, p. 73. 2004.

36. Grageda, E: Platelet-Rich Plasma and Bone Graft Materials: A Review and A Standardized Research Protocol, *Implant Dent*13, p. 301. 2004.

37. Kitoh, H. Kitakoji, T. Tsuchiya, H. Mitsuyama, H. Nakamura, H. Katoh, M. and Ishiguro, N: Transplantation of Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells and Platelet-Rich Plasma During Distraction Osteogenesis—A Preliminary Result of Three Cases, *Bone*35, p. 892. 2004.

38. Kovacs, K. Velich, N. Huszar, T. Fenyves, B. Suba, Z. and Szabo, G. Histomorphometric and Densitometric Evaluation of The Effects of Platelet-Rich Plasma on the Remodeling of Beta-Tricalcium Phosphate in Beagle Dogs, *J Craniofac Surg*16, p. 150. 2005.

39. Mazor, Z. Peleg, M. Garg, A. and Luboshitz, J: Platelet-Rich Plasma for Bone Graft Enhancement in Sinus Floor Augmentation with Simultaneous Implant Placement: Patient Series Study, *Implant Dent*13, p. 65. 2004.
40. Merkx, M. Fennis, J. Verhagen, C. and Stoelinga, P: Reconstruction of The Mandible Using Preshaped 2.3 mm Titanium Plates, Autogenous Particulate Cortico-Cancellous Bone Grafts and Platelet Rich Plasma: A Report On Eight Patients, *Int J Oral Maxillofac Surg*33, p. 733. 2004.
41. Oyama, T. Nishimoto, S. Tsugawa, T. and Shimizu, F: Efficacy of Platelet-Rich Plasma in Alveolar Bone Grafting, *J Oral Maxillofac Surg*62, p. 555. 2004.
42. Oyama, T. Nishimoto, S. and Takeda, M: Alveolar Bone Regeneration Utilizing b-TCP and Platelet-Rich Plasma (PRP) Derived From Bone Marrow Aspirate, *Ann Plast Surg*54, p. 222. 2005.
43. Roldan, J. Jepsen, S. Schmidt, C. Knuppel, H. Rueger, D. Acil, Y. and Terheyden, H: Sinus Floor Augmentation with Simultaneous Placement of Dental Implants in the Presence of Platelet-Rich Plasma or Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-7, *Clin Oral Implants Res*15, p. 716. 2004.

44. Roldan, J. Jepsen, S. Schmidt, C. Knuppel, H. Rueger, D. Acil, Y. and Terheyden, H: Bone Formation in The Presence of Platelet-Rich Plasma vs. Bone Morphogenetic Protein-7, *Bone*34, p. 80.2004.
45. Suba, Z. Takacs, D. Gyulai-Gal, S. and Kovacs, K: Facilitation of Beta-tricalcium Phosphate–Induced Alveolar Bone Regeneration by Platelet-Rich Plasma in Beagle Dogs: A Histologic and Histomorphometric Study, *Int J Oral Maxillofac Implants*19, p. 832. 2004.
46. Yazawa, M. Ogata, H. Nakajima, T. Mori, T. Watanabe, N. and Handa, M: Basic Studies on The Clinical Applications of Platelet-Rich Plasma, *Cell Transplant*12, p. 509. 2003.
47. Yazawa, M. Ogata, H. Nakajima, T. Watanabe, N: Influence of Antiplatelet Substances on Platelet-Rich Plasma, *J Oral Maxillofac Surg*62, p. 714. 2004.
48. Yazawa, M. Ogata, H. Nakajima, T. Mori, T. Watanabe, N: Basic Studies on The Bone Formation Ability by Platelet Rich Plasma In Rabbits, *J Craniofac Surg*15, p. 439. 2004.
49. Froum, S. Wallace, S. Tarnow, D. and Cho, S: Effect of Platelet-Rich Plasma on Bone Growth and Osseointegration In Human Maxillary Sinus Grafts: Three Bilateral Case Reports, *Int J Periodontics Restor Dent*22, p. 45. 2002.

50. Lekovic, V. Camargo, P. Weinlaender, M. Vasilic, N. and Kenney, E: Comparison of Platelet-Rich Plasma, Bovine Porous Bone Mineral, and Guided Tissue Regeneration Versus Platelet-Rich Plasma and Bovine Porous Bone Mineral in The Treatment of Intrabony Defects: a Reentry Study, J Periodontol73, p. 198. 2002.

51. Lekovic, V. Camargo, P. Weinlaender, M. Vasilic, N. Aleksic, Z. and Kenney, E: Effectiveness of a Combination of Platelet-Rich Plasma, Bovine Porous Bone Mineral and Guided Tissue Regeneration in the Treatment of Mandibular Grade II Molar Furcations in Humans, J Clin Periodontol30, p. 746. 2003.

52. Kassolis, J. Rosen, P. and Reynolds, M: Alveolar Ridge and Sinus Augmentation Utilizing Platelet-Rich Plasma in Combination with Freeze-Dried Bone Allograft: Case Series, J Periodontol71, p. 1654. 2000.

53. Petrungaro, P: Using Platelet-Rich Plasma to Accelerate Soft Tissue Maturation in Esthetic Periodontal Surgery, Compend Contin Educ Dent22, p. 729. 2001.

54. Petrungaro, P: Treatment of the Infected Implant Site Using Platelet-Rich Plasma, Compend Contin Educ Dent23, p. 363. 2002.

55. Sanchez, R. Sheridan, P. and Kupp, L: Is Platelet-Rich Plasma the Perfect Enhancement Factor? A Current Review, Int J Oral Maxillofac Implants18, p. 93. 2003.

56. Camargo, P. Lekovic, V. Weinlaender, M. Vasilic, N. Madzarevic, M. and Kenney, E: Platelet-Rich Plasma and Bovine Porous Bone Mineral Combined with Guided Tissue Regeneration in the Treatment of Intrabony Defects in humans, *J Periodontal Res*37, p. 300. 2002.
57. Choi, B. Zhu, S. Kim, B. Huh, J. Lee, S. Jung, J: Effect of Platelet-Rich Plasma on Bone Regeneration in Autogenous Bone Graft, *Int J Oral Maxillofac Surg*33, p. 56. 2004.
58. Della Valle, A. Sammartino, G. Marenzi, G. Tia, M. Espedito di Lauro, F. A. Ferrari, F. and Lo Muzio, L: Prevention of Postoperative Bleeding in Anticoagulated Patients Undergoing Oral Surgery: Use of Platelet-Rich Plasma Gel, *J Oral Maxillofac Surg*61, p. 1275. 2003.
59. Jakse, N. Tangl, S. Gilli, R. Berghold, A. Lorenzoni, M and Eskici, A, et al.: Influence of PRP on Autogenous Sinus Grafts. An Experimental Study on Sheep, *Clin Oral Implants Res*14, p. 578. 2003.
60. Jensen, T. Rahbek, O. Overgaard, S. and Soballe, K: Platelet Rich Plasma and Fresh Frozen Bone Allograft as Enhancement of Implant Fixation. An Experimental Study in Dogs, *J Orthop Res*22, p. 653. 2004.
61. Jensen, T. Rahbek, O. Overgaard, S. and Soballe, K: No Effect of Platelet-Rich Plasma with Frozen or Processed Bone Allograft Around Noncemented Implants, *Int Orthop*29, p. 67. 2005.

62. Li, H. Zou, Z. Xue, Q. Egund, N. Lind, M. and Bunger, C: Anterior Lumbar Interbody Fusion With Carbon Fiber Cage Loaded With Bioceramics and Platelet-Rich Plasma. An Experimental Study on Pigs, *Eur Spine* J13, p. 354. 2004.
63. Schlegel, K. Donath, K. Rupprecht, S. Falk, S. Zimmermann, R. Felszeghy, E. and Wiltfang, J: De Novo Bone Formation Using Bovine Collagen and Platelet-Rich Plasma, *Biomaterials*25, p. 5387. 2004.
64. Weibrich, G. Hansen, T. Kleis, W. Buch, R. and Hitzler, W: Effect of Platelet Concentration in Platelet-Rich Plasma on Peri-Implant Bone Regeneration, *Bone*34, p. 665. 2004.
65. Wiltfang, J. Kloss, F. Kessler, P. Nkenke, E. Schultze-Mosgau, S. Zimmermann, R. and Schlegel, K: Effects of Platelet-Rich Plasma on Bone Healing in Combination with Autogenous Bone and Bone Substitutes in Critical-Size Defects. An Animal Experiment, *Clin Oral Implants Res*15, p. 187. 2004.
66. Aghaloo, T. Moy, P. and Freymiller, E: Evaluation of Platelet-Rich Plasma in Combination with Anorganic Bovine Bone in the Rabbit Cranium: A Pilot Study, *Int J Oral Maxillofac Implants*19, p. 59. 2004.
67. Aghaloo, T. Moy, P. and Freymiller, E: Investigation of Platelet-Rich Plasma in Rabbit Cranial Defects: A Pilot Study, *J Oral Maxillofac Surg*60, p. 1176. 2002.

68. Mulhern, M. Cullinane, A. and Cleary, P: Visual and Anatomical Success with Short-Term Macular Tamponade and Autologous Platelet Concentrate, *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*238, p. 577. 2000.
69. Paques, M. Chastang, C. Mathis, A. Sahel, J. Massin, P. and Dosquet, C, et al.: Effect of Autologous Platelet Concentrate in Surgery for Idiopathic Macular Hole: Results of a Multicenter, Double-Masked, Randomized Trial. Platelets in Macular Hole Surgery Group, *Ophthalmology*106, p. 932. 1999.
70. Wiltfang, J. Schlegel, K. Schultze-Mosgau, S. Nkenke, E. Zimmermann, R. and Kessler, P: Sinus Floor Augmentation with Beta-Tricalciumphosphate (beta-TCP): Does Platelet-Rich Plasma Promote Its Osseous Integration and Degradation, *Clin Oral Implants Res*14, p. 213. 2003.
71. Zechner, W. Tangl, S. Tepper, G. Furst, G. Bernhart, T. and Haas, R. et al.: Influence of Platelet-Rich Plasma on Osseous Healing of Dental Implants: a Histologic and Histomorphometric Study in Minipigs, *Int J Oral Maxillofac Implants*18, p. 15. 2003.
72. Choukroun, J. Adda, F. Schoeffler, C. and Vervelle, A: Une opportunité en paro-implantologie: le PRF, *Implantodontie*42, p. 55. French. 2000.

73. Simonpieri, A. Choukroun, J. Girard, O. Ouaknine, T. and Dohan, D: Immediate Post-Extraction Implantation: Interest of The PRF, *Implantodontie*13 , p. 177. 2004.
74. Dohan, D. Donsimoni, J. Navarro, G. and Gaultier, F: Platelet Concentrates. Part 1: Technologies. *Implantodontie*12, p. 5. French. 2003.
75. Dohan, D. Donsimoni, J. Navarro, G. and Gaultier, F: Platelet Concentrates. Part 2: Associated biology, *Implantodontie*12, p. 17. French. 2003.
76. Gaultier, F. Navarro, G. Donsimoni, J. and Dohan, D: Platelet Concentrates. Part 3: Clinical Applications. *Implantodontie*13, p. 3. French. 2004.
77. Weibrich, G. Kleis, W. Hafner, G. Hitzler, W. and Wagner, W: Comparison of Platelet, Leukocyte, and Growth Factor Levels in Point-of-Care Platelet-Enriched Plasma, Prepared Using a Modified Curasan Kit, with Preparations Received from a Local Blood Bank, *Clin Oral Implants Res*14, p. 357. 2003.
78. Weibrich, G. Kleis, W. Kunz-Kostomanolakis, M. Loos, A. and Wagner, W: Correlation of Platelet Concentration in Platelet-Rich Plasma to the Extraction Method, Age, Sex, and Platelet Count of the Donor, *Int J Oral Maxillofac Implants*16, p. 693. 2001.

79. Appel, T. Potzsch, B. Muller, J. Lindern, V. Berge, S and Reich, R: Comparison of Three Different Preparations of Platelet Concentrates for Growth Factor Enrichment, Clin Oral Implants Res13, p. 522. 2002.
80. Schilephake, H: Bone Growth Factors in Maxillofacial Skeletal Reconstruction, Int J Oral Maxillofac Surg31, p. 469. 2002.
81. Giannobile, W. Hernandez, R. Finkelman, R. Ryan, S. Kiritsy, C. D'Andrea, M and Lynch, S: Comparative Effects of Platelet-Derived Growth Factor-BB and Insulin-Like Growth Factor-I, Individually and in Combination, on Periodontal Regeneration in Macaca fascicularis, J Periodontal Res31, p. 301. 1996.
82. Border, W. and Noble, N: Transforming Growth Factor Beta in Tissue Fibrosis, N Engl J Med331, p. 1286. 1994.
83. Rosenkranz, S. and Kazlauskas, A: Evidence for Distinct Signaling Properties and Biological Responses Induced by the PDGF Receptor Alpha and Beta Subtypes, Growth Factors16, p. 201. 1999.
84. Lucarelli, E. Beccheroni, A. Donati, D. Sangiorgi, L. Cenacchi, A. and Del Vento, A. et al.: Platelet-Derived Growth Factors Enhance Proliferation of Human Stromal Stem Cells, Biomaterials24, p. 3095. 2003.

85. Heldin, C: Simultaneous Induction of Stimulatory and Inhibitory Signals by PDGF, FEBS Lett410, p. 17. 1997.
86. Yu, J. Ustach, C. and Kim, H: Platelet-Derived Growth Factor Signaling and Human Cancer, J Biochem Mol Biol36, p. 49. 2003.
87. Winkler, R. Pasleau, F. Boussif, N and Hodzic, D: The IGF System: Summary and Recent Data, Rev Med Liege55, p. 725. 2000.
88. Butt, A. Firth, S. and Baxter, R: The IGF Axis and Programmed Cell, Immunol Cell Biol77, p. 256. 1999.
89. Clark R: Fibrin and Wound Healing, Ann N Y Acad Sci936, p. 355. 2001.
90. Weibrich, G. Kleis, W. Hafner, G. and Hitzler, W: Growth Factor Levels in Platelet-Rich Plasma and Correlations with Donor Age, Sex, and Platelet Count, J Craniomaxillofac Surg30, p. 97. 2002.
91. Weibrich, G. Kleis, W. Hafner, G. and Hitzler, W: Growth factor Levels in the Platelet-Rich Plasma Produced by 2 Different Methods: Curasan-type PRP Kit versus PCCS PRP System, Int J Oral Maxillofac Implants17, p. 184. 2002.
92. Zimmermann, R. Jakubietz, R. Jakubietz, M. Strasser, E. Schlegel, A. Wiltfang, J. and Eckstein, R: Different Preparation Methods to Obtain Platelet Components as a Source of Growth Factors for Local Application, Transfusion41, p. 1217. 2001.

93. Weibrich, G. Kleis, W. Buch, R. Hitzler, W and Hafner, G: The Harvest SmartPReP System Versus the Friadent-Schutze Platelet-Rich Plasma Kit, Clin Oral Implants Res14, p. 233. 2003.
94. Mosesson, M. Siebenlist, K and Meh, D: The Structure and Biological Features of Fibrinogen and Fibrin, Ann N Y Acad Sci936, p. 11. 2001.
95. Dohan, D. Choukroun, J. Diss, A, Dohan, S. Dohan, A. Mouhyi, J. Gogly, B. Platelet-Rich Fibrin (PRF): A Second-Generation Platelet Concentrate. Part I: Technological Concepts and Evolution. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology Volume 101, Issue 3, p.37. March 2006.
96. Dohan D, Choukroun J, Diss A, Dohan S, Dohan J, Mouhyi J, Gogly B: Platelet-Rich Fibrin (PRF): A Second-Generation Platelet Concentrate. Part II: Platelet-Related Biologic Features. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 101 (3):e37-44. 2006.
97. Dohan D, Choukroun J, Diss A, Dohan S, Dohan J, Mouhyi J, Gogly B. Platelet-Rich Fibrin (PRF): A Second-Generation Platelet Concentrate. Part III: Leucocyte Activation: A New Feature for Platelet Concentrates? Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 101 (3):e45-50. 2006.
98. Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, Girard M, Schoeffler C, Dohan S, Dohan J, Mouhyi J, Dohan D. Platelet-Rich Fibrin (PRF): A

Second-Generation Platelet Concentrate. Part IV: Clinical Effects on Tissue Healing. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 101 (3):e51-5. 2006.

99. Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, Girard M, Schoeffler G, Dohan S, Dohan J, Mouhyi J, Dohan D. Platelet-Rich Fibrin (PRF): A Second-Generation Platelet Concentrate. Part V: Histologic Evaluations of PRF Effects on Bone Allograft Maturation in Sinus Lift. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 101 (3):e56-60. 2006.

100. Dinarello C: The IL-1 Family and Inflammatory Diseases, Clin Exp Rheumatol20, (5 Suppl 27), p. S1. 2000.

101. Rosenwasser L: Biologic Activities of IL-1 and its Role in Human Disease, J Allergy Clin Immunol102, p. 344 (1998)

102. Dinarello C: Therapeutic Strategies to Reduce IL-1 Activity in Treating Local and Systemic Inflammation, Curr Opin Pharmacol4, p. 378. (2004)

103. Kwan S, Padrines M, Theoleyre S, Heymann D, Fortun Y: IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: Interrelations in Bone Resorption Pathophysiology, Cytokine Growth Factor Rev15, p. 49. (2004)

104. Tiggeleman A, Boers W, Linthorst C, Brand H, Sala M, Chamuleau M: Interleukin-6 Production by Human Liver

(myo)fibroblasts in Culture. Evidence for a Regulatory Role of LPS, IL-1 Beta and TNF Alpha, *J Hepatol*23, p. 295. (1995)

105. Heinrich P, Behrmann I, Haan S, Hermanns H, Muller-Newen G, Schaper F: Principles of Interleukin (IL)-6-type Cytokine Signaling and its Regulation, *Biochem J*374 (Pt 1), p. 1. (2003)

106. Aggarwal B, Shishodia S, Ashikawa K, Bharti A: The role of TNF and its Family Members in Inflammation and Cancer: Lessons From Gene Deletion, *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*1, p. 327. (2002)

107. Aggarwal B: Signalling Pathways of the TNF Superfamily: a Double-edged Sword, *Nat Rev Immunol*3, p. 745. (2003)

108. Gaur U, Aggarwal B: Regulation of Proliferation, Survival and Apoptosis by Members of the TNF Superfamily, *Biochem Pharmacol*66, p. 1403. (2003)

109. Boothby M, Mora A, Aronica M, Youn J, Sheller J, Goenka S, Stephenson L: IL-4 signaling, Gene Transcription Regulation, and the Control of Effector T Cells, *Immunol Res*23, p. 179. (2001)

110. Keegan A, Zamorano J: Regulation of Gene Expression, Growth, and Cell Survival by IL-4: Contribution of Multiple Signaling Pathways, *Cell Res*8, p. 1. (1998)

111. Kay N, Pittner B: IL-4 Biology: Impact on Normal and Leukemic CLL B Cells, *Leuk Lymphoma*44, p. 897. (2003)
112. Tiggelman A, Boers W, Linthorst C, Sala M, Chamuleau R: Collagen Synthesis by Human Liver (myo)fibroblasts in Culture: Evidence for a Regulatory Role of IL-1 beta, IL-4, TGF Beta and IFN Gamma, *J Hepatol*23, p. 307. (1995)
113. Hayashi Y, Kobayashi M, Kuwata H, Atsumi G, Deguchi K, Feng X, et al.: Interferon-gamma and Interleukin 4 Inhibit Interleukin 1beta-induced Delayed Prostaglandin E(2) Generation Through Suppression of Cyclooxygenase-2 Expression in Human Fibroblasts, *Cytokine*12, p. 603. (2000)
114. Li-Weber M, Laur O, Davydov I, Hu C, Salgame P, Krammer P: What Controls Tissue-specific Expression of the IL-4 Gene?, *Immunobiology*198, p. 170. (1997)
115. Brown M, Hural J: Functions of IL-4 and Control of its Expression, *Crit Rev Immunol*17 , p. 1. (1997)
116. Zachary I: VEGF Signalling: Integration and Multi-tasking in Endothelial Cell Biology, *Biochem Soc Trans*31 (Pt 6), p. 1171. View Record in Scopus | Cited By in Scopus (110) (2003)

117. Harry L, Paleolog E: From the Cradle to the Clinic: VEGF in Developmental, Physiological, and Pathological Angiogenesis, Birth Defects Res Part C Embryo Today69, p. 363. (2003)
118. Ruhrberg C: Growing and Shaping the Vascular Tree: Multiple Roles for VEGF, Bioessays25, p. 1052. (2003)
119. Tiong A, Freedman S: Gene Therapy for Cardiovascular Disease: the Potential of VEGF, Curr Opin Mol Ther6, p. 151 (2004)
120. Dvorak H, Harvey V, Estrella P, Brown L, McDonagh J, Dvorak A: Fibrin Containing Gels Induce Angiogenesis. Implications for Tumor Stroma Generation and Wound Healing, Lab Invest57), p. 673. (1987)
121. Feng X, Clark R, Galanakis D, Tonnesen M: Fibrin and Collagen Differentially Regulate Human Dermal Microvascular Endothelial Cell Integrins: Stabilization of Alphav/beta3 mRNA by Fibrin1, J Invest Dermatol113, p. 913. (1999)
122. Sahni A, Odrlijin T, Francis C: Binding of Basic Fibroblast Growth factor to Fibrinogen and Fibrin, J Biol Chem273 , p. 7555. 1998.
123. Nehls V, Herrmann R: The Configuration of Fibrin Clots Determines Capillary Morphogenesis and Endothelial Cell Migration, Microvasc Res51, p. 347 (1996)

124. Loike J, Sodeik B, Cao L, Leucona S, Weitz J, Detmers P et al.: CD11c/CD18 on Neutrophils Recognizes a Domain at the N Terminus of the A Alpha Chain of Fibrinogen, Proc Natl Acad Sci USA88, p. 1044 (1991)

125. Kazura J, Wenger J, Salata R, Budzynski A, Goldsmith H: Modulation of Polymorphonuclear Leukocyte Microbicidal Activity and Oxidative Metabolism by Fibrinogen Degradation Products D and E, J Clin Invest83, p. 1916. (1989)

126. Lanir N, Ciano P, Van de Water L, McDonagh J, Dvorak A, Dvorak H, Macrophage Migration in Fibrin Gel Matrices. II. Effects of Clotting Factor XIII, Fibronectin, and Glycosaminoglycan Content on Cell Migration, J Immunol140 p. 2340 (1988)

127. Hamaguchi M, Morishita Y, Takahashi I, Ogura M, Takamatsu J, Saito H, FDP D-dimer Induces the Secretion of Interleukin-1, Urokinase-type Plasminogen Activator, and Plasminogen Activator Inhibitor-2 in a Human Promonocytic Leukemia Cell Line, Blood77, p. 94. (1991)

128. Gray A, Bishop J, Reeves J, Laurent G; A Alpha and Beta Chains of Fibrinogen Stimulate Proliferation of Human Fibroblasts, J Cell Sci104 (Pt 2), p. 409 (1993)

129. Tuan T, Song A, Chang S, Younai S, Nimni M: In Vitro Fibroplasia: Matrix Contraction, Cell Growth, and Collagen Production

of Fibroblasts Cultured in Fibrin Gels, *Exp Cell Res*223, p. 127. (1996)

130. Bonucci E, Marini E, Valdinucci F, Fortunato G: Osteogenic Response to Hydroxyapatite-fibrin Implants in Maxillofacial Bone Defects, *Eur J Oral Sci*105 p. 557.(1997)

131. Bucala R, Spiegel L, Chesney J, Hogan M, Cerami A: Circulating Fibrocytes Define a New Leukocyte Subpopulation that Mediates Tissue Repair, *Mol Med*,1 p. 71. (1994)

132. Badiavas E, Abedi M, Butmarc J, Falanga V, Quesenberry P: Participation of bone Marrow Derived Cells in Cutaneous Wound Healing, *J Cell Physiol*196, p. 245. (2003)

133. Bensaid W, Triffitt J, Blanchat C, Oudina K, Sedel L, Petite H: A Biodegradable Fibrin Scaffold for Mesenchymal Stem Cell Transplantation, *Biomaterials*24, p. 2497. (2003)

134. Yamada Y, Boo J, Ozawa R, Nagasaka T, Okazaki K, Hata K, Ueda M: Bone Regeneration Following Injection of Mesenchymal Stem Cells and Fibrin Glue with a Biodegradable Scaffold, *J Craniomaxillofac Surg*31, p. 27. (2003)

135. Boo J, Yamada Y, Okazaki Y, Hibino Y, Okada K, Hata K, et al.: Tissue-Engineered Bone Using Mesenchymal Stem Cells and a

Biodegradable Scaffold, J Craniofac Surg13, p. 231 discussion 240-3.
(2002)

136. Soffer E, Ouhayoun J, Anagnostou F: Fibrin Sealants and Platelet Preparations in Bone and Periodontal Healing, Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod95, p. 521. (2003)

137. Kawamura M, Urist M: Human Fibrin is a Physiologic Delivery System for Bone Morphogenetic Protein, Clin Orthop235, p. 302. (1988)

138. Ballester JF, et al.: Protocolo Para La Obtención De PDGF A Partir De PRF. Revista Española Odontoestomatológica de implantes (España). 12(1): 14-29. Febrero 2004.

139. Carmagnola D, Adriaens P, Berglundh T: Healing of human extraction sockets filled with Bio-Oss A Clin. Oral Impl. Res, 14,; 137–143. 2003.

140. Diss A, Dohan D, Mouhyi J, Mahler P: Osteotome Sinus Floor Elevation Using Choukroun's Platelet-rich Fibrin as Grafting Material: A 1-year Prospective Pilot Study With Microthreaded Implants. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. Feb 23; 18299229. 2008.

141. Palma L, Gallimidi J: Utilización de los Factores de Crecimiento Derivados del Plasma En Implantología Oral. Revista ciencias de la salud, adverbio 021, vol. 3 no. 1 enero-abril 2006.
142. Quintana R, Saucedo J: Efectos de la Aplicación de Plasma Rico en Factores de Crecimiento Sobre la Viabilidad y Celularidad en colgajos cutáneos tallados al azar. Trabajo de investigación cirugía plástica Vol. 17, Núm. 3 Septiembre- Diciembre pp 150 – 154. México 2007.
143. Porucznik M: Articular Cartilage Defects: Emerging Technologies are Changing the Treatment Landscape. June AAOS Now <http://www.aaos.org/news/bulletin/jun07/cover2.asp> 2007.
144. Steenvoorde P, van Doorn L, Naves C: Use of Autologous Platelet-rich Fibrin on Hard-to-heal Wounds Journal of Wound Care, Vol. 17, Iss. 2, 31 Jan, pp 60 – 63. 2008.
145. Gosh J. Platelet-rich Fibrin Matrix Promotes Foot Wound Healing. (Dermatology). Internal Medicine News. July 15, 2007.
146. Danielsen P, Jørgensen B, Karlsmark T, Nannestad Jørgensen L, Ågren M. Effects of Locally Applied Autologous Platelet-Rich Fibrin® (PRF) on Split-thickness Skin Graft Donor Sites. EWMA, Prague. 2006.

147. Sanchez M, Anitua E: Comparison of Surgically Repaired Achilles tendon Tears Using Platelet-Rich Fibrin Matrices. American Journal of Sports Medicine; 35:245. 2007.

148. Bahadir G, et colls. Scintigraphic Evaluation of Osteoblastic Activity in Extraccion Sockects Treated With Platelet Rich- Fibrin. Journal Of Oral and Maxillofacial Surgery, digital article to be published 2010.

149. Chen Y, et colls. In Vitro Release of Growth Factors From Platelet- Rich Fibrin (PRF): A Proposal to Optimize the Clinical Applications of PRF Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 108 56-61. 2009.

150. Ling H, et colls: A Comparative Study of PRF and PRP on the Effect of Proliferation and Differentiation of Rat Osteoblasts In Vitro. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 108. 707-713. 2009.

151. Dohan D. et al: In Vitro Study of Choukron's PRF on Human Gingival Fibroblasts, Dermal Prekeratinocytes, Preadipocytes and Maxillofacial Osteoblasts in Primary Cultures. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod ; 108: 341 -352. 2009.

152. Lee E. et al: A combination Graft of Low-molecular-weight Silk Fibro in with Choukroun PRF for Rabbit Calvarial Defect. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. articulo por publicar. 2010

153. Jang E, et al. Restoration of Periimplant Defects in Immediate Implant Installations by PRF and Silk Fibroin Powder Combination Graft. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. articulo por publicar. 2010
154. Dohan D, et al: Three-Dimensional Architecture and Cell Composition of a Choukroun's Platelet-Rich Fibrin Clot and Membrane. J Periodontology. Paris, France, 2010.
155. J. J. Thomson, Phil. Mag. 44, 293 (1897).
156. De Broglie, Phil. Mag. 47, 446 (1924).
157. H. Busch Ann. d. Physik 81. 974 (1926).
158. C. J. Davisson, Nature 119, 558 (1927).
159. J. J. Thomson, G. P. Thomson Nature 119, 890 (1927).
160. M. Kndl and E. Ruska, Ann. d. Physik 12, 607 (1932); Zeit f. Phy, 12, 389 (1931).
161. L. Morton, Hnn. Bull. Soc. Roy Med. Nat. Bruselas 92 106 (1934).
162. B. Van Borries and E. Ruska, Z. Wiss. Mikroskop 56, 317 (1939).

163. Robert D: Fundamentals of transmission electron microscopy. Heidenreich.
164. Kodak. Data book. no. p -267 cat. 179 7703.
165. Introduction to Scanning Electron Microscopy W. C. Nixon 1969 Proceedingsof and Annual Scanning Electron Microscopy Symposium, Patrocinadopor IIT Research Institute.
166. Joel News. Vol. 10, n.2.
167. Apuntes del cursillo de «Teoría y práctica del microscopio electrónico» dirigido por el Dr. Ooki de la Universidad de Córdoba, Argentina.
168. Hayat M. Fixation for Electron Microscopy, Academic Press. (1981).
169. Electron microscopy and Photography. Kodak Publication.
170. Grágeda M, Montesinos S: Aplicaciones de microscopia electrónica de barrido (sem) y análisis de fractura de una aleación de cu – 10 . Estudiantes del Programa de Doctorado en Ciencias de la Ingeniería, mención Ciencia de los Materiales, Facultad de ciencias físicas y matemáticas, Universidad de Chile.
171. Belloni F, Lazo G, Durso G, Lazo S Ivanov M. Abal A, Tanevich A, Pazos F, Perez P: Multidireccionalidad de las Varillas del Esmalte.

Estudio al Microscopio Electrónico de Barrido (S.E.M). Implicancias Clínicas, Facultad De Odontología - UNLP - Argentina.

172. Lazo G, Abal A, Lazo S, Durso G, Belloni F, Ivanov M, Tanevich A, Pazos F, Perez, Cagliada N: Alteraciones de las Varillas del Esmalte Ante la Aplicación de Ácidos Fosfórico, Oxálico y Maleico al SEM, Facultad de Odontología - UNLP – Argentina.

173. Información obtenida de la Unidad de Microscopía Electrónica, Centro de Investigación y Control de la Calidad, Instituto Nacional del consumo, Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid, España.

174. Silva M, Galván, Ortíz A: El Microscopio Electrónico de Barrido un Instrumento Útil para la Ciencia. Universidad Autónoma de Aguascalientes. Centro de Ciencias Básicas. Departamento de Biología. Laboratorio de Microscopio Electrónico de Barrido. Edificio 202. Av. Universidad 940. Ciudad Universitaria. Aguascalientes, México. 2010.

175. Dykstra M: Biological Electron Microscopy: Theory, Techniques and Troubleshooting. Plenum Press. 1992.

176. López M : Serie Científica Avanzada: El microscopio Electrónico. Centro de Extensión Biomédica Facultad de Medicina Universidad de Chile. Santiago de Chile, Chile. 2003.

177. Oxford Instrument microanalysis group Link ISIS operator's guide. Oxford instruments (UK) Limited microanalysis group. Vol. I. Pp 1-14. England, UK. 1997
178. Poblete V. Pilleux C. Et al: Ciencia De Los Materiales "Microscopia Electrónica De Barrido" Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas. Santiago de Chile, Chile. 2001.
179. Castell E: Hipertensión arterial. Facultad de Medicina de la Universidad de Málaga.
180. World Health Organization-International Society of Hypertension. Guidelines for the Management of Hypertension : Guidelines Subcommittee. J Hypertension; 17: 151-183. 1999
181. Banegas J, Villar F, Pérez C et al. Blood Pressure in Spain: Distribution, Awareness, Control and Benefits of a Reduction in Average Pressure. Hypertension, 32:998-1002. 1998.
182. Coca A. Control de la Hipertensión Arterial en España. Resultados del estudio Control presión 98.Hipertension; 15: 298-307. 1998.
183. Control de la hipertensión arterial en España, Madrid. Ministerio de Sanidad y Consumo- SEH/LELHA.1996.

184. Dyer A, Elliot P, Shipley M, Stamler R, Stamler J: Body Mass Index and Associations of Sodium and Potassium with Blood Pressure in INTERSALT. *Hypertension*; 26: 729-736. 1994.
185. Gong L, Zhang W, Zhu Y, Kong D, Page V: Shanghai Trial of Nifedipine in the Elderly (STONE). *J Hypertens*; 14: 1237-1245. 1996.
186. Kaplan M. *Clinical Hypertension*, 7th Edition. Baltimore, Williams & Wilkins. 1998.
187. Kasper et al: Harrison. Principles of internal medicine. 16va Edición. Edición en español.
188. Arteaga A, Maiz A, Olmos P, Velasco N: Manual de Diabetes y Enfermedades Metabólicas. Depto. Nutrición, Diabetes y Metabolismo. Escuela de Medicina. P. Universidad Católica de Chile. Santiago de Chile, Chile 1997.
189. WHO. Expert Committee on Diabetes Mellitus. Second report. Geneva Switzerland (WHO technical report series N° 646) 1980.
190. ADA. Expert Committee on the diagnosis and classification of Diabetes Mellitus. Report of the Experts. *Diabetes Care*; 20: 1183-97. 1997.
191. Summary and Recommendations of the second International Workshop. Conference on Gestational Diabetes Mellitus. *Diabetes*; 34 (Suppl.2): 123-6. 1985

192. Atkinson M , Maclaren N: The Pathogenesis of Insulin Dependent Diabetes Mellitus New. Engl. J. Med.; 331: 1428-36. 1994.
193. Sacks D, MacDonald J: The Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus. AJCP; 105: 149-57. 1996.
194. Yki-Jarvisen H: Pathogenesis of Non Insulin Dependent Diabetes Mellitus. Lancet; 343: 91-94. 1994.
195. De Fronzo R, Bonadonna R , Ferranini E: Pathogenesis of NIDDM: A Balanced Overview Diabetes Care; 15: 318-368. 1992.
196. American Diabetes Association: Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care. Vol 20. N ° 7- 1997.
197. American Diabetes Association. Role of Fat Replacers in Diabetes Medical Nutrition Therapy (Position Statement) Diabetes Care – Vol 22. Sup.1- 1999.
198. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. American Diabetes Association (ADA). Diabetes Care 35 (Supp 1). Enero 2012.
199. Silander K, Mohlke K, Scott L: Genetic Variation Near the Hepatocyte Nuclear Factor-4 Gene Predicts Susceptibility to Type 2 Diabetes. 53. 2004.
200. Federación internacional de la Diabetes FDI. 2004.

201. Riegelman R, Hirsch R: Como Estudiar un Estudio y Probar una Prueba: Lectura crítica de la literatura médica. Organización Panamericana de la Salud. Washington, Estados Unidos. 1992.
202. Polit D, Hungler B: Investigación Científica en Ciencias de la Salud. McGraw-Hill Interamericana. Mexico D.F. 1997.
203. Namakforoosh M. Metodología de la Investigación. Limusa S.A. México D.F. 2005.
204. Hernández R, Fernández C, Baptista P: Metodología de la Investigación. Caracas: McGrawHill. 2003.
205. White J: Anatomy and Structural Organization of the Platelet, in Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice, 3rd ed, p 397. JB Lippincott, Filadelfia, Estados Unidos, 1993.
206. Lauricella A: Variabilidad de las Redes de Fibrina. Fibrin network variability. Acta Bioquím Clín Latinoam; 41 (1): 7-19. 2007.
207. Lévy M, Varela M: Análisis Multivariable para las Ciencias Sociales. Pearson-Prentice Hall S.A. Madrid, España. 896p. 2003.
208. Peña D: Análisis de Datos Multivariantes. McGraw-Hill / Interamericana de España, S.A. Primera Edición. 560 p. 2002.
209. Cuadras C: Métodos de Análisis Multivariantes. Editorial Universitaria de Barcelona. Segunda Edición. 285p. 1991.

210. Hair J, Anderson R, Tatham R, Black WÑ Análisis Multivariante. 5a ed. Prentice Hall Iberia. Madrid. España. xxv + 799 p. 1999.
211. Castaño M y cols. Morfodiferenciación Ósea del Plasma Rico en Plaquetas Autólogo (PRP) Mediante Microscopía Electrónica de Barrido y Tomografía Axial Computarizada. UNAM, DF. México, 2004.
212. Vega S, Reyes–Maldonado E, Vela–Ojeda J, Xolotl–Castillo M, Cervantes L, Cerecedo–Mercado D: Estudio Ultraestructural de las Plaquetas de Pacientes con Hemoglobinuria Paroxística Nocturna. Rev. invest. clín. v.58 n.5, DF. México sep./oct. 2006.
213. Gensint G, Abbate R, Farilla S, Neri S: Changes of Platelet Function and Blood Clotting in Diabetes Mellitus. Thrombos. Haemostas (Stuttg) Alemania. 42:983-993. 197
214. Anjali A, Sharathkumar A, Shapiro D: Trastornos de la Función Plaquetaria. Segunda edición. Indiana Hemophilia and Thrombosis Center Indianápolis, Estados Unidos, abril 2008.

XII. Anexos

Anexo 1: Consentimiento Informado

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR COMO SUJETO DE INVESTIGACIÓN

Yo _____ mayor de edad, identificado (a) con la C.I. _____ domiciliado(a) en _____ actuando en nombre propio, certifico que he autorizado voluntariamente y sin coacción alguna, mi participación en el estudio clínico: *Evaluación y comparación in vitro de las características ultraestructurales de fibrina rica en plaquetas (FRP) bajo microscopía electrónica en pacientes tratados en el Postgrado de Cirugía Bucal de la UCV.* Con la finalidad de conocer las características ultraestructurales de mi sangre y sus efectos en el proceso de cicatrización y regeneración.

DECLARO que he acudido a consulta en el Postgrado de Cirugía Bucal de la UCV el día _____ habiendo sido atendido, interrogado y examinado, mi diagnóstico es _____ y el tratamiento a realizar es: _____ previo a la realización de exámenes de laboratorios rutinarios y la toma de 2 tubos de 10ml de sangre por medio de venopunción, en el mismo momento de la intervención a realizar, trabajado con los más rigurosos medios de esterilización, para la obtención de fibrina rica en plaqueta después del centrifugado con la finalidad de evaluar *in vitro* las características ultraestructurales bajo microscopía electrónica, pudiendo presentar hematomas y dolor posterior a dicha toma. Por lo tanto consiento que se me realice el tratamiento indicado, la toma de sangre según el protocolo propuesto en esta investigación y la realización del control postoperatorio según las condiciones del Postgrado de Cirugía Bucal de la UCV.

Estoy al tanto y asumo la cancelación de las tarifas de la Institución. Así mismo, se me informó que dicha investigación no generará un costo extra ni compensación ni indemnización alguna. Si mi caso puede ser de utilidad científica y a tal fin se toman fotografías y videos, en el mismo acto quirúrgico, autorizo a que sean proyectadas solamente para fines académicos y científicos siempre y cuando se me garantice el más absoluto respeto a mi intimidad de mi identidad e información. Autorizo la presencia de estudiantes de Postgrado de Cirugía Bucal y de especialistas asistentes al cirujano principal.

En tal sentido DOY MI CONSENTIMIENTO AL FACULTATIVO A REALIZAR DICHA INVESTIGACION Y EL TRATAMIENTO PERTINENTE _____ o NO CONSIENTO _____, con el buen entendido que puedo retirar este consentimiento por escrito cuando así lo desee, sin represalia, ni penalidad alguna.

Nombre del paciente: _____ Firma: _____ CI: _____
Nombre del investigador: **Daniel Requena Rachadell** Firma: _____ CI: **15396280**
COV: **24652** MSDS: **24379** TLF: **04122453559/04142553559**
Nombre de testigo: _____ Firma: _____ CI: _____
Nombre de testigo: _____ Firma: _____ CI: _____

Caracas, _____ de _____ de _____.

Rechazo el tratamiento y declaro que he sido ampliamente informado de las consecuencias de mi decisión.

Nombre del paciente: _____ Firma: _____ CI: _____
Nombre de testigo: _____ Firma: _____ CI: _____
Nombre de testigo: _____ Firma: _____ CI: _____



Oficio de aprobación de consentimiento informado por parte del
Comité de bioética

RECIBIDO 01 FEB 2012
9:00 a.m.

COMITE
BIOÉTICA
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA - UCV

Nº 0240-2012

Caracas, 01 de marzo de 2012

Ciudadano
Od. Daniel Requena.

Nos dirigimos a usted en la oportunidad de informarle que el Comité de Bioética de esta Facultad, una vez analizado el proyecto de investigación, presentado por usted bajo el título: *"Evaluación y comparación in vitro de las características ultraestructurales de fibrina rica en plaquetas (FRP) bajo microscopía electrónica en pacientes tratados en el Postgrado de Cirugía Bucal de la UCV."*

Concluye que el mismo aprueba su protocolo de investigación, por lo tanto tiene una validez de un año a partir de la fecha 01-03-2012 al 02-03-2013. Se le informa que al cabo del año debe presentar un informe sobre los resultados parciales o finales de la investigación, ya que el aval es indispensable para defender su presentación o para publicarla. En caso de no concluirlo, deberá consignar un informe con los resultados parciales antes mencionados, para prorrogar el aval o en el mejor de los casos un informe con los resultados finales de su investigación para concluir el seguimiento de la investigación por parte del Comité de Bioética.

Sin otro particular a que hacer referencia.

Atentamente.-


Prof. María J. Ferro de Fariss
Coordinadora del Comité de Bioética



MJFF/mjff

Ciudad Universitaria de Caracas, Patrimonio Mundial de la Humanidad

