



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES  
UNIDAD LEÓN**

**TEMA: Efectos del plasma rico en factores de  
crecimiento (PRGF) en cultivos con células orales.**

**FORMA DE TITULACIÓN: TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
LICENCIADO EN ODONTOLOGÍA**

**P R E S E N T A:  
Jorge Alberto Velázquez Méndez**

**TUTOR: Dr. René García Contreras**

**ASESOR: Esp. Gabriela Hernández  
Gómez**

**LEÓN DE LOS ALDAMA, GTO.  
OCTUBRE 2018**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# Efectos del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en cultivos con células orales.

---

## Índice

	Dedicatoria	
	Agradecimientos	
	Resumen y abstract	
	Introducción	
	Marco teórico	
	Capitulo 1.....	10
1	Concentrados plaquetarios .....	12
1.1	Antecedentes .....	13
1.2	Plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) .....	14
1.3	Plasma rico en plaquetas (PRP).....	15
1.4	Plasma rico en fibrina (PRF) .....	17
1.5	Diferencias entre PRP, PRF y PRGF.....	18
2	Plaquetas.....	19
3	Factores de crecimiento .....	20
4	Cultivos celulares.....	22
4.1	Concepto .....	23
4.2	Antecedentes históricos.....	23
4.3	Aislamiento de células.....	24
4.4	Mantenimiento de las células .....	25
4.4.1	Cambios de medio.....	25
4.4.2	Subcultivos .....	26
4.5	Biología del cultivo celular .....	26
4.6	Tipos de cultivo celular.....	27
4.6.1	Cultivos en Monocapa.....	27
4.6.2	Tipos de cultivos de acuerdo a su forma de cultivo .....	28
4.7	Ventajas de los cultivos celulares.....	29
4.8	Desventajas de los cultivos celulares .....	29
4.9	Usos de los cultivos celulares.....	30
5	Fibroblastos gingivales humanos, fibroblastos del ligamento periodontal humano y osteoblastos .....	31
5.1	Fibroblasto periodontal.....	31
5.2	Diferencias entre fibroblastos periodontales .....	32
5.3	Osteoblastos.....	33

# **Efectos del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en cultivos con células orales.**

---

6	Ensayos de viabilidad y proliferación celular .....	34
6.1	Ensayo de captación del rojo neutro .....	34
6.2	Ensayo de enlazamiento al azul de kenacid .....	35
6.3	Ensayo de reducción del MTT .....	36
	Capítulo 2.....	36
7	Planteamiento del problema .....	38
8	Justificación .....	39
9	Objetivos .....	39
9.1	Objetivo general.....	39
9.2	Objetivos específicos.....	39
10	Hipótesis .....	40
10.1	Hipótesis de investigación.....	40
10.2	Nula .....	40
	Capítulo 3.....	40
11	Tipo de estudio.....	42
12	Universo .....	42
13	Muestra y tipo de muestreo .....	42
14	Criterios de selección.....	42
14.1	Criterios de inclusión.....	42
14.2	Criterios de exclusión .....	42
14.3	Criterios de eliminación .....	43
15	Materiales y métodos.....	43
15.1	Implicaciones éticas .....	43
15.2	Materiales .....	44
15.3	Instrumental.....	45
15.4	Insumos .....	45
15.5	Obtención del PRGF .....	45
15.6	Ensayo de viabilidad celular .....	48
15.7	Análisis estadístico .....	51
	Capítulo 4.....	51
16	Resultados.....	53
17	Discusión .....	61
18	Conclusión .....	63

## **Efectos del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en cultivos con células orales.**

---

19	Bibliografía.....	64
20	ANEXOS .....	71

# Efectos del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en cultivos con células orales.

---

## Dedicatoria

A mí padres Luis Velázquez y Ana Méndez por su apoyo incondicional, siempre creer en mí y respaldarme en esta y en cada una de las etapas de mi vida.

A mi gemelo Luis Velázquez por siempre hacerme llegar tarde a todos lados, pero sobre todo gracias siempre haber estado a mi lado, a mi hermana Daniela Velázquez por ser siempre un gran apoyo y un ejemplo a seguir.

A mi novia Gema Vieyra por compartir toda la carrera a mi lado, por ayudarme a crecer juntos y siempre apoyarme en los momentos más complicados, muchísimas gracias por ser siempre tan importante para ti.

A mí tutor Dr. René García por su enorme paciencia y por todo su tiempo y apoyo brindado en este proyecto, desde asesorías hasta comidas en pampas.

A mí asesora la Esp. Gabriela Hernández por su gran apoyo desde el inicio de la licenciatura, por no perder nunca la fe en mí y tenerme paciencia y a la Esp. Karla Aguirre por toda su ayuda y apoyo en momentos complicado y a la Esp. Paola Campos por compartirme siempre de manera desinteresada un poco de su conocimiento.

A mis amigos de la RPSI de León por cada uno de los tantos años de amistad que hemos tenido, por estar en los buenos y malos momentos y por tantos momentos de alegría.

A mis amigos de licenciatura chuy, Paco, Diana Gv, Ale Rangel, Vico, Vicky, Beto, Chicken, machín, Grimaldi, Selina, Ashanty, Dany Márquez, Sonia, Sonora, Lalo y fany Roa por todos los buenos momentos durante toda la carrera y crecer juntos en esta una de las mejores etapas de mi vida, especialmente quiero agradecer a mis amigos Ángel Paulino por no odiarme por perderle tanto material y brindarme su sincera y desinteresada amistad y a Samuel Zatarain que siempre me brindo su apoyo y por tantos años de ser uno de mis mejores amigos

# **Efectos del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en cultivos con células orales.**

---

## **Agradecimientos**

A la Universidad Nacional Autónoma de México

A la Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad León

Al Rector Enrique Graue Wiechers

Al exdirector de la ENES-UNAM unidad León Mtro. Javier de la Fuente Hernández

A la directora de la ENES-UNAM unidad León Dra. Laura Acosta

Al programa de becas Manutención-UNAM antes pronabes

Agradecimientos a Proyecto UNAM-DGAPA: PAPIIT: IA205518, PAPIIME: PE208518.

Agradecimientos a la Red temática de Farmoquímicos del CONACyT.

# Efectos del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en cultivos con células orales.

---

## Resumen

**Título:** Efectos del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en cultivo con células órales.

**Introducción:** Actualmente el enfoque de múltiples procedimientos quirúrgicos orales está encaminado hacia promover una regeneración o en su defecto una reparación tisular más acelerada y efectiva, es por esto que el uso del PRGF y otros concentrados plaquetarios han aumentado exponencialmente en los últimos años. **Objetivo:** Investigar el papel que el plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) juega en la conducta de los fibroblastos gingivales humanos (HGF) fibroblastos del ligamento periodontal humano (HPLF) y osteoblastos humanos (HBC). **Metodología:** Se realizó un estudio *in vitro* en cultivo celulares de HGF, HPLF y HBC que fueron subcultivados con o sin medio DMEM adicionado con 25% de PRGF durante 24, 48, 72, 120 y 144 horas. La viabilidad celular del ensayo de proliferación fue determinada por ensayo MTT. Los datos fueron analizados con pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk y pruebas de t-student con un valor  $p < 0.05$  y un coeficiente de confiabilidad del 95%. **Resultados:** Se obtuvieron resultados sobre ambos grupos, observando, en el caso de HGF un promedio de viabilidad celular hasta las 144 horas de 212% con PRGF contra un 159% sin PRGF; 197% y 152% respectivamente en el caso HPLF y 122% contra 84% en HBC. En todos los grupos en los que se utilizó PRGF se observó una mejor respuesta en comparación con los grupos de control sin PRGF, sin embargo la mejoría que mostraron los grupos con PRGF no fue tan marcada como la mayor parte de la literatura científica reporta. **Conclusiones:** El uso del PRGF acelera el proceso de reparación de los tejidos, sin embargo es necesario aportar más evidencia científica que apoye a esclarecer de manera definitiva la efectividad de este producto.

**Palabras clave:** plaquetas, cultivo, reparación, regeneración, PRGF.



## Efectos del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en cultivos con células orales.

---

### Abstract

**Title:** Effects of plasma rich in growth factors (PRGF) in cultures of oral cells.

**Introduction:** Currently, the approach of multiple oral surgical procedures is aimed at promoting regeneration or, failing that, a more accelerated and effective tissue repair, which is why the use of PRGF and platelet concentrates has increased exponentially in recent years. **Objective:** To investigate the role that PRGF plays in the behavior of human gingival fibroblasts (HGF) human periodontal ligament fibroblasts (HPLF) and human osteoblasts (HBC). **Methodology:** An in vitro study was performed in cell cultures of HGF, HPLF and HBC that were subcultivated with or without DMEM medium added with 20% during 24, 48, 72, 120 and 144 hours. The cell viability of the proliferation assay was determined by MTT assay. The data were analyzed with Shapiro-Wilks normality tests and t-student tests with a value  $p < 0.05$  and a reliability coefficient of 95%. **Results:** Results were obtained on both groups, observing, in the case of HGF, the cell viability average were up to 144 hours of 212% with PRGF against 159% without PRGF; 197% and 152%, respectively, in the HPLF case and 122% versus 84% in HBC. In all the groups we used PRGF we observed a better response compared to the PRGF control groups, however, most of the groups with the PRGF were not as marked as most of the scientific literature reports. **Conclusions:** The use of PRGF accelerates the process of tissue repair, however, it is necessary to provide more scientific evidence to support the definitive clarification of the effectiveness of this product.

**Key words:** platelets, culture, repair, regeneration, PRGF.

## **Efectos del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en cultivos con células orales.**

---

### **Introducción**

El plasma rico en factores de crecimiento, por sus siglas en inglés (PRGF) puede definirse como una formulación 100% autóloga y biocompatible elaborada mediante un proceso de centrifugación de un solo paso, utilizando citrato de sodio al 3.8% y cloruro de calcio al 10% como anticoagulante y activador respectivamente. Su fundamento principal es aislar del plasma sanguíneo las proteínas responsables de la cicatrización de las heridas y de la regeneración de los tejidos con la finalidad de optimizar la reparación y acelerar este proceso de manera natural (1).

El fundamento principal de los concentrados plaquetarios se basa en la constante y sostenida liberación de factores de crecimiento contenido en las plaquetas.

Sus predecesores fueron el adhesivo de fibrina, utilizado como hemostático y adhesivo quirúrgico, posteriormente, en 1997 surgió el gel en plaquetas propuesto por Whitman y solo un año después se propuso el uso del plasma rico en plaquetas (PRP), el cual se mezcla con cloruro cálcico y trombina bovina para producir la agregación y desgranulación plaquetaria, obteniéndose factores de crecimiento (2).

Estos concentrados plaquetarios son un volumen de plasma autólogo que poseen una concentración de plaquetas superior a la de los valores basales. El valor medio de plaquetas plasmáticas es de 150.000 a 400.000/mm<sup>3</sup> aproximadamente, mientras que estos concentrados pueden tener un valor por encima de 1.000.000mm<sup>3</sup> (3).

Aunque los concentrados plaquetarios actuales como el plasma rico en plaquetas (PRP), el plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) y el plasma rico en fibrina (PRF) presentan similitudes significativas existen múltiples diferencias entre cada una de estas.

Siguiendo los mismos principios del PRP, surgió la técnica de obtención del PRGF, que requiere menores volúmenes de sangre, un equipamiento más sencillo que permite su uso en la consulta, no utiliza trombina bovina y plantea un solo paso de centrifugación con menos revoluciones, preservando la integridad de la membrana plaquetaria, permitiendo así obtener una mayor

## **Efectos del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en cultivos con células orales.**

---

concentración de factores de crecimiento; siendo un procedimiento más económico, aparentemente más eficiente y 100% autólogo (1) (4).

A pesar de toda la evidencia científica existente que respalda el uso del PRGF y de los concentrados plaquetarios, existen otros autores que afirman que el resultado en cuanto a regeneración y cicatrización es el mismo aunque no se utilice PRGF (5) (6) (7) (8) (9).

El objetivo principal del trabajo fue Investigar el papel que el PRGF juega en la conducta de HGF, HPLF y HBC, esto se realizó mediante un estudio *in vitro* en células que fueron subcultivadas con o sin medio DMEM adicionada con 25% durante 24, 48, 72, 120 y 144 horas. La viabilidad celular del ensayo de proliferación fue determinada por conteo celular con hematocitómetro y ensayo MTT.

# Capítulo 1

---

# **Efectos del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en cultivos con células orales.**

---

## **Marco teórico**

### **1 Concentrados plaquetarios**

Los concentrados plaquetarios son, como su nombre lo menciona, concentrados con un valor de plaquetas mayor al que contiene la sangre periférica; obtenidos a partir de una muestra sanguínea autóloga en la cual mediante diversos procesos (dependiendo el tipo de concentrado que se quiera obtener) se logra separar del plasma sanguíneo una porción con niveles de plaquetas hasta 5 veces mayor comparado con una porción regular de sangre periférica (10).

Estos concentrados plaquetarios son un volumen de plasma autólogo que poseen una concentración de plaquetas superior a los valores basales. El valor medio de plaquetas plasmáticas es de 150.000 a 400.000/mm<sup>3</sup> aproximadamente, mientras que en estos concentrados pueden tener un valor por encima de 1.000.000 (3).

Estos concentrados tienen su primer antecedente en cuanto a demostraciones clínicas en el año de 1986 con los estudios de Knighton y col. igualmente Marx en 1998, utilizó el PRP en cirugía maxilofacial por primera vez, así como Anitua en 1999 lo hizo con el PRGF. El Dr. Choukrun desarrolló el protocolo de PRF para odontología en 2001 (1) (11) (12) (13).

Bioquímicamente, los concentrados plaquetarios, aunque todos son diferentes, se componen de suero, leucocitos (el plasma rico en factores de crecimiento no contiene leucocitos), plaquetas y factores de crecimiento, pero aunque la presencia conjunta de todos estos elementos favorece la acción del concentrado, los elementos fundamentales son los factores de crecimiento, que ejercen la función de regeneración del lecho donante (14).

El uso de los concentrados plaquetarios está basado en la sostenida liberación de factores de crecimiento, estos factores son proteínas que desempeñan un papel esencial en la migración, diferenciación y proliferación celular. Estas proteínas incluyen factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF) factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) factor de

## **Efectos del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en cultivos con células orales.**

---

crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento fibroblástico (FGF), a pesar de que se han descrito una gran cantidad de estas proteínas, estas son las más estudiadas y con efectos más determinantes (15).

### **1.1 Antecedentes**

Los concentrados plaquetarios tienen su antecedente en la década de los setentas cuando Matras realizó sus primeras publicaciones sobre adhesivo de fibrina mientras que la primer demostración clínica de estos concentrados plaquetarios fue reportada por Knighton et al. en 1986 estos autores utilizaron el término “factor de curación de heridas derivados de plaquetas” utilizando un procedimiento de centrifugación de dos pasos pasando a nombrarlo después de un tiempo “formula de curación de heridas derivado de plaquetas” estos autores usaron el término PRP como un término general para medicina transfuncional, pero este aún no hacía mención a un tipo de concentrado plaquetario (11) (16).

Algunos años después en 1997 Whithman et al. presentan sus resultados en cirugía oral y maxilofacial de un concentrado plaquetario que era producido por un denso gradiente de separación celular en un laboratorio hematológico. Durante la recolección este producto, este fue nombrado PRP pero los autores entendieron el producto final como un gel de fibrina posteriormente llamado gel de plaquetas (17).

Un año después en 1998 inicio el uso del término PRP con Marx y Cols. los cuales propusieron el uso del PRP en la colocación de injertos óseos en cirugía oral y maxilofacial, observaron que el PRP aumentaba la concentración de plaquetas en los injertos, observándose la presencia de al menos tres factores de crecimiento: Factor de crecimiento de origen plaquetario (PDGF), y factor de crecimiento de transformación beta-1 y 2 (TGF- $\beta$ 1 y  $\beta$ 2) (12).

Durante los siguientes años existió una confusión en cuanto al protocolo que debía de seguir el PRP pues la mayoría de los estudios emplearon “protocolos internos” con modificaciones en los números de pasos de centrifugación, fuerza centrifuga y tiempo, esto llevo a una gran confusión pues incluso múltiples autores consideraban iguales todos los concentrados independientemente lo que contuvieran (18) (19).

## **Efectos del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en cultivos con células orales.**

---

En 1999, Anitua junto Biotechnology Institute, BTI, Vitoria, Spain, a dental implant company introdujeron el concepto de plasma rico en factores de crecimiento por primera vez, esto con el fin de darle visibilidad al producto en el mercado (1) (20) (21).

Algunas otras compañías empezaron emplear esta misma estrategia como el caso de Vivostat PRF®.

Posteriormente en el año de 2001 Choukroun et al. Propusieron el uso del plasma rico en fibrina (PRF) el cual es un concentrado plaquetario de segunda generación probado por primera vez en Francia (13).

En 2006 Bielecki et al. Insistió en diferenciar tanto el PRP como los concentrados plaquetarios por usos clínicos.

Posteriormente algunos autores como Evert et al. 2008 y Dohan-Ehrenfest 2009 han propuesto sistemas de clasificaciones de concentrados plaquetarios, los cuales aunque no han sido definitivos han supuesto un gran avance en cuanto al esclarecimiento de la terminología de cada uno de estos concentrados (22).

### **1.2 Plasma rico en factores de crecimiento (PRGF)**

El plasma rico en factores de crecimiento, por sus siglas en inglés (PRGF) puede definirse como una formulación 100% autóloga y biocompatible elaborada mediante un proceso de centrifugación de un solo paso, utilizando citrato de sodio 3.8% y cloruro de calcio 10% como anticoagulante y activador respectivamente. Su fundamento principal es aislar del plasma sanguíneo las proteínas responsables de la cicatrización de las heridas y con esto promover la regeneración de los tejidos así como optimizar la reparación y acelerar este proceso de manera natural (1).

El PRGF contiene plaquetas y factores de crecimiento relacionados con el proceso de reparación, además contiene proteínas plasmáticas como fibrina, fibronectina y vitronectina, entre otros. Este es el único concentrado plaquetario que no contiene leucocitos, esto con el fin de evitar sus funciones proinflamatorias (23).

El PRGF se obtiene a partir de una pequeña muestra de sangre del mismo individuo, la cual puede variar ligeramente dependiendo el caso entre 9

## **Efectos del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en cultivos con células orales.**

---

y 18ml aproximadamente. La muestra de sangre es obtenida de una vena periférica y transferida a un tubo recolector con 1.8ml de anticoagulante (citrato de sodio 3.8%).

El PRGF es posteriormente preparado en un único paso de centrifugación a 1800 rpm durante 8 minutos, esto representa una ventaja, ya que múltiples y rápidos ciclos de centrifugación pueden causar fuerzas mecánicas que aumenten la temperatura e induzcan cambios en la estructura y forma de las plaquetas, lo que puede causar una activación parcial ocasionando que parte del contenido se pierda (1).

Debido al paso de centrifugación las distintas porciones del plasma se fraccionan, separándose en tres fracciones, la primer fracción es pobre en plaquetas, la segunda contiene un número similar de plaquetas a la de la sangre periférica, la tercer porción es la fracción rica en factores de crecimiento ubicada inmediatamente por encima de la serie blanca la cual se presenta como una delgada capa blanquecina encima de la serie roja, además de una última fracción más voluminosa que contiene exclusivamente serie roja. Cabe añadir que la cantidad de cada fracción puede variar de un individuo a otro.

Una vez obtenido y separado el PRGF se prosigue a la activación del mismo la cual se realiza añadiendo cloruro cálcico al 10% la proporción que deberá de utilizarse es de 50 microlitros de cloruro cálcico por cada mililitro de PRGF (23).

El PRGF debe sus características al elevado número de plaquetas que presenta, las cuales liberan numerosas sustancias que promueven la reparación tisular y afectan la conducta de otras células, a su vez las plaquetas deben su papel fundamental en el proceso de reparación a los factores de crecimiento como el factor de crecimiento de origen plaquetario (PDGF), factor de crecimiento transformante beta (TGF-B), factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-I), factor de crecimiento fibroblástico (FGF) y factor de crecimiento epidérmico (EGF) (20).

### **1.3 Plasma rico en plaquetas (PRP)**

El uso clínico del plasma rico en plaquetas (PRP) fue reportado por primera vez en 1998 por Marx et al. este es un concentrado autólogo de



## **Efectos del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en cultivos con células orales.**

plaquetas, obtenido de una muestra de sangre del paciente y procesado a dos pasos de centrifugación (24).

El PRP es un volumen de plasma autólogo que posee una concentración de plaquetas superiores a los valores basales, los cuales son de 150.000 hasta 400.000/mm<sup>3</sup> mientras que el PRP tiene una concentración de plaquetas en plasma cerca de 1.000.000/mm<sup>3</sup>, el cual es el valor ideal para asegurar un aporte de factores de crecimiento óptimo (3).

Existen múltiples métodos estandarizados para la obtención del PRP siendo los que se muestran en la tabla 1 algunos de los más populares y en los cuales existe la polémica sobre el activador que debe utilizarse, así como el número de centrifugaciones que deben realizarse, pues a pesar de que algunos autores realizan un único paso de centrifugación, otros autores como Marx et al. aseguran que el PRP obtenido con una sola centrifugación no es más que una mezcla de PPP (plasma pobre en plaquetas) y PRP (25) (26).

### **Métodos para la obtención de PRP/PRGF**

<b>Autor</b>	<b>Anticoagulante</b>	<b>Método de Sedimentación</b>	<b>Activación</b>
<b>Gruberet al 2002</b>	Citrato Dextrosa 1:10	1400 g 10 min.	Trombina
<b>Jakse et al 2003</b>	Citrato Dextrosa 1:10	800 g 15 min	ND
<b>Eppley et al 2004</b>	Citrato Dextrosa 1:10	3200 rpm 12 min	Trombina 1000 U 10% CaCl <sub>2</sub> /ml
<b>Anitua et al 2005</b>	Citrato sódico 3.8%	PRP 460 g 18 min PPP 4500 g 12 min	22.8mM CaCl <sub>2</sub>
<b>Ranly et al 2005</b>		Preparación de cosecha	Trombina
<b>Gandhi et al 2006</b>	EDTA	1ro 1800 rpm 10 min 2do 3600 rpm 10 min	Trombina 1000 U 10% CaCl <sub>2</sub> /ml
<b>Christgau et al 2006</b>		Apheresis 5 horas antes hasta alcanzar 10 <sup>10</sup> trombocitos	
<b>Fdez Brbero et al 2006</b>	Citrato sódico 3.8%	1500 rpm 6min	CaCl <sub>2</sub> + baño caliente 20 minutos

## Efectos del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en cultivos con células orales.

<b>Duhan et al 2006</b>	Sin anticoagulante EDTA	400g 10 min PRP 300 rpm 10 min PPP	Se dejan 30 minutos hasta coagular
<b>Duhan et al 2006</b>		1000g 15 min suero (det. Factores) 1000g 15 min plasma (det. Factores)	
<b>Chang et al 2007</b>	Citrato Dextrosa 1:10	1ro 3650 rpm 6 min 2do 3000 rpm 6 min	Trombina 1000 U 10% CaCl <sub>2</sub> /ml
<b>O'Connell et al 2007</b>		1100g 6 min	Sin activación Trombina 1000 U/ml
<b>Anitua et al 2007</b>	Citrato sódico 3.8%	460 g 8 min PRP 4500 g 12 min PPP	10% CaCl <sub>2</sub> /ml
<b>Kawasami et al 2008</b>	ND	1100g 10 min. PRP Sobrenadante 2ª centrifugación PPP	
<b>Hatakeyama et al 2008</b>	Citrato sódico 3.8%	Método anitua una centrifugación 1300 rpm 7 min Método Sonleitner dos centrifugaciones 1ª 1000rpm 20 min 2ª 1600 rpm 15 min	10% CaCl <sub>2</sub> /ml
<b>Sanchez et al 2009</b>	Citrato sódico 3.8%	640 g 8 min PRP + membrana de fibrina	10% CaCl <sub>2</sub> /ml
<b>Sarkar et al</b>	Citrato sódico	840 g 10 min 1310 g min	Colágeno tipo 1

Tomado de: Revista Española de Cirugía Osteoarticular. N.º 239. Vol. 46. JULIO - SEPTIEMBRE 2009

Tabla 1

### 1.4 Plasma rico en fibrina (PRF)

El plasma rico en fibrina (PRF) es un concentrado plaquetario de segunda generación probado por primera vez en Francia por Choukroun et al. (13).

El PRF regula la inflamación y estimula el proceso de quimiotaxis. Este es un proceso que no requiere de anticoagulantes, trombina bovina, o ningún tipo de activador, lo que hace al producto más fácil de manejar y con menor grado de errores durante la etapa de preparación (27).

## **Efectos del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en cultivos con células orales.**

---

Para su preparación debe obtenerse una muestra de sangre de aproximadamente 10 ml en un tubo sin anticoagulante y centrifugarla inmediatamente a 3000 rpm durante 10 minutos. Después del proceso de centrifugación se obtiene de la parte media del tubo un coagulo de fibrina, justo debajo del plasma pobre en plaquetas (PPP) y arriba de la serie roja la cual está ubicada en el fondo del tubo. Este coagulo de fibrina se separa de la capa de glóbulos rojos, el resultado de este proceso será la obtención de una membrana de consistencia tensa-elástica, cabe resaltar que el éxito de este procedimiento depende principalmente de la velocidad de la recolección de la sangre y que esta sea inmediatamente transportada a la centrifuga (13).

### **1.5 Diferencias entre PRP, PRF y PRGF**

El plasma rico en plaquetas (PRP), y el plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) son dos concentrados plaquetarios que surgen a partir de un mismo principio, obtener una elevada concentración de plaquetas que favorezca a acelerar la reparación de heridas. A pesar de esto existen diferencias significativas entre ambos concentrados.

El PRP es un concentrado plaquetario que en la mayoría de los protocolos descritos hasta el momento lleva dos procesos de centrifugación y como activador trombina bovina, a diferencia de esto el PRGF utiliza un único ciclo de centrifugación y cloruro cálcico como activador (ambos utilizan citrato sódico como anticoagulante) adicionalmente el PRGF no contiene leucocitos a diferencia del PRP que contiene una concentración del 0-50% (28).

El plasma rico en fibrina (PRF) es otro tipo de concentrado plaquetario comúnmente utilizado que vale la pena comparar con el resto de los concentrados. El PRF es un concentrado plaquetario de segunda generación que ayuda a regular la inflamación y estimula el proceso de quimiotaxis. Este al igual que el PRGF es un proceso que requiere un único proceso de centrifugación aunque este presenta una gran diferencia en comparación con el PRP y PRGF ya que no requiere de anticoagulantes o trombina bovina, tampoco requiere de ningún tipo de activador, esto representa una gran ventaja ya que se disminuye el riesgo de errores durante la fase de preparación de la muestra, igualmente disminuye los costos del proceso (20).

## Efectos del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en cultivos con células orales.

A continuación se mostrará una tabla con algunas diferencias de los tres concentrados plaquetarios.

Concentrado plaquetario	PRF (2004)	PRGF (2001)	PRP (1998)
Protocolo	Fácil	Complejo	Muy complejo
Velocidad	Rápido	Lento	Muy lento
Reproductibilidad	Sin sesgo	Posible sesgo	Posible sesgo
Uso de anticoagulantes	No	Si	Si
Cantidad obtenible	Buena	Baja	Suficiente
Cantidad de fibrina obtenible	Alta	Baja	Baja
Cantidad de leucocitos	65%	0%	50%
Propiedades inmunomoduladoras	Si	No	Baja
Potencial neo-angiogénico	++++	++	+
Potencial osteoconduccion	Alto	Pobre	Pobre
Propiedades mecánicas	Bueno	Pobre	Suficiente
Presencia de MSCs	Si	Si	Si
Costo del protocolo	Bajo	Moderado	Alto

Tomado de: S. Gianni, A. Cielo, L. Bonanome, C. Rastelli, C. Derla, F. Corpacil, G. Falsi. Comparison between PRP, PRGF and PRF: lights and shadows in three similar but different protocols. European review for medical and pharmacological sciences. 2015; 19, 6.

**Tabla 2**

## 2 Plaquetas

Las plaquetas, también llamadas trombocitos, fueron descubiertas en 1882 por Giulio Bizzozero, estas son células nucleadas, de pequeño tamaño (2 hasta 5  $\mu\text{m}$ ), cuyo valor en sangre es de 150,000-400,000  $\text{p}/\text{mm}^3$  son provenientes de restos citoplasmáticos de los megacariocitos y que, además de tener un rol fundamental en la hemostasia y la trombosis (los cuales llevan a cabo gracias a 4 pasos: adhesión, activación, agregación y coagulación), participan también en el desarrollo de diferentes procesos tales como la remodelación tisular, la inflamación y el control de infecciones virales y

## **Efectos del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en cultivos con células orales.**

---

bacterianas. Estas células además son capaces de interaccionar y modificar la activación de neutrófilos, monocitos y linfocitos (29).

Las plaquetas tienen una vida de entre 7 y 10 días aproximadamente y su producción está regulada por la trombopoyetina, una hormona que es producida en hígado y riñones, las plaquetas son finalmente eliminadas por un proceso de fagocitosis el cual se lleva a cabo en el bazo.

El desarrollo de las plaquetas comienza con el previo desarrollo de los megacariocitos, también llamado desarrollo megacariocítico o megacariopoyesis, el cual se puede definir como el proceso por el cual las células madre hematopoyéticas, proliferan y se diferencian a megacariocitos maduros, a grandes rasgos puede resumirse en un primer precursor llamado tromboplasto, el cual se transforma en promegacariocito y después en megacariocito, que a su vez puede dividirse en dos, megacariocito granular y megacariocito maduro liberador de plaquetas (30).

Los megacariocitos poseen un gran tamaño y un núcleo poliploide y multilobulado, son células altamente especializadas cuya función es producir y liberar plaquetas a la circulación sanguínea, cada una de estas puede producir de 2000 hasta 4000 plaquetas (31).

Las plaquetas son el producto final de un proceso de los megacariocitos llamado trombopoyesis (32).

Al igual que todas las células sanguíneas, las plaquetas provienen de una célula llamada célula madre hematopoyética (33).

La hematopoyesis comienza en el saco vitalino alrededor de la segunda semana de gestación y continúa alrededor de la quinta semana en el bazo y hígado, estos dos son responsables de la hematopoyesis en el segundo trimestre del embarazo. La médula ósea comienza con la producción sanguínea hasta después del cuarto mes y continuará ejerciendo esta función durante el resto de la vida (34) (35).

### **3 Factores de crecimiento**

Los factores de crecimiento son un conjunto de proteínas presentes en plasma y plaquetas, los cuales desempeñan una función esencial en los procesos de reparación y regeneración de los tejidos, ya que estos

## Efectos del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en cultivos con células orales.

desencadenan efectos biológicos como la proliferación y diferenciación celular, angiogenesis y quimiotaxis (36).

Las plaquetas comienzan a liberar activamente estos factores de crecimiento en los 10 primeros minutos después de la coagulación, con más del 95% de los factores de crecimiento pre sintetizados secretados en el intervalo de 1 hora. Después de esta primera segregación de los factores de crecimiento, las plaquetas sintetizan y secretan factores de crecimiento adicionales durante varios días después de la lesión (37).

En la tabla 3 se observan algunas de las principales características de los factores de crecimiento más importantes (38).

Factor de crecimiento (FC)	de Origen	Función
<b>FC transformativo b (TGF b)</b>	Plaquetas, matriz ósea y cartilaginosa, macrófagos, monocitos, neutrófilos, “natural killers” y células TH1 activadas.	Proliferación de células mesenquimales indiferenciadas; inhibición de la proliferación linfocitaria y macrofágica; interviene regulando: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Mitogénesis endotelial, fibroblástica y osteoblástica.</li> <li>- Síntesis de colágeno y secreción de colagenasas.</li> <li>- Efecto mitogénico de otros FC.</li> <li>- Quimiotaxis endotelial y angiogénesis.</li> </ul>
<b>FC fibroblástico básico (FGFb)</b>	Plaquetas, macrófagos, células mesenquimales, condrocitos y osteoblastos.	Estimula mitogénesis, crecimiento y diferenciación de condrocitos y osteoblastos y la mitogénesis de células mesenquimales.

## Efectos del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en cultivos con células orales.

<b>FC derivado de plaquetas (PDGF)</b>	Plaquetas, osteoblastos, células endoteliales, macrófagos, monocitos, células musculares lisas	Estimula mitogéneis de células mesenquimales y osteoblastos; mitogénesis y quimiotáxis de células estirpe fibroblástica, glial y muscular lisa; regula secreción colgenasas; estimula mitogénesis mesenquimal y epitelial.
<b>FC factor del endotelio vascular (VEGF)</b>	Plaquetas, células endoteliales.	Incrementa angiogénesis, permeabilidad vascular y mitogénesis de células endoteliales.
<b>FC tejido conectivo (CTGF)</b>	Plaquetas.	Promueve angiogénesis, regeneración condral, fibrosis y adhesión plaquetaria.
<b>FC epidérmico</b>	Plaquetas, macrófagos y monocitos.	Estimula quimiotaxis endotelial y angiogénesis; regula secreción de colagenasas; estimula mitogénesis de células mesenquimales y epiteliales.
<b>FC insulínico tipo I</b>	Células madres Mesenquimales.	Acción estimuladora de la síntesis de matriz ósea y actúa como agente quimiotáctico que favorece la neovascularización. De forma general, estimula el crecimiento, potencian la acción de la insulina y regulan la proliferación celular.

Tomado de: R. Moreno, M. Carreño, J. Torres, J. Herreros, A Villimar, P Sánchez. Técnicas de obtención del plasma rico en plaquetas y su empleo en terapéutica osteoinductora. Farm Hosp. 2015;39(3):130-136

**Tabla 3**

## Efectos del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en cultivos con células orales.

### 4.1 Concepto

Se entiende por cultivo celular al conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de las células '*in vitro*', preservando al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas (39).

### 4.2 Antecedentes históricos

#### Tabla de antecedentes históricos cultivos celulares

Año	Autor	Antecedente
1885	Wilhem Roux	Mantuvo células de embrión de pollo en solución salina durante unos días.
1907	Harrison	Fue el primer científico que empleó técnicas <i>in vitro</i> para el estudio de fenómenos <i>in vivo</i> , realizando cultivos de médula espinal embrionaria de anfibios.
1913	Burrows y Carrel	Demostraron que la vida del cultivo se puede prolongar mediante subcultivos. En este mismo año Carrel demostró la posibilidad de mantener en cultivo células extraídas de un animal.
1916	Rous y Jones	Emplearon por vez primera extractos enriquecidos en tripsina para disociar las células de embriones de pollo, estableciendo el primer cultivo celular. Uno de los mayores problemas que describen para el establecimiento de los cultivos celulares es la aparición de múltiples contaminaciones, por lo que desarrollaron numerosos métodos de manipulación en condiciones de asepsia que aún hoy día se utilizan.
1952	Gey y col.	Establecieron la primera línea celular humana, las células HeLa, células



## Efectos del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en cultivos con células orales.

---

		extraídas a partir de un tumor de cuello del útero de una paciente afroamericana que se llamaba Henrietta Lacks.
<b>1975</b>	Kohler y Milstein	Establecen la primera línea celular productora de anticuerpos monoclonales. El establecimiento de la tecnología de obtención de anticuerpos monoclonales les valió el Premio Nobel.
<b>1976</b>	Sato y cols.	Publican una serie de trabajos que demuestran las distintas necesidades de hormonas y factores de crecimiento que precisan diferentes líneas celulares.
<b>1986</b>	Martín y Evans	Aíslan y cultivan células madre embrionarias pluripotenciales del ratón.
<b>1998</b>	Thomson y Gearhart	Aíslan células madre embrionarias humanas.
<b>2007</b>	Takahashi et al.	Reprograman células adultas de humano para convertirlas en células pluripotenciales inducidas.

(39) (40).

### 4.3 Aislamiento de células

Para el aislamiento de células de los tejidos para cultivos in vitro existen diferentes técnicas. La hidrólisis enzimática con enzimas como la colagenasa o tripsina o pronasa degradan la matriz extracelular de las células mononucleares para liberar las células mononucleares de los tejidos blandos. Otro método

## **Efectos del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en cultivos con células orales.**

---

comúnmente utilizado es el cultivo por explantes, el cual consiste en la colocación de explantes de tejido en medio de cultivo para que con esta técnica las células que crezcan sean aptas. Las células primarias o cultivos primarios son células que se cultivan directamente desde un sujeto. Exceptuando algunos derivados de tumores, la mayoría de los cultivos celulares primarios tienen un periodo de vida limitado, es decir, entran en proceso de senescencia después de cierto número de divisiones (41).

### **4.4 Mantenimiento de las células**

Los cultivos celulares siempre deben de ser mantenidos a una temperatura y medio ambiente adecuados, el cual es de 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> y 95% de humedad en la incubadora celular, esto para la mayoría de los grupos celulares, aunque estos valores pueden llegar a variar dependiendo el tipo de células. Otro factor que comúnmente puede variar es los cultivos celulares es el medio de crecimiento. La variación de las condiciones para un tipo celular concreto, puede dar lugar a la expresión de diferentes fenotipos (41).

Aunque el principio de los medios de cultivos es el mismo, las recetas de algunos de estos pueden llegar a variar en distintos factores como concentración de glucosa, pH, factores de crecimiento, antibióticos y la presencia de otros componentes nutritivos. A menudo los factores de crecimiento usados para suplementar a los medios de cultivos derivan de sangre animal, como el suero bovino (42).

#### **4.4.1 Cambios de medio**

El objetivo de realizar un cambio de medio es renovar los nutrientes y evitar la acumulación de productos metabólicos potencialmente tóxicos y de células muertas, así como evitar la sobrepoblación celular. En el caso de las suspensiones celulares, las células se separan del medio mediante centrifugación y se re suspenden en medio fresco. En los cultivos adherentes, el medio puede eliminarse directamente mediante aspiración y reemplazarse por el fresco (43).

## **Efectos del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en cultivos con células orales.**

---

### **4.4.2 Subcultivos**

El subcultivo o también llamado pase de las células se refiere al hecho de transferir un pequeño número de células a un nuevo continente, tiene como principal objetivo evitar que las células mueran debido a senescencia o sobrepoblación. Las células pueden cultivarse durante un periodo de tiempo más prolongado si se pasan regularmente, ya que de esta manera se evita la senescencia asociada a situaciones prolongadas de alta densidad celular.

Con cultivos en suspensión el pase se hace fácilmente, tomando una pequeña cantidad de cultivo que contenga unas pocas células y diluyéndola en un volumen mayor de medio fresco. En cultivos adherentes, las células deben ser inicialmente despegadas; esto suele realizarse comúnmente con una mezcla de tripsina y EDTA, aunque actualmente existen otras mezclas de enzimas para esto. Un pequeño número de las células despegadas pueden cultivarse en un nuevo recipiente (44) (45).

### **4.5 Biología del cultivo celular**

La validez de un cultivo celular como modelo de función fisiológica *in vivo* ha sido causa de polémica durante mucho tiempo pues puede llegar a presentar diversos problemas como problemas de caracterización por la alteración del desarrollo celular; la proliferación *in vitro* no se presenta de igual manera a la de *in vivo*, debido a la reducción de la relación célula-célula y la interacción matriz-célula por la no presencia de la heterogeneidad y la estructura tridimensional de las células *in vivo*, además porque el medio hormonal y nutricional se ve alterado. Esto crea un ambiente que favorece la difusión, migración y proliferación de células no especializadas, pero no a la expresión de funciones diferenciadas, a pesar de todo esto, presenta múltiples ventajas por lo cual es un modelo de trabajo sumamente aceptado (41).

En los cultivos celulares la mayor parte de las células que crecen a partir de un tejido sólido disgregado tienen la capacidad de adherirse en monocapa, o anclarse independientemente. Esta adherencia celular es mediada por receptores celulares específicos de superficie en la matriz extracelular y la dispersión celular podría ser precedida por la secreción de proteínas de la matriz extracelular y proteoglicanos por parte de la célula. Las células se

## **Efectos del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en cultivos con células orales.**

---

pueden difundir y anclar al material donde estas se cultivan a partir de ligeras cargas negativas. Las células pueden adherirse al plástico, adicionalmente si tienen una propiedad o tratamiento con descargas eléctricas o con radiación ionizante de alta energía. El cultivo en vidrio o plástico provee condiciones favorables para el crecimiento y anclaje celular (41).

Dentro de un cultivo celular primario el crecimiento dependerá de la supervivencia de éstas a las diferentes técnicas de disgregación y a la capacidad de adherirse al sustrato o de sobrevivir en suspensión. Las células capaces de proliferar podrían aumentar, algunos tipos de células podrán sobrevivir pero no aumentar y otros podrían ser capaces de sobrevivir en condiciones especiales. Además el crecimiento celular va ligado al espacio del cultivo, ya que algunas células detienen su crecimiento, mientras que otras lo incrementan (44).

Las células de humanos y tejidos pueden ser obtenidas a partir de biopsias, post-mortem, placenta o de procedimientos quirúrgicos. Se pueden cultivar una amplia variedad de cultivos de células, entre ellas células de cáncer y sangre humana para investigación (44).

### **4.6 Tipos de cultivo celular**

#### **4.6.1 Cultivos en Monocapa**

En los cultivos celulares en monocapa las células crecen adheridas sobre un soporte sólido el cual puede ser plástico o vidrio. El anclaje al sustrato es un requisito fundamental para la proliferación celular de la mayoría de los grupos celulares. Este es el método utilizado para la mayor parte de las células a excepción de las células hematopoyéticas.

Los recipientes para el cultivo de células estacionarias son cajas de Petri, frascos para el cultivo de tejido Roux, entre otros, que pueden ser de material de plástico o de vidrio previamente tratado y su desprendimiento para transferirlas a superficies mayores se realizan con agentes proteolíticos como la tripsina (41) (44).

## Efectos del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en cultivos con células orales.

---

### 4.6.2 Tipos de cultivos de acuerdo a su forma de cultivo

- **Cultivo primario**: Son cultivos los cuales provienen de células las cuales han sido disgregadas de un tejido original, puede ser tomado después de un procedimiento quirúrgico o bien post-mortem.
- **Línea celular continua**: se denomina línea celular cuando un cultivo primario es sometido a procesos de transformación que le confiere capacidad ilimitada de multiplicación.
- **Línea celular de cultivo primario**: se denomina así a un cultivo primario cuando este es subcultivado.
- **Cocultivo**: Cuando en un mismo cultivo coexisten dos tipos de células de linajes diferentes que se pueden separar recibe este nombre.

#### 4.6.2.1 Cultivos en suspensión

En este tipo de cultivo las células se encuentran dispersas en el medio de cultivo. El crecimiento de las células no dependerá de un anclaje a la superficie. Actualmente este tipo de cultivo se encuentra prácticamente limitado solo para las células hematopoyéticas, células madre, líneas celulares transformadas y células tumorales. Alcanzan la confluencia cuando el número de células es mayor a la cantidad de nutrientes obtenibles (39).

#### 4.6.2.2 Cultivos primarios

Los cultivos primarios tienen características especiales que los diferencian de las líneas celulares: conservan la morfología de las células del órgano del que fueron aisladas, sus cromosomas tienen un número diploide, su crecimiento *in vitro* es limitado y hay inhibición por contacto. El estar más cercanas a las células que las originaron, se ve reflejado en una mejor actividad y funcionalidad similar a su ambiente natural, por lo que en aislamientos primarios de cepas virales éstas tienen mayor sensibilidad que una línea celular ya establecida. Algunas de las desventajas de este tipo de cultivos es una mayor probabilidad de presentar virus adventicios o latentes, lo

## **Efectos del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en cultivos con células orales.**

---

que implica el desarrollo de la adecuada tecnología para el control de calidad (44).

### **4.6.2.3 Líneas continuas celulares**

Las Líneas celulares continuas están formadas por células que se diferencian genética y morfológicamente de las células de las cuales se originaron. Pueden provenir de células que se derivan de tumores o de un proceso de transformación de un cultivo primario mediante transfección con oncogenes o con tratamiento con carcinogénicos, lo que les confiere un nuevo fenotipo. Este tipo de cultivo tiene la característica de no tener inhibición por contacto y de crecer de manera indefinida. El paso de un cultivo primario a línea se denomina transformación. Una transformación puede inducirse fisiológicamente una interacción celular, polaridad a través de hormonas como la hidrocortisona o utilizando inductores no fisiológicos como el dimetil sulfoxido (DMS) (44).

### **4.7 Ventajas de los cultivos celulares**

Algunas de las principales ventajas cuando se utilizan cultivos celulares son, control del entorno y caracterización, lo cual permite que sea más sencillo emular condiciones ambientales específicas para los cultivos, esto a su vez permite un mayor control sobre lo que ocurre en el ambiente del cultivo y por lo tanto, resultados más predecibles, otra gran ventaja que presenta son las motivaciones éticas, ya que el uso de los cultivos celulares evita la experimentación sobre animales. Aunque los estudios *in vivo* resulten más económicos que los *in vitro* estos presentan una gran problemática, ya que el uso de la experimentación en animales resulta cuestionado en aspectos legales, morales y éticos (39) (44) (45).

### **4.8 Desventajas de los cultivos celulares**

Las técnicas de cultivo celular necesitan unas estrictas condiciones de asepsia porque las células animales crecen menos rápido que la mayoría de los contaminantes comunes como las bacterias, los mohos y las levaduras.

## **Efectos del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en cultivos con células orales.**

---

Además las células precedentes de animales no pueden desarrollarse en medios de cultivo, por lo que es necesario agregar a los medios suplementos como suero, plasma y fluidos intersticiales, entre otros para de una manera u otra proveer a las células cultivadas un medio semejante al *in vivo* (39) (44).

Los costos de producir células en cultivo son diez veces más que el uso de tejido animal, ya que se invierte bastante en ensayos o procedimientos preparativos que pueden ayudar en la estandarización del proceso reduciendo tiempo de manipulación, volúmenes de muestra, tiempos de centrifugación.

En los cultivos celulares se dificulta relacionar las células cultivadas con las células funcionales ubicadas en el tejido del cual son derivadas, esto porque en la mayoría de los casos presentan propiedades muy diferentes; para esto es necesario utilizar marcadores de células los cuales van a ser de gran ayuda en el momento de caracterizarlas en cultivo porque van a garantizar que las células crecidas en cultivo son las mismas que se sembraron y no otras. Además, suelen presentarse problemas de inestabilidad genética cuando se realizan varios pases de cultivos de células no transformadas, lo que va a originar una gran heterogeneidad en el crecimiento de las células y en su diferenciación. (45)

### **4.9 Usos de los cultivos celulares**

- Estudio de células específicas, es decir investigar cómo crecen, qué necesitan para su crecimiento, cómo y cuándo dejan de crecer, como es su bioquímica, etc.
  - Estudios virológicos.
  - Investigaciones sobre el ciclo celular, el control del crecimiento de células tumorales y la modulación de la expresión genética.
  - Estudios de interacción/señalización celular.
  - Búsqueda de modelos experimentales para estudios de la biología del desarrollo y la diferenciación celular.
  - Estudios de biocompatibilidad.

(39) (44) (45)

## **Efectos del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en cultivos con células orales.**

---

### **5 Fibroblastos gingivales humanos, fibroblastos del ligamento periodontal humano y osteoblastos**

#### **5.1 Fibroblasto periodontal**

El fibroblasto es la célula predominante de los tejidos conectivos del cuerpo y su función varía dependiendo la ubicación en que se encuentre este. Resulta de gran interés el conocer su origen, estructura, funciones y la existencia de una heterogeneidad poblacional, con el fin de comprender posteriormente, su importancia dentro de la salud y enfermedad periodontal (46).

Dentro de las principales funciones del fibroblasto resalta la producción de colágeno y elastina, aunque desempeñan múltiples funciones adicionales, tales como producción y mantenimiento de la sustancia fundamental, capacidad de sintetizar y fagocitar el colágeno y los componentes de la matriz extracelular, así como la producción de citoquinas capaces de promover la destrucción tisular y ósea (reabsorción ósea).

En resumen, los fibroblastos son células que en caso de alguna lesión, se activan, proliferan y migran hacia el sitio de la lesión y sintetizan nuevos componentes de la matriz extracelular mientras el defecto es corregido.

Ten Cate describió en el año de 1998 al Fibroblasto como “el arquitecto, constructor y responsable del mantenimiento del tejido conectivo” (47).

Los fibroblastos se presentan como células achatadas, con finas prolongaciones, núcleo oval cerrado, algo achatado, y escaso citoplasma, el cual es eosinófilo, contiene 1-2 nucléolos. En actividad (como es el caso del fibroblasto del ligamento periodontal), éste presenta un núcleo abierto, con una coloración pálida y mucho más contenido citoplasmático (48).

Bajo el microscopio electrónico, los fibroblastos activos cuentan con una gran cantidad de organelos complementarios dentro de los que se observan numerosos complejos de Golgi y perfiles de retículo endoplasmático rugoso, mitocondria y vesículas secretoras, todos indicativos de la actividad sintética y secretora manifiesta por este tipo de células. Asimismo, es posible distinguir la presencia de un citoesqueleto complejo, constituido por un sistema de



## **Efectos del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en cultivos con células orales.**

---

microtúbulos y microfilamentos, los cuales completan el patrón de complejidad estructural de esta célula multifuncional (49).

En el tejido periodontal existen 2 tipos de fibroblastos bien definidos por su localización, el fibroblasto gingival y el fibroblasto del ligamento periodontal

### **5.2 Diferencias entre fibroblastos periodontales**

La principal y más obvia diferencia entre los fibroblastos periodontales es su ubicación mientras que los fibroblastos gingivales humanos (HGF) se ubican en el tejido conectivo gingival, los fibroblastos del ligamento periodontal humano (HPLF) se localizan dentro del ligamento periodontal.

Los HGF son células de origen mesenquimal, predominantes en los tejidos conectivos gingival y periodontal; están comprometidos en el funcionamiento normal y anormal de los tejidos periodontales así como en su desarrollo, mantenimiento, reparación y defensa. Los fibroblastos alteran sus funciones normales en respuesta a citoquinas proinflamatorias, además de esto los fibroblastos producen y mantienen los componentes extracelulares que proveen la integridad del tejido, así como la producción y mantenimiento de la lámina propia del tejido gingival, siendo esta su principal función (49).

Por su parte el fibroblasto del ligamento periodontal (HPLF) es la célula principal del ligamento periodontal, produce y mantiene la inserción del tejido conectivo que provee anclaje firme del mismo dentro del alvéolo, dentro de sus principales funciones resaltan dos, producción de sustancias como colágeno tipo I, fosfatasa alcalina, inhibidor de reabsorción ósea, osteonectina y prostaglandina E<sub>2</sub> y el mantenimiento del espacio del ligamento periodontal (50).

Los HPLF son de suma importancia y tienen múltiples funciones, tienen la responsabilidad de producir, mantener y remodelar el ligamento periodontal, cemento radicular, además de esto se ha propuesto que los fibroblastos del ligamento periodontal son células multipotenciales capaces de diferenciarse en osteoblastos y cementoblastos de acuerdo al microambiente, por lo cual también estarían involucrados en el proceso de producción y remodelado del hueso alveolar (50).

## **Efectos del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en cultivos con células orales.**

---

Existen otras diferencias entre estas células además de su localización y algunas funciones, tales como su morfología aunque son casi similares, pues ambas se presentan como células alargadas de forma estrellada, prolongaciones irregulares y núcleo esférico, presentan ligeras diferencias como presencia de lagunas de glicógeno dentro de su citoplasma, las cuales alojan numerosas bandas de microfilamentos de tipo contráctil en los HPLF, mientras que estos microfilamentos no se observan en el caso de HGF. (51)

La tasa de proliferación también es una diferencia entre ambas células pues aunque son muy similares, la tasa proliferativa de HGF, es ligeramente mayor a las de HPLF (51) (52).

### **5.3 Osteoblastos**

Los osteoblastos son la célula fundamental del tejido óseo. Son células formadoras de hueso, estas están compuestas por fosfato y calcio y son las células encargadas de sintetizar la matriz ósea que compone el hueso (53).

Los osteoblastos tienen una morfología particular, con un aspecto piriforme, se caracterizan por ser células mono nucleares de núcleo grande, con aparato de Golgi y retículo endoplasmático muy desarrollado y con abundantes mitocondrias. Los osteoblastos pueden quedar incluidos en el hueso mineralizado, las células que quedan incluidas se denominan osteocitos (54).

El osteoblasto, al igual que los pre osteoblastos, los osteocitos y las células del revestimiento óseo provienen de la línea osteogénica de las células, las cuales a su vez surgen de las células mesenquimáticas primitivas del estroma de la médula ósea y de los pericitos adyacentes a los vasos sanguíneos del tejido conectivo (55).

Adicionalmente tienen un papel principal en la formación ósea, los osteoblastos expresan quimiocinas, prostaglandinas y factores de crecimiento como proteínas óseas morfogenéticas (BMP), factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), factor estimulante de colonias- (CSF-) 1, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor de crecimiento de fibroblastos básicos (FGF básico) y factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) que regula las células osteogénicas y osteoclasticas (56).

## **Efectos del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en cultivos con células orales.**

---

### **6 Ensayos de viabilidad y proliferación celular**

Diferentes autores han desarrollado pruebas *in vitro* para predecir los efectos tóxicos de drogas y diversos compuestos, utilizando como modelos experimentales cultivos primarios y órganos aislados como líneas celulares establecidas.

Muchos de las pruebas *in vitro* surgen a partir de la necesidad de conseguir un sustituto a los experimentos con animales, esto principalmente por cuestiones éticas.

Se considera como un buen método *in vitro* todos aquellos que cumplan con los postulados del principio de las tres R.

Este principio surgió en 1959, cuando Russell y Burch publicaron el libro "The Principles of Humane Experimental Technique". Las tres R se refieren a reemplazar los animales de experimentación por otros métodos que no impliquen su uso, reducir su número cuando sea necesario utilizarlos y refinar las técnicas para aminorar su sufrimiento (57).

Algunos de los ensayos *in vitro* para medir la viabilidad y proliferación más populares son:

- Ensayo de captación del rojo neutro.
- Ensayo de enlazamiento al azul de kenacid.
- Ensayo de reducción del MTT.

Para cualquiera de estos ensayos es necesario tener en cuenta que si el producto que se evalúa se precipita en el medio de cultivo, estos resultados deben ser descartados. Debe utilizarse en el ensayo un control de medio, un control de solvente y es recomendable un control positivo.

Para presentar los resultados suele realizarse un gráfico donde se exponen las concentraciones evaluadas y el porcentaje de inhibición del crecimiento celular (58).

#### **6.1 Ensayo de captación del rojo neutro**

Esta prueba es una medida de la toxicidad de un compuesto a corto o largo término, determinado por la liberación de un colorante (rojo neutro) debido a la pérdida de la viabilidad celular.

## **Efectos del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en cultivos con células orales.**

---

El rojo neutro es captado por las células (específicamente por los lisosomas y endosomas) y en la medida que la célula pierda viabilidad por la acción del compuesto que se evalúa se libera al medio el colorante pues solo las células viables son capaces de retener el colorante en su interior. Seguidamente se determina la cantidad de rojo neutro que permanece después de la exposición dentro de la célula y calculada la concentración que produce la inhibición del 50 % del crecimiento celular (59).

Bajo condiciones controladas debe asumirse que no hay salida de rojo neutro.

La densidad óptica (D.O) obtenida se toma como índice de la cantidad original de rojo neutro presente en el cultivo.

### **6.2 Ensayo de enlazamiento al azul de kenacid**

Este ensayo permite medir el cambio en el contenido de proteínas totales, lo cual constituye un reflejo de la proliferación celular. Si algún compuesto es citotóxico a la célula este afectara al menos uno o más procesos implicados en la proliferación celular como son:

- La síntesis del ADN.
- Adecuado funcionamiento de los organelos como mitocondrias, lisosomas.
- Afectación de la integridad de la membrana o en la síntesis de proteínas.

Al encontrarse afectado el crecimiento celular debe reducirse el número de células presentes en el cultivo tratado con respecto al control, por lo que la medida de la concentración de proteínas presentes en el cultivo constituye un índice de toxicidad.

Después de evaluar el producto durante un periodo de tiempo, el producto debe ser retirado y debe exponerse las células al colorante, el cual se enlaza a las proteínas celulares. Por último se determina la cantidad de azul de kenacid retenido por las células y se cuantifica el porcentaje de inhibición del crecimiento celular (60).

## **Efectos del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en cultivos con células orales.**

---

### **6.3 Ensayo de reducción del MTT**

Este método es simple y el más popular, se utiliza para determinar la viabilidad celular, dada por el número de células presentes en el cultivo lo cual es capaz de medirse mediante la formación de un compuesto coloreado, debido a una reacción que tiene lugar en las mitocondrias de las células viables.

El MTT (Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico), es captado por las células y reducido por la enzima succínico deshidrogenasa mitocondrial a su forma insoluble formazán. El producto de la reacción, el formazán queda retenido en las células y puede ser liberado mediante la solubilización de las mismas. De esta forma es cuantificada la cantidad de MTT reducido mediante un método colorimétrico, ya que se produce como consecuencia de la reacción un cambio de coloración del amarillo al azul (61).

La capacidad de las células para reducir al MTT constituye un indicador de la integridad de las mitocondrias y su actividad funcional es interpretada como una medida de la viabilidad celular. La determinación de la capacidad de las células de reducir al MTT a formazán después de su exposición a un compuesto permite obtener información acerca de la toxicidad del compuesto que se evalúa (62).

---

# Capítulo 2

---

## **Efectos del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en cultivos con células orales.**

---

### **7 Planteamiento del problema**

La cicatrización de heridas es un proceso complejo que involucra cuatro fases distintas, pero íntimamente relacionadas cada una, una fase de hemostasia, inflamación, proliferación y remodelación. La estructura única del periodonto hace que la regeneración periodontal sea un proceso más complejo en comparación con la curación de otros componentes de tejidos blandos. Requiere una interacción entre los tejidos blandos y duros, el tejido conjuntivo gingival, el ligamento periodontal, el cemento y el hueso.

Los estudios sobre la cicatrización de heridas periodontales coinciden en que la terapia periodontal convencional frecuentemente da como resultado la reparación con tejido fibroso colagenoso y la migración apical del epitelio gingival entre el tejido conectivo gingival y la superficie de la raíz. Este proceso de curación no restaura completamente la forma y la función de las estructuras perdidas y, por lo tanto, no constituye regeneración. Este proceso de cicatrización de heridas es estimulado y regulado por sustancias biológicamente activas conocidas como factores de crecimiento, que regulan procesos celulares como la mitogénesis, la quimiotaxis, la diferenciación celular y el metabolismo. En las primeras etapas de la curación de heridas, las plaquetas desempeñan un papel fundamental en la liberación de factores de crecimiento.

El plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) es una fuente autóloga de factores de crecimiento fácilmente accesible que puede tener efectos beneficiosos para la curación del tejido blando y duro al reducir significativamente el tiempo de curación de la herida. La filosofía detrás de su uso se refiere al mayor nivel de factores de crecimiento presentes en un concentrado PRGF bien preparado, el cual también promueve la regeneración periodontal.

En base a lo anteriormente descrito se plantea la siguiente pregunta de investigación:

¿Cuál es el papel que el PRGF juega en la viabilidad de los fibroblastos gingivales humanos, fibroblastos periodontales humanos y osteoblastos y que tan importante es su papel en la aceleración de los procesos de cicatrización?

## **Efectos del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en cultivos con células orales.**

---

### **8 Justificación**

El plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) es una fuente autóloga de factores de crecimiento de una sencilla obtención el cual puede tener efectos beneficiosos sobre la reparación y regeneración de los tejidos blandos y duros al reducir significativamente el tiempo de cicatrización de la herida. La filosofía detrás de su uso se basa en un nivel más concentrado de factores de crecimiento presentes en un concentrado plasmático, el cual también promueve la regeneración periodontal y aumenta la proliferación celular en hasta un 300% según diversos estudios (63).

En la institución no se tiene conocimiento de investigaciones previas acerca de este tema, por lo que abrirá las posibilidades de mayor profundización en este tema y con ello la generación de nuevo conocimiento. Beneficia además a nivel educativo y de investigación por la apertura de nuevos temas y debates acerca del uso de este material en procesos de cicatrización.

Esta investigación permitirá que en un futuro nuevas opciones de tratamiento sean ofertadas para beneficio de los pacientes así como una fase post operatoria con menores complicaciones y una recuperación más rápida y eficiente, con lo que aporta beneficio a nivel de salud pública.

### **9 Objetivos**

#### **9.1 Objetivo general**

Conocer el efecto *in vitro* del plasma rico en plaquetas (PRGF) en cultivos humano de fibroblastos gingivales humanos (HGF), fibroblastos del ligamento periodontal humano (HPLF) y osteoblastos humanos (HBC).

#### **9.2 Objetivos específicos**

1. Identificar la viabilidad celular de los cultivos empleados en presencia y ausencia de PRGF a las 24, 48, 72, 120 y 144 hrs.
2. Valorar si afecta de manera positiva o negativa la presencia del PRGF. en las poblaciones celulares estudiadas.



## **Efectos del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en cultivos con células orales.**

---

### **10 Hipótesis**

#### **10.1 Hipótesis de investigación**

El plasma PRGF estimula la proliferación celular de HGF, HPLF y HBC más del 50% en comparación a un grupo control.

#### **10.2 Hipótesis nula**

El plasma PRGF estimula la proliferación celular de HGF, HPLF y HBC en menos o igual al 50% en comparación a un grupo control.

# Capítulo 3

---

# **Efectos del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en cultivos con células orales.**

---

## **11 Tipo de estudio**

Se realizó un estudio experimental puro, prospectivo, y comparativo.

## **12 Universo**

Pacientes donadores.

Muestras de Plasma rico en factores de crecimiento (PRGF)

Células orales.

## **13 Muestra y tipo de muestreo**

Muestreo no probabilístico por conveniencia: Paciente donador de 24 años, PRGF (n=3), células orales  $2 \times 10^5$  células/mL (n=9 por grupo)

## **14 Criterios de selección**

Paciente con historia clínica dentro de la clínica de odontología de la ENES UNAM Unidad León, de 20 a 40 años de edad sin antecedente personales patológicos, antecedentes personales o heredofamiliares de cáncer, así como ningún tipo de trastornos homológico y que acepte de manera voluntaria formar parte del estudio mediante la firma del consentimiento informado.

### **14.1 Criterios de inclusión**

- Paciente con historia clínica dentro de la clínica de odontología de la ENES UNAM unidad León
- Paciente de entre 18 y 30 años de edad
- Sin antecedentes personales o heredofamiliares de cáncer
- Que acepte de manera voluntaria formar parte del estudio
- Sin trastornos homológicos
- Valor normal de plaquetas en sangre

### **14.2 Criterios de exclusión**

- Paciente que no tenga historia clínica dentro de la clínica de odontología de la ENES UNAM unidad León

## **Efectos del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en cultivos con células orales.**

---

- Pacientes mayores de 30 años de edad
- Antecedentes personales o heredofamiliares de cáncer
- Que acepte de manera voluntaria formar parte del estudio
- Presencia de trastornos homológicos
- Valor anormal (alto o bajo) de plaquetas en sangre

### **14.3 Criterios de eliminación**

- Faltas constantes a la toma de muestras
- Negarse a firmar el consentimiento informado
- Negarse a realizar los exámenes de laboratorios previos (biometría hemática) a la toma de muestras

## **15 Materiales y métodos**

### **15.1 Implicaciones éticas**

El proceso de obtención de las muestras se llevó a cabo con previo consentimiento informado, el cual se entregó al paciente voluntario del estudio y en el cual se explicó de manera clara, breve y concisa los propósitos de la investigación.

Dicho consentimiento se realizó en concordancia con la versión revisada de la declaración de Helsinki (2008) y en estricto apego a las Leyes y reglamentos vigentes en nuestro país promulgados en el Reglamento de la Ley general de salud en materia de control sanitario de la disposición de órganos, tejidos y cadáveres humanos (1984) y La ley general de salud en materia de investigación para la salud (1984) (64).

De acuerdo al reglamento de la ley general de salud y al Título Segundo: Delos aspectos éticos de la Investigación en Seres Humanos, Artículo 13, en toda investigación en la que el ser humano sea sujeto de estudio, deberán prevalecer el criterio del respeto a su dignidad y la protección de sus derechos y bienestar; para esta investigación prevalecerá lo antes mencionado de los pacientes que aceptaron donar sus dientes y tejidos orales.

## **Efectos del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en cultivos con células orales.**

---

El Artículo 16: En las investigaciones en seres humanos se protegerá la privacidad del individuo sujeto de investigación, identificándolo sólo cuando los resultados lo requieran y éste lo autorice.

Artículo 17: Se considera como riesgo de la investigación a la probabilidad de que el sujeto de investigación sufra algún daño como consecuencia inmediata o tardía del estudio. Categoría II: II.

Investigación con riesgo mínimo: Estudios prospectivos que emplean el riesgo de datos a través de procedimientos comunes en exámenes físicos o psicológicos de diagnósticos o tratamiento rutinarios, entre los que se consideran: pesar al sujeto, pruebas de agudeza auditiva, colección de excretas y secreciones externas, colección de líquido amniótico al romperse las membranas, obtención de saliva, dientes temporales y dientes permanentes extraídos por indicación terapéutica, placa dental y cálculos removidos por procedimiento profilácticos no invasores, corte de pelo y uñas sin causar desfiguración, extracción de sangre por punción venosa en adultos en buen estado de salud, ejercicio moderado en voluntarios sanos, pruebas psicológicas a individuos o grupos en los que no se manipulará la conducta del sujeto, investigación con medicamentos de uso común, amplio margen terapéutico, autorizados para su venta, empleando las indicaciones, dosis y vías de administración establecidas y que no sean los medicamentos de investigación que se definen en el artículo 65 de este Reglamento, entre otros (65).

La investigación es considerada como un riesgo mínimo al paciente.

El primer paso para la realización de este estudio fue el obtener una muestra sanguínea de parte del paciente voluntario para posteriormente procesarla y obtener la muestra de PRFC.

### **15.2 Materiales**

Para aumentar la probabilidad de éxito del proyecto durante la realización de los cultivos celulares fue necesario mantener un control estricto y minucioso de los materiales, equipos e insumos a utilizar entre los cuales se contemplaron: Equipo: Campana de flujo laminar horizontal (Lumistell<sup>MR</sup> LH-120, Celaya, Guanajuato, México), Microscopio (Leica AxioCamp MRc,

## Efectos del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en cultivos con células orales.

Wetzlar, Alemania), Centrifugadora (Beckman®, J2-MC, Indianápolis, EUA) Incubadora (Binder®, Tuttlingen, Alemania), Cámara de Neubauer (Boeco®, Alemania), Espectrofotómetro (Thermo Scientific®, Finlandia).

### 15.3 Instrumental

Micropipetas (Thermo Scientific®, Rochester, NY, EUA), frascos de cultivo Falcon® 12.5 cm<sup>2</sup> (Becton, Dickinson Labware, NJ, EUA), cajas Petri de (Thermo Scientific Rochester, NY, EUA).

### 15.4 Insumos

Buffer de fosfato (PBS, pH 7.4), suero fetal bovino (SFB) (Gibco® by Life Technologies corporation, Gran Island, NY, EUA) al 10% y 20%, Tripsina al 0,05% (Gibco® by Life Technologies corporation, Gran Island, NY, EUA), Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco® by Life Technologies corporation, Gran Island, NY, EUA), Penicilina/estreptomicina 10,000UI/ml y 10,000µg/ml (Gibco® by Life Technologies corporation, Gran Island, NY, EUA), dimetilsulfóxido (DMSO, J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, EUA).



Figura 1

### 15.5 Obtención del PRGF

Para la obtención de la muestra sanguínea se utilizó el sistema colector de sangre (BD Vacutainer® push botton, Franklin Lakes, NY, EUA). (Fig 1. Fuente: <http://bti-biotechnologyinstitute.com/es/actualidad/novedad-de-producto/nuevo-kit-de-explantacion/#>

Consultado: 03 Septiembre 2018), se limpió la zona a puncionar con alcohol y se introdujo el bisel de la aguja sobre la zona radial y se extrajeron dos porciones de 9 mm depositadas en dos tubos recolectores con 1.8 microlitros de citrato sódico al 3.8% cada uno, posteriormente la muestra fue llevada a la centrifuga del



Figura 2

del sistema (bti® endoret, Vitoria, España) y se procesó la muestra durante 8 minutos a 1800 rpm, esto con el fin de separar las distintas fases del plasma

## Efectos del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en cultivos con células orales.



**Figura 3**

sanguíneo. Después de someter la muestra sanguínea al proceso de centrifugación, la muestra se dividió en 3 fases del plasma, las dos porciones más superficiales correspondieron al plasma pobre en plaquetas, mientras que la tercer porción del plasma correspondió al plasma rico en plaquetas, además de una porción de poco menos del 50% de la muestra que corresponde a la serie roja, ubicada en el fondo del tubo recolector y una delgada capa leucocítica ubicada inmediatamente después de la serie roja (fig 2. Fuente:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001731014001793>, Consultado: 03 Septiembre 2018). Las fracciones situadas inmediatamente encima de la capa leucocítica se recogieron de cada tubo, mediante un pipeteo y se depositaron en un tubo recolector para muestras (fig 3. Fuente propia), posteriormente se transfirieron a una placa de Petri estéril, cabe añadir que previamente se añadieron (10% de cloruro de calcio) al PRGF líquido (50 microlitros por mililitro de PRGF) (PRGF-Endoret activator®, Vitoria España).

Previo al inicio del muestreo se solicitó al paciente la realización de un examen de laboratorio (biometría hemática), esto con el fin de descartar que un conteo anormal de plaquetas pudiera influenciar en los resultados del estudio. En dicha biometría hemática se pudo observar un número de plaquetas dentro de los parámetros considerados para un paciente sano, con un número de  $173,000/\text{mm}^3$ .

## Efectos del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en cultivos con células orales.

### Pasos para la obtención del plasma rico en factores de crecimiento



Figura 4 Limpieza con alcohol de la zona a puncionar



Figura 5 Colocación del torniquete para realizar la punción venosa.



Figura 7 Centrifugado de muestras para separar las distintas fases del plasma.



Figura 6 punción venosa del área cubital para obtención de muestra.



Figura 8 Separación de las distintas fases del plasma gracias al proceso de centrifugación.



Figura 9 Pipeteado de la muestra para separar la porción del PRFC del resto del plasma.



Figura 11 Colocación del activador (cloruro de calcio al 10%) 5 µL por cada 1ml de plasma.

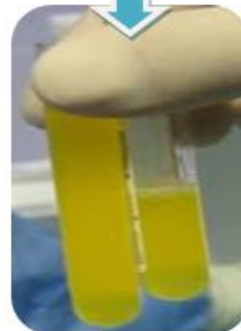


Figura 10 Aislamiento del PRFC del resto del plasma pobre en plaquetas.

Fuente propia



## **Efectos del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en cultivos con células orales.**

---

Una vez obtenido el cultivo celular de los tres grupos celulares y preparado adecuadamente el PRGF, se prosiguió con la evaluación del PRGF para valorar principalmente su capacidad en cuanto a proliferación y viabilidad celular.

### **15.6 Ensayo de viabilidad celular**

Los tres grupos celulares: fibroblastos gingivales humanos (HGF), fibroblastos del ligamento periodontal humano (HPLF) y osteoblastos (HBC) se colocaron en un plato Petri de 96 pocillos (Thermo ScientificRochester, NY, EUA) y cultivados  $1 \times 10^5$  células/mL y se evaluaron en presencia de PRGF al 25% a las 24, 48, 72, 120 y 144 horas para así valorar la respuesta que estos grupos celulares presentaban en cuanto a viabilidad y proliferación celular, además de contar con un grupo control de células en presencia únicamente de medio de cultivo  $\alpha$  MEM+10% de SFB+2% antibiotico+1% Glutamax (Gibco® by Life Technologies corporation, Gran Island, NY, EUA) y un grupo control valorado con PRGF al 25%. Adicionalmente, se realizaron cambios de medio de manera periódica a las 72 horas en cada uno de los experimentos.

Los experimentos fueron realizados por triplicado para así asegurar la reproductibilidad del estudio.

Para evaluar los resultados de ambos grupos, se realizó un conteo celular con hematocitómetro, además del ensayo de metil tiazol tetrazolio MTT (Sigma, Basilea, Suiza). El ensayo de MTT se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazán), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas ya que solo las células viables son capaces de reducir MTT a formazán. Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido. La lectura se realizó en un espectrofotómetro a 570nm (Thermo Sientific®, Multiscank Go, Finlandia) con el programa XFluor basado en Microsoft Excel®.

## Efectos del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en cultivos con células orales.

Este método fue desarrollado por Mosmann en 1983 siendo modificado en 1986 por Francois Denizot y Rita Lang.

Para realizar cada uno de los experimentos fue de vital importancia mantener los grupos celulares en un medio ambiente idóneo para su existencia es por esto que durante cada periodo de evaluación los cultivos debieron de ser en colocados en una incubadora celular (Binder®, Tuttlingen, Alemania), que proporcionara estos medios de manera adecuada, la temperatura a la que se mantuvieron los cultivos celulares fue a 37° con una concentración de CO<sub>2</sub> del 5% (fig 13. fuente propia).



Figura 13

El estudio se realizó siempre manteniendo un ambiente lo más estéril posible para así evitar la contaminación de las muestras, para esto fue necesario trabajar las muestras en una Campana de flujo laminar horizontal (Lumistell<sup>MR</sup> LH-120, Celaya, Guanajuato, México), utilizando material estéril



Figura 14

para todo lo que estuviera en contacto directo con el medio de cultivo y desinfectando con alcohol el área de trabajo y todo el material que entrara en la campana de flujo; colocando después durante un lapso de 10 minutos luz UV, las soluciones que entraron en el área de trabajo únicamente se desinfectaron con alcohol, todo esto con el fin de evitar la contaminación de la muestras (fig 14

fuentes propia).

## Efectos del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en cultivos con células orales.

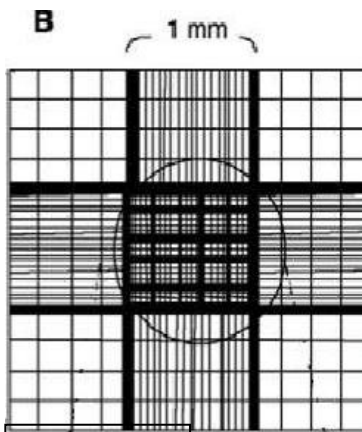


Figura 15

Una vez transportado y delimitado adecuadamente la muestra al plato de Petri, se prosiguió a realizar las pruebas de proliferación y vitalidad celular (conteo celular con hematocitómetro (fig 15. Fuente propia) y ensayo MTT para esto, durante cada periodo de evaluación, se retiró el medio de cultivo y se agregó 50  $\mu\text{L}$  de tripsina, se pipeteó y se colocó en la incubadora durante 10 minutos, posterior a este periodo, se retiró el plato de la incubadora y transportó una porción del cultivo celular al hematocitómetro y se observó el número de células bajo microscopio, el conteo de cada grupo se realizó por triplicado, posterior a esto se obtuvo una media, esto para asegurar la reproductibilidad del estudio, terminado el conteo celular con hematocitómetro, se retiró el medio de cultivo del segundo pocillo y se agregó 100  $\mu\text{L}$  MTT, una vez realizado esto se incubó la caja durante un periodo de 24 horas, pasadas las 24 horas se retiró la caja de la incubadora y se retiró el medio MTT, para inmediatamente después de esto agregar 50  $\mu\text{L}$  de dimetil sulfoxido (DMSO, J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, EUA) el cual se pipeteó evitando generar burbujas, para posteriormente transportarlo a una nueva caja que serviría para colocar las muestras de MTT, una vez transportado las muestras, se evaluaron en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 570 nm.



Figura 16

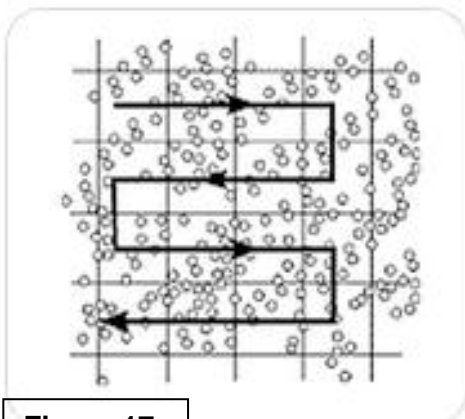


Figura 17

Por otra parte el conteo celular con hematocitómetro se realizó colocando una pequeña muestra del medio de cultivo del grupo celular en un cubreobjetos y llevando a su vez este cubre objetos al hematocitómetro, también llamado cámara de Neubauer (Boeco®, Alemania), una vez llevada la muestra al hematocitómetro, se observó la muestra bajo microscopio y se prosiguió a realizar el conteo celular, este se realiza contando la cantidad de

## Efectos del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en cultivos con células orales.

células visibles en cada uno de los cuatros cuadrantes, esto como se muestra en la figura 16 (fuente propia), el conteo se realiza en ambas cámaras (superior e inferior) y siempre debe de llevar el mismo orden al momento de realizar el conteo, esto será iniciando con el cuadro superior izquierdo de cada cuadrante y continuando a manera de zigzag, esto como se explica en la figura 17 (fuente propia).

La viabilidad y proliferación celular fueron evaluadas a las 24, 48, 72, 120 y 144 horas en ambos grupos, el diseño de la caja Petri se realizó en base a esto.



**Figura 18**

El diseño de la caja Petri para el muestreo consistió en 3 hileras horizontales desde A hasta F, cada una representando los grupos celulares que se utilizaron para el muestreo y cada grupo abarcó dos pocillos de manera vertical, uno para el conteo con hematócrito y el otro para el ensayo MTT. Adicionalmente se trazó una línea vertical a la mitad del plato para dividir las muestras positivas (con PRGF) y las muestras negativas (sin PRGF) y cada una de estas muestras contó con 5 pocillos de manera horizontal, representando las muestras de 24, 48, 72, 120 y 144 horas comenzando de izquierda a derecha (fig 18. Fuente propia).

### 15.7 Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados con pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk, con una prueba de *t*-student y *t*-student pareada para comparar la proliferación celular. La significancia estadística fue fijada con un valor de 0,05 y un coeficiente de confiabilidad del 95%. Los datos fueron representados con gráficos.

---

# Capítulo 4

---

## **Efectos del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en cultivos con células orales.**

---

### **16 Resultados**

Una vez transcurridas las 144 horas del periodo de evaluación de las muestras y habiendo replicado el experimento por triplicado se prosiguió a capturar y analizar los datos, obteniendo un valor medio de los tres experimentos, con el objetivo principal de comparar los resultados obtenidos entre el grupo positivo con PRGF y el grupo control sin PRGF, así como realizar un análisis estadístico para comprobar la significancia estadística del presente trabajo.

En la gráfica 1 y 2 se puede observar la comparación en cuanto a la proliferación celular que se presentó en cada uno de los grupos, cada una expresada en porcentajes, representando los resultados obtenidos en cuanto a los fibroblastos gingivales humanos (HGF).

En la gráfica 1 podemos observar el nivel en cuanto a proliferación (HGF) donde se puede observar, expresado en color azul el grupo celular en presencia de PRGF, un aumento en la población celular de HGF que alcanza un pico máximo de proliferación a las 48 horas aumentando en poco más del doble la población inicial de los HGF, observando después de esto un descenso en la población celular; a su vez, expresado en color rojo, se puede observar el grupo control de HGF en el cual se pueden observar resultados similares a los del grupo positivo pero en menor escala, observando igualmente un pico máximo de acción a las 48 horas y un posterior descenso de HGF.

## Efectos del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en cultivos con células orales.

Conteo celular con hematocitómetro de fibroblastos gingivales humanos con y sin PRGF

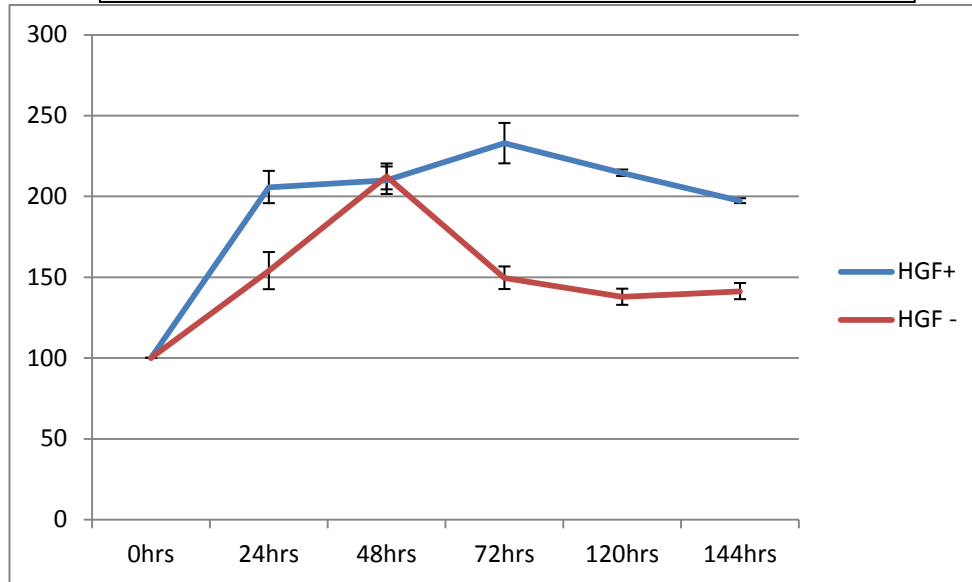


Gráfico 1

Por otra parte, en el gráfico 2, se pueden observar valores similares, pero con la diferencia de que en esta se presentan picos de acción muy marcados, presentando igualmente el pico máximo de acción a las 48 horas pero mientras en el grupo positivo con PRGF se mantiene hasta las 120 horas y después presentando un pico crítico de descenso a las 144 horas, en el grupo control se observa una caída drástica de la población celular después de las 48 horas.

## Efectos del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en cultivos con células orales.

Ensayo MTT de fibroblastos gingivales humanos con y sin PRGF

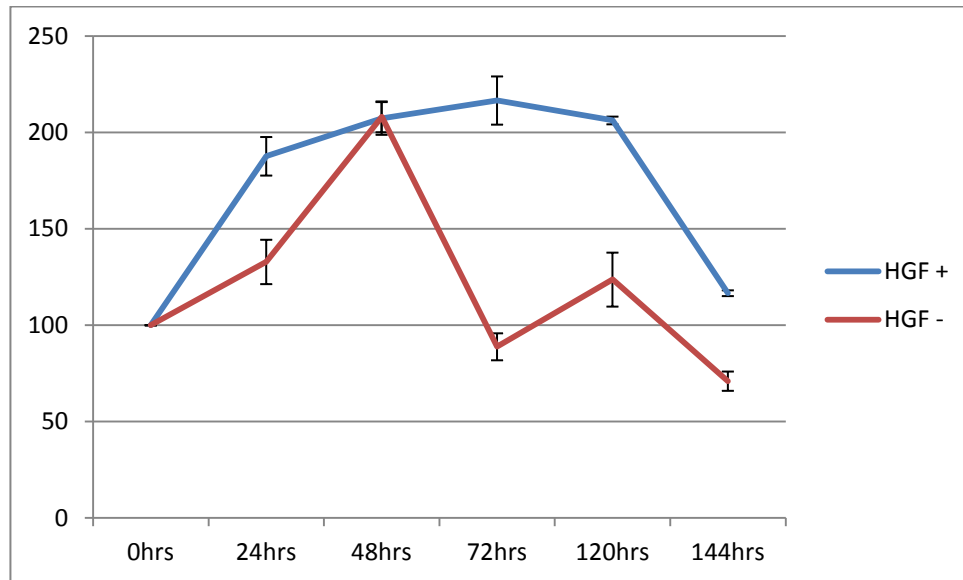


Gráfico 2

La gráfica 3 y 4 corresponden al estudio de los fibroblastos del ligamento periodontal humano (HPLF); en el gráfico 3 se observa un nivel de distribución similar al visto en el gráfico 1, alcanzando igualmente su pico máximo de acción a las 48 horas, duplicando en el caso del grupo con PRGF la población celular original del cultivo, para posteriormente comenzar a disminuir. El grupo control sin PRGF presentó resultados similares al grupo positivo pero en menor escala y sin una proliferación tan acelerada, especialmente en la respuesta a las 24 horas.



## Efectos del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en cultivos con células orales.

Conteo celular con hematocitómetro de fibroblastos del ligamento periodontal humano con y sin PRGF

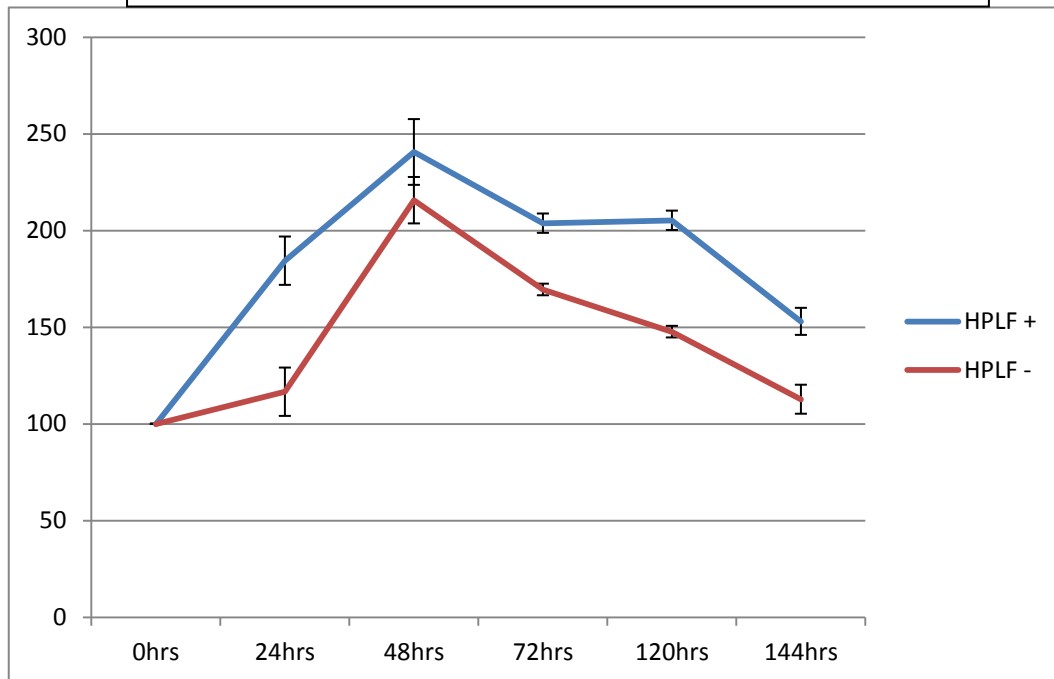


Gráfico 3

El gráfico 4, el cual representa el mismo grupo celular, pero evaluado con el ensayo MTT, presentó similitudes significativas a las del gráfico 2, ya que se puede observar de igual manera una reproducción exponencial a las 48 horas pero un posterior descenso de manera drástica a las 72 horas en el grupo control sin PRGF, a diferencia del gráfico 2, en este no se presentó una recuperación en el siguiente periodo de evaluación a las 120 horas.

## Efectos del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en cultivos con células orales.

### Ensayo MTT de fibroblastos del ligamento periodontal humano con y sin PRGF

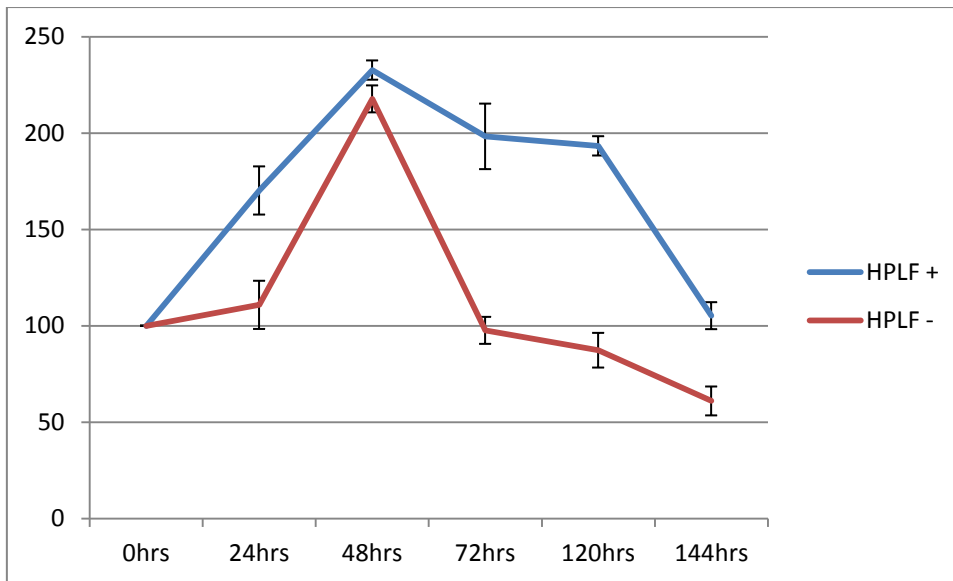


Gráfico 4

En los gráficos 5 y 6 donde se observó la respuesta de la proliferación celular de osteoblastos. En la gráfica 5, al igual que en las de los dos grupos anteriores, se puede distinguir un pico máximo de acción a las 48 horas y un posterior descenso de la población celular, aunque siendo este descenso de manera mucho más gradual, pero en este caso se observa únicamente en el grupo positivo con PRGF mientras que en el grupo control sin PRGF, se observa que la población celular se mantiene estable, sin picos de acción muy marcados, en esta muestra (sin PRGF) la población celular disminuyó a la observada inicialmente y esta nunca recuperó su valor, es decir, se mantuvo por debajo de la cantidad contabilizada previo al inicio de la muestra.

## Efectos del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en cultivos con células orales.

### Conteo celular con hematocitómetro de osteoblastos con y sin PRGF

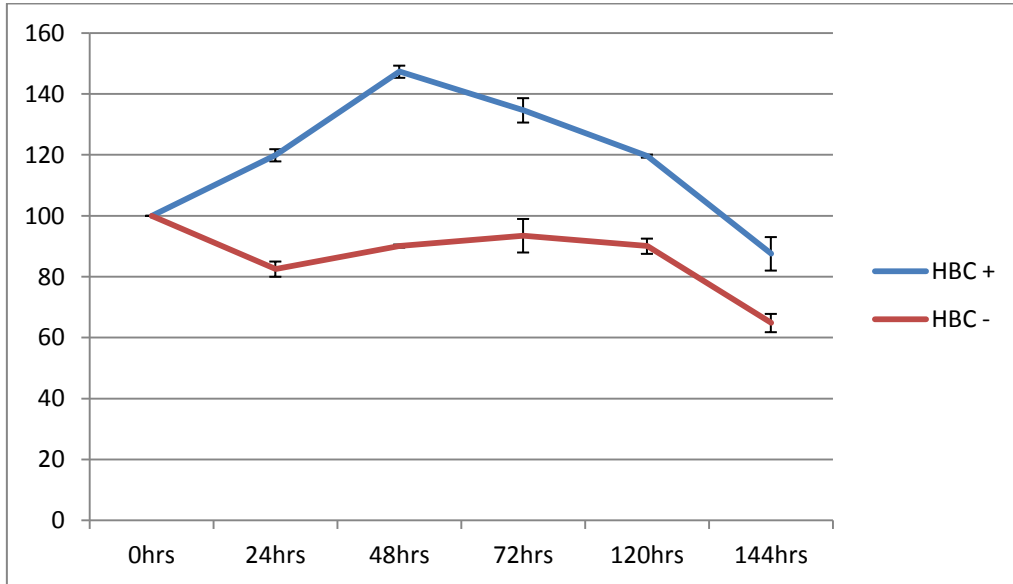


Gráfico 5

En la gráfica 6 se observa la viabilidad celular del ensayo de MTT del grupo con osteoblastos, donde igualmente, se observó su pico máximo de acción a las 48 horas, pero en este caso, posterior a las 48 horas, se observó un descenso menor a los valores iniciales, esto en el caso de la muestra positiva con PRGF, en el caso del grupo control, al igual que en el conteo celular con hematocitómetro, descendió por debajo de su nivel inicial desde las 24 horas, para posteriormente continuar descendiendo de manera gradual.

## Efectos del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en cultivos con células orales.

### Ensayo MTT de osteoblastos con y sin PRGF

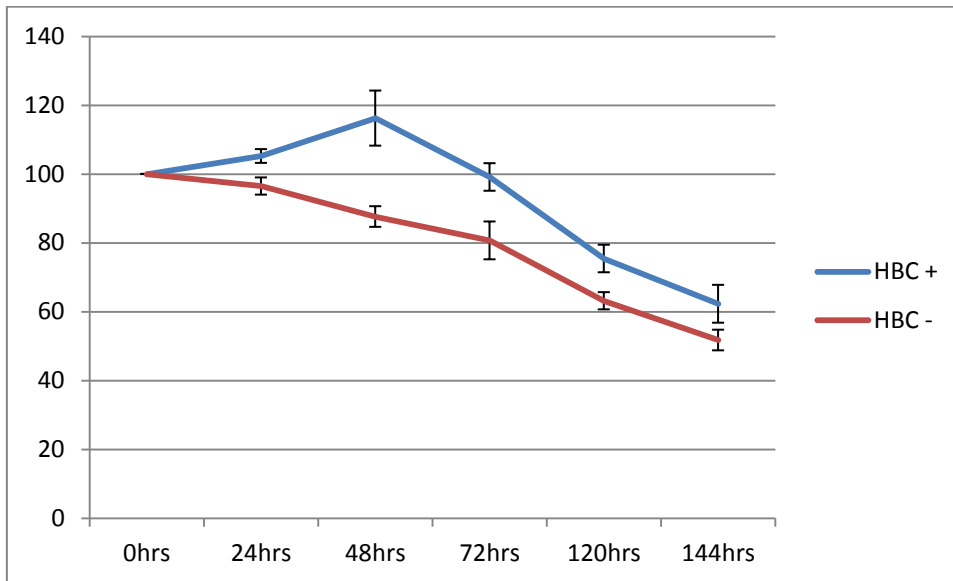
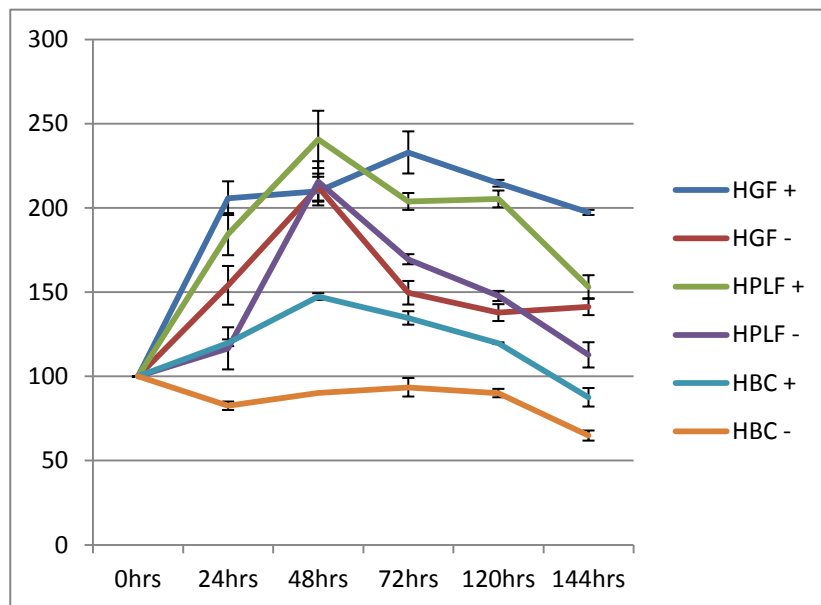
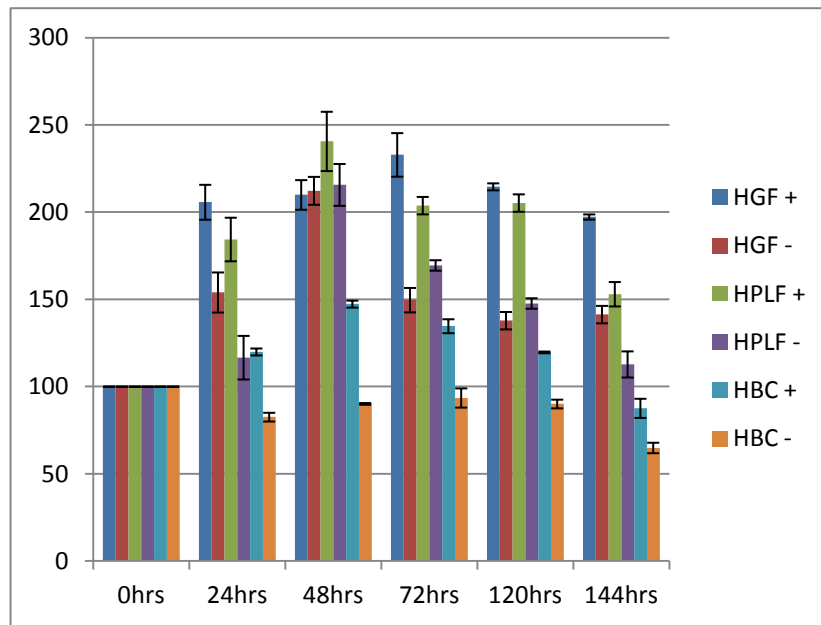


Gráfico 6

En las gráficas 7 y 8 podemos observar de manera gráfica y completa, la comparación expresada en porcentaje, entre los tres grupos celulares, así como la diferencia entre los grupos positivos y los grupos control, la gráfica 7 está representada en una grafica lineal mientras que la gráfica 8 se observa en una gráfica de barra.

## Efectos del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en cultivos con células orales.

Gráfico comparativo de los tres grupos celulares con y sin PRGF



## Efectos del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en cultivos con células orales.

Tiempo (hrs)	HGF		HPLF		HBC	
	+	-	+	-	+	-
0	75 ± 0	75 ± 0	87 ± 0	87 ± 0	61 ± 0	61 ± 0
24	154.3 ± 20	115.4 ± 23	160 ± 25.7	101.4 ± 25.2	73.1 ± 4.6	50.3 ± 5
48	157.4 ± 17.4	159.2 ± 16	209 ± 34.7	187.6 ± 24.6	89.8 ± 4.3	54.9 ± 1.7
72	174.6 ± 25.5	112.1 ± 14.4	177 ± 10.2	147.4 ± 6.8	82.1 ± 8.3	57 ± 11.1
120	160.9 ± 4.5	103.3 ± 10	179 ± 10.8	128.4 ± 6.1	72.9 ± 1.7	54.9 ± 5.6
144	147.9 ± 3.6	105.9 ± 10.5	133 ± 13.8	98 ± 15.5	53.4 ± 11.3	39.5 ± 6.6

**Tabla 3**

Conteo celular con hematocitómetro de los tres grupos celulares y su respectiva desviación estándar expresada en números.

## 17 Discusión

En el año de 1999, Anitua introdujo el concepto de plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) por primera vez, a partir de esto se han realizado múltiples estudios para comprobar o refutar su supuesta eficacia en cuanto a la aceleración de la cicatrización (20).

A lo largo de los años múltiples autores han defendido la eficacia del PRFC esto basado en evidencia mediante múltiples estudios, tanto clínicos como *in vitro*.

En el año de 1999, Anitua observó en un estudio clínico que no se presento ningún efecto negativo en pacientes que utilizaron PRGF, además mencionó que en el 100% de los casos observó mejor epitalización comparado con los pacientes que no fueron tratados con PRGF, por último, observó que se encontró mayor cantidad y calidad en cuanto a regeneración ósea de hueso maduro en los pacientes tratados con PRGF (20).

Posteriormente en el año de 2015 Vahabi et al. observaron en un estudio con ensayo MTT a 24, 48 y 72 horas que la viabilidad en fibroblastos gingivales humanos aumento a poco más del 200% a las 48 y 72 horas en las muestras con PRGF mientras que el grupo control, a pesar de aumentar su valor inicial alcanzando su pico máximo a las 48 horas (150%) tuvo una respuesta menor, además que esta cifra disminuyó al 127% a las 72 horas, comparado con el

## **Efectos del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en cultivos con células orales.**

---

grupo con PRGF que se aumento ligeramente su población (63), resultados similares a los aquí encontrados.

Kobayashi et al. en 2017 mediante un estudio *in vitro* con fibroblastos gingivales humano (HGF), fibroblastos del ligamento periodontal humano (HPLF) y osteoblastos (HBC) observaron que el PRGF promovía la proliferación celular de HGF y HPLF en hasta un 300% y que esta curva de aumento poblacional se mantenía constante hasta el décimo día, por otra parte no se observó un incremento significativo en la proliferación celular de HBC (66).

A pesar de la evidencia científica que respalda el uso del PRFC existen otros autores e investigaciones que afirman que el uso de concentrados plaquetarios no promueve la aceleración de la reparación y regeneración celular y que por el contrario puede promover efectos negativos.

En 2005 Choi et al. realizaron un estudio *in vitro* en el cual suplementaron altas concentraciones de PRFC en cultivos de células del hueso alveolar, el resultado fue un descenso en la concentración de la proliferación y viabilidad celular. Concluyendo con que esos resultados apoyaban la opinión que las variaciones en los concentrados plaquetarios podían influir en el resultado final en la aplicación de estos productos (67).

Molina-Miñano observaron en un estudio realizado en conejos neozelandeses que a pesar de la evidencia científica a favor de la aplicación de PRFC en defectos infraóseos, en su estudio no se observó significancia estadística en cuanto a potencial regenerativo, esto en el año de 2009 (68).

J. Carrasco concluyó en el año de 2009 que la falta de un consenso sobre la composición y la producción de los concentrados plasmáticos hacía imposible establecer un estándar que integrara todos los trabajos de investigación, por lo cual afirmó que no existía evidencia suficiente para respaldar el uso del PRGF y proponía realizar estudios experimentales en los que se incluya, la determinación y cuantificación de los factores de crecimiento *in situ* en la aplicación del PRP en la regeneración de las lesiones que nos permita profundizar en el conocimiento del comportamiento biológico de los factores de crecimiento plaquetarios en la reparación ósea (5).

## **Efectos del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en cultivos con células orales.**

---

Las limitantes del estudio se identificaron durante el proceso de preparación de las muestras de PRGF ya que no siempre fue obtenida la misma cantidad del factor, por lo que se sugiere estandarizar un protocolo.

Proyectos a futuro deberán considerar asimismo que los productos ricos en plaquetas son muy efectivos y se sugiere la evaluación en cultivo celular. Además, es recomendable profundizar la investigación realizando más ensayos tanto clínicos como en cultivos celulares tanto en el PRGF como en el resto de concentrados plaquetarios.

### **18 Conclusión**

Los resultados antes mostrados coinciden con los hallazgos encontrados en esta investigación donde los HGF aumentaron en un 197% los HPLF, 212% en HGF y 122% en HBC.

Con el análisis de los resultados es posible aceptar la hipótesis de investigación y ser soportada por la evidencia científica encontrada en este estudio, esto en el caso de los fibroblastos ya que en el caso de los osteoblastos no se observó una diferencia significativa, aunque la literatura científica menciona que los resultados en osteoblastos son considerablemente menores que en fibroblastos.

La relevancia clínica del estudio se centra en que el PRGF es un producto efectivo que es ampliamente utilizado en la práctica clínica y la evidencia científica aquí mostrada lo respalda por lo que su aplicación es sugerida.

A pesar que los resultados obtenidos en esta investigación fueron positivos se recomienda estandarizar un método para evitar posibles sesgos en la evaluación de los concentrados plaquetarios.

Finalmente, en todos los grupos así como en todos los periodos de evaluación en los que se utilizó PRGF se observó una mejor respuesta en comparación con los grupos de control sin PRGF.



## Efectos del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en cultivos con células orales.

---

### 19 Bibliografía

- 1.- Anitua E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1999; 14(4):529-535.
- 2.- Matras I. The use of fibrin glue in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg*. 1982; 7(13):181-210.
- 3.- Medlineplus.gov. (2018). *Conteo de plaquetas: MedlinePlus enciclopedia médica*. [online] disponible en: <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/003647.html> [consultado: Octubre 2018].
- 4.- Anitua E. The use of plasma-rich growth factors (PRGF) in oral surgery. *Pract Proced Aesthet Dent*. 2001; 13(6): 487-493
- 5.- Carrasco BG. Plasma Rico en Plaquetas vs. Plasma rico en factores de crecimiento. *Revista Española de Cirugía Osteoarticular*. 2009; 46(239): 127-140
- 6.- Molina-Miñano LC. Plasma rich in growth factors and bone formation: a radiological and histomorphometric study in New Zealand rabbits. *Braz Oral Res*. 2009; 23(3): 275-280.
- 7.- Choi ZK. Effect of platelet-rich plasma (PRP) concentration on the viability and proliferation of alveolar bone cells: an in vitro study. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2005; 34(4): 420-447.
- 8.- Kanno TT. Platelet-rich plasma enhances human osteoblast-like cell proliferation and differentiation. *J Oral Maxillofac Surg*. 2005; 63(9): 362-369.
- 9.- Hatakeyama BZ. Radiographic and histomorphometric analysis of bone healing using autogeneous graft associated with platelet rich plasma obtained by 2 different methods. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008; 105(13): 362-369
- 10.- Kobayashi K. Effects of platelet rich plasma (PRP) on human gingival fibroblast, osteoblast and periodontal ligament cell behaviour. *BMC Oral health*. 2017; 17(91): 9.

## **Efectos del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en cultivos con células orales.**

---

11.- Knighton CF. Classification and treatment of chronic nonhealing wounds. Successful treatment with autologous platelet-derived wound healing factors (PDWHF). *Annals of surgery*. 1986; 204(3): 322-330.

12.- Marx RE. Platelet rich plasma Growth Factors Enhancement for Bone Graft. *Oral Surg RadioEndod*. 1998; 7(46): 638-646.

13.- Choukroun JA. Une opportunité en paro-implantologie: le PRF.. *Implantodontie*. 2001; 42(7): 1294-1299.

14.- Marx RE. Quantification of Growth factor levels using a simplified method of Platelet-Rich Plasma Gel Preparation. *J Oral Maxillofac Surg*. 2000; 58(8): 297-300.

15.- Yao E. Gene therapy in wound repair and regeneration. *Wound Repair Regener*. 2000; 8(12): 443-451.

16.- Glavina BG. Plasma rich in growth factors in dentistry. *Australian Medical Journal*. 2017; 10(6): 99-104

17.- Whtiman DH. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J. Oral Maxillofac Surg*. 1997; 55(11):1294-1299.

18.- Beca HM. Plasma rico en plaquetas, una revisión bibliográfica. *Av Periodon Implantol*. 2007; 19(1): 44-56.

19.- Arora RR. Platelet-rich plasma: a literature review. *Implant Dent*. 2009 aug; 4(18):303-310.

20.- Gianni CB. Comparison between PRP, PRGF and PRF: lights and shadows in three similar but different protocols. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2015; 19(6): 927-930

21.- Anitua E. Un nuevo enfoque en la regeneración ósea. Plasma rico en factores de crecimiento (PRGF). *Int J Oral Maxillofacial Implants*. 2000; 1(2): 297-300.

22.- Ehrenfest D. In Search of a Consensus Terminology in the Field of Platelet Concentrates for Surgical Use: Platelet-Rich Plasma (PRP), Platelet-Rich Fibrin (PRF), Fibrin Gel Polymerization and Leukocytes. *Current pharmaceutical biotechnology*. 2011; 13(7):1131-1137.

## **Efectos del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en cultivos con células orales.**

---

- 23.- Anitua E. Plasma rich in growth factors. *Dental dialogue*. 2004; 3(1): 6-19.
- 24.- Marx RE. Platelet rich plasma. Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral surg oral med oral pathol oral radiol endod*. 1998;85(6):638-646
- 25.- Marxs RE. Quantification of Growth factor levels using a simplified method of Platelet-Rich Plasma Gel Preparation. *J Oral Maxillofac Surg*. 2000; 18(7): 503-571.
- 26.- Fernandez Barbero JE. Flow cytometric and morphological characterization of platelet rich plasma gel. *Clin Oral Implant Res*. 2006; 17(9): 687-693.
- 27.- Baeyens GE. The use of platelet concentrates: platelet-rich plasma (PRP) and platelet-rich fibrin (PRF) in bone reconstruction prior to dental implant surgery. *Rev Med Brux*. 2010; 31(6):521-527
- 28.- Gianni AC. Comparison between PRP, PRGF and PRF: lights and shadows in three similar but different protocols. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2015; 19(6): 927-930
- 29.- Ribatti EC. Giulio Bizzozero and the discovery of platelets. *Leuk Res*. 2007 Oct; 31(10): 1339-1341.
- 30.- Michelson. *Platelets*. 3rd ed. Elsevier; 2013.
- 31.- Rivadeneyra L. Así comienza la vida plaquetaria: un viaje desde los megacariocitos medulares a las plaquetas circulantes. *Acta Bioquím Clín Latinoam*. 2016; 2(50): 233-245.
- 32.- Zimmet R. Polyploidy: occurrence in nature, mechanisms, and significance for the megakaryocyte-platelet system. *Exp Hematol*. 2000; 28(1): 3-16.
- 33.- Lordier JA. Megakaryocyte endomitosis is a failure of late cytokinesis related to defects in the contractile ring and Rho/Rock signaling. *Blood*. 2008; 112(8): 1164- 1174.
- 34.- Djaldetti FB. Observations on the mechanism of platelet release from megakaryocytes. *Thromb Haemost*. 1979; 42(2): 611-627.

## **Efectos del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en cultivos con células orales.**

---

35.- Thon MP. Cytoskeletal mechanics of proplatelet maturation and platelet release. *J Cell Biol.* 2010; 191(4).

36.- Regeneración [Internet]. BTI Biotechnology Institute. 2018 [citado: Octubre 2018]. Disponible en: <http://bti-biotechnologyinstitute.com/mx/dental /regeneracion/>

37.- Marx RE. Platelet rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004; 62(96): 864-876.

38.- Moreno CT. Técnicas de obtención del plasma rico en plaquetas y su empleo en terapéutica osteoinductora. *Farm Hosp.* 2015; 3(39): 130-136.

39.- Stacey G. *Cell culture methods for in vitro toxicology.* 4th ed. Springer; 2011.

40.- Davis J. *Animal cell culture.* 6th ed. Wiley-Blackwell; 2011.

41.- Karp G. *Biología celular y molecular.* 6th ed. McGraw-Hill; 2011.

42.- Passarge E. *Genética.* 3rd ed. Editorial Médica Panamericana; 2010.

43.- Gil-Loyzaga P. *Cultivo de células animales y humanas.* 2nd ed. Visión libros; 2011.

44.- Freshney R. *Culture of animal cells.* 6th ed. Wiley-Blackwell; 2011.

45.- Helgason C. *Basic cell culture protocols.* 2nd ed. Human Press; 2005.

46.- Genco T. Host responses in periodontal diseases: current concepts. *J Periodontol.* 1992; 63(5): 338-355.

47.- Ten Cate A. *Ten Cate's oral histology.* 5th ed. Mosby; 2008.

48.- McCulloch LP. Periodontal ligament cell populations: the central role of fibroblasts in creating a unique tissue. *The Anatomical Record.* 1996; 245(41): 327-341.

49.- Bartold WN. Molecular and cell biology of the gingiva. *Periodontol* 2000. 2000; 24(28).

## **Efectos del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en cultivos con células orales.**

---

50.- Alves MG. Expression of osteoblastic phenotype in periodontal. *J Appl Oral Sci.* 2015; 23(2): 206–214.

51.- Acosta. El fibroblasto: su origen, estructura, funciones y heterogeneidad dentro del periodonto. *Univ Odontol.* 2006; 25(57): 26-33.

52.- McCulloch L. Periodontal ligament cell populations: the central role of fibroblasts in creating a unique tissue. *The Anatomical Record.* 1996; 245 (2):327-41.

53.- Silvio LD. Osteoblasts in bone tissue engineering. *J. Engineering in Medicine.* 2010; 224(12):1415-1440.

54.- Stefan A. Mechanisms of Bone Resorption in Periodontitis. *Journal of Immunology Research.* 2014; 15(5):1-10.

55.- Raynal PC. Bone sialoprotein stimulates in vitro bone resorption. *Endocrinology.* 1996; 137(6): 2347-2354.

56.- Giannobile KF. Matrix molecules and growth factors as indicators of periodontal disease activity. *Periodontology 2000.* 2003; 31(1): 125-134.

57.- Huggins J. Alternatives to animal testing: research, trends, validation, regulatory acceptance. *Alternatives to Animal Experimentation.* 2003; 20(1): 3-61.

58.- Giron AR. A low-cost method to test cytotoxic effects of *Crotalus vegrandis* (Serpentes: Viperidae) venom on kidney cell cultures. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2005; 47(3): 147-152.

59.- Norton. Dye exclusion viability assays using a hemacytometer. *Tech Note: Nalge Nunc International Corp.* 2000; 3(25): 67-68.

60.- Vanesa U. Caracterización de derivados polifenólicos obtenidos de fuentes naturales. Citotoxicidad y capacidad antioxidante frente a estrés oxidativo en modelos celulares. Tesis en opción de grado Científico de Doctor en Ciencias de la Salud. Barcelona: Universidad de Barcelona, España, Ciencias de la salud; 2009. Report No1 ISBN B.

61.- Shayne GC. Alternatives to in vivo studies in toxicology. In: Balantyne B, Marrs T, Syversen T. *General and applied toxicology.* USA: Grove's dictionaries Inc. 1999; 1(1): 2200-2350.

## **Efectos del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en cultivos con células orales.**

---

- 62.- Eisenbrand PZ. A. Methods of in vitro toxicology. Food Chem Toxicol. 2002; 40(2): 193-236.
- 63.- Vahabi. Effects of Plasma Rich in Growth Factors and Platelet-Rich Fibrin on Proliferation and Viability of Human Gingival Fibroblasts. Journal of Dentistry, Tehran University of Medical Sciences. 2015; 12(7): 504-512.
- 64.- WMA - The World Medical Association-Declaración de Helsinki de la AMM – Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos [Internet]. Wma.net. 2018 [consultado: 18 Octubre 2018]. disponible en: <https://www.wma.net/es/policias-post/declaracion-de-helsinki-de-la-amm-principios-eticos-para-las-investigaciones-medicas-en-seres-humanos/>
- 65.- Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud [Internet]. Salud.gob.mx. 2018 [consultado: Octubre 2018]. Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/compi/rlgsmis.html>.
- 66.- Kobayashi. Effects of platelet rich plasma (PRP) on human gingival fibroblast, osteoblast and periodontal ligament cell behaviour. BMC Oral Health. 2017; 17(1): 91-94.
- 67.- Choi ZK. Effect of platelet-rich plasma (PRP) concentration on the viability and proliferation of alveolar bone cells: an in vitro study. Int J Oral Maxillofac Surg. 2005; 34(4):420-434.
- 68.- López-Jornet CA. Effects of plasma rich in growth factors on wound healing of the tongue. Experimental study on rabbits. Med Oral Pat Oral Cir Bucal. 2009; 14(9): 425-428.
- 69.- Anitua E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of sites for implants. Int J Oral Maxillofacialimplants. 1999; 4(14): 529-535.
- 70.- Sanchez AR. Is platelet-rich plasma the perfect echancement factor A current review. Int J Oral Maxillofacial Implants. 2003; 18(1):93-103.
- 71.- Choukroun J. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part V: histologic evaluations of PRF effects on bone

## **Efectos del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en cultivos con células orales.**

---

allograft maturation in sinus lift. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006; 101(3):299-303.

72.- Ross R. The biology of platelet-derived growth factor. *Cell*. 1986; 46(2):155–169.

73.- Whitman DH. An autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg*. 1997; 55(11):1294-1299.

74.- Moreno MC. Técnicas de obtención del plasma rico en plaquetas y su empleo en terapéutica osteoinductora. *Farm Hosp*. 2015; 39(3): 130-136.

75.- Freshney I. *Culture of animal cells*. 6th ed. Wiley-Blackwell; 2011.

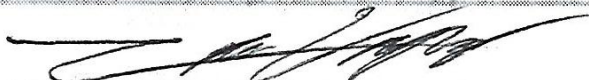
76.- Montuenga Badía L, Esteban Ruiz F, Calvo González A. *Técnicas en histología y biología celular*. 2nd ed. Masson; 2009.

77.- Davis J. *Animal cell culture*. 2nd ed. Wiley-Blackwell; 2011.

78.- Gomez A. El fibroblasto: su origen, estructura, funciones y heterogeneidad dentro del periodonto. *Univ Odontol*. 2006; 25(57):26-33.

## Efectos del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en cultivos con células orales.

### 20 ANEXOS

<b>Consentimiento Informado</b>			
Lugar	Escuela Nacional de Estudios Superiores, Unidad León; Universidad Nacional Autónoma de México. Dirección: Boulevard UNAM No. 2011, Col. Predio el Saucillo y El Potrero CP36909, León, Gto.		
Introducción	Antes de aceptar la participación en este estudio de investigación, es importante que usted lea y entienda la siguiente explicación sobre el estudio de investigación propuesto. Este documento de consentimiento describe el propósito, procedimientos, beneficios, riesgos, inconformidades y precauciones del estudio.		
Propósito	El propósito de esta investigación es los tejidos que le serán extraídos puedan ser donados a uno de los proyectos de investigación de la Escuela Nacional de Estudios Superiores, UNAM, Unidad León		
Población de los participantes	<p>Para participar en esta investigación usted tendrá que:</p> <table border="1" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 20%; text-align: center;">Paciente sano</td> <td> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Tener de 18 a 30 años de edad que acudan a la clínica de cirugía bucal de la ENES, UNAM.</li> <li>- No infectados</li> <li>- Sin enfermedades sistémicas</li> <li>- Sin toxicomanías</li> <li>- Paciente saludable de acuerdo a su historia clínica.</li> <li>- Firmar este Informe de Consentimiento.</li> </ul> </td> </tr> </table> <p>No será permitido su participación si usted:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Tiene alguna enfermedad de tejido óseo.</li> <li>- Pacientes que utilicen inmunomoduladores, esteroides, o bifosfonatos.</li> <li>- Tiene cáncer.</li> <li>- Alérgicos a la Penicilina</li> <li>- Tiene alguna enfermedad cardiovascular diagnosticada.</li> <li>- Si tiene alguna enfermedad sistémica diagnosticada.</li> <li>- Está embarazada o se encuentra bajo lactancia.</li> </ul> <p>Si usted califica, usted será uno de los participantes que colaborará en este estudio.</p>	Paciente sano	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tener de 18 a 30 años de edad que acudan a la clínica de cirugía bucal de la ENES, UNAM.</li> <li>- No infectados</li> <li>- Sin enfermedades sistémicas</li> <li>- Sin toxicomanías</li> <li>- Paciente saludable de acuerdo a su historia clínica.</li> <li>- Firmar este Informe de Consentimiento.</li> </ul>
Paciente sano	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tener de 18 a 30 años de edad que acudan a la clínica de cirugía bucal de la ENES, UNAM.</li> <li>- No infectados</li> <li>- Sin enfermedades sistémicas</li> <li>- Sin toxicomanías</li> <li>- Paciente saludable de acuerdo a su historia clínica.</li> <li>- Firmar este Informe de Consentimiento.</li> </ul>		
Procedimientos (Aproximadamente 20 minutos)	<p>A usted se le pedirá:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Leer y firmar este formulario de Informe de Consentimiento.</li> <li>• Preguntas para determinar si usted califica para participar en este estudio.</li> <li>• Preguntas acerca de su estado actual de salud.</li> </ul>		
Riesgos e Inconformidades			
Costos	No hay costo por la cual usted participe en este estudio, otro que su tiempo.		
Confidencialidad	El presente estudio tiene consideraciones de confidencialidad basado en la ley orgánica de protección de datos personales 15/1998. Donde solo se accederá al historial clínico por los monitores del estudio, los miembros del comité de bioética, las autoridades sanitarias.		
Participación Voluntaria	Su decisión de participar en este estudio es voluntaria.		
Consentimiento	<ul style="list-style-type: none"> <li>• He leído y entendido la información en este documento de informe de consentimiento. He tenido la oportunidad de hacer preguntas y todas las mismas han sido respondidas satisfactoriamente. Yo voluntariamente acepto participar en este estudio.</li> </ul>		
Firma del Participante			



## Efectos del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en cultivos con células orales.

 <b>Análisis Clínicos de León</b> <small>RESPONSABLE: D.F.B. AZYADEH COMY            CEDULA PROFESIONAL: 165541 U.N.A.M.            REGISTRO S.S.A.: 1526 S.S.G. 136</small>			
PACIENTE : VELAZQUEZ MENDEZ LUIS ALBERTO MEDICO : A QUIEN CORRESPONDA		SEXO: MASCULINO    EDAD: 24 Año(s) FECHA IMPRESIÓN: 01/03/2018 18:30 PM FOLIO : 1803011810	
FECHA : 01/03/2018			
ESTUDIO	RESULTADO	UNIDAD	VALOR DE REFERENCIA
<b>BIOMETRIA HEMATICA</b>			
<b>FORMULA ROJA</b>			
Eritrocitos:	4,940,000	mm <sup>3</sup>	Hombres 4.5 - 6.5 Mujeres 3.9 - 5.6
Hemoglobina:	14.1	g/dL	Hombres 14 - 18 Mujeres 12 - 16
Hematocrito:	41.5	%	Hombres 42 - 52 Mujeres 37 - 47
Vol. Glob. Med.	84.0	f	( 80 - 100 )
C.M. Hb:	34.0	g/dL	Hombres: 31 - 36 Mujeres: 31 - 34
Anormalidades de eritrocitos:			
<b>FORMULA BLANCA</b>			
Leucocitos:	5,570	mm <sup>3</sup>	( 5000 - 10,000 )
Monocitos:	8	%	( 0 - 10 )
Linfocitos:	49	%	( 20 - 45 )
Mielocitos:	0	%	
Metamielocitos:	0	%	
En Banda:	3	%	( 0 - 2 )
Segmentados:	37	%	( 0 - 10 )
Eosinófilos:	3	%	( 55 - 70 )
Basófilos:	0	%	( 0 - 6 )
Neutrófilos:	40	%	( 0 - 1 )
Anormalidades de leucocitos:			
<b>PLAQUETAS</b>	173,000	mm <sup>3</sup>	( 150,000 - 450,000 )
Método: Citometría de Flujo/Microscopia			