

UNIVERSIDAD DE GRANADA



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

TESIS DOCTORAL

“EL PLASMA RICO EN PLAQUETAS
COMO INDUCTOR DE PROCESOS DE
PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN
CELULAR EPITELIO-MESENQUIMAL”

GUSTAVO ÁVILA ORTIZ

DIRECTORES

PROF. D. PABLO GALINDO MORENO

PROF. D. JUAN EMILIO FERNÁNDEZ BARBERO

PROF. D^a. ELENA SÁNCHEZ FERNÁNDEZ

GRANADA 2006



Universidad de Granada

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

El trabajo de investigación que se expone en la siguiente Tesis, titulada **“EL PLASMA RICO EN PLAQUETAS COMO INDUCTOR DE PROCESOS DE PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN CELULAR EPITELIO-MESENQUIMAL”**, ha sido realizado bajo nuestra dirección por el Licenciado Don Gustavo Ávila Ortiz durante el periodo de tiempo correspondiente entre los años 2003 y 2006.

Una vez redactada, la presente memoria ha sido revisada y es adecuada para ser presentada y permitir al doctorando aspirar al grado de Doctor ante el Tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, se expide la presente en Granada a 19 de Junio de 2006,

Pablo Galindo Moreno

Profesor Asociado
Dpto. de Estomatología
U.D. de Cirugía Bucal
Facultad de Odontología
Universidad de Granada

Juan E. Fernández Barbero

Profesor Titular
Dpto. de Anatomía y Embriología
Facultad de Medicina
Universidad de Granada

Elena Sánchez Fernández

Profesora Titular
Dpto. de Estomatología
U.D. de Cirugía Bucal
Facultad de Odontología
Universidad de Granada

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mis más sinceros agradecimientos:

Al **Profesor Don Pablo Galindo Moreno**, mi maestro, mentor, profesor, tutor y director de esta Tesis Doctoral, pero sobre todo mi amigo. A él le debo no sólo el grueso de mi formación odontológica, sino el permanente aliento personal y la orientación científica en momentos de oscuridad intelectual. Su buen corazón y su excelente capacidad profesional están fuera de toda duda; no es posible conocerlo y quedarte indiferente.

Al **Profesor Don Juan Emilio Fernández Barbero**, director de esta Tesis Doctoral, su dedicación y ayuda científica han sido vitales para el desarrollo de este trabajo. Es muy difícil encontrar a una persona que, como él, sea capaz de aunar una gran capacidad de trabajo y un depurado conocimiento científico con tal valía humana y espíritu de sacrificio.

A la **Profesora Doña Elena Sánchez Fernández**, directora de este trabajo de Tesis Doctoral, el entusiasmo y la profunda dedicación que ha mostrado para la enseñanza de la Cirugía Bucal, siempre al lado del alumno, me han servido de inspiración y ejemplo para el desarrollo de mi carrera.

Al **Profesor Mr. Hom-Lay Wang**, director del Graduate Periodontics Program en la Universidad de Michigan, su trayectoria académica y profesional, así como la seriedad y el rigor que rigen su producción científica hacen de él un modelo a seguir y un espejo en el que mirarse día a día.

Al **Profesor Don Francisco Luís Mesa Aguado**, primero profesor, después amigo y compañero de viaje, por sus valiosos consejos y su honradez como persona.

A la **Profesora Doña Antonia Aránega** por el desinteresado préstamo de los medios disponibles en el laboratorio que dirige en el Departamento de Anatomía y Embriología Humana de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada.

A los **Profesores Don Francisco O'Valle Ravassa** y **Don Mariano Aguilar Peña** por poner a plena disposición de nuestras necesidades las instalaciones del Departamento de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada.

Al **Profesor Don Francisco Ruiz Cabello**, Jefe de la Sección de antígenos HLA y tumores del Servicio de Inmunología del Hospital Ruiz de Alda de Granada, y a **Doña María del Carmen Amezcua**, técnico especialista de laboratorio, por su ayuda para llevar a cabo el tipaje de las líneas celulares.

A **Doña M^a Dolores Rodríguez Martínez**, técnico especialista en Anatomía Patológica, por su agradable trato y buena disposición a la hora de realizar las técnicas de inmunohistoquímica en el Departamento de Anatomía Patológica de la Universidad de Granada.

Al insustituible personal del **Centro de Instrumentación Científica** de la Universidad de Granada por su buen hacer en todo momento.

A **Don Rafael Olivares** y **Don Antonio Navarro** por su impagable consejo, ayuda y orientación bibliográfica. Todas las bibliotecas del mundo deberían tener bibliotecarios como ellos.

A **Don Octavio Caba** por su inestimable ayuda y manifiesto compañerismo, colaborando en el desarrollo de las experiencias de laboratorio incluidas en este trabajo.

A **Don Ildelfonso Moreno Riestra** y a **Don Jesús López Martínez**, por el aliento que me han insuflado en todo momento como amigos y compañeros de profesión.

A **Doña Lorena Felip Santamaría**, por su eterno apoyo y cariño en la distancia.

A todos los familiares, amigos y compañeros a los que me es imposible citar justamente en este apartado, pero que saben quienes son y lo importantes que son para mí. Por eso les dedico este trabajo de un modo muy especial.

ÍNDICE

A. ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DE LA CUESTIÓN	1
B. INTRODUCCIÓN	8
B.2. EL CICLO CELULAR	10
B.2.1. Fases del ciclo	10
B.2.2. El potencial de proliferación	11
B.2.3. Reguladores del ciclo celular	12
A.2.3.1 Puntos de control del ciclo celular	12
A.2.3.2. Ciclinas y kinasas dependientes de las ciclinas	13
A.2.3.3. Factores de Crecimiento	14
B.3. LA SANGRE	15
B.4. EL PLASMA SANGUÍNEO	17
B.5. LOS MEGACARIOCITOS	18
B.5.1. El génesis de las plaquetas	18
B.6. LAS PLAQUETAS	20
B.7. LOS GRÁNULOS PLAQUETARIOS	24
B.7.1. Los lisosomas	24
B.7.2. Los gránulos densos	24
B.7.3. Los gránulos alfa	25
B.8. FUNCIONES DE LAS PLAQUETAS	26
B.8.1. La coagulación de la sangre	26
B.8.1.1. La fibrina	30
B.8.2. Liberación de factores mitogénicos	32
B.8.2.1. La regeneración tisular	32
B.8.2.2. Los factores de crecimiento	35
B.8.2.2.1. VEGF	38
B.8.2.2.2. PDGF	40
B.8.2.2.3. TGF- β 1	44
B.8.2.2.4. bFGF	47
B.8.2.2.5. IGF-1	49
B.8.2.2.6. EGF	51

B.9. MARCADORES DE DIFERENCIACIÓN Y PROLIFERACIÓN CELULAR	54
B.9.1. Marcadores de diferenciación celular	54
B.9.1.1. Citoqueratinas	56
B.9.1.2. Vimentina y Desmina	57
B.9.2. Marcadores de proliferación celular	58
B.9.2.1. Ki67	58
B.10. CLUSTERS DE DIFERENCIACIÓN (CD)	59
B.10.1. Los anticuerpos monoclonales	59
B.10.2. La nomenclatura CD	61
B.10.2.1. CD10	62
B.10.2.2. CD41	63
B.10.2.3. CD56	63
B.11. INTERÉS CIENTÍFICO DE LA TESIS DOCTORAL	64
C. <u>HIPÓTESIS DE TRABAJO</u>	65
D. <u>OBJETIVOS</u>	67
E. <u>MATERIAL Y MÉTODOS</u>	69
E.1. MATERIAL	70
E.1.1. Donantes	70
E.1.2. Centrifugadoras	71
E.1.3. Cloruro de Calcio	71
E.1.4. Líneas celulares	71
E.1.4.1. Modelo óseo: Línea celular MG63	71
E.1.4.2. Modelo epitelial: Línea celular DOK	72
E.1.5. Material para Western Blot	72
F.1.5.1. Anticuerpos	72
F.1.5.2. Soluciones	73
F.1.5.3. Cuba de electroforesis y aparato de transferencia proteica	75
E.1.6. Anticuerpos para Citometría de Flujo	76
E.1.7. Material para Inmunohistoquímica	78
E.1.8. Microscopios electrónicos	79
E.1.9. Microscopio óptico	79
E.1.10. Citómetro de flujo	79
E.1.11. Campana de flujo y estufa de cultivo	79
E.1.13. Pipetas	80
E.1.14. Material fungible	80

E.2. MÉTODOS	81
E.2.1. Preparación de los coágulos de PRP y PPP	81
E.2.2. Preparación de las muestras biológicas para análisis con TEM	83
E.2.3. Preparación de las muestras biológicas para análisis con SEM	84
E.2.4. Citometría de flujo para la caracterización del coágulo de PRP	86
E.2.5. Caracterización bioquímica mediante Western Blot	86
E.2.6. Cultivo de las células	87
F.2.6.1. MG63	87
F.2.6.2. DOK	88
E.2.7. Tipaje de las líneas celulares	88
E.2.8. Caracterización morfológica de las líneas celulares	90
E.2.9. Cultivo de los coágulos de PRP y PPP con las líneas celulares	90
E.2.10. Técnica de Inmunohistoquímica	91
F. RESULTADOS	94
F.1. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DEL COÁGULO DE PRP Y PPP	95
F.1.1. Citometría de flujo para CD41-PE	95
F.1.2. Microscopía electrónica de barrido	95
F.1.3. Microscopía electrónica de transmisión	96
F.2. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DEL COÁGULO DE PRP Y PPP	97
F.3. LÍNEAS CELULARES Y COÁGULO DE PRP/PPP: CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA E INMUNOHISTOQUÍMICA	98
F.3.1. Caracterización de la línea MG63	98
F.3.1.1. Microscopía óptica	98
F.3.1.2. Microscopía electrónica de barrido y transmisión	98
F.3.1.3. Tipaje mediante citometría de flujo	99
F.3.1.4. Caracterización morfológica de los cocultivos de MG63	100
F.3.1.5. Caracterización inmunohistoquímica: Cocultivos de MG63	104
F.3.2. Caracterización de la línea DOK	106
F.3.2.1. Microscopía óptica	106
F.3.2.2. Microscopía electrónica de barrido y transmisión	106
F.3.2.3. Tipaje mediante citometría de flujo	107
F.3.2.4. Caracterización morfológica de los cocultivos de DOK	107
F.3.2.5. Caracterización inmunohistoquímica: Cocultivos de DOK	110

G. <u>FIGURAS Y TABLAS</u>	113
G.1. FIGURAS	114
G.2. TABLAS	167
Tabla 1	167
Tabla 2	168
Tabla 3	169
Tabla 4	170
Tabla 5	171
H. <u>DISCUSIÓN</u>	172
I. <u>CONCLUSIONES</u>	189
J. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	191

ABREVIATURAS

5HT: Serotonina
ADP: Adenosin Difosfato
Ag: Antígeno
ATP: Adenosin Trifosfato
bFGF: Factor de Crecimiento Fibroblástico básico
BMPs: Proteínas Morfogenéticas
CD: Grupo de Diferenciación
cdk: kinasas dependientes de las ciclinas
CK: Citoqueratina
CTAP-III: Péptido Activador del Tejido Conectivo III
ECGF: Factor de crecimiento de células endoteliales
EGF: Factor de Crecimiento Epidérmico
FBS: Suero Fetal Bovino
GFs: Factores de Crecimiento
GMP33: Proteína Granular de la Membrana
HGF: Factor de Crecimiento del Hepatocito
HRGP: Glucoproteína Rica en Hidroxiprolina
IGF: Factor de Crecimiento similar a la Insulina
IL1-β: Interleuquina 1 Beta
IL-8: Interleuquina 8
LAMP-1: Proteína 1 de Membrana asociada a lisosomas
LAMP-2: Proteína 2 de Membrana asociada a lisosomas
MoAb: Anticuerpo Monoclonal
MTOC: Centro Organizador de Microtúbulos
NAP-2: Péptido activador de neutrófilos 2
PBP: Proteína Plaquetaria Básica
PDGF: Factor de Crecimiento derivado de las Plaquetas
PF4: Factor Plaquetario 4
PIGF: Factor de Crecimiento Placentario
PPP: Plasma Pobre en Plaquetas
PRP: Plasma Rico en Plaquetas
PTK: Receptores Tirocin-Kinasa
TEM: Microscopía Electrónica de Transmisión
TGβ: Tromboglobulina Beta
TGF-β: Factor de Crecimiento Transformante Beta
TNF: Factor de Necrosis Tumoral
TRAP: Péptido Agonista para el Receptor de la Trombina
SEM: Microscopía Electrónica de Barrido
VEGF: Factor de Crecimiento Vasculo-Endotelial
vWF: Factor de von Willebrand

TESIS DOCTORAL

**“EL PLASMA RICO EN PLAQUETAS COMO INDUCTOR DE
PROCESOS DE PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN
CELULAR EPITELIO-MESENQUIMAL”**



Autor:

GUSTAVO ÁVILA ORTIZ

Directores:

PROF. D. PABLO GALINDO MORENO

PROF. D. JUAN EMILIO FERNÁNDEZ BARBERO

PROF. D^a. ELENA SÁNCHEZ FERNÁNDEZ

NOTA ACLARATORIA

Tanto el doctorando como los directores de este trabajo de Tesis Doctoral no tienen interés comercial alguno, ya sea directa o indirectamente, en los productos nombrados en el estudio.

A. ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DE LA CUESTIÓN

A. ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DE LA CUESTIÓN

El daño tisular que se crea en una cirugía es una consecuencia inevitable del tratamiento quirúrgico, que debe ser asumida dentro de este tipo de intervenciones. La pericia clínica del cirujano a la hora de realizar una intervención quirúrgica limpia, en cuanto a causar el mínimo trauma posible, es un factor importante para facilitar la regeneración de los tejidos dañados tras la cirugía, lo que favorecerá un postoperatorio adecuado para el paciente. En todo caso, y al margen de cualidades meramente individuales muy difícilmente objetivables, existen otro tipo de medidas y procedimientos terapéuticos encaminados a intentar reducir los plazos biológicos necesarios para la regeneración de los tejidos, rebajando de este modo el tiempo de convalecencia y minimizando las molestias de los pacientes.

A lo largo de los últimos años, el avance de las Ciencias Biomédicas ha experimentado una progresión espectacular, gracias al desarrollo conjunto de la investigación científica básica y la investigación clínica. A medida que la Tecnología y las Ciencias Biomédicas han evolucionado, por desgracia no siempre de una manera paralela en lo que atañe a la vertiente odontológica (Mallo-Pérez & Sanz-Serrulla 2004), se han desarrollado nuevos métodos terapéuticos que pretenden mejorar las condiciones de regeneración y reparación tisular de los tejidos dañados.

Dentro de la práctica odontológica actual no son pocos los productos y técnicas que se han propuesto para promover la regeneración tisular tras cirugías de orden implantológico y periodontal. Se han llegado a materializar grandes avances, con la aplicación del láser (Corsair 1997; Antenucci 2000) y se han presentado interesantes perspectivas para el campo de la ingeniería tisular (Bartold et al., 2000), que incluyen multitud de indicaciones en el empleo de sustitutos óseos (Moy 1993; Heijl et al. 1997; Ilan & Ladd 2003; Ueda et al., 2005), y el uso de nuevas terapias regenerativas usando células madre pluripotenciales (Thesleff & Tummer 2003; Yamada 2003; Ohya et al., 2005; Zhu et al., 2006).

La aplicación quirúrgica de productos derivados de la sangre del propio paciente con intención de mejorar las condiciones de regeneración y reparación de los tejidos tras una situación de daño tisular, ya sea su origen un traumatismo o como consecuencia de la misma intervención quirúrgica, actualmente representa un prometedor campo dentro de la Cirugía Bucal y Maxilofacial, la Periodoncia y la Implantología.

Hace pocos años, introducido por Marx y colaboradores en su afamado trabajo publicado en 1998, surgió el término de PRP o plasma rico en plaquetas (Marx et al., 1998). Siguiendo la definición propuesta por el propio Marx en un trabajo de posterior publicación (2001), se entiende que el plasma rico en plaquetas es un volumen de plasma autólogo que contiene una alta concentración plaquetaria, por encima de las concentraciones en sangre normal, y que podría ser empleado como agente regenerador en cirugías de diverso orden. De la definición del plasma rico en plaquetas surge antagónicamente el concepto de plasma pobre en plaquetas (PPP), es un volumen de plasma autólogo que se obtendría con la misma metodología seguida para producir PRP, pero empleando en dicho proceso las fracciones plasmáticas de la sangre que carecen de celularidad y cuyo componente elemental sería la fibrina.

Recientemente el uso de PRP y otros productos análogos, ha ganado una gran popularidad dentro de la Cirugía Oral y la Periodoncia, sin embargo las aplicaciones clínicas descritas para este tipo de preparados no se limitan al ámbito odontoestomatológico. Por el contrario se ha descrito la utilidad de los concentrados plaquetarios en intervenciones quirúrgicas relacionadas con la Traumatología (Lowery et al., 1999; Sanchez et al., 2003 b; Gandhi et al., 2006), la Cirugía oftalmológica (Gehring et al., 1999; Paques et al., 1999), la Neurocirugía (Choi et al., 2005), la Dermatología (Crovetti et al., 2004; Kimura et al., 2005) y la Cirugía plástica (Man et al., 2001; Bhanot & Alex 2002).

Sin embargo, la propuesta para el uso de derivados sanguíneos para su aplicación quirúrgica no es algo nuevo. El primer indicio de la aplicación de la fibrina con fines terapéuticos data de principios del S.XX, cuando Bergel (1909)

describió su utilidad como agente hemostático. Ya en la década de los 40, se empezó a observar, paralelamente a su capacidad hemostática, su potencial como agente adhesivo con posibilidades clínicas (Young & Medawar 1940). Pero no fue hasta 1972 cuando se propuso el uso del denominado “gel de fibrina” como agente hemostático y adhesivo en complejas regeneraciones dentro del área de la Cirugía Oral y Maxilofacial (Matras et al., 1972). Desde entonces se ha descrito el empleo de geles de fibrina, también conocidos como selladores de fibrina, dentro de intervenciones quirúrgicas correspondientes a diversas disciplinas médicas como Ginecología (Takeuchi et al., 1996), Cirugía Intestinal (Rousou et al. 1984; Swain & Ellis 2004) o la propia Cirugía Maxilofacial (Matras 1982; Davis & Sandor 1998).

Este tipo de productos se presentan comúnmente en kits formados por proporciones diferentes de factores proteicos y activadores de la coagulación, de origen humano o animal, que ofrecen como resultado final tras su manipulación un coágulo de fibrina insoluble de origen exógeno que puede ser aplicado con diferentes fines terapéuticos, como agentes hemostáticos y adhesivos. Han sido presentadas comercialmente varias preparaciones de gel de fibrina en las últimas décadas, entre las que destacan como las más empleadas en nuestro entorno TisseelTM (Baxter Immuno AG, Viena, Austria), BeriplastTM (Aventis Behring, Marburg, Alemania) y AutocolleTM (Laboratoire Français de Fraccionnement et de Biotechnologies, Tours, Francia). Sin embargo, al tratarse de productos exógenos, el temor a provocar reacciones de base inmune y la posibilidad de transmisión de infecciones cruzadas de origen viral tras su uso, frenó la difusión de este tipo de preparados comerciales de gel de fibrina en diversos países desde la década de los 70 hasta finales del S.XX, como ocurrió por ejemplo en Estados Unidos, hasta que se ha aprobado la licencia para algunos de estos productos en el año 1998 (Soffer et al., 2003).

Pese a que en la actualidad se permite el uso de dichos derivados en la mayoría de los países, aún no está resuelto el debate en torno a la posible transmisión de enfermedades infecciosas y la aparición de otros efectos colaterales indeseables tras el empleo de geles de fibrina. Por este motivo, la aplicación de fibrina autóloga obtenida de la sangre del propio paciente,

mediante centrifugación de la misma y su posterior procesado con activadores, se ha mostrado como una opción muy atractiva y segura. Desde que fue descrita la aplicación de preparados de fibrina autóloga en intervenciones quirúrgicas del área maxilofacial con resultados positivos (Tayapongsak et al., 1993), este procedimiento se ha popularizado dentro de la práctica quirúrgica en la última década, de manera paralela a la difusión alcanzada por el plasma rico en plaquetas.

Según los primeros autores que preconizaron el uso de productos autólogos ricos en plaquetas (Whitman et al., 1997; Marx et al. 1998; Anitua 1999), los beneficios que se obtendrían con su aplicación derivarían de un hecho diferencial con respecto a los preparados a base de fibrina: la capacidad de modular positivamente la actividad de las células del entorno a través de la acción de unas proteínas con gran potencial biológico, las cuales se encuentran incluidas dentro de los gránulos alfa del citoplasma de las plaquetas, conocidas como factores de crecimiento (Bennett & Schultz 1993a; Slater et al., 1995). Los factores de crecimiento son mediadores biológicos que regulan eventos celulares directamente relacionados con la regeneración de los tejidos como son la proliferación y diferenciación tisular, la quimiotaxis y la síntesis de la matriz extracelular a distintos niveles dentro del organismo (Graves & Cochran 1990). La expresión de estos factores de crecimiento en situaciones de daño en tejidos blandos o en tejido óseo, como acontece por ejemplo en la enfermedad periodontal, es fundamental para la regulación los procesos reparativos y regenerativos necesarios para la restitución funcional de las estructuras que conforman dichos tejidos (Blom et al., 1994). Por tanto, el motivo fundamental para la administración de PRP en el tratamiento de defectos tisulares es la búsqueda de una estimulación de la respuesta regenerativa celular mediada por algunos de los productos de secreción plaquetarios.

El empleo de concentrados plaquetarios en Cirugía Bucal o Periodoncia constituye una técnica que, pese a ser de reciente introducción, es el tema central de gran número de publicaciones hasta la fecha y objeto de discusión científica en diversos foros.

Al margen de sus reconocidas propiedades adhesivas y hemostáticas (Della Valle et al., 2003), la mayor parte del conocimiento acerca del potencial terapéutico de estos productos ha venido dado principalmente por la descripción de su influencia en la regeneración tisular al ser aplicados en diferentes modelos experimentales in vivo (Kim et al., 2001, 2002; Aghaloo et al., 2002, 2005; Fennis et al., 2002, 2004; Fuerst et al., 2003a, 2003b, 2004a, 2004b; Jakse et al., 2003; Schlegel et al., 2004; Wiltfang et al., 2004; Yazawa et al., 2004; Nagai et al., 2005; Pryor et al., 2005a, 2005b; Sanchez et al., 2005; Gerard et al., 2006; Klongnoi et al., 2006; Plachokova et al., 2006; Sarkar et al., 2006; Thorwarth et al., 2006) y en terapias odontoestomatológicas en seres humanos (de Obarrio et al., 2000; Shanaman et al., 2001; Petrunaro 2001, 2002; Camargo et al., 2002, 2005; Thor 2002; Lekovic et al., 2002, 2003; Babbush et al., 2003; Griffin & Cheung 2004; Merckx et al., 2004; Oyama et al., 2004; Thorn et al., 2004; Franchini et al., 2005; Huang et al., 2005; Okuda et al., 2005; Sammartino et al., 2005), con gran abundancia de referencias a su aplicación en técnicas de elevación de seno (Rosenberg & Torosian 2000; Danesh-Meyer et al., 2001; Lozada et al., 2001; Froum et al., 2002; Wiltfang et al., 2003; Mazor et al., 2004; Kassolis & Reynolds 2005; Raghoobar et al., 2005; Steigmann & Garg 2005).

En conjunto, estos estudios deberían aportar una fuerte evidencia que apoyase el uso clínico del PRP, por desgracia muchos de ellos son meramente anecdóticos y pocos incluyen un protocolo de análisis científico adecuado que permita determinar el papel e indicaciones de los concentrados plaquetarios (Pietrzak & Eppley 2005). Por este motivo y debido a que la gran variabilidad entre los diseños empleados hace complicada una comparación productiva, aún no ha llegado a establecerse un consenso acerca del protocolo más adecuado para su obtención, sus indicaciones clínicas y las implicaciones biológicas que conlleva su aplicación. Mientras que algunos autores defienden el uso clínico del PRP (Carlson & Roach 2002; Marx 2004), otros cuestionan su verdadero potencial terapéutico (Sanchez et al., 2003a; Freymiller & Aghaloo 2004) y, sobre todo, la seguridad biológica que implica la aplicación de este tipo de preparados, pudiendo influir en la aparición de patologías tumorales indeseables (Schmitz & Hollinger 2001; Martínez-González et al., 2002).

El hecho de que no exista un criterio uniforme sobre los aspectos fundamentales que atañen al empleo clínico del PRP indica que es necesario profundizar en su conocimiento y en sus bases biológicas, estableciendo líneas de investigación que permitan despejar las múltiples dudas que se suscitan a su alrededor.

De este modo, y con objeto de arrojar luz sobre algunos de los interrogantes que se encuentran aún sin respuesta en el seno de la comunidad científica acerca de este prometedor campo, fue diseñado un protocolo de investigación que permitiera cumplir ese cometido cuyo desarrollo, resultados y conclusiones quedan recogidos en este trabajo de tesis doctoral.

B. INTRODUCCIÓN

B. INTRODUCCIÓN

B.1. EL CICLO CELULAR

La célula es la unidad mínima de un organismo con capacidad para actuar de manera autónoma. Todos los organismos vivos están formados por células; de hecho, en general se acepta que ningún organismo es un ser vivo si no consta al menos de una célula. Algunos organismos microscópicos, como las bacterias y los protozoos, son células únicas, mientras que los animales y las plantas están formados por varios millones de células organizadas en tejidos, los cuales se organizan a su vez para dar lugar a los órganos. La vida de una célula gira cíclicamente sobre la referencia de una actividad biológica crucial: conseguir una descendencia de nuevas células con sus mismos caracteres, funciones y herencia genética.

El ciclo de la vida de una célula incluye un paso continuado por momentos de reproducción, por etapas de crecimiento y diferenciación e incluso por fases de reserva (Imagen 1). Durante su recorrido vital, una célula se ve influenciada por numerosas señales, ya sean externas o internas, estimulantes o inhibitoras, para que sus funciones y sus relaciones con otras células se desarrollen con normalidad. Por este motivo, no debe extrañar que las alteraciones en la regulación del ciclo celular den lugar a fenómenos de reproducción celular descontrolados (Bartek et al., 1999).

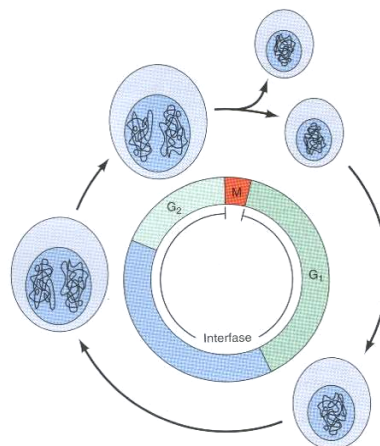


Imagen 1. El ciclo celular.
(Extraído de Cooper 2002)

B.2.1. Fases del ciclo celular

En el ciclo celular existen dos fases claramente diferenciadas: la fase de reproducción, conocida como mitosis, y la fase o periodo comprendido entre dos mitosis, que es conocido como interfase.

En la fase de mitosis la célula madre se divide dando dos células hijas de la misma herencia genética y características morfológicas que su predecesora. Una célula madre es una célula hija no constituida que sirve de reserva para reaprovisionar a una población de células determinada.

La interfase es el periodo en el que la célula crece y se desarrolla, madurando al adquirir los caracteres diferenciales propios del tipo celular hacia el que se diferencia y desempeñando las funciones características que le correspondan, en función a las distintas señales y estímulos externos que reciba. Esencialmente, éste es un periodo de actividad celular: Los cromosomas se descondensan y se distribuyen por el núcleo, por lo que presenta un aspecto uniforme, con baja condensación cromática. Sin embargo, a nivel molecular, ocurre la replicación del DNA para una nueva mitosis, así como otros procesos fundamentales para el desarrollo y futura división de la célula (Imagen 1). Dentro de la interfase pueden diferenciarse 3 periodos. La fase G_1 , la cual comienza justamente al terminar la fase de mitosis celular. En este momento la célula se puede considerar como metabólicamente activa y se encuentra en crecimiento, pero no se replica su DNA. Dentro de este periodo G_1 hay 4 estados de detención cuyo motivo de existencia parece ser regular el crecimiento y maduración de la célula. La actividad desarrollada en cada uno de estos puntos está controlada por diversos agentes moduladores, entre los que se encuentran los factores de crecimiento. Posteriormente la célula pasa al periodo S, o de síntesis, en el que se replica el DNA nuclear, con vistas a la duplicación mitótica celular. Una vez se cumple ese cometido la célula entra en el periodo G_2 , en el que prosigue el crecimiento de la célula y se sintetizan las proteínas celulares que van a ser necesarias para llevar a cabo la mitosis. La interfase se cierra cuando la célula entra en la fase M, que corresponde a la mitosis o división celular (Lodish et al., 2000).

B.2.2. El potencial de proliferación

Salvo algunos tejidos, que se forman por células no divisibles, la mayoría de los tejidos maduros contienen una mezcla de células pertenecientes a diferentes estirpes, las cuales poseen potencial para multiplicarse. De este modo, las células del organismo se pueden dividir en tres grupos atendiendo a su capacidad de proliferación y su actividad relacionada con el ciclo celular (Cooper 2002):

1.- Células lábiles: Son aquellas que están en división constante. Recorren el ciclo celular de una mitosis a otra y siguen proliferando durante toda la vida. Se suelen presentar como una agrupación de células, cuya capacidad de proliferación es ilimitada. Algunos ejemplos de este tipo de células son aquellas que se encuentran en el epitelio estratificado de la piel o de la cavidad bucal, en la mucosa de la vagina, en los conductos secretores glandulares y las células del tejido hematopoyético medular.

2.- Células quiescentes: Son células con escasa actividad mitótica. Estas células salen de la fase G_2 y entran en un periodo de reposo G_0 donde permanecen activas metabólicamente, procurándose la subsistencia necesaria para que la célula no claudique, pero sin proliferar, a no ser que sean requeridas para ello mediante señales extracelulares emitidas desde el entorno. Claros ejemplos de este tipo son las células parenquimatosas de todo el organismo, así como los miocitos de las fibras musculares lisas y los fibroblastos del tejido conjuntivo.

3.- Células permanentes: Son células que abandonan el ciclo celular y no pueden entrar en mitosis en la vida postmitótica. Las células del miocardio, los miocitos del músculo esquelético y algunas neuronas son células que corresponden a este grupo.

B.2.3. Reguladores del ciclo celular

Las células neoplásicas, propias del cáncer, se perpetúan por fracaso de los mecanismos que controlan la proliferación y maduración celular. Para evitar la proliferación descontrolada de elementos celulares existen tres clases de controles que regulan el paso a cada fase del ciclo celular (Cooper 2002):

- Puntos de control del ciclo celular
- Ciclinas y kinasas
- Factores de Crecimiento (GFs)

B.2.3.1. Puntos de control del ciclo celular

Los fenómenos biológicos que tienen lugar durante las distintas fases del ciclo han de coordinarse entre sí de manera que ocurran en orden adecuado. Los denominados puntos de control del ciclo celular sirven para evitar la entrada de la célula en la siguiente fase del ciclo hasta que se haya completado la fase anterior (Imagen 2). La función esencial de estos puntos es asegurar que los cromosomas incompletos o dañados no se repliquen y pasen a las células hijas, lo que podría provocar la aparición de una célula aberrante con potencial proliferativo descontrolado debido a un contenido genético anómalo (González Moles 2001).

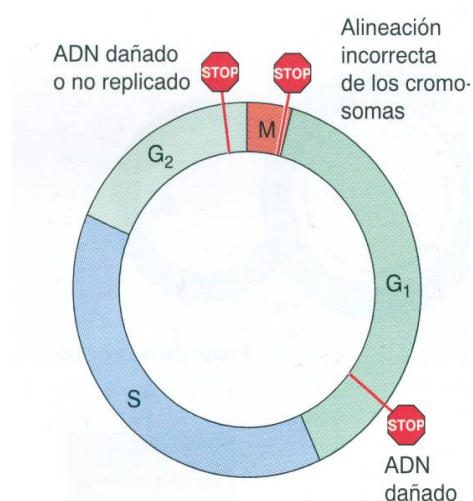


Imagen 2. Puntos de control del ciclo celular

(Extraído de Cooper 2002)

Estos puntos se localizan en:

G₂: Detecta el DNA que no se ha replicado y genera una señal que hace que se detenga el ciclo, evita que se pase a la fase M antes de completarse S.

G₁: Mediada por la acción de la proteína p53. Ante una alteración del DNA por radiación aumentan los niveles de p53 inhibiendo la progresión del ciclo celular.

Final de M: Supervisa que los cromosomas se alineen de forma correcta en el huso mitótico, asegura que se distribuya un juego completo de cromosomas a cada célula hija.

B.2.3.2. Ciclinas y kinasas dependientes de las ciclinas

El avance de la célula a lo largo de cada fase del ciclo es controlado por variaciones en los niveles y grado de actividad de las ciclinas. Estas proteínas realizan sus funciones formando complejos con otro grupo de moléculas: las quinasas dependientes de ciclinas (CDK). De este modo, se podría afirmar que las ciclinas, asociadas con las CDK, son los elementos encargados de regular la entrada de la célula en las diferentes fases del ciclo celular (Prosperi et al., 1997).

Algunas ciclinas alcanzan su máxima concentración en ciertas fases del ciclo celular y luego se degradan rápidamente cuando pasan a otra fase. La progresión a través de las cuatro etapas del ciclo celular depende de que se alcancen niveles elevados de ciclinas, siendo las más importantes las ciclinas de los tipos A, B, D y E (Murray 2004).

B.2.3.3. Factores de crecimiento

Los factores de crecimiento (GFs) actúan en el punto de restricción localizado en G_1 , antes del paso a fase S, que es considerado el momento clave del ciclo celular (Imagen 3). En presencia de determinados GFs, las células pasan de G_1 a S. Si los GFs no están disponibles en G_1 , la célula entra en un estado de reposo G_0 , donde permanecen sin proliferar hasta que sean requeridas y estimuladas por la acción de la que puede ser una gran y compleja variedad de factores mitogénicos (Antoniades & Owen 1982).

La acción de los factores de crecimiento está relacionada con la síntesis de ciclina D. Durante G_1 , en presencia de una determinada concentración de una serie de factores de crecimiento, se sintetiza la ciclina D que se une a la CDK 4, permitiendo que la célula atraviese el punto de restricción (Armelin 1990).

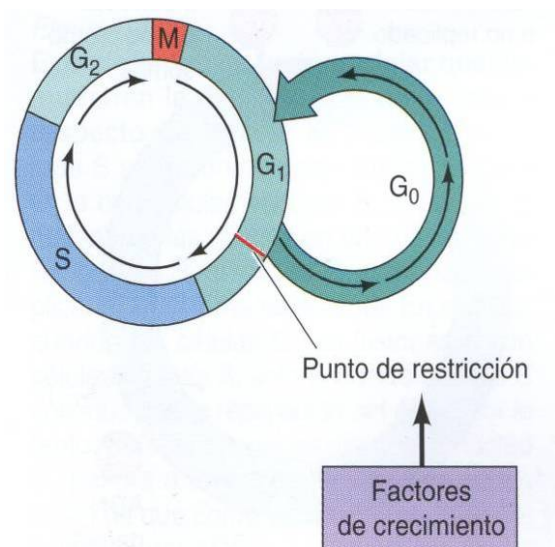


Imagen 3. Esquema de la actuación de los GFs como reguladores del ciclo celular
(Extraído de Cooper 2002)

B.3. LA SANGRE

La sangre, líquido fundamental para la vida en el ser humano, es un tipo de tejido conectivo especializado que se encuentra contenido en el sistema circulatorio sanguíneo. Dentro del organismo, la sangre es el principal medio de transporte de oxígeno, dióxido de carbono, nutrientes y productos de degradación metabólicos, células del sistema inmunitario y mediadores celulares (Stevens & Lowe 1998). De este modo se puede afirmar que, además de ser fundamental para la regulación de la temperatura corporal, la sangre tiene una importancia fundamental para el mantenimiento de la homeostasis normal del organismo, preservando el equilibrio fisiológico general del cuerpo humano (Gartner & Hiatt 2003).

Un ser humano alberga alrededor de 5 litros de sangre en condiciones normales, lo que supone un 7% del total del peso corporal. A *grosso modo*, la sangre esta constituida por una mezcla de células y fragmentos celulares, lo que se conoce como los elementos figurados o formes de la sangre, que circulan en el plasma, una solución líquida que representa aproximadamente el 55% del volumen de la sangre y que incluye proteínas con diversas funciones biológicas y también por metabolitos. La sangre obtenida por punción venosa almacenada en tubos de ensayo estandarizados que contengan anticoagulantes, como la heparina o el citrato de sodio, y que es centrifugada inmediatamente, se separa en diversas capas que demuestran su heterogeneidad. El resultado de este proceso de centrifugado que se obtiene en el interior de los tubos responde al nombre de hematocrito (Imagen 4).

Dentro del hematocrito, el sobrenadante translúcido y amarillento corresponde al plasma sanguíneo. La fracción inferior (35 al 50% del total del volumen de la sangre) tiene un color rojo intenso y está formada por los hematíes, también conocidos como eritrocitos o glóbulos rojos, que esencialmente cumplen con la función del transporte de O₂ y CO₂ por todo el organismo. La capa inmediatamente superior a éstos (1% del volumen sanguíneo), de un color ceniciento, contiene a los leucocitos o glóbulos

blancos, menos densos que los eritrocitos, por lo que se depositan encima. Sobre los leucocitos reposa una delgada capa, indistinguible a simple vista, que está conformada por las plaquetas (Junqueira & Carneiro 2005). En resumidas cuentas, una vez termina el proceso de centrifugado de una muestra de sangre, se obtiene la separación de las distintas fracciones que la constituyen, por los diversos gradientes de precipitación, siendo fácilmente distinguible la porción plasmática, inmediatamente bajo la cual se encuentran las plaquetas sobre los demás elementos formes de la sangre.



Imagen 4. Hematocrito sanguíneo

B.4. EL PLASMA SANGUÍNEO

El plasma sanguíneo es una solución acuosa, constituido en un 90-92% por agua, que transporta elementos con pesos moleculares de un rango muy amplio, los cuales representan el 10% de su volumen y que se pueden agrupar en tres categorías:

- Proteínas plasmáticas: El plasma contiene varias clases de proteínas, cada una con sus funciones y propiedades específicas y que corresponden a un 7% del total del volumen plasmático. La presencia de dichas proteínas hace que la sangre sea unas seis veces más viscosa que el agua. Las principales proteínas plasmáticas son las albúminas, que colaboran en la regulación de la presión osmótica de la sangre, con lo que son parte importante en la distribución del agua entre el plasma y los líquidos tisulares. Las alfa, beta y gamma globulinas son anticuerpos que proporcionan inmunidad frente a muchas enfermedades. También se pueden encontrar en el plasma gran variedad de lipoproteínas y, por supuesto, la protrombina, el fibrinógeno y el resto de factores de la coagulación, fundamentales dentro del proceso de formación del coágulo y el control de la hemorragia (Bocci 1970).
- Sales inorgánicas: Suponen el 1% del plasma y se encuentran disueltas en forma de aniones (iones cloro, bicarbonato, fosfato y sulfato) y cationes (sodio, potasio, calcio y magnesio). Fundamentalmente actúan como una reserva alcalina que mantiene constante el pH y regula la proporción de agua presente en la sangre, aunque, como ocurre con el calcio, algunos de estos iones poseen un importante papel dentro de otros mecanismos fisiológicos.
- Sustancias de transporte: Son moléculas que proceden de la digestión (glucosa y aminoácidos) o de la respiración de la célula (nitrógeno y oxígeno) y residuos del metabolismo de la misma (dióxido de carbono, urea y ácido úrico).

Tras la formación del coágulo el plasma desaparece y se expresa el **suero**, un líquido amarillento que es idéntico al plasma salvo por que no contiene fibrinógeno y el resto de constituyentes plasmáticos implicados en el proceso de la coagulación (Garnett & Hiatt 2003).

B.5. LOS MEGACARIOCITOS

Los megacariocitos son células poliploides gigantes, de carácter lábil por su alto potencial endomitótico. Su tamaño varía entre 35 y 160 μm de diámetro, y se originan en la médula ósea (Becker et al., 1963). Tienen un núcleo de tamaño irregular y lobulado, con forma de anillo o de rosca en el que no se observan nucleolos. Su citoplasma contiene gran cantidad de organelas y un extenso sistema de vesículas y túbulos interconectados, cuya función es delinear y conformar los campos plaquetarios en desarrollo o, lo que es lo mismo, las plaquetas en potencia (Stevens & Lowe 1998).

El primer precursor morfológicamente reconocible del megacariocito es el megacarioblasto, que es una célula con un tamaño que oscila entre las 15 y 20 μm , con un núcleo grande de morfología ovalada o arriñonada en el que se pueden observar varios nucleolos. Su citoplasma es de dimensiones reducidas, con poco contenido gránular. Cuando alcanza la fase de diferenciación dentro de su ciclo celular, el megacarioblasto se agranda y comienzan a aparecer gránulos citoplasmáticos, dando lugar a una célula de entre 20 y 80 μm de diámetro conocida como promegacariocito. El núcleo de esta célula es oval y posee un citoplasma más abundante que el del megacarioblasto, con alto contenido de gránulos que se desarrollan perinuclearmente. A partir de esta célula precursora se forma el megacariocito maduro granular que es el elemento celular que dará lugar a las plaquetas (Wintrobe et al. 1979a).

B.5.1. El génesis de las plaquetas

A principios del siglo XX, Wright (1910) ya indicó por primera vez que las plaquetas provienen de porciones desprendidas del citoplasma de los megacariocitos. Esta hipótesis fue demostrada en años venideros por diversos hechos biológicos constatados científicamente como por ejemplo la gran similitud en la composición citoquímica y antigénica entre los megacariocitos y las plaquetas, y la presencia en las plaquetas de isótopos radiactivos

introducidos previamente de manera experimental en los megacariocitos (Maupin 1969).

El megacariocito es la única célula de la médula ósea que tiene capacidad de reproducir su DNA sin sufrir división celular y que se posiciona en íntima relación con la membrana sinusoidal (French 1967). Se ha estimado que un megacariocito da lugar aproximadamente a 1.000 plaquetas, durando la secuencia madurativa entre cuatro y cinco días. La maduración del megacariocito está controlada por una serie de citoquinas, entre las que destaca la trombopoyetina (Zucker-Franklin & Kaushansky 1996). En el ser humano, las plaquetas pueden producirse a partir del megacariocito por dos procesos diferentes: por formación pseudopódica y por fragmentaciones *in situ* de grandes porciones del citoplasma plaquetario.

La formación plaquetaria pseudopódica, descrita por Wright hace casi cien años (Wright 1910), comienza con el desarrollo de numerosos pseudópodos citoplasmáticos largos en el megacariocito, que se extienden a través de las aberturas de la membrana sinusoidal. Dichas prolongaciones se tornan cada vez más finas para terminar en una morfología filiforme, en cuyo interior se forman masas granulares del tamaño de plaquetas normales. Debido a las contracciones que se establecen en los capilares sanguíneos sinusales se provoca la liberación de estos segmentos del megacariocito, siendo las plaquetas arrastradas por la propia corriente sanguínea. En cambio, la formación de plaquetas por fragmentación citoplasmática del megacariocito comienza con la aparición de las conocidas como “zonas de demarcación”. Dichas zonas aparecen inicialmente como una cadena de pequeñas vesículas que se funden para dar lugar a la aparición de fisuras. El agrandamiento y la fusión simultánea de varias de estas fisuras provocan la rotura del megacariocito en multitud de partículas distintas, que son las plaquetas. En este proceso de plaquetogénesis generalmente todo el citoplasma del megacariocito se rompe y el núcleo se degenera, dando lugar a la desaparición de este tipo celular (Wintrobe et al. 1979a).

B.6. LAS PLAQUETAS

De los tres elementos formes de la sangre, la plaquetas, también conocidas como trombocitos, fueron las últimas en ser descubiertas. Este hecho puede ser justificado por distintos motivos. En primer lugar, en comparación con los eritrocitos y, por supuesto, con los leucocitos, las plaquetas tienen un tamaño mucho más reducido, lo que unido a las comprensibles limitaciones técnicas de los microscopios de la época, explica el retraso de su identificación y caracterización por parte de los primeros investigadores que se sumergieron en este campo. En segundo lugar, el carácter agregable de estas células provocaba que tras la obtención de las muestras de sangre y su preparación para ser observadas al microscopio, la cual se realizaba por extensión sobre rudimentarias pletinas de vidrio, se formaran conglomerados de plaquetas que dificultaban enormemente su observación como elementos independientes (Izaguirre-Ávila 1997).

Es probable que, según los datos que han llegado documentados hasta nuestros días, el inglés William Hewson (1739-1774) fuera el primero en observar plaquetas en muestras de sangre ya en el siglo XVIII, en los albores de la Histología como campo de estudio dentro de la Medicina. Durante el siglo XIX, diversos científicos indicaron la presencia en la sangre de corpúsculos más pequeños que los glóbulos rojos y los glóbulos blancos. Pero no fue hasta mediados del siglo XIX cuando el francés Alfred Donné (1801-1878) se convirtió en el primer autor que reportó su presencia en la sangre en 1842. Ese mismo año el inglés William Addison (1802-1881), describe a las plaquetas como elemento presente en el fluido sanguíneo en su trabajo "Sobre los corpúsculos pálidos en la sangre". Friederich Arnold (1803-1890), fue el primer anatomista en reconocer e ilustrar plaquetas en 1845. En 1846, Gustav Zimmermann, médico militar alemán, describió "billones de ciertos corpúsculos incoloros" que tendían a agruparse, los llamó "cuerpos elementales". En 1873, en Francia, Edme Felix Alfred Vulpian (1826-1887) describió la propiedad de esos cuerpos incoloros de la sangre de adherirse al vidrio y formar agregados (Tocantins 1948; Rossi 1972).

La primera observación de que las plaquetas se encontraban como unidades en la circulación y que se acumulaban, fue hecha por William Osler (1849-1919) en 1874. En 1878 el autor francés George Hayem (1841-1935), indicó que "...en la sangre existen unos pequeños elementos..." que tenían tendencia a agregarse y a cambiar de forma, además describió interacciones de estos corpúsculos con la fibrina y su participación en la detención de la hemorragia. Hayem empleó por primera vez la palabra "plaquette" en 1883 para referirse a los trombocitos, por la forma discoide aplanada que observó en estas células, siendo éste un término que perdura en la actualidad como el más empleado para designar a este tipo celular. Giulio Bizzozero (1841-1901), aisló plaquetas a partir de trombos de sangre e identificó a la hemostasia y a la trombosis como procesos análogos orientados al control de la hemorragia. Schimmelbusch, en 1885, fue el primer autor en describir los cambios morfológicos que sufren las plaquetas en un vaso dañado o cuya superficie es irregular con cambios no compatibles con condiciones fisiológicas normales. En 1906, James Homer Wright (1869-1928), descubrió, que el megacariocito era la célula precursora de las plaquetas (Robb-Smith 1967).

Más de 100 años después de que se hicieron las primeras observaciones y estudios acerca del conocido clásicamente como tercer elemento forme de la sangre, la plaqueta ha pasado de ser una misteriosa partícula apenas visible en muestras sanguíneas, hasta ser reconocida como un elemento fundamental no solo para el funcionamiento de diversos procesos vitales, cuyo mayor exponente es su intervención indispensable dentro la coagulación de la sangre, sino también por su implicación dentro la regeneración de los tejidos dañados, actividad en la que interviene como acelerador de dichos procesos biológicos mediante la liberación de diversos factores proteicos que almacena en el interior de sus gránulos.

Las plaquetas son pequeños fragmentos celulares con forma de disco que carecen de núcleo, por lo que su capacidad mitótica es nula y se consideran células permanentes en cuanto a su potencial proliferativo. Su tamaño oscila, en condiciones normales, entre las 1.5 y las 4 μm en sangre

periférica. En términos de salud el número de plaquetas circulantes varía entre las 150.000 y las 400.000 plaquetas por mm^3 de sangre y el recuento de plaquetas se presenta en niveles similares tanto en adultos como en niños en condiciones normales (Ablin et al. 1961). Se encuentran acumuladas en el bazo y en el pulmón y son destruidas en el sistema reticuloendotelial, en el hígado y en el bazo, tras un periodo de unos 7 a 10 días de vida efectiva. Por eso, la extirpación del bazo, determina normalmente un aumento pasajero en la concentración de plaquetas; fenómeno que es a menudo persistente en las púrpuras que cursan por trombocitopenia (Wintrobe et al., 1979b). Al ser observadas a gran aumento, tras ser teñidas con hematoxilina-eosina, las plaquetas pueden ser estructuralmente divididas en dos partes fundamentales: una región central granular denominada granulómero o cromómero, que contiene una gran cantidad de gránulos teñidos de color púrpura, y una región periférica menos densa conocida como hialómero, que se tiñe de azul claro (Stevens & Lowe 1998).

La membrana celular de la plaqueta de un grosor de entre 15 y 20 nm, posee un glucocáliz prominente que incluye moléculas de adhesión celular, a la vez que posee gran cantidad de depresiones externas que conectan con un sistema de conductos de membrana interconectados con el medio externo, el cual se conoce como sistema canalicular abierto. A través de este sistema ductular la plaqueta libera su contenido granular. La cara citoplasmática de la membrana se asocia con una corteza de actina, que participa en la retracción del coágulo y la liberación del contenido granular citoplasmático plaquetario (Parise et al., 2005). Aunque son células anucleadas, las plaquetas contienen mitocondrias, microtúbulos, ribosomas y otras organelas celulares, así como enzimas necesarias para la respiración aeróbica y anaeróbica celular (Imagen 5).

Las plaquetas se caracterizan por un consumo muy extenso de oxígeno, que puede ser hasta 6 veces más alto que en las células musculares en reposo. La fuente de energía es la glucosa que se obtiene a partir del glucógeno y la vía fundamental metabólica que emplean es la glicolisis anaerobia, que convierte la glucosa en lactato e iones de hidrógeno, los cuales son captados por el acetato, que entra a las mitocondrias para su oxidación en

el ciclo del ácido tricarboxílico, lo que propicia la síntesis de ATP por la fosforilación oxidativa y la estabilización del pH celular. Incorporan a su interior, a través de un mecanismo de transporte pasivo independiente de energía, fragmentos de membrana que contienen GPIIb/IIIa y también fibrinógeno, y, esta vez por un mecanismo dependiente de energía, fragmentos de membrana que contienen GPIb, ambos hechos fundamentales para la organización estructural de esta célula, una vez es activada (Morgorsten 1997). En cualquier caso, de entre las organelas que se pueden encontrar en el interior de las plaquetas son los gránulos las que las caracterizan y las distinguen de otros elementos sanguíneos.

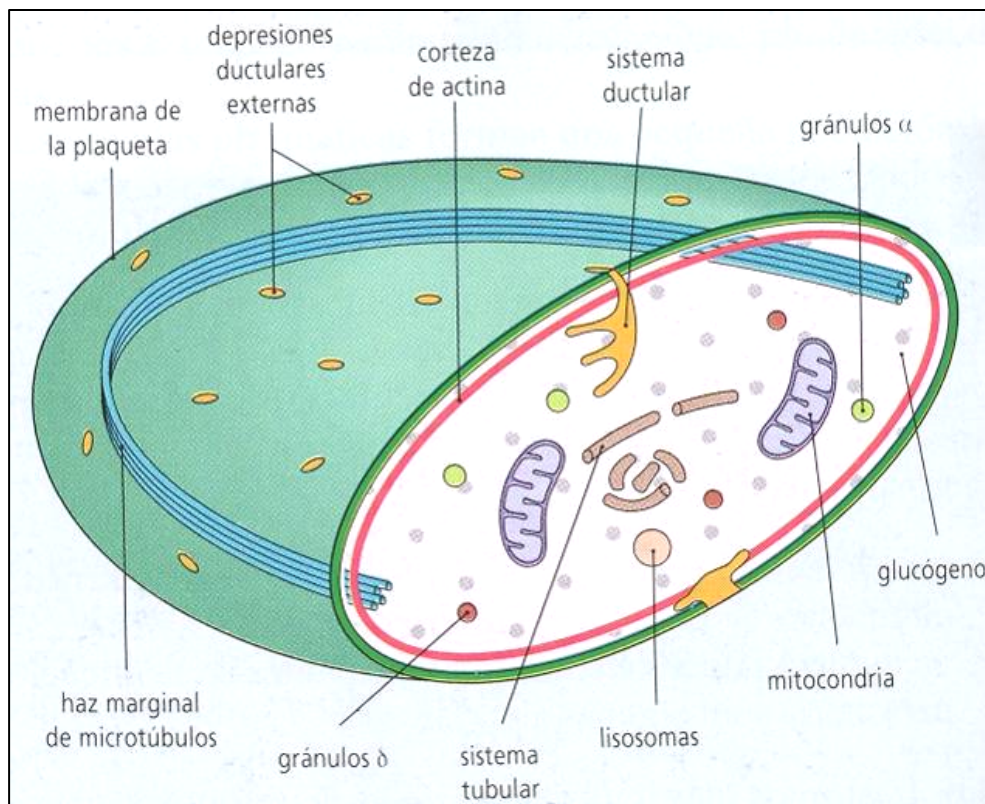


Figura 5. Esquema de una plaqueta

(Extraído de Stevens & Lowe 1998)

B.7. LOS GRÁNULOS PLAQUETARIOS

B.7.1. Los lisosomas o gránulos λ (lambda)

Las plaquetas solo albergan unos pocos lisosomas primarios y secundarios (Menard et al., 1990). Con un diámetro entre 175 y 250 nm y de aspecto electro-denso (Rendu & Brohard-Bohn 2001), contienen gran cantidad de enzimas degradativas (Tabla 1), entre las que destacan las hidrolasas ácidas y la catepsina D y E. Su función, al igual que ocurre en otros tipos celulares, es la liberación de su contenido para la digestión de todas las moléculas inservibles para la célula.

B.7.2. Los gránulos densos o gránulos δ (delta)

Los gránulos δ , con unos 250-300 nm de diámetro, se caracterizan por la presencia de un cuerpo intensamente opaco rodeado de un sencillo espacio claro rodeado de una membrana simple. Los gránulos densos se forman en el megacariocito inmaduro, donde se originan como sacos vacíos que son rellenados progresivamente de ADP, ATP, serotonina y otros componentes conforme avanza el proceso de diferenciación de esta célula (Youssefian & Cramer 2000). Cada plaqueta humana suele contener de 3 a 9 gránulos densos (White 1969). Almacenan una alta concentración de pequeñas moléculas no proteicas como ADP, ATP, calcio y serotonina (5-hidroxitriptamina), la cual procede del plasma sanguíneo.

La naturaleza de este contenido hace que estos gránulos tengan una apariencia electro-opaca al ser observados en análisis ultraestructural, de modo que por ello reciben la denominación común de gránulos densos. (King & Reed 2002). De todos los elementos que hay albergados dentro de los gránulos densos (Tabla 1), destaca una elevada cantidad de calcio, que supone el 50 % del total de su contenido, en una concentración 2 mol/L (Klinger 1996), y que es de vital importancia en la cascada de la coagulación.

B.7.3. Los gránulos α (alfa)

Los gránulos alfa son organelas esféricas de 200 a 400 nm de diámetro y los gránulos más abundantes dentro de las plaquetas, constituyen un 15 % del volumen total de las plaquetas, con un número aproximado de 80 por célula (Sixma et al., 1989). Contienen moléculas de amplia heterogeneidad y alta repercusión biológica; de ahí que la cantidad de gránulos alfa que se alberga una plaqueta en su interior determina el valor funcional de la misma (Rendu & Brohard-Bohn 2001). Alteraciones cuantitativas o cualitativas en el contenido o número de los gránulos α pueden encontrarse en diversos problemas hereditarios de la coagulación como son el síndrome de la plaqueta gris, el desorden plaquetario de Quebec o la trombocitopenia dismegacariopoyética (Hayward 1997). En el interior de los gránulos α se encuentran macromoléculas, como el fibrinógeno, otros factores de la coagulación, proteínas adhesivas y factores de crecimiento, entre otros elementos moleculares (Tabla 1). Estas moléculas incluyen proteínas de secreción específicas de las plaquetas como por ejemplo el PF4 y la Tromboglobulina β , que son sintetizadas sólo en los megacariocitos en su proceso de diferenciación, moléculas selectivas de plaquetas, como por ejemplo el factor V, la trombospondina y la P-selectina, que son sintetizadas en los megacariocitos durante su fase de maduración y otros pocos tipos celulares y moléculas no sintetizadas por las plaquetas ni los megacariocitos, como por ejemplo el fibrinógeno, que parece que son tomadas por las plaquetas del medio plasmático a través de procesos de transporte molecular por endocitosis. Los gránulos α tienen cuatro zonas morfológicamente distinguibles al ser observados al microscopio electrónico (Harrison & Cramer 1993). Desde el exterior hacia el interior del gránulo se pueden observar la membrana periférica de la plaqueta, estructuras tubulares y vesiculares, un área electro-lúcida, rica en fibrinógeno trombospondina y albúmina, y un pseudonúcleo electro-denso, en el se concentra la mayor parte de su contenido molecular. En su membrana expresan también GPIIb/IIIa, pequeñas cantidades de GPIb, GPIX y P-selectina, proteínas de gran importancia en el desarrollo del proceso de la coagulación (King & Reed 2002).

B.8. FUNCIONES DE LAS PLAQUETAS

A través de la liberación de su contenido granular la plaqueta es capaz de ejercer sus dos funciones esenciales:

- 1.- Colaborar en el control de la hemorragia orquestando la respuesta defensiva del organismo que culmina con la coagulación sanguínea.
- 2.- Liberación de factores mitogénicos que ayuden a la regeneración de los tejidos tras el daño causante de la hemorragia.

B.8.1. La coagulación de la sangre

Tras una lesión de sobre los tejidos del cuerpo humano, se producen daños en el sistema vascular, unas veces a nivel de la macrocirculación y siempre en la microcirculación, mantenida por arteriolas, capilares y vénulas. La consecuencia de la falta de integridad de los vasos sanguíneos es la hemorragia, o lo que es lo mismo, la salida de un determinado flujo de sangre fuera del sistema vascular, sea arterial o venoso, y los fenómenos generales consiguientes a esas hemorragias que, cuando sobrepasan cierto límite sin ser controlados, provocan un cuadro de hipovolemia e hipoperfusión de los tejidos que puede llevar al paciente hasta el estado de shock constituido. Dentro de los elementos formes de la sangre, las plaquetas son las encargadas de orquestar la respuesta defensiva del organismo frente a una lesión de los vasos sanguíneos, mediante la adhesión a los defectos de las paredes de los vasos y participando en el proceso de coagulación mediante la liberación de su contenido granular (Zwaal et al., 1992).

De estas consideraciones se deduce la gran importancia que tiene para el cirujano el conocimiento preciso de la hemostasia, es decir, del conjunto de procesos biológicos y de procedimientos técnicos quirúrgicos que sirven para detener y controlar la hemorragia. La hemostasia espontánea o natural puede ser definida como el conjunto de procesos biológicos, organizados de una manera precisa, cuya finalidad es conseguir que la sangre se mantenga dentro

del sistema vascular, obturando las soluciones de continuidad que se produzcan en los vasos, mientras que la hemostasia quirúrgica agrupa todos los procedimientos técnicos que el cirujano emplea para controlar la hemorragia que se produce accidentalmente o durante el acto operatorio.

Ante una lesión vascular se inicia la hemostasia natural, en la producen sucesivamente una serie de fenómenos biológicos que conducen a la coagulación de la sangre. La hemostasia natural consta de tres fases claramente diferenciadas, pero que se relacionan entre sí:

1. Fase vascular
2. Fase plaquetaria
3. Fase de la coagulación plasmática

1. Fase vascular

Inmediatamente después del daño vascular, en décimas de segundo, se inicia el proceso de hemostasia natural con una vasoconstricción local, debida en parte a reflejos nerviosos locales (axónicos) y espinales, y también a la acción de ciertas aminas vasoactivas liberadas tras la acción traumática, entre las que destaca la serotonina (5HT). Dicha vasoconstricción inicial está orientada a minimizar la extravasación de sangre mediante la reducción del diámetro del vaso, lo que dificulta el flujo sanguíneo al exterior (Hajjar et al., 2005).

2. Fase plaquetaria

Una vez se produce la vasoconstricción del vaso, las plaquetas circulantes se adhieren a las fibras de colágeno (en su mayor parte colágeno tipo III) de la pared de los vasos, que han quedado expuestas tras el daño, merced a la interacción de unos receptores glucoproteícos de membrana conocidos como integrinas, en este caso la glucoproteína Ib, a través del factor plasmático de von Willebrand (vWF) que se encarga de mediar la adhesión entre la plaqueta y el colágeno. Aparte de sus propiedades adhesivas, las integrinas son capaces de emitir señales moleculares bidireccionalmente, tanto intra como extracelularmente, regulando, en función a determinados condicionantes, el comportamiento de la célula (Schaffner & Dard 2003). En el

caso de las plaquetas, las integrinas no sólo permiten su adhesión sino que, una vez entran en contacto con su sustrato, se encargan de iniciar la activación plaquetaria mediante el inicio de una cascada de transducción de señales intracitoplasmáticas. Dentro de las proteínas de membrana implicadas en los procesos de agregación plaquetaria la más destacada es la integrina conocida como GPIIb/IIIa, que se une al fibrinógeno para producir la agregación plaquetaria (Shattil 1999). Esta proteína ocupa una gran proporción de la superficie plaquetaria (15 % de la proteína total de la membrana y 3 % de la célula). Es un heterodímero de 228 kDa de peso molecular, dependiente del calcio, cuyas subunidades a y b son codificadas por genes diferentes. La mayor proporción de esta glicoproteína es extracelular y dispone de 2 segmentos transmembrana y 2 segmentos cortos citoplasmáticos formados por los extremos C terminales. En la plaqueta en reposo se halla en forma de proteína monómerica ya que, para que se produzca la asociación de las subunidades, se requiere calcio extracelular, que se enlaza a la subunidad IIb (Jennings & Phillips 1982).

Una vez las plaquetas se activan se producen en ellas una serie de cambios celulares que cursan con un aumento de su tamaño, una mayor capacidad adhesiva y una variación en su morfología, emitiendo numerosas prolongaciones citoplasmáticas, conocidas como filopodios. Estos cambios de forma se acompañan de un incremento en la superficie desde los 8,02 mm², de la plaqueta en reposo, a los aproximadamente 13,0 mm², que alcanza la plaqueta activada. Los microtúbulos que están en estrecho contacto con el gel contractil, se trasladan hacia el centro de la célula. Se procede a la desintegración del citoesqueleto y se restituye a partir de la internalización de fragmentos de la membrana externa. Este es un proceso independiente del calcio (cuando el estímulo es el ADP) y dependiente de energía. De este modo, los trombocitos se organizan, relacionándose entre sí, para dar lugar a la conocida como placa trombótica, que se adhiere a la zona dañada y sirve como tapón primario (Parise et al., 2005). El proceso es de carácter autoestimulante, ya que, una vez activadas, las plaquetas segregan, provenientes de los gránulos densos, ADP, el cual funciona como activador de otros trombocitos que circulan por la zona en ese momento, además de una cantidad serotonina

adicional, lo que estimula la contracción del músculo liso del vaso lesionado, manteniendo la mencionada vasoconstricción inicial.

3. Fase plasmática

Estos eventos primarios fisiológicos de hemostasia permiten taponar pequeños defectos en la pared vascular, sin embargo para el control de la hemorragia provocada por defectos mayores es necesaria la formación de un coágulo sanguíneo. Una vez se organiza la placa trombótica, la posterior liberación de factores de la coagulación por parte de los trombocitos y por la pared vascular dañada da lugar al inicio de una compleja reacción en cascada que conduce finalmente a la coagulación de la sangre. La hipótesis de "cascada" pretende explicar el hecho de que los factores de coagulación existen de una forma inactiva o procoagulante, y de una forma activa. La forma activa de un factor activaría específicamente al siguiente de una forma secuencial, dando lugar a la llamada cascada de la coagulación (Imagen 6).

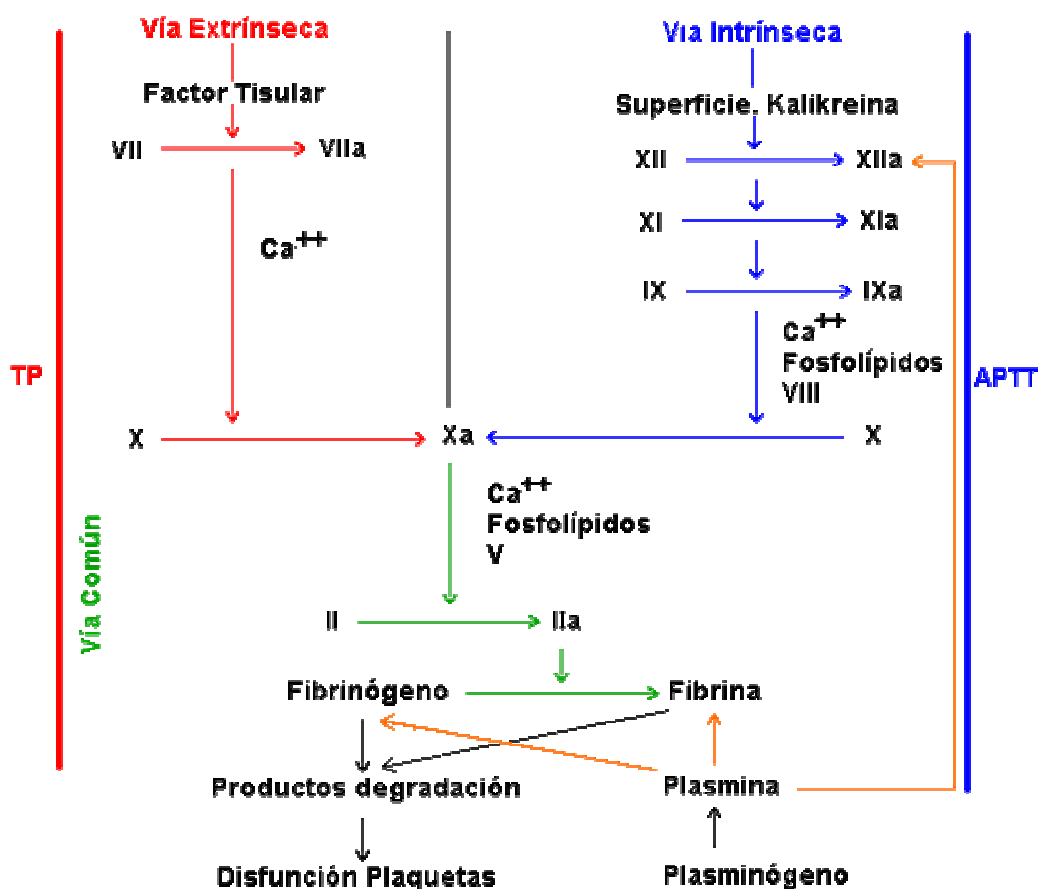


Imagen 6. Cascada de la coagulación

El proceso de activación para la mayoría de los factores se lleva a cabo por la "división" de una pequeña parte de la forma inactiva. La mayoría de los factores activados son serin-proteasas, pertenecientes a una familia de enzimas proteolíticas con una serina en su centro activo. Los factores serin-proteasa tienen un alto grado de especificidad en el sustrato. No son serin-proteasas el factor V, el factor VIII y el fibrinógeno. En la Tabla 2 se recoge la relación de los factores de la coagulación y la correspondencia de los números con el nombre de la proteína que representan (Davie et al., 1991).

La activación de la protrombina se puede alcanzar por dos vías o sistemas: la vía intrínseca de la coagulación y la vía extrínseca de la coagulación. Los términos intrínseco y extrínseco se refieren a la formación del coágulo dentro o fuera del sistema vascular. El sistema intrínseco es relativamente lento, y el extrínseco, más rápido. En ambas vías, el resultado último de la cascada de la coagulación es la transformación de la proteína plasmática conocida como protrombina en trombina. La trombina es una proteína enzimática que se encarga de catalizar la transformación de otra proteína plasmática, como el fibrinógeno, para dar lugar a la fibrina. La fibrina es el componente esencial del coágulo sanguíneo y se dispone en forma de una compleja malla cuyos filamentos se orientan en todas las direcciones. La fibrina posee una alta capacidad adhesiva, por lo que se adhiere a los trombocitos que originariamente se hallaban dispuestos sobre el defecto vascular, deteniendo de manera más efectiva la hemorragia. Sobre este reticulado de fibrina se adhieren nuevas plaquetas, las cuales inician su proceso de contracción tras activarse. Por este motivo, al adherirse entre sí y, a su vez, al coágulo de fibrina, se produce lo que conoce como retracción del coágulo, fenómeno que se traduce en una mayor hemostasia al la aproximación de los bordes del defecto originalmente establecido (Roberts et al., 2005).

B.8.1.1. La fibrina

El fibrinógeno es una abundante proteína plasmática también conocida como Factor I de la coagulación, cuya concentración media en la sangre es de unos 2.5 g/l (Bakker et al., 1992). Tras una extravasación sanguínea, el

fibrinógeno y la fibrina son elementos fundamentales dentro de la coagulación de la sangre, la respuesta inflamatoria tras el daño y las relaciones entre las células y la matriz extracelular en los procesos de regeneración tisular. Esencialmente, las moléculas de fibrinógeno constan de distintos grupos de cadenas peptídicas unidas por puentes disulfuro de tipo α , β y γ . La molécula individual de fibrinógeno es una estructura elongada de 45 nm de longitud que consta de dos dominios proteicos globulares (D), situados lateralmente en posición terminal, y que se encuentran conectados a un domino central (E) por medio de estructuras α -helicoidales (Mosseson et al., 2001). La polimerización de la fibrina ocurre en los últimos estadios de la cascada de la coagulación, tras la acción enzimática de la trombina sobre estructuras peptídicas del dominio E o dominio central del fibrinógeno, lo que provoca la exposición de fracciones proteicas con capacidad de interacción con los agujeros que se presentan con una periodicidad de 22.5 nm en las porciones terminales (D) de otras moléculas de fibrinógeno. Así se produce la formación de uniones dobles entre los dominios D y E de distintas moléculas, creando asociaciones fibrilares laterales sucesivas, lo que resulta en la formación de una malla o red de fibrina que se orienta desordenadamente en todas las direcciones del espacio. Finalmente, el coágulo de fibrina queda estabilizado por la acción del Factor XIII activado, creando un coágulo insoluble (Weisel 2004). Además de su función prioritaria dentro de los procesos de hemostasia naturales, aportando el andamiaje fundamental del trombo sanguíneo, la fibrina participa en otros importantes procesos biológicos debido a su peculiar estructura tridimensional, a su viscoelasticidad y a la capacidad de aportar sitios de unión para distintos elementos proteicos, posibilitando interacciones celulares complejas (Mosseson 2005). Entre estas importantes funciones alternativas, dentro del contexto de este trabajo, cabe destacar su interacción con la matriz extracelular mediante la unión de la fibronectina a la fibrina (Stathakis & Mosesson 1977) y la posibilidad de unión de células de distinto origen a la malla de fibrina mediante la acción de proteínas de superficie (integrinas), como ocurre en el caso de las plaquetas (Bennett 2001), lo que explica el importante papel que puede jugar dentro de los complejos procesos de regeneración y reparación de los tejidos (Nehls & Herrmann 1996).

B.8.2. Liberación de factores mitogénicos

Siguiendo el orden de los procesos normales de regeneración tisular, una vez acontece la coagulación de la sangre, en una etapa posterior y de una forma más lenta, a través de la acción moduladora de los GFs liberados por las plaquetas presentes en el coágulo, se estimula la proliferación y diferenciación de las células de los tejidos circundantes de la zona dañada. Tras la formación de un tejido inflamatorio de granulación y la aparición de nuevos vasos sanguíneos que aporten el necesario soporte nutricional, proceso que se conoce como angiogénesis, se favorece el depósito de colágeno, como elemento fundamental de la nueva matriz de reparación, (Kiritsy et al., 1993). De esta manera también se favorece la limitación del daño y la pérdida de sangre indirectamente a través una regeneración tisular estimulada, modulada por los factores mitogénicos secretados por las plaquetas.

B.8.2.1. La regeneración tisular

Existen descritos diversos modelos para explicar los procesos de regeneración tisular normales y, aunque existen claras diferencias entre los fenómenos que acontecen en tejidos de distinta naturaleza, en general, los procesos de regeneración tisular comparten un patrón básico que puede ser aplicable a todos ellos. La regeneración de los tejidos normales consta de tres fases consecutivas: (A) Hemostasis e inflamación, (B) Formación de un tejido de granulación y (C) Formación y remodelado de la matriz. Aunque existe un inevitable solapamiento entre las distintas fases, este modelo es válido para comprender el funcionamiento de los estadios iniciales de los procesos regenerativos (Imagen 7).

Como se describió anteriormente, las plaquetas inician la hemostasis mediante la formación de un agregado celular en la zona del daño. La activación plaquetaria, debido a su interacción con componentes moleculares del entorno, conlleva la liberación de su contenido granular al medio, iniciándose la fase precoz de la hemostasia, que se encuentra representada en la Imagen 7 por la primera campana. Entre los diversos agentes que son expulsados al secretar el trombocito su contenido granular se encuentran los

factores de crecimiento, los cuales se encargan de modular la diferenciación y proliferación de las células con potencial regenerativo presentes en el entorno. Pasadas unas pocas horas tras la hemorragia se establece un coágulo estable, esencial para la migración y organización de células indiferenciadas e inflamatorias y que consta fundamentalmente de fibrina. Entonces se inicia un proceso de inflamación local con objeto de limitar el daño y la pérdida de sangre, en lo que sería la fase tardía de la hemostasia (Imagen 7). Dicho proceso se encuentra intrínsecamente relacionado con la liberación de mediadores inflamatorios y quimiotácticos por parte de las plaquetas como son algunos metabolitos del ácido araquidónico y el Factor de Hageman (HF), que conducen a la activación de la vía clásica del complemento. Otras moléculas liberadas durante estos procesos como la Kalicreína (Sharma & Mohsin 1990) y el TGF- β (Wahl et al., 1987) son quimiotácticas para células proinflamatorias como los neutrófilos y los macrófagos, que acuden a la zona.

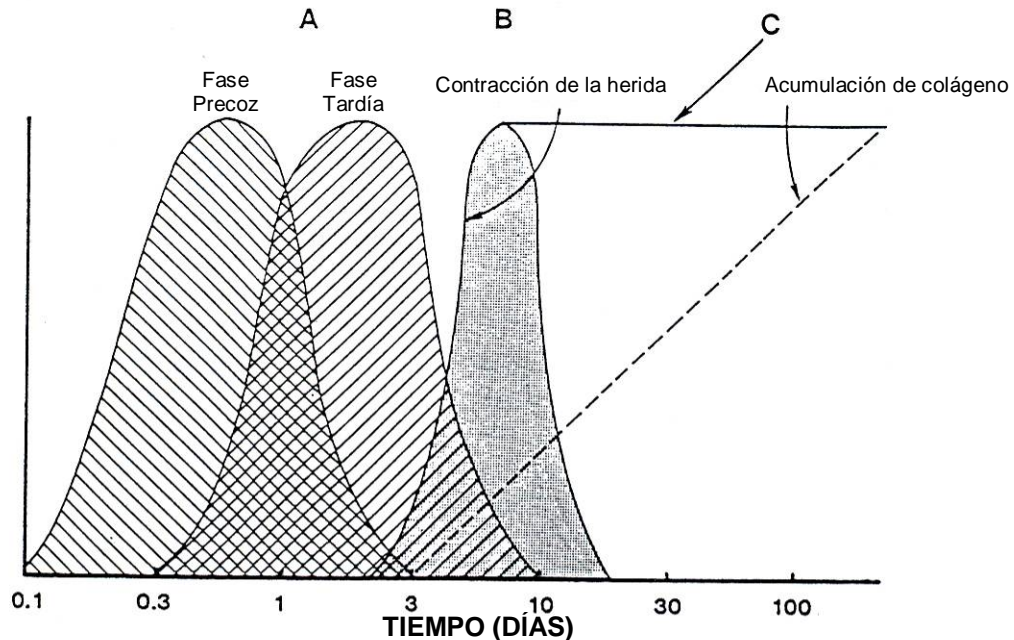


Imagen 7. Fases de la regeneración tisular.

(Adaptado de Kiritsy et al. 1993)

Así, tras la inflamación original, se inicia la fase B que cursa con la formación de un tejido de granulación, que se caracteriza por la presencia de gran cantidad de células inflamatorias infiltradas. La plaqueta es una importante fuente inicial de GFs, sin embargo la estimulación de la mitogénesis y la diferenciación que deben acompañar a un proceso de regeneración se mantiene gracias a la liberación de GFs y otros agentes mitogénicos por parte de otras plaquetas que se adhieren a la zona dañada a lo largo del proceso de regeneración y, sobre todo, a otras células que acuden o están presentes en la zona de la herida, como las propias células endoteliales, los fibroblastos y los macrófagos. Dentro del periodo de formación del tejido de granulación, los macrófagos juegan un importante papel. Además de ser quimiotácticos para los macrófagos, los factores de crecimiento PDGF y TGF- β inducen la secreción de más cantidades de estos y otros factores de crecimiento, como bFGF, por parte de los macrófagos, con lo se establece un sistema de “feedback” autocrino (Pierce et al., 1991).

La neovascularización (o angiogénesis) es el proceso biológico que se encamina a la restauración del aporte sanguíneo al nuevo tejido en formación de una zona que ha recibido un daño. Este proceso, fundamental para la adecuada regeneración del tejido por la necesidad no sólo de aportar nutrientes y oxigenación sino también del transporte de células, se inicia durante la fase de formación del tejido de granulación y se puede ver estimulado por diversos factores de crecimiento. De entre los factores de crecimiento angiogénicos más potentes destacan VEGF (Dvorak 2000) y bFGF (Gospodarowicz et al., 1987).

Una vez pasan tres días tras la respuesta hemostática (Imagen 7), comienza la paulatina desaparición del tejido de granulación y se inicia la síntesis y deposición del colágeno, componente fundamental de la matriz extracelular, así como de otros elementos de gran importancia para estos procesos como son los glicosaminoglicanos y algunas glucoproteínas estructurales, entre las que destaca la fibronectina. Los componentes más abundantes dentro de la matriz extracelular en los periodos iniciales subsiguientes a la formación del tejido de granulación son la fibronectina, el ácido hialurónico y, sobre todo, fibras de colágeno tipo I, II y V. Conforme la

herida madura y se inicia la remodelación de la matriz sobre la que se establece la regeneración, los niveles del fibronectina, ácido hialurónico y colágeno tipo III disminuyen, mientras que se incrementa el número de fibras de colágeno tipo I y la presencia de otros proteoglicanos (Kiritsy et al. 1993).

Al mismo tiempo en que la matriz extracelular es producida y se organiza, las nuevas células propias del tejido dañado se posicionan sobre ésta dando lugar a la paulatina regeneración del tejido. La duración y las particularidades de los mecanismos inherentes a esta fase final de maduración tisular son exclusivas para cada tipo de tejido.

Dichos acontecimientos biológicos están generalmente orquestados por los fibroblastos en el caso de los tejidos blandos, por los osteoblastos cuando se habla de tejido óseo y por los queratinocitos en el tejido epitelial cutáneo o intraoral. Como se apuntó previamente, estas células se ven altamente influenciadas por la acción de diversos factores de crecimiento, los cuales pueden actuar tanto en sentido positivo como inhibidor (Martin et al., 1992).

B.8.2.2. Los factores de crecimiento (GFs)

Las citoquinas conforman un heterogéneo grupo de proteínas de gran importancia en la regulación de multitud de procesos vitales para el funcionamiento normal del organismo. Las citoquinas podrían ser definidas como un grupo de factores proteicos polipéptidicos que se producen en la mayoría de las células nucleadas del organismo, con especial preponderancia por parte de las células del sistema inmune, y que tienen acción pleiotrópica (esto significa que su objetivo, en este caso las células, es múltiple y que pueden producir en ellas diversos y dispares efectos), situándose como mediadores de interacciones complejas entre distintos tipos celulares.

El campo de la investigación sobre citoquinas, tal y como se entiende hoy día, ha evolucionado a partir de cuatro fuentes independientes. La primera y posiblemente más importante es la Inmunología y, más específicamente, el conocimiento que deriva del estudio de las linfoquinas, cuyo origen se remonta

a la década de los 60. La segunda fuente de la investigación sobre las citoquinas proviene del estudio de los interferones. Originalmente descritos en los años 50 como agentes antivirales selectivos, poco a poco fueron reconocidos como proteínas con un amplio rango de acciones moduladoras de la diferenciación y proliferación de gran variedad de tipos celulares, entre los que destacan elementos del sistema inmune. La tercera fuente de los avances sobre el estudio de las citoquinas emana del campo de los factores de crecimiento hematopoyéticos y los factores estimuladores de colonias. Por último, aunque discutida, la cuarta fuente de investigación en citoquinas deriva del estudio de los factores de crecimiento (GFs) que actúan en células no hematopoyéticas (Graves & Cochran 1990).

Algunos autores se muestran reacios a incluir los factores de crecimiento “clásicos” dentro de las citoquinas propiamente dichas, sin embargo algunos de los GFs son capaces de inducir lo que se define como acciones similares (del inglés “cytokine-like action”) a las que poseen las citoquinas descritas en los tres grupos anteriores.

Apoyando estas tesis existen dos hechos fundamentales que abogan por la distinción entre citoquinas y factores de crecimiento (Vilcek 2003):

1.- La producción o liberación de GFs suele ocurrir de modo constitutivo en la mayoría de las células que los sintetizan, mientras que en el caso de las citoquinas dicha producción es muy baja o inexistente, dado que está regulada por diversos estímulos inter o intracelulares que acontecen en situaciones especiales.

2.- Al contrario que ocurre con las citoquinas, las acciones fundamentales de los factores de crecimiento tienen como diana células no hematopoyéticas.

Pese a estos datos, la línea de separación entre ambos grupos sigue manteniéndose tenue ya que los factores de crecimiento (GFs) comparten una serie de características comunes con las citoquinas (Vilcek 2003):

1.- Todos ellos son polipéptidos de bajo peso molecular (~30 KDa)

2.- La producción y liberación de GFs y citoquinas por parte de las células encargadas de ello es transitoria y su radio de acción es generalmente corto, limitándose a ejercer una acción paracrina o autocrina, nunca endocrina.

3.- Las citoquinas y los factores de crecimiento ejercen sus acciones mediante una unión de alta especificidad a receptores específicos de membrana, desencadenando una transducción de señales intracelulares que culminan con un determinado efecto sobre el comportamiento de la célula diana.

4.- Consecuentemente, la mayoría de las acciones biológicas que provocan los GFs pueden ser atribuidas a una inducción de la alteración de patrón de expresión génica de la célula diana, interviniendo de manera determinante en el ciclo celular (Ver apartado A.8.3.3.). Fenotípicamente, la acción de los GFs conduce a un incremento o reducción de las tasas de proliferación celular, cambios en la diferenciación de la célula y la expresión de determinados marcadores o funciones de diferenciación.

En el marco de los procesos normales de regeneración y reparación tisular, la intervención de los factores mitogénicos albergados en los gránulos α de las plaquetas en la regeneración de los tejidos dañados, no deja de ser un hecho fundamental (Bennett & Schultz 1993b; Parkar et al., 2001). En este sentido es un hecho constatado la capacidad de estimulación que se observa tras la aplicación de plaquetas sobre células con potencial osteogénico, gracias a la liberación de los GFs que albergan (Slater et al., 1995; Gruber et al., 2003; Kark et al., 2006). Un mayor conocimiento acerca de los mecanismos íntimos en los que intervienen en estos elementos proteicos, abriría la posibilidad de aplicar los factores de crecimiento con fines terapéuticos o investigadores.

B.8.2.2.1. Factor de crecimiento vasculo-endotelial (VEGF)

El estudio del factor de crecimiento vasculo-endotelial (Imagen 8) ha suscitado gran interés en la comunidad científica debido al papel que desempeña en la formación de vasos sanguíneos (angiogénesis / vasculogénesis) y en la influencia que tiene sobre una amplia variedad de procesos biológicos fisiológicos y patofisiológicos incluidos la embriogénesis, la cicatrización, el crecimiento tumoral, la isquemia miocárdial, algunos defectos neovasculares oculares y procesos inflamatorios crónicos tales como la artritis reumatoide (Folkman 1995; Ferrara 1996).

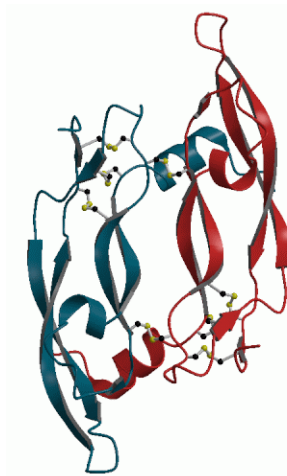


Imagen 8. VEGF

Bioquímica del VEGF

El VEGF, también llamado VEGF-A, pertenece a una familia en la cual se incluyen VEGF-B, VEGF-C y el factor de crecimiento placentario (PlGF). El gen VEGF-A humano se localiza en el cromosoma 6p21.3 (Ferrara 1996). Este gen contiene ocho exones los cuales pueden producir al menos cinco isoformas diferentes de VEGF, de 121, 145, 165, 189 y 206 aminoácidos (Poltorak et al., 1997). Estas isoformas se expresan como proteínas diméricas las cuales, exceptuando Vegf₁₂₁, se unen mediante unión heparínica a receptores específicos celulares. Vegf₁₆₅, la proteína más representativa de este grupo, es típicamente expresada como un homodímero de 45 KDa, que consta de dos monómeros de aproximadamente 23 KDa de peso molecular (Ferrara et al. 1992).

Se han identificado dos receptores proteicos tirosin-kinasa (PTK) de alta afinidad para VEGF: el PTK Flt-1 (o VEGF-r1) y el PTK KDR (o VEGF-r2). Los dos receptores presentan un 44% de aminoácidos homologos del uno al otro. Las estructuras de los receptores de VEGF son similares a las de los receptores PTKs de la familia de PDGF, comprendiendo regiones citoplasmáticas con secuencias insertadas en dominios catalíticos, un único dominio hidrofóbico transmembrana y siete dominios inmunoglobulina en las regiones extracelulares. (Ferrara 1996, 2000). KDR parece ser el mayor transductor de las señales VEGF que inician la mitogénesis y otros efectos biológicos en células endoteliales. Por el contrario, Flt-1 es el único receptor VEGF expresado en monocitos que, tras su estimulación por VEGF o PlGF, media en la estimulación de la quimiotaxis y la producción de factores tisulares por parte estas células (Clauss et al., 1996). Las funciones de Flt-1 en el endotelio no son del todo conocidas.

Propiedades biológicas del VEGF

El papel central del VEGF en el desarrollo de los vasos sanguíneos embrionarios se ha confirmado mediante estudios en los cuales la inactivación de un solo alelo del gen VEGF causaba un estancamiento letal de la angiogénesis en ratones (Carmeliet et al., 1996). Por otra parte, el VEGF es también un potente factor que influye en la permeabilidad de los vasos, por este motivo también recibe el nombre de factor de permeabilidad vascular, pero el papel biológico de esta función no está muy bien descrito. VEGF también tiene efectos hipotensivos in vivo, y es capaz de estimular la quimiotaxis de monocitos y la producción de factores tisulares (Clauss et al., 1996; Ferrara 1996).

Estos hechos hablan del importante papel del VEGF en los procesos de angiogénesis tanto a nivel embrionario como en los procesos de reparación vascular tras un daño. Probablemente la hipoxia sea el mayor estímulo para el aumento de la expresión de VEGF tanto in vivo como en modelos celulares normales y tumorales (Risau 1997). El VEGF es conocido por jugar un papel central en los procesos angiogénicos críticos en la patogenia del cáncer y de la retinopatía diabética, entre otras alteraciones vasculares (Folkman 1995). Sin embargo, los efectos angiogénicos de VEGF podrían ser clínicamente

beneficiosos frente a otras entidades patológicas (Asahara 1996). Pese a ello existen aún muchas preguntas sin respuesta acerca de la biología de este factor de crecimiento. En un futuro la investigación a este respecto debería centrarse en el incremento del conocimiento acerca de los mecanismos por los cuales el VEGF induce sus diversos efectos biológicos. De este modo, la capacidad de VEGF de promover la regeneración endotelial en arterias dañadas y aumentar las funciones protectoras del endotelio podría abrir un nuevo camino terapéutico. En este sentido, es bien sabido que, al margen de otros tipos celulares, los gránulos α de las plaquetas son una importante fuente de VEGF (Wartiovaara et al., 1998; Salgado 2001), por ello no es inconcebible que en el futuro, en la práctica clínica, se usen terapias antagónicas a VEGF mediante anticuerpos bloqueantes para tratar distintas clases de cáncer, mientras que, por otra parte, el VEGF pueda ser administrado a través de concentrados plaquetarios para tratar arteriosclerosis u otros procesos patológicos de daño vascular.

B.8.2.2.2. Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF)

Clásicamente el suero ha sido empleado para estimular el crecimiento de cultivos celulares *in vitro*. De hecho, el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) es un abundante factor de crecimiento en suero humano, con una presencia estimada de entre 15 y 50 ng/ml (Singh et al., 1982; Huang et al., 1983), que es suministrado a cultivos de células de origen mesenquimal como fibroblastos o células musculares lisas de las paredes vasculares (Antoniades & Owen 1982) para favorecer su desarrollo.

Este importante factor mitogénico fue detectado por primera vez en plaquetas humanas (Kohler & Lipton 1974; Ross et al., 1974), hallazgo científico al que esta proteína debe su nombre. Pese a que los gránulos α de las plaquetas son un importante reservorio de este factor, recientes estudios demuestran que puede ser sintetizado y liberado por otros tipos celulares como los macrófagos, los fibroblastos y los queratinocitos (Khan et al. 2000).

Bioquímica del PDGF

Los PDGF conforman una familia de homodímeros y heterodímeros proteicos catiónicos que incluía clásicamente dos tipos de cadenas peptídicas A y B unidas por enlaces disulfuro (Ross et al., 1986). Recientemente se han aislado dos nuevos péptidos pertenecientes a esta familia, la cadenas C (Li et al., 2000) y la cadena D (LaRochelle et al., 2001), que solo se asocian entre ellas formando dos homodímeros. Las formas maduras de las cadenas A y B del PDGF muestran entre ellas un 60% de similitud en la secuencia de aminoácidos. De este modo, existen cinco isoformas de PDGF que incluyen cuatro homodímeros: PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-CC y PDGF-DD y un heterodímero: PDGF-AB. Debido al reciente descubrimiento de las isoformas PDGF-CC y PDGF-DD, y pese a que hasta la fecha alrededor de 60 publicaciones acerca de estas dos nuevas proteínas están disponibles en la literatura científica, poco se sabe aún sobre la expresión génica, la estructura y el comportamiento biológico de ambos factores.



Imagen 9. PDGF-A

Las formas maduras de PDGF se presentan como proteínas de 30 KDa de peso molecular, mientras que las cadenas individuales migran en gel de electroforesis como componentes individuales de aproximadamente 15 KDa (Meyer-Ingold & Eichner 1995). Los genes que codifican las cadenas A y B del PDGF están localizados en los cromosomas 7 y 22 respectivamente (Betsholtz

et al., 1986). Ambos se organizan de manera similar con 7 exones, de los que generalmente el 4 y el 5 codifican la mayoría de la proteína madura (Bonthon et al., 1988). El exon 6 codifica una secuencia terminal COOH- para la cadena B. En el caso de la cadena A (Imagen 9), ésta se sintetiza en dos porciones separadas una con la secuencia COOH- y otra sin este terminal. Estas moléculas precursoras deberán sufrir un proceso de maduración proteolítica, eliminando la secuencia terminal COOH-, antes de alcanzar su forma final bioactiva (Heldin & Westermark 1999).

Hasta ahora se han identificado dos receptores de tipo tirosin-kinasa a través de los cuales las distintas isoformas de PDGF pueden ejercer su efecto sobre las células diana (Rosenkranz & Kazlauskas 1999). Dichos receptores de membrana, denominados PDGF R- α y PDGF R- β tienen un peso molecular de entre 170 y 180 KDa (Hart et al., 1988). Extracelularmente cada receptor comprende cinco dominios pseudo-inmunoglobulina, mientras que la porción intracelular del receptor corresponde a un dominio tirosin-kinasa (Heldin & Westermark 1990). El gen para el receptor PDGF R- α se localiza en el cromosoma 4q12 (Spritz et al., 1994) y el gen para el receptor PDGF R- β se encuentra en el cromosoma 5 (Yarden et al., 1986). Dado que las isoformas de PDGF son moléculas de tipo dímérico, se unen a dos receptores simultáneamente. El receptor α se une tanto a las cadenas A como a las B con alta afinidad, mientras que el receptor β solo permite la unión de la cadena B. De este modo PDGF-AA se une a receptores $\alpha\alpha$, PDGF-AB a receptores $\alpha\alpha$ o $\alpha\beta$ y PDGF-BB es capaz de interactuar con los tres tipos de combinaciones díméricas de receptores tirosin-kinasa (Heldin et al., 1988).

Propiedades biológicas del PDGF

Las isoformas díméricas de PDGF poseen capacidad de inducir una gran variedad de efectos que se pueden solapar, pero que no son idénticos para cada una de estas proteínas. El grado de interacción de PDGF con un tipo celular dependerá de la expresión en membrana de receptores para este factor de crecimiento que presente. Lógicamente, debido a su alta capacidad de

interacción con los distintos receptores, PDGF-BB es la isoforma con más actividad biológica (Robson et al., 1992), seguido de PDGF-AB (Boyan et al., 1994).

Tras la unión del PDGF a su receptor específico de la membrana plasmática de la célula diana se provoca la autofosforilación del dominio tirosin-kinasa del receptor. Este fenómeno conduce a la creación de sitios de anclaje para moléculas de transducción de señal que contienen dominios tipo SH2. Se genera una señal que es propagada intracelularmente de un modo muy rápido, a través del citoplasma hacia el núcleo, en el que se desencadenan una serie de eventos transcripcionales que modulan el ciclo celular (Heldin & Westermark 1999). En un modelo de regeneración experimental empleando fibroblastos gingivales y del ligamento peridontal, Mumford et al. (2001) observaron un patrón de comportamiento distinto entre ambos tipos celulares tras la administración de PDGF-BB, lo que sugiere que las diferencias específicas entre la expresión de receptores de membrana para este factor pueden determinar sustancialmente su efecto.

La capacidad mitogénica y de modulación del comportamiento celular que pudiera ejercer PDGF sobre células mesenquimales ha sido ampliamente estudiada en diversos ensayos experimentales para evaluar la posible influencia de esta proteína sobre las condiciones de regeneración en determinadas situaciones de daño tisular. PDGF es un potente mitógeno para la mayoría de las células de origen mesenquimal, incluyendo fibroblastos gingivales (Dennison et al., 1994; Wang et al., 1994), células musculares lisas (Graves & Cochran 1990), osteoblastos (Graves et al., 1989; Zhang et al., 1991) y células preosteoblásticas de origen tumoral MG63 (Graves et al., 1984). También es bien sabido que las células osteoblásticas humanas responden frente a PDGF-AA y PDGF-BB, mientras que los fibroblastos humanos son más susceptibles a la isoforma BB (Graves & Cochran 1991). PDGF es capaz de estimular la quimiotaxis (Terranova & Wikesjo 1987), la proliferación y la síntesis de colágeno de células del ligamento periodontal (Bartold & Raben 1996; Ojima et al., 2003), lo que indica que PDGF podría ser uno de los más importantes reguladores en el mantenimiento de la matriz

extracelular dentro del ligamento periodontal, aspecto que es de capital importancia en cualquier tipo de terapia de tipo regenerativo periodontal. También se ha observado experimentalmente en estudios realizados sobre distintos modelos animales que PDGF posee una importante capacidad de actuar como regenerador periodontal y periimplantario tanto solo (Vikjaer et al., 1997) como combinado con IGF (Lynch et al., 1991; Rutherford et al., 1992; Nociti et al., 2000; Stefani 2000). Atendiendo a estos resultados parece claro que la aplicación de las distintas isoformas de PDGF, entre las que destaca PDGF-BB como el factor más potente, podría suponer una serie de beneficios regenerativos a través de la estimulación de diversas células de origen mesenquimal.

Uno de los aspectos más interesantes de la biología de los factores de crecimiento es cómo su actividad puede ser regulada por otros GFs o citoquinas. Dicha regulación puede ser compleja y puede ocurrir tanto a nivel de producción y síntesis del factor como a nivel de respuesta celular. En este sentido, se ha observado como la administración de TGF- β sobre cultivos primarios de fibroblastos humanos estimula la secreción de PDGF por parte de estas células (Soma & Grotendorst 1989), mientras que la adición de TGF- β a cultivos de fibroblastos de ratón modula, mediante fenómenos competitivos, la interacción de las distintas isoformas de PDGF con sus receptores específicos, (Gronwald et al., 1989).

B.8.2.2.3. Factor de crecimiento transformante beta (TGF- β)

Hace más de 20 años un grupo de investigadores observaron la presencia de una actividad proliferativa de células transformadas en cultivo en agar promovida por una proteína, la cual recibió el nombre de factor de crecimiento transformante β (Moses et al., 1981). Posteriormente el TGF- β fue aislado y purificado a partir de plaquetas humanas (Assoian et al., 1983). Hoy día, TGF- β 1 (Imagen 10) es considerada la proteína tipo de una superfamilia de factores de crecimiento, diferenciación y morfogenéticos a la que pertenecen las activinas, las inhibinas y las proteínas morfogenéticas (Howe 2003)

Bioquímica del TGF- β

TGF- β es una molécula dimérica de 25 KDa de peso molecular, que consiste en dos cadenas polipeptídicas unidas por puentes disulfuro (Frolik et al., 1983). En mamíferos, TGF- β está codificado por, al menos, tres genes diferentes: TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3. TGF- β 3 presenta una homología del 80% con las dos primeras, mientras que TGF- β 2 comparte una homología del 70% con TGF- β 1 (Derynck et al., 1985). La mayoría del conocimiento relacionado con estas proteínas deriva de estudios realizados con TGF- β 1 y TGF- β 2. TGF- β 1 y TGF- β 2 pueden dar lugar a tres isoformas: homodímeros de TGF- β 1 o TGF- β 2 o un heterodímero de TGF- β 1 y TGF- β 2 (Cheifetz et al., 1987).

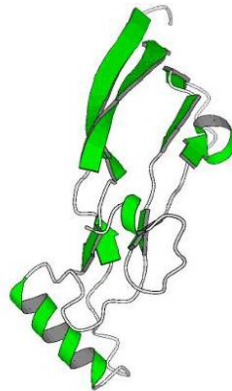


Imagen 10. TGF- β

Han sido identificados tres tipos de receptores para TGF- β : T β RI de 53 KDa, T β RII de 80 KDa y T β RIII, también conocido como betaglicano o endoglina, de 300 KDa (Cheifetz et al., 1988). Los dos primeros se unen con igual afinidad a TGF- β 1 y a TGF- β 2, mientras que el otro receptor se une con mayor afinidad a TGF- β 1. Este hecho biológico concuerda con los hallazgos de la mayoría de estudios en los que TGF- β 1 y TGF- β 2 tienen una actividad similar. Una vez TGF- β se une a estos receptores específicos de membrana se inicia una cascada de señalización intracelular a través de las vías proteicas Smad o MAPK, cuyo desenlace final es la modulación de la actividad de crecimiento celular mediante su acción sobre el núcleo (Howe 2003)

Propiedades biológicas del TGF- β

TGF- β se almacena en los gránulos alfa de las plaquetas circulantes en cantidades similares a PDGF y es liberado en la herida durante la coagulación sanguínea y la coexistente activación plaquetaria (Kiritsy et al., 1993). Sin embargo el hueso es el mayor reservorio de este factor en el organismo (Seyedin et al., 1987), lo que parece indicar que las células óseas son una importante fuente de esta proteína. TGF- β también puede ser secretado por un amplio rango de células entre las que destacan, además de algunas células de estirpe ósea, los linfocitos infiltrados (Kehrl et al., 1986), los macrófagos (Assoian et al., 1987) y los fibroblastos (Lyons et al., 1988).

Las posibles aplicaciones terapéuticas de TGF- β están relacionadas con su reconocido papel dentro de los procesos de regeneración tisular (Shah et al., 1999; Faler et al., 2006). TGF- β tiene la capacidad de estimular eventos relacionados con la regeneración de tejidos blandos como la inducción de la quimiotaxis al lugar de la herida de fibroblastos (Postlethwaite et al., 1987), macrófagos y sus precursores, los monocitos (Assoian et al., 1987). Pero TGF- β es, sobre todo, un importante factor regulador in vivo del crecimiento y diferenciación de las células que regulan la homeostasis ósea, como demuestran diversos estudios experimentales (Heckman et al., 1995; Sun et al., 1996; Beck et al., 1998). Al igual que ocurre con otros factores de crecimiento, dependiendo de las condiciones, del tipo celular con el que interacciona y de la relación de inhibición o sinergismo que pueda establecer con otros mediadores, TGF- β puede inhibir o estimular el crecimiento celular. En general TGF- β se comporta como un inhibidor para células epiteliales (Sporn et al., 1987) y como un estimulador del crecimiento y diferenciación de diversas células mesenquimales, como los fibroblastos y los osteoblastos (Mundy et al., 1995; Khan et al., 2000), siendo capaz a su vez de inducir la capacidad mitogénica y de síntesis de colágeno por parte de células osteoblásticas (Centrella et al., 1987; Robey et al., 1987). También se ha observado como TGF- β puede inhibir la reabsorción ósea mediante la estimulación de la apoptosis de los osteoclastos (Hughes et al., 1994).

Diversos estudios *in vitro* han revelado como es capaz de interactuar a diversos niveles con otros factores de crecimiento. Por ejemplo se ha demostrado *in vitro* como, dependiendo de la dosis administrada de cada factor, TGF- β puede estimular la proliferación de células osteoblásticas humanas que han recibido PDGF (Piche & Graves 1989), a la vez que puede actuar como modulador de la actividad celular inhibiendo la proliferación de fibroblastos de ratón (Anzano et al., 1986) y células humanas del ligamento periodontal (Oates et al., 1993) estimuladas con PDGF.

B.8.2.2.4. Factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF)

Los factores de crecimiento fibroblástico (FGF) componen una vasta familia de factores presentes en diversas especies que parecen haberse originado de una molécula antecesora común a través de complejos procesos de duplicación genética coincidentes en su origen con la evolución de los vertebrados (Coulter et al., 1997). De hecho, FGF no solo está presente en vertebrados sino que también existe en invertebrados y algunas familias de virus, como el baculovirus. Los FGFs conforman una gran familia de mediadores biológicos cuyo peso molecular oscila entre 17 y 34 KDa y pueden ser sintetizados a partir de diferentes genes según la especie y el subtipo de proteína (Imagen 11).

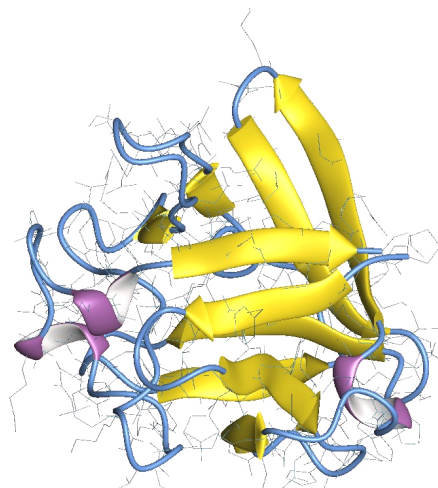


Imagen 11. Proteína tipo FGF

Los FGF están implicados en la regulación de procesos biológicos complejos como el desarrollo embriológico, la remodelación de los tejidos, la neoangiogénesis, fenómenos de carcinogénesis, la inflamación crónica y la regeneración tisular (Ornitz & Itoh 2001). La familia de los FGF humanos se compone de, al menos, 22 miembros, que comparten entre un 13% y un 80% de homología peptídica entre ellos (Ensoli et al., 2003). Dentro de esta familia el factor de crecimiento más interesante en el contexto de este trabajo, por sus propiedades como agente regenerador, es el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF).

Bioquímica del bFGF

El factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) es conocido por ser la isoforma 2 dentro de los FGFs humanos. Es una proteína de 154 aminoácidos cuyo peso molecular oscila entre 16 y 18 KDa y es codificada por un gen presente en el cromosoma 4 (4q26-27) del genoma humano. bFGF y la isoforma 1 o factor de crecimiento fibroblástico ácido (aFGF) comparten un 55% de homología (Thomas 1987). Ambos factores interactúan con los mismos receptores de membrana (FGFR), de los que existen descritos hasta la fecha cuatro tipos distintos (FGFR1, FGFR2, FGFR3 y FGFR4). Todos los FGFR, cuyo peso molecular varía entre los 95 y los 150 KDa, tienen una estructura similar, con un dominio extracelular que consta de tres regiones similares a inmunoglobulinas a la que se unen los FGF, un dominio transmembrana y un dominio intracelular que alberga una región tirosin-kinasa, encargada de iniciar la cascada de transducción de señales una vez se fosforila tras la unión del factor (McKeehan et al., 1998). bFGF y aFGF se unen con igual afinidad a FGFR1, FGFR2, mientras que solo aFGF se une a FGFR4 (Dionne et al., 1990; Partanen et al., 1991). bFGF tiene capacidad de unirse a la heparina, al heparan sulfato y a la fibronectina de la matriz extracelular a modo de reservorios, y mantenerse biológicamente activo tras esta unión (Rothe & Falanga 1989), lo que es de suprema importancia en el comportamiento biológico de este mediador ya que así se previene la rápida degradación del mismo en torrente sanguíneo o en el medio extracelular. Las

células endoteliales y los macrófagos se encuentran entre las principales células productoras de bFGF (Baird et al., 1985)

Propiedades biológicas del bFGF

Dentro de la gran familia de los FGF, bFGF, junto con aFGF, es la proteína más empleada en estudios experimentales y de la que se tiene más conocimiento. bFGF es conocido por su importante papel en la angiogénesis (Cross & Claesson-Welsh 2001) y la capacidad de estimular, de manera dosis dependiente, la actividad de las células regeneradoras más importantes del área orofacial como son queratinocitos (O'Keefe et al., 1988), osteoblastos (Nakamura et al., 1995) y fibroblastos de ligamento periodontal (Terranova et al., 1989). Sus efectos, al igual que ocurre con otros factores de crecimiento, dependen de múltiples circunstancias como son la presencia de otras proteínas o factores reguladores y del tipo celular con el que interactúa. En este sentido, se ha observado como TGF- β podría mediar de una manera importante la función de bFGF en tejido óseo, ya que estudios *in vitro* han demostrado como la estimulación del crecimiento de células osteoblásticas mediante bFGF cursa con un incremento de la expresión de mRNA de TGF- β (Noda & Vogel 1989)

B.8.2.2.5. Factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF-1)

La familia de los factores de crecimiento similares a la insulina comprende a dos moléculas: IGF-1 e IGF-2, también conocidas como somatomedinas (Laron 2001). Ambos factores son conocidos por el nombre de "similares a la insulina" puesto que comparten un 47% de homología con respecto a esta hormona, fundamental dentro del metabolismo de la glucosa, mientras que exhiben una homología del 62% entre ellos (Rall et al., 1987). Los IGF pueden ser hallados en plasma sanguíneo a altas concentraciones, ya sea en estado inactivo como unidos a grandes proteínas de transporte, seguramente debido a que se encuentran almacenados dentro de los gránulos alpha de las plaquetas en una considerable proporción (Chan & Spencer 1998). IGF-1 (Imagen 12) es conocida desde hace décadas por mediar *in vivo* en los efectos de promoción del crecimiento óseo que ejerce la GH, u hormona de

crecimiento (Schoenle et al., 1982), lo que la convierte en un mediador con un marcado efecto sobre la homeostasis ósea. IGF-2 es funcionalmente similar a IGF-1, sin embargo se relaciona más con el crecimiento fetal.

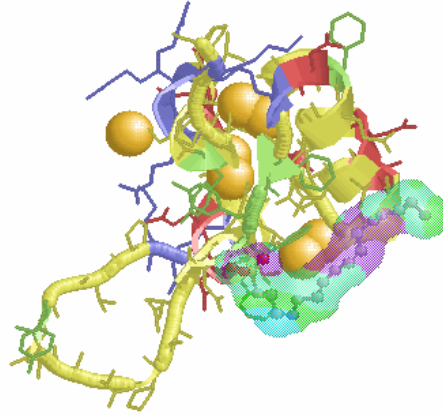


Imagen 12. IGF-1

Bioquímica del IGF-1

El factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF-1) es un péptido con un peso molecular de 7.6 KDa, y un pH ligeramente básico (pH 8.4). El gen que sintetiza a esta proteína está localizado en el brazo largo del cromosoma 12 (12q23-23) y está formado por 6 exones (Brissenden et al., 1984). Tanto IGF-1 como IGF-2 son sintetizados en forma de precursores proteicos para luego sufrir un proceso de maduración molecular mediada por distintas enzimas que los conduzca a su forma madura y activa (Jansen et al., 1983). El receptor para IGF-1 (IGF-1R) es codificado por un gen presente al final del brazo largo del cromosoma 15 (15q25-26) y consta de 21 exones (Seino et al., 1989). Este receptor es una proteína tetramérica que consiste en dos cadenas α extracelulares, con un dominio cisteína cada una, y 2 cadenas β intracelulares, que incluyen un dominio tirosin-kinasa, esencial para la transducción de señales que acontecen tras la activación del receptor cuando se une su sustrato, IGF-1 (Delafontaine et al., 2004). IGF-1R es expresado en la mayoría de los tejidos y células durante la embriogénesis (Seino et al., 1989), lo que explica la gran importancia de IGF-1 en los procesos de desarrollo del organismo.

Propiedades biológicas del IGF-1

IGF-1 es un factor producido en prácticamente todos los tejidos, siendo, por ejemplo, el factor de crecimiento sintetizado en mayor proporción por las células óseas (Giannobile 1996), por eso se pueden localizar grandes cantidades de IGF-I e IGF-II en hueso, siendo el IGF-II el factor de crecimiento más abundante en la matriz ósea (Khan et al., 2000). El tejido sobre el que IGF-1 posee mayor grado de modulación es el óseo, habiéndose observado como IGF-1 es el mediador de la actividad anabólica y mitogénica de la Hormona de Crecimiento (GH) en los procesos de desarrollo y crecimiento del hueso (Laron 1999). Los efectos de IGF-1 en células óseas incluyen la estimulación de la proliferación osteoblástica y la síntesis de colágeno tipo I por parte de éstas (Graves et al., 1994), habiéndose observado como la combinación de IGF-1 con PDGF se traduce en efectos sinérgicos de ambas moléculas modulando positivamente la proliferación y actividad osteoblástica (Howell et al., 1996).

B.8.2.2.6. Factor de crecimiento epidérmico (EGF)

El factor de crecimiento epidérmico (EGF) fue el primer factor de crecimiento en ser descubierto a principios de los años 60, tras observarse como extractos de la glándula submaxilar de ratones que fueron inyectados a ratones recién nacidos, indujeron la erupción precoz de incisivos (Cohen 1962). EGF pertenece a una superfamilia de factores proteicos, de la cual es la proteína tipo. La superfamilia EGF incluye a las subfamilias de las neuregulinas y los EGFs, a la que pertenecen miembros como el propio EGF, TGF- α , la betacelulina y la epiregulina (Lee et al., 2003). EGF y TGF- α son péptidos homólogos, con 53 y 50 aminoácidos respectivamente, que poseen un marcado potencial mitogénico. Ambas proteínas se unen al mismo receptor de membrana, sin embargo no ejercen idénticos efectos y son antigénicamente diferentes, por ello, pese a sus similitudes y haber sido consideradas clásicamente la misma proteína, deben ser tenidas en cuenta como moléculas distintas (Nimni 1997).

Bioquímica del EGF

EGF es una proteína monomérica que tiene un peso molecular de alrededor de 6 KDa (Imagen 13). En humanos es codificada por un gen que se localiza en el cromosoma 4, un gen relativamente largo con 24 exones (Lee et al., 2003).

El receptor para EGF es una proteína de membrana de 170 KDa, conocida por el nombre de EGFR, ErbB1 o HER1, y formada por una cadena peptídica sencilla que consta de un dominio extracelular de 621 aminoácidos, al que se une el EGF, un dominio hidrofóbico de transmembrana de 23 aminoácidos y un dominio intracitoplasmático de 542 aminoácidos, que contiene una porción tipo tirosin-kinasa, la cual una vez se une EGF al receptor, al igual que ocurre con los receptores para PDGF o IGF-1, se encarga de iniciar la cascada de señales intracelulares que culminan con la modulación de la actividad celular inducida por este factor (Carpenter & Wahl 1990).

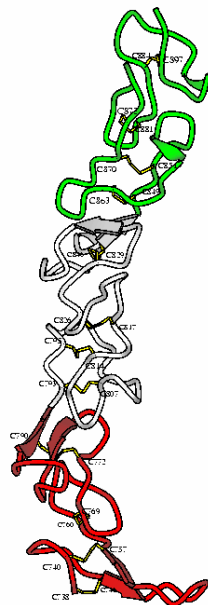


Imagen 13. EGF

Propiedades biológicas del EGF

EGF es una proteína que se encuentra presente en la mayoría de los mamíferos, siendo su espectro de acción muy amplio ya que ejerce sus efectos tanto en células epiteliales como mesenquimales. EGF puede ser secretado por múltiples tipos celulares, siendo las plaquetas son una importante fuente de este factor (Pesonen et al., 1989). La lista de acciones atribuida a este factor de crecimiento es extensa (Carpenter & Wahl 1990). Esto se debe probablemente a que es uno de los factores más estudiados por su temprano descubrimiento. Sin embargo es pertinente afirmar que cualquiera de sus acciones puede ser atribuida a otro factor de la subfamilia EGF, dada su capacidad de mimetizar las acciones de la proteína tipo.

En cualquier caso, dentro del contexto de este trabajo, es interesante reseñar el importante papel que EGF parece jugar en la regeneración tisular, con mayor influencia en los procesos que atañen a los tejidos blandos. Se demostró como EGF estimula la proliferación de queratinocitos *in vitro* y la regeneración epidérmica *in vivo* (Brown et al., 1989). Además EGF estimula la secreción de colagenasa por parte de fibroblastos, lo que parece indicar que EGF tiene un importante papel en la remodelación de los tejidos blandos (Rumalla & Borah 2001). Dentro de la reparación ósea EGF no parece tener un papel estimulante, al contrario, desde los primeros estudios diseñados para evaluar el comportamiento de EGF se observó, como esta proteína puede estimular la reabsorción ósea en cultivos de osteoblastos de origen animal (Tashjian & Levine 1979) e inhibir la síntesis de colágeno de células osteoblásticas (Hiramatsu et al., 1982).

B.9. MARCADORES DE DIFERENCIACIÓN Y PROLIFERACIÓN CELULAR

B.9.1. Marcadores de diferenciación celular

El citoesqueleto es una estructura tridimensional citoplasmática dinámica, esencialmente proteica, propia de las células eucariotas. Esta estructura celular podría ser entendida como análoga al aparato locomotor de los seres multicelulares complejos, actuando como un músculo y como un esqueleto que permite el movimiento y la estabilidad de la célula. La expresión concreta de algunos de los componentes del citoesqueleto en células de una muestra puede ser útil con fines diagnósticos e investigadores, ya que pueden servir como marcadores de diferenciación celular.

Existen tres tipos primarios de fibras que componen el citoesqueleto, son los microfilamentos, los microtúbulos y los filamentos intermedios.

Los **microfilamentos** son fibras finas y flexibles formadas de proteínas que se disponen como hilos de entre 6 y 8 nm de diámetro organizados de forma lineal helicoidal bicatenaria. Los microfilamentos están compuestos predominantemente de un tipo de proteína contráctil de 42 KDa de peso molecular llamada actina, una de las proteínas celulares más abundantes, pudiendo llegar a constituir hasta el 20% del total de las proteínas de algunas células no musculares. La asociación de los microfilamentos con la proteína miosina es la responsable de la contracción muscular, basándose en un sistema de consumo energético por ATP. Los microfilamentos se encargan de llevar a cabo movimientos celulares. Estas fibras se pueden hallar en el centro de las microvellosidades de las células, concentrados bajo la membrana plasmática, en el anillo contráctil en el proceso de división celular o formando parte fundamental del entramado contráctil de las células musculares, conocido como sarcómero (Ross et al., 2004).

Los **microtúbulos** son largos tubos cilíndricos huecos no ramificados de 20-25 nm de diámetro y una pared con un espesor de alrededor de 5 nm. Se organizan en 13 protofilamentos de moléculas globulares diméricas de tubulina, proteína estructural cuyo peso molecular es de unos 110 KDa. Cada dímero de tubulina se compone de una molécula de α -tubulina y otra de β -tubulina, cada una de ellas con un peso molecular de aproximadamente 55 KDa. Se organizan de una manera muy especial, ya que se originan en el MTOC (Centro organizador de microtúbulos), el cual se ubica en las proximidades del núcleo, extendiéndose hacia la periferia celular. Los microtúbulos actúan como un andamio que determina la forma celular, aportando un conjunto de pistas para que se muevan las organelas y vesículas de secreción. Los microtúbulos también forman las fibras del huso para separar los cromosomas durante la mitosis y pueden ser usados para la locomoción. (Ross et al., 2004).

Los **filamentos intermedios** se disponen como fibras, trenzadas como si fueran cuerdas, con un diámetro que oscila entre 8 y 10 nm. Se denominan "intermedios" puesto que su diámetro se encuentra entre el correspondiente a los filamentos de actina (6 a 8 nm) y el de los microtúbulos (20 a 25 nm). Dentro del citoesqueleto celular representan estructuras resistentes y estables, siendo su función principal aportar solidez estructural y resistencia mecánica a la célula frente a las fuerzas de cizallamiento. Se extienden a través del citoplasma, conectando desmosomas y hemidesmosomas. En el núcleo se encuentran justo debajo de la membrana nuclear interna. Casi todos los filamentos intermedios se forman de subunidades con un peso molecular de alrededor de 50 KDa, de este modo, a diferencia de los microtúbulos y los microfilamentos exhiben una diversidad y una especificidad para cada tejido considerables (Steiner & Roop 1988). La gran estabilidad estructural y la especificidad de los filamentos intermedios en determinados tipos celulares, hacen de la identificación de algunas proteínas constituyentes de los filamentos un elemento de gran valor diagnóstico como marcadores de diferenciación de células de diversas estirpes presentes en una muestra biológica.

B.9.1.1. Citoqueratinas

Las citoqueratinas (CK) son el grupo de filamentos intermedios más diverso, comprendiendo más de 50 isoformas diferentes. Los filamentos de queratina están formados por una gran variedad de subunidades de citoqueratina diferentes y es posible encontrarlos en diversas células de estirpe epitelial (Moll et al., 1982).

Las subunidades de citoqueratina no copolimerizan con proteínas de otros tipos de filamentos intermedios, conformando un sistema citoespecífico e histoespecífico bien definido, lo que implica una serie de consecuencias diagnósticas claras. Según su comportamiento bioquímico, se pueden clasificar en dos grupos (Sun et al., 1985): Las de grupo I (CK 9-20), comprenden proteínas relativamente pequeñas, de bajo peso molecular y de punto isoeléctrico ácido, mientras que el grupo II (CK 1-8), está constituido por proteínas más grandes, con un alto peso molecular (56 a 67 kDa) y un punto isoeléctrico relativamente básico.

Los dos grupos de citoqueratinas se comportan como heteropolímeros obligados, es decir, se requiere un miembro de cada grupo para la formación de un filamento de queratina. Como consecuencia de esto, cada epitelio expresa por lo menos dos citoqueratinas diferentes, ya que generalmente, cada una de las queratinas ácidas se coexpresa con otra queratina básica específica, formándose pares de queratinas (Crewther et al., 1983), siendo excelentes marcadores de diferenciación en células de estirpe epitelial.

B.9.1.2. Vimentina y Desmina

Los filamentos intermedios de vimentina y símil vimentina se forman de filamentos homopoliméricos de una sola proteína, de este modo, en contraste con las citoqueratinas, constituyen una familia de filamentos intermedios muy diversa presente en muchos tipos celulares de varias estirpes, también útiles como marcadores de diferenciación celular para células de origen generalmente mesenquimal.

Los de **vimentina** son los filamentos intermedios más abundantes que hay en todas las células mesenquimales. La vimentina es una proteína, cuyo peso molecular es de 58 KDa y tiene 464 aminoácidos. La vimentina se expresa ampliamente al inicio del desarrollo embrionario y puede ser detectada en tejidos originados tanto en el ectodermo como en el mesodermo, pero progresivamente su expresión se debilita y se va restringiendo a unos pocos tipos celulares. En la mayoría de los casos, los filamentos intermedios específicos de cada tejido, reemplazan a la vimentina en forma progresiva, aunque a veces se puede observar coexpresión de los dos tipos de filamentos intermedios en la misma célula (Duprey & Paulin 1995).

Entre los filamentos símil vimentina se incluyen los de **desmina**, que son característicos de las células musculares (Paulin & Li 2004). Small & Sobieszek (1977) purificaron esta proteína, esencial dentro de los filamentos intermedios de las células musculares, denominándola esqueletina. Pero Lazarides & Hubbard (1976), quienes también la habían purificado, la llamaron desmina, del griego “desmos” que significa unión, por sus atribuidas funciones como elementos de unión entre los sarcómeros, que son las unidades contráctiles de las células musculares. Su purificación bioquímica condujo a la producción de anticuerpos para esta proteína, lo que permitió a su vez la determinación de su distribución espacial dentro de diversos tejidos (Lazarides 1980). El gen que codifica esta proteína fue identificado en 1984 (Capetanaki et al. 1984). Se ha demostrado como la desmina es capaz de interaccionar con diversas moléculas y, por tanto, las funciones específicas de la desmina se relacionan con esa capacidad de interacción. Muchos aspectos de la biología celular de la desmina son destacables, como por ejemplo su resistencia a la desnaturalización química, su alta estabilidad mecánica y su interacción directa dentro de los procesos de diferenciación de células musculares, por lo que es un excelente marcador de dichos procesos para esta estirpe celular (Costa et al., 2004). Sin embargo, a día de hoy y pese a la curiosidad que inspira esta proteína, aún se desconocen gran parte de las funciones que pudiera poseer la desmina.

B.9.2. Marcadores de proliferación celular

B.9.2.1. Ki67

Ki67 es una enorme proteína, cuyo peso molecular es de 395 KDa y que es codificada por casi 30000 pares de bases del genoma humano. La expresión de esta proteína en una célula o población celular es asociada con fenómenos de proliferación, ya que el hecho biológico de su presencia en todas las fases activas de la célula (G_1 , S, G_2 y M) y su ausencia en G_0 la convierten en un excelente marcador para determinar la proliferación celular (Scholzen & Gerdes 2000).

Ki67 tiene un patrón de localización muy complejo pero también muy específico dentro del núcleo, ya que durante la mitosis se mueve de una manera muy precisa desde el nucleolo hacia la capa pericromosómica. De hecho durante la interfase Ki67 sólo puede ser detectada dentro del núcleo, mientras que en mitosis la mayoría de la proteína se reubica en la superficie de los cromosomas (Brown & Gatter 2002). La proteína Ki67 se fosforila y defosforila durante el proceso de mitosis celular; esto la hace susceptible a la acción de proteasas, lo que sugiere que su expresión está regulada por procesos proteolíticos (Schluter et al., 1993).

Pese a conocerse mucho sobre su estructura, localización y significado biológico, la función de Ki67 aún permanece desconocida, aunque existen indicios de que la expresión de esta proteína es un requisito absolutamente necesario para la progresión de la célula a lo largo de su ciclo de división, lo que justificaría su presencia en las fases activas del ciclo celular.

B.10. CLUSTERS DE DIFERENCIACIÓN (CD)

Desde el momento en el que se identificaron diferentes tipos de linfocitos, los inmunólogos han intentado desarrollar métodos válidos para clasificarlos, estableciendo lo que se conoce por el nombre de “tipaje” celular, el cual permita la identificación de distintas subpoblaciones leucocitarias con fines diagnósticos o investigadores.

La forma básica de orientar este proceso de caracterización celular está fundamentada en producir anticuerpos que reconozcan selectivamente distintas subpoblaciones de linfocitos. Inicialmente se emplearon aloanticuerpos, es decir, anticuerpos capaces de reconocer formas alélicas de proteínas de la superficie celular, cuyas posibilidades eran limitadas puesto que sólo son útiles para proteínas de superficie que existan en formas alélicas, y autoanticuerpos específicos frente a linfocitos en pacientes con enfermedades autoinmunitarias, también con evidentes limitaciones. El desarrollo de la ciencia y la tecnología referente a este campo tuvo su punto de inflexión con el avance desarrollo de los hibridomas, cuya utilidad más interesante científicamente fue la posibilidad de producir anticuerpos monoclonales (Abba et al., 2002a).

B.10.1. Los anticuerpos monoclonales

Cada linfocito B produce anticuerpos con una única especificidad. Dado que los linfocitos B normales no pueden crecer y prevalecer de una manera indefinida, para producir un anticuerpo concreto en las cantidades deseadas era necesario immortalizar las células B productoras de un anticuerpo específico. Tras un proceso de fusión celular entre una célula B y una célula de mieloma, conocido como hibridación, se logró la obtención de células immortalizadas y productoras de anticuerpos, las cuales se denominaron **hibridomas** (Kohler & Milstein 1975). Los anticuerpos producidos por los hibridomas reciben el nombre de anticuerpos monoclonales (MoAbs). Actualmente, los hibridomas se generan de un modo habitual fusionando mielomas de ratón sensibles al medio HAT (Hypoxanthine-Aminopterin-Thymidine) con células B de ratones, ratas o hamsters inmunizados. El descubrimiento de los anticuerpos monoclonales revolucionó la investigación

biomédica, siendo en la actualidad las aplicaciones más comunes de los hibridomas y los anticuerpos monoclonales las siguientes (Abba et al., 2002b):

1.- Identificación de marcadores fenotípicos exclusivos de un tipo celular determinado. Esta es la base de la clasificación moderna de los linfocitos, leucocitos y otros tipos celulares dando lugar a la conocida nomenclatura CD (del inglés Cluster of Differentiation).

2.- El diagnóstico de diversas enfermedades infecciosas y sistémicas, basándose en la detección de antígenos, anticuerpos o ambos, manifestados específicamente en tejidos o muestras biológicas del sujeto portador de dicha enfermedad.

3.- Diagnóstico y tratamiento de tumores. Los anticuerpos monoclonales específicos de algunos tumores se emplean para la detección precoz de estas patologías además de ser útiles para la inmunoterapia tumoral *in vivo*.

4.- Análisis funcional de la superficie celular y de moléculas secretadas. En investigación inmunológica, los anticuerpos monoclonales que se unen a moléculas de la superficie celular y, consecuentemente a este fenómeno, estimulan o inhiben determinadas funciones celulares son herramientas de un valor extraordinario para definir las implicaciones biológicas de las moléculas de superficie celular, incluyendo a los receptores de los antígenos. Los anticuerpos que se unen a las citoquinas y las neutralizan se usan de manera sistemática para la detección de la presencia y analizar las funciones ejercidas por estos señalizadores intercelulares en experimentación tanto *in vivo* como *in vitro*.

Las moléculas de la superficie celular que son reconocidas por anticuerpos monoclonales se denominan antígenos de superficie, ya que es posible crear anticuerpos o “marcadores” contra esas moléculas, que permitan identificar y diferenciar distintas poblaciones celulares. Estos marcadores pueden ser agrupados en distintas categorías; algunos son específicos para células de una determinada estirpe o vía de maduración, y la expresión de otros marcadores varía según el estado de actividad o diferenciación de las

propias células. Los análisis bioquímicos de las proteínas de superficie celular reconocidas por diferentes anticuerpos monoclonales demostraron que, en muchos casos, estos anticuerpos reconocían la proteína equivalente de otras especies. Este descubrimiento generó una considerable confusión, dado que dichos marcadores de superficie se designaron inicialmente en función de los anticuerpos que reaccionaban con ellos.

B.10.2. La nomenclatura CD

Con objeto de clasificar de un modo razonado los muchos anticuerpos monoclonales generados por diversos laboratorios de todo el mundo y solventar este problema de designación se propuso adoptar un sistema de nomenclatura uniforme. De este modo se estableció la conocida como nomenclatura "CD", siglas corresponden al anglicismo "cluster of differentiation" el cual significa grupo de diferenciación. Según dicho sistema, un marcador de superficie que identifica una estirpe o una fase determinada de la diferenciación, que tiene una estructura definida y que es reconocido por un grupo (cluster) de anticuerpos monoclonales se considera miembro de un grupo de diferenciación (CD). Las siglas CD vienen seguidas de un número ordinal que las determina. Esta manera tan actualmente aceptada de clasificar los marcadores de superficie fue propuesta y establecida por primera vez en el 1st International Workshop and Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens (HLDA), que se celebró en París en 1982 con la participación de eminentes inmunólogos de todo el mundo (Zola 2001).

Dicho código, aunque aplicado originalmente en exclusiva para linfocitos humanos, ahora es normal referirse a marcadores homólogos presentes en otras especies y en células diferentes a los leucocitos. El uso de la nomenclatura CD se ha ampliado a muchos tipos celulares, habiéndose identificado más de 250 tipos y subtipos de CDs; además existen tres tipos de proteínas: BCR, TCR y HLA, que marcan el reconocimiento específico del antígeno por el sistema inmune y que no han recibido un número CD de identificación. Los sucesivos HLDA Workshops asignan cada CD basado en la misma reactividad a un antígeno humano con al menos dos mAbs, es decir, debe haber al menos dos anticuerpos monoclonales para cada antígeno. El

indicador provisional “w” (del inglés workshop) se aplica cuando un antígeno no se encuentra bien caracterizado o está representado por solamente un MoAb, como por ejemplo le ocurre al CDw136, y significa que dicho CD es un nuevo candidato en estudio (Zola & Swart 2005).

La investigación relacionada con los efectos de los anticuerpos monoclonales sobre la función linfocitaria han demostrado que los antígenos de superficie no son únicamente meros marcadores fenotípicos, sino que también participan en diversas respuestas de los linfocitos. Por lo tanto, en la actualidad se considera que las dos funciones esenciales que pueden ser atribuidas a los distintos antígenos CD son:

- 1.- Promocionar la reacción y la interacción intercelular y,
- 2.- Participar en la transducción de las señales intracelulares que conducen a la activación o respuesta celular.

B.10.2.1. CD10

Este marcador, conocido también como antígeno de la leucemia aguda linfoblástica común (cALLA), endopeptidasa neutra, metaloendopeptidasa o encefalinasa, fue descrito por primera vez en 1975 (Greaves et al., 1975). Es una proteína de 100 KDa de peso molecular. Su naturaleza es de carácter enzimático, siendo considerada una metaloendopeptidasa, que funciona como una enzima de superficie encargada de reducir la respuesta celular frente a hormonas peptídicas regulando la concentración local de péptidos mediante su degradación (Oliva 2004). De este modo, muchas células sensibles a hormonas y a péptidos expresan el antígeno para CD10. Esta proteína se puede localizar en la membrana celular, en el área del aparato de Golgi o en el citoplasma celular. CD10 se encuentra expresado principalmente por células B inmaduras y algunas células B maduras, además de células progenitoras linfoides y los granulocitos. Otros tejidos normales no linfoides que se sabe que expresan comúnmente CD10 incluyen a los melanocitos, células mioepiteliales de las glándulas salivares y de la mama, el borde apical de células del intestino, los túmulos y glomérulos renales, el epitelio prostático

glandular, el borde apical de las células ductales del epidídimo, células de la médula ósea y células de los alveolos pulmonares y de los canalículos hepáticos (Metzgar et al., 1981; Keating et al., 1983; Erdos et al., 1985; Gusterson et al., 1986; Mahendran et al., 1989).

B.10.2.2. CD41

Conocido también como GPIIb o cadena de las integrinas α IIb. Es un heterodímero proteico que consta de dos monómeros: GPIIba, con 120 KDa de peso molecular, y GPIIbb, péptido con un peso molecular de 23 KDa. Establece una unión de tipo no covalente con GPIIIa, conocido también como CD61, para formar la integrina GPIIb/IIIa. Se encuentra expresado solamente en plaquetas y megacariocitos, y de una manera especialmente intensa en las plaquetas con un número de aproximadamente 80000 por plaqueta, representando la proteína de superficie más abundante de este tipo celular (Wagner et al., 1996). La importancia biológica del CD41 radica en el hecho de que interviene en la agregación y activación de las plaquetas, dentro de la coagulación, de una manera determinante, permitiendo la unión de la plaqueta al fibrinógeno o la fibronectina, puesto que reconoce la secuencia peptídica RGD (Berlanga et al., 2005). Dado que los megacariocitos se encuentran en médula ósea, su detección en sangre es un indicativo de la presencia de plaquetas o restos de la membrana de las mismas tras su activación.

B.10.2.3. CD56

Conocido también como marcador Leu-19 o NKH-1, es una proteína de diversas isoformas con un peso molecular que oscila entre 120 y 140 KDa (Massaro 2002). Es una isoforma de la molécula de adhesión de células nerviosas N-CAM, perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas. Se encuentra expresada principalmente por neuronas y linfocitos NK (Natural Killers), aunque también se puede detectar su expresión por parte de algunas subpoblaciones de células T y B. Es una proteína de adhesión intercelular, aunque se ha demostrado recientemente que también puede funcionar como señalizador celular, interviniendo en el proceso de activación del receptor para FGF (Kiselyov et al., 2005).

B.11. INTERÉS CIENTÍFICO DE LA TESIS DOCTORAL

No existe hasta la fecha una descripción de la ultraestructura de los preparados ricos en plaquetas obtenidos a partir de la sangre del propio paciente, que son empleados para mejorar las condiciones de regeneración tisular. Tampoco existe ningún trabajo que certifique la presencia, dentro del coágulo que es aplicado clínicamente, de los factores de crecimiento plaquetarios con mayor implicación biológica en la regeneración de los tejidos, ni ningún modelo válido que ayude a conocer las relaciones que se pudieran establecer entre las células presentes en la zona receptora y el producto autólogo aplicado.

Debido a la controversia científica y las importantes lagunas de conocimiento que existen alrededor del uso del plasma rico en plaquetas como agente terapéutico, por sus posibles implicaciones en la alteración del ciclo celular y su indeterminado potencial para ser aplicado en determinados escenarios clínicos como agente inductor de los procesos de regeneración y reparación tisular normales, nuestro grupo de trabajo se planteó el desarrollo de un proyecto de investigación que permitiera despejar algunas de las dudas que existen planteadas a este respecto.

La profundización en el conocimiento del plasma rico en plaquetas, en lo que atañe a su estructura y componentes biológicos y sus propiedades como agente potenciador de la regeneración tisular, permitiría establecer los caminos que ayuden a conseguir alcanzar un grado de protocolización del empleo de concentrados plaquetarios en base a una consistencia científica, ampliando las posibilidades terapéuticas en cirugías de orden regenerativo no sólo en el campo de la Cirugía Bucal o la Periodoncia, sino también con posibilidades de aplicación a intervenciones quirúrgicas ejercidas en otras localizaciones.

C. HIPÓTESIS DE TRABAJO

C. HIPÓTESIS DE TRABAJO

El plasma rico en plaquetas debería contener plaquetas y fibrina, y es conocido que las plaquetas contienen gránulos α , los cuales, a su vez, albergan factores de crecimiento. Estos factores conforman un grupo de proteínas conocidas por su capacidad de intervenir en el ciclo celular, modulando la proliferación, diferenciación y quimiotactismo de múltiples tipos celulares esencialmente de carácter no hematopoyético. Por tanto, el coágulo de plasma rico en plaquetas debería contener dichos factores de crecimiento y la aplicación de este preparado en condiciones de daño tisular debería ayudar a promover una acción biológica modulada que conduzca a la regeneración y reparación de los tejidos, mediante la modulación de las células del entorno en términos de diferenciación, proliferación y quimiotaxis, mientras que la fibrina podría ser un importante soporte como matriz primaria de regeneración, al margen de sus conocidas propiedades hemostáticas y adhesivas.

D. OBJETIVOS

D. OBJETIVOS

Los objetivos científicos de este trabajo de investigación son los siguientes:

- Analizar ultraestructuralmente los coágulos de plasma rico y pobre en plaquetas que se emplean en cirugías regenerativas del ámbito orofacial.
 - Evaluar la presencia en el coágulo de PRP, mediante técnicas de específicas de laboratorio, de los factores de crecimiento con mayores implicaciones biológicas dentro de los tejidos presentes en el área bucal.
 - Estudiar los efectos que se producen, tras la aplicación del coágulo de PRP sobre modelos celulares *in vitro* de tipo óseo y epitelial, en cuanto a su proliferación, diferenciación celular y relaciones establecidas con el preparado plasmático.
 - Asentar las bases que permitan desarrollar un nuevo tipo de terapia con fines regeneradores utilizando productos derivados de la propia sangre del paciente.
-

E. MATERIAL Y MÉTODOS

E. MATERIAL Y MÉTODOS

E.1. MATERIAL

E.1.1. Donantes

Para este estudio fueron seleccionados 20 sujetos, de los cuales 16 eran varones y 4 mujeres, con un rango de edad comprendido entre los 22 y los 44 años, conformando un grupo de donantes con una edad media de 27.4 años. Para el diseño de este trabajo de investigación se siguieron las normas establecidas en los protocolos bioéticos de Helsinki (World Medical Association Declaration of Helsinki, 2000). Todos los donantes aceptaron las condiciones explicadas acerca de la naturaleza del estudio y firmaron el documento de consentimiento informado elaborado para hacer saber a cada individuo en que consistiría el uso que se le daría a la sangre que dona.

Los donantes, en aras de minimizar las posibles interferencias producidas por factores ajenos a la normalidad, fueron seleccionados siguiendo los siguientes criterios (Eriksson & Whiss 2005):

- Ser pacientes sanos, sin ninguna patología de base digna de consideración que pudiera alterar los resultados obtenidos en este estudio, como pudieran ser coagulopatías, alteraciones hepáticas, renales o esplénicas.

- Los donantes no debían haber consumido ningún fármaco sea cual fuera su naturaleza durante al menos 14 días previos al momento de la extracción de la sangre venosa, ni debían haber sido tratados por motivos odontológicos, también en los anteriores 14 días.

- Los donantes no debían haber recibido ninguna vacuna ni haber sufrido una infección severa en el último mes.

- Por último los donantes fueron incluidos sólo si habían declarado que en los tres meses previos no habían:

- Sufrido hospitalización
- Recibido acupuntura, tatuajes o piercing
- Padecido fiebre tras visitar una región en la que exista la malaria
- En el caso de las mujeres, estado embarazadas.

E.1.2. Centrifugadoras

La centrifugadora utilizada para obtener el hematocrito de las distintas muestras de sangre que se han manejado en este estudio fue una Nahita modelo 2600.

Para centrifugar las muestras contenidas en los tubos Eppendorf se empleó una centrifugadora modelo Eppendorf Centrifuge 5810 R.

E.1.3. Cloruro de Calcio

El Cloruro de Calcio empleado como activador del coágulo tanto en el procedimiento de obtención de PRP como de PPP se encontraba en una solución de 0.025 mol/l (Diagnostica Stago^R).

E.1.4. Líneas celulares

E.1.4.1. Modelo óseo: Línea celular MG63

Se empleó como modelo óseo la contrastada línea celular MG63 (Billiau et al., 1977). Dicha línea, cuyo número de referencia de la ATCC es CRL-1427, fue suministrada por el banco de células del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada. MG63 es una línea de estirpe mesenquimal, derivada de osteosarcoma humano de un varón, caucasiano de 14 años. Esta línea celular requiere actuar en cultivo con un nivel 1 de bioseguridad

E.1.4.2. Modelo epitelial: Línea celular DOK

Como modelo celular epitelial se utilizó la línea DOK (Chang et al., 1992), obtenida del banco celular de la ECACC y cuyo número de referencia es 94122104. La línea DOK deriva de una pieza dorsal de lengua de un varón caucasiano de 57 años. Tras eliminar un carcinoma de células escamosas del paciente, el cual había sido un gran fumador, la displasia fue quitada subsecuentemente y se empleó para iniciar un cultivo primario hasta establecer la línea DOK. El grado de displasia en el paciente fue descrito como moderado. Las células muestran alguna estratificación en cultivos confluentes y presentan un perfil de producción de queratina similar a la displasia original. El cultivo de esta línea requiere un nivel 1 de bioseguridad.

E.1.5. Material para Western Blot

E.1.5.1. Anticuerpos

Para la ejecución de la técnica de Western Blot fueron empleados anticuerpos monoclonales primarios específicos para los distintos factores de crecimiento que se pretendían identificar: Anti VEGF (C-1): sc-7269 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, California, Estados Unidos), Anti PDGF-A (E-10): sc-9974 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, California, Estados Unidos), Anti-Human TGF- β 1 Clone 9016.2 (Sigma, Saint Louis, Missouri, Estados Unidos), Anti-Human IGF-1 Goat (Sigma, Saint Louis, Missouri, Estados Unidos), Anti-Human bFGF Clone FB-8 (Sigma, Saint Louis, Missouri, Estados Unidos), Anti-Human EGF Clone EGF-10 (Sigma, Saint Louis, Missouri, Estados Unidos). Como anticuerpos secundarios se emplearon anticuerpos IgG marcados con fluorocromos, específicos para la especie en la que se produjo el anticuerpo primario, todos obtenidos de Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, California, Estados Unidos).

E.1.5.2. Soluciones

Las soluciones y geles empleados para la técnica de Western Blot, así como el material empleado para elaborarlos quedan recogidos a continuación:

GELES DE ELECTROFORESIS

Gel Superior (para un gel)

Agua milliQ: 2.56 ml

Tampón del gel superior: 1 ml

S.D.S. 10%: 40 μ l

Acrilamida 30%: 0.4 ml

AMPS (Sulfato amónico): 25 μ l

TEMED: 5 μ l

Gel Inferior (al 12%)

Agua milliQ: 2.1 ml

Tampón del gel superior: 2.3 ml

S.D.S. 10%: 90 μ l

Glicerol 50%: 0.9 ml

Acrilamida 30%: 3.7 ml

AMPS (Sulfato amónico): 50 μ l

TEMED: 10 μ l

SOLUCIONES CONSTITUYENTES

Tampón del Gel Superior

6 gr de Tris

80 ml de agua milliQ

Completar hasta 100 ml con pH= 6.8

Tampón del Gel Inferior

18.5 gr de Tris

80 ml de agua milliQ

Completar hasta 100 ml con pH= 8.8

S.D.S. 10%

1 gr de S.D.S.

9 ml de agua milliQ

A.M.P.S.

0.1 gr de A.M.P.S.

1 ml de agua milliQ

Sample buffer

0.0605 gr de Tris

1 gr de S.D.S.

5 ml de glicerol

0.01 gr de Azul Bromofenol

2.75 ml de β -mercaptoetanol

30 ml de agua milliQ

Completar hasta 50 ml con pH= 6.8

Tampón de electroforesis

6 gr de Tris

1 ml de S.D.S. 10%

28.8 gr de glicina

Completar hasta 1000 ml con pH= 8.3 (Conservar en frío a 4°C)

Tampón de transferencia

1.455 gr de Tris

0.7325 gr de glicina

50 ml de metanol

0.9375 ml de S.D.S. 10%

Completar hasta 250 ml con pH= 9.2

Solución de bloqueo

5 gr de leche desnatada en polvo

100 ml de TBS (1x)

Solución de lavado

0.5 ml de Tween 20 al 0.1 %

500 ml de TBS (1x)

(**NOTA:** Todos los procedimientos se realizaron a temperatura ambiente)

E.1.5.3. Cuba de electroforesis y aparato de transferencia

Para la técnica de Western Blot se utilizó el kit de electroforesis Power Pac HC™ (BIO-RAD, Hercules, California, Estados Unidos). Una vez se terminó el proceso de corrido proteico fue empleado el Trans-Blot^R SD (BIO-RAD, Hercules, California, Estados Unidos) para realizar la transferencia de proteínas desde el gel a los soportes de nitrocelulosa.

E.1.6. Anticuerpos para el tipaje de las líneas celulares

Para la identificación de elementos plaquetarios en el preparado de PRP se empleo el PE-conjugated anti-**CD41**, específico para GPIIb de plaquetas, R7058, 0.375 mg/l (DAKO A/S, Glostrup, Dinamarca).

Para el tipaje de las dos líneas celulares, MG63 y DOK, se emplearon los siguientes anticuerpos monoclonales:

CD45 (BD Biosciences, San Jose, CA, EEUU):

Antígeno común de leucocitos. Es una proteína de transmembrana de tipo I presente en todas las células hematopoyéticas excepto en eritrocitos. Por su especificidad para células de origen sanguíneo se empleó como control negativo para MG63 y DOK.

CD14 (BD Biosciences, San Jose, CA, EEUU)

Es una proteína de membrana que se observó en macrófagos y cuya función es la unión a lipopolisacaridos de origen bacteriano. Se empleó en el mismo panel que CD45, también como control negativo.

HLA-ABC (BD Biosciences, San Jose, CA, EEUU)

El anticuerpo monoclonal W6/32 reacciona con el complejo mayor de histocompatibilidad de clase I, HLA-A, B, C. Este complejo está asociado a la β 2-microglobulina, se expresa en todas las células nucleadas y juega un papel destacado en la respuesta inmune y la vigilancia tumoral. Fue usado como control positivo.

CCR5 (BD Biosciences, San Jose, CA, EEUU)

Es un receptor de membrana presente en macrófagos, entre otros tipos celulares. Es el receptor para algunas quimioquinas como RANTES, MIP 1-alpha y MIP 1-beta. En otro orden de propiedades biológicas, puede ser también el sitio de unión para HIV y SIV.

CXCR3 (BD Biosciences, San Jose, CA, EEUU)

También conocido como CD183, es el receptor para algunas quimioquinas. Su activación induce la activación de integrinas, cambios en el citoesqueleto y la migración quimiotáctica asociada a procesos inflamatorios.

CXCR4 (BD Biosciences, San Jose, CA, EEUU)

Es también conocido por la designación CD184. Es el receptor para la quimioquina de tipo CXC conocida como SDF-1. Dentro del desarrollo embrionario, está implicado en la linfopoiesis y mielopoiesis, la cardiogénesis, la formación de vasos sanguíneos y el desarrollo del cerebelo. Aunque se encuentra expresado en varias células sanguíneas y pertenecientes a diversos tejidos, su papel en la homeostasis tisular tras el desarrollo aún no está desvelado.

CD95 (BD Biosciences, San Jose, CA, EEUU)

También llamado Apo-1 o receptor Fas, es miembro de la superfamilia de los receptores para factores de necrosis tumoral. La unión a su ligando Fas ligand (también conocido por FasL o CD178) activa la apoptosis celular, o muerte celular programada. Su expresión no significa necesariamente la presencia de fenómenos apoptóticos.

HLA-DR (BD Biosciences, San Jose, CA, EEUU)

Es una glucoproteína de transmembrana, que forma parte del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II. Este complejo es de vital importancia en el inicio de la respuesta inmune.

CD55 (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, California),

Conocido como DAF (Complement Decay-Accelerating Factor), es un factor regulador de una de las tres vías del sistema del complemento.

CD59 (Immunotech, Marsella, Francia)

También conocido por las siglas MACIF (Membrane attack complex inhibition factor), al igual que CD55 es un factor regulador de la cascada del sistema del complemento.

CD 56 (Immunotech, Marsella, Francia),

También denominada N-CAM, su expresión se ha asociado clásicamente con células de origen linfoide, sobre todo linfocitos NK, aunque se puede encontrar en otros tipos celulares, como las neuronas y células del músculo esquelético. Es una proteína que media en la adhesión intercelular, aunque se ha observado como es capaz de funcionar como señalizador celular, interviniendo en el proceso de activación del receptor para FGF.

CD38 (BD Biosciences, San Jose, CA, EEUU)

CD38 es una ectoenzima multifuncional que se encuentra expresada en una amplia variedad de células y tejidos especialmente en leucocitos. Se encarga de mediar en la adhesión celular y la transducción de señales intracitoplasmáticas inducidas por el Calcio.

CD10 (BD Biosciences, San Jose, CA, EEUU)

Es una metaloendopeptidasa, que funciona como una enzima de superficie encargada de reducir la respuesta celular frente a hormonas peptídicas regulando la concentración local de péptidos mediante su degradación. Puede tener importancia en los fenómenos de remodelación de la matriz extracelular.

CD20 (BD Biosciences, San Jose, CA, EEUU)

Realizada en el mismo panel que CD10, es una proteína de transmembrana de tipo III que forma un canal que permite el flujo de calcio

hacia el interior de la célula, requerido para su activación. Se expresa en diversos tipos de leucemias y linfomas.

CD3 (BD Biosciences, San Jose, CA, EEUU)

Es una proteína perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas que se asocia con el receptor para antígenos de las células T (TCR). Es esencial para la expresión de superficie del propio TCR y la transducción de señales.

CD19 (BD Biosciences, San Jose, CA, EEUU)

CD19 está implicado en la transducción de señales, dado que su activación cursa con un incremento intracelular de la concentración de Ca^{2+} . Esta proteína interviene en el desarrollo de las células que lo expresan (clásicamente los linfocitos B), así como en su activación y diferenciación.

CKA – PE / CK18 – FITC (BD Biosciences, San Jose, CA, EEUU)

CKA y CK18 son citoqueratinas, un grupo de filamentos intermedios del citoesqueleto que se expresan comúnmente en células de origen epitelial. La expresión de citoqueratinas suele ser un claro indicador de actividad diferenciadora.

EPCAM (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EEUU):

También llamada proteína de membrana celular KSA, es una proteína de adhesión celular expresada en algunas células epiteliales normales y en la mayoría de las células tumorales de origen epitelial.

(<http://pathologyoutlines.com/cdmarkers.html>)

E.1.7. Material para Inmunohistoquímica

Para llevar a cabo la técnica de inmunohistoquímica se utilizaron el inmunotecnidor de capilaridad Immunotek 500 Plus (DAKO, Barcelona, España) y el kit para anticuerpos monoclonales y policlonales MASVISION (Master Diagnostica, Granada, España) empleando los siguientes anticuerpos: Anti-

CD10 (Clona 56C6), Anti-CD 56 (Clona 1B6), Anti-Desmina (Clona C18), Anti-Vimentina (Clona V9), Pancitoqueratina (Clona CK AE1-AE3) y Anti-Ki67 (Clona SP6), todos ellos obtenidos de Master Diagnostica (Granada, España) y aplicados en una dilución de 1:20.

E.1.8. Microscopios electrónicos

Para la obtención de imágenes de los distintos preparados biológicos analizados en este trabajo mediante la técnica de microscopía electrónica de transmisión (TEM) se empleó un microscopio electrónico Zeiss modelo DSM 950 (Berlín, Alemania). Las imágenes de SEM convencional fueron obtenidas observando la muestra con un microscopio electrónico de barrido LEO modelo 1430VP SEM con una intensidad de 20Kv. Las imágenes de microscopía electrónica de barrido de alta resolución fueron obtenidas con un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM) LEO modelo 1530 – GEMINI con una intensidad de 5Kv y un WD = 5mm.

E.1.9. Microscopio óptico

Las imágenes de microscopía óptica presentadas se obtuvieron empleando un microscopio Nikon Phase contrast – 2 ELWD 0.3 que llevaba acoplada una cámara NIKON Coolpix 5400 con 5.5 Megapixels de resolución.

E.1.10. Citómetro de flujo

La citometría de flujo por fluorescencia para el tipaje de las líneas celulares se realizó con un citómetro de flujo FACSort BD (Becton Dickinson Biosciences Immunocytometry Systems, San Jose, California, Estados Unidos).

E.1.11. Campana de flujo y estufa de cultivo

Para el manejo en esterilidad de los cultivos celulares fue usada una campana de flujo modelo Aura Vertical S.D.4 (Bio Air Instruments, Siziano, Italia). Para el cultivo de las líneas celulares empleadas en el presente trabajo

se utilizó una estufa Steri Cult CO₂ Incubator – HEPA Class 100 (Thermo Electro Corporation, NY, Estados Unidos), siempre mantenida a 37°C y un 5% de CO₂.

E.1.12. Pipetas

Todas las pipetas empleadas en las distintas fases experimentales recogidas en este trabajo fueron pipetas Nichipet EX (Japón) con distintos rangos de aspiración.

E.1.13. Material Fungible

Las puntas de pipetas usadas fueron puntas Neptune Barrier Tips, que presentan un filtro de seguridad y que son adaptables al tipo de pipeta descrito anteriormente. Para el manejo de la mayoría de las diversas muestras biológicas obtenidas se emplearon tubos Eppendorf con capacidad de 2 ml. Las líneas celulares fueron cultivadas en Falcons de 250 ml, mientras que la incubación con las distintas muestras de coágulos de PRP y PPP se realizó en microplacas estériles de poliestireno de 24 pocillos de 16 mm de diámetro (Iwaki, Asahi Techno Glass, Japón). Los porta y cubre objetos empleados en el procesado de las diversas muestras obtenidas a lo largo del proceso de experimentación fueron obtenidos de la casa Menzel-Glaser (Braunschweig, Alemania).

E.2. MÉTODOS

E.2.1. Preparación de los coágulos de PRP y PPP

Se extrajo sangre venosa a cada uno de los donantes seleccionados para el ensayo en distintos días, siguiendo la planificación marcada por el protocolo de investigación previamente establecido. En el procedimiento de extracción sanguínea, se minimizó la posibilidad de activación plaquetaria mediante el uso de una aguja de palometa con un torniquete ligero, pese a ello se desecharon los primeros 2 ml de sangre, para obtener muestras lo menos alteradas posible. Tras la extracción de un volumen determinado de sangre a cada paciente, según los requerimientos del ensayo programado, ésta se almacenó en tubos Vacutainer (BD, Reino Unido) de 5cc, los cuales contenían 0.1 cc de citrato de sodio al 3.8% para evitar su coagulación, identificando posteriormente cada una de las muestras. Para la obtención de los coágulos de PRP y PPP, los tubos que contenían las muestras de sangre se introdujeron en la centrifugadora Nahita, la cual se programó para que centrifugara las muestras a 1500 rpm durante 7 minutos. Terminado el proceso de centrifugado, se extrajeron cuidadosamente los tubos del interior de la maquina, para evitar la alteración en la distribución de las fracciones del hematocrito. Para preparar el coágulo de PRP se extrajeron 500 μ l de la porción de plasma que quedó encima del precipitado, o serie roja, resultante tras el centrifugado de las muestras sanguíneas, usando una pipeta con un rango de aspiración entre 100 y 1000 μ l, con cuidado de no aspirar serie roja. Para preparar PPP se siguió el mismo procedimiento anterior, con la diferencia de que se pipeteó la fracción más superior del sobrenadante plasmático. Dichas muestras de plasma, tanto rico como pobre en plaquetas, se depositaron separadamente, debidamente identificadas, en tubos de ensayo estériles o Eppendorf de 2 ml. A cada una de estas muestras de 500 μ l de plasma se le añadieron 250 μ l de Cloruro de Calcio y fueron inmediatamente sumergidas en agua mantenida a 37° C durante aprox. 12 minutos para acelerar el proceso de coagulación del plasma, tanto rico como pobre, obteniendo las que fueron la muestra finales de PRP (Imagen 14) y PPP (Imagen 15) empleadas para cada uno de los ensayos.

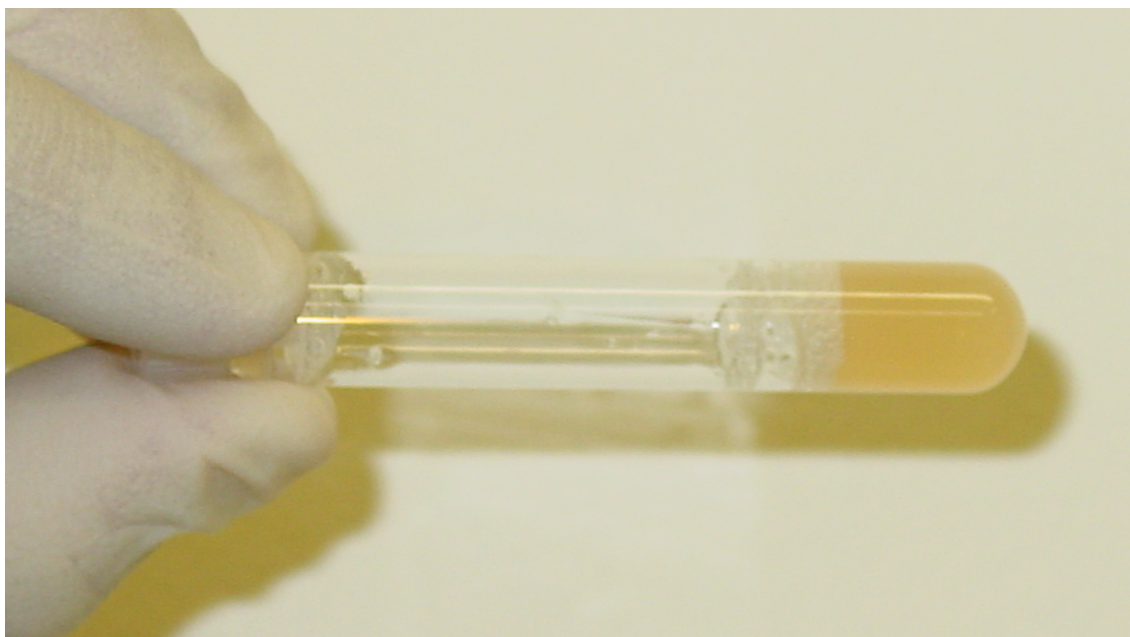


Imagen 14. Coágulo de PRP



Imagen 15. Coágulo de PPP

E.2.2. Preparación de las muestras biológicas para análisis con TEM

Las muestras obtenidas se fijaron in situ con glutaraldehído al 2.5% en una solución 0.1M de tampón de cacodilato de sodio (pH 7.4) durante una hora a temperatura ambiente. Concluidas las 2 horas, las muestras se lavaron en tampón cacodilato 0.1M con pH 7.4 por tres veces con intervalos de 10 minutos entre cada lavado, siempre con una temperatura entre 0°C y 4°C. A continuación se llevó a cabo una postfijación en una solución de agua destilada que contenía OsO₄ al 1% y ferricianuro potásico al 1% que fue aplicada durante 60 minutos en oscuridad, entre 0°C y 4°C. Transcurridos los 60 minutos, se realizaron tres lavados en agua destilada con intervalos de 5 minutos entre ellos a la misma temperatura que en los pasos anteriores. Posteriormente se aplicó ácido tánico al 0.15% en tampón durante un minuto a temperatura ambiente. Tras ello se sumergieron las muestras en solución tampón cacodilato, descrito anteriormente, durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, con un intervalo de tiempo de 5 minutos entre ellos, se realizaron dos lavados con agua destilada, de nuevo a temperatura ambiente. Las muestras fueron después sumergidas en una solución de agua bidestilada con acetato de uranilo al 2%, en oscuridad y a temperatura ambiente durante 120 minutos. Transcurrido ese tiempo se lavaron las muestras tres veces con agua bidestilada, a intervalos de minutos a temperatura ambiente. Las muestras se deshidrataron con un gradiente de concentraciones crecientes de etanol a una temperatura entre 0-4°C, siguiendo este protocolo:

- 1.- Etanol al 50% durante 5 minutos
 - 2.- Etanol al 75% durante 5 minutos
 - 3.- Etanol al 90% durante 5 minutos
 - 4.- Etanol al 95% durante 5 minutos
 - 5.- Etanol al 100% durante 5 minutos
 - 6.- Etanol al 100% durante 5 minutos
 - 7.- Etanol al 100% durante 5 minutos
 - 8.- Etanol al 100% durante 5 minutos
-

Posteriormente las muestras se infiltraron en Epon-etanol (en relación 1:2) durante 60 minutos a temperatura ambiente. A continuación se infiltraron otra vez las muestras un tiempo de 60 minutos en Epon-etanol (esta vez en relación 1:1) a temperatura ambiente.

Tras estos dos primeros procesos de infiltración, se infiltraron de nuevo las muestras en Epon-etanol (2:1) durante 60 minutos a temperatura ambiente para, una vez transcurrido el tiempo estipulado en el protocolo seguido, infiltrar finalmente las muestras en Epon completo durante toda una noche a una temperatura de entre 0°C y 4°C.

Al día siguiente, tras separar las muestras del recipiente con óxido de propileno, se cortaron secciones ultrafinas, con un grosor de 500 a 700 μm , que fueron montadas sobre rejillas de cobre. Por último y para dejar las muestras listas para ser observadas con TEM, se contrastó el preparado final con acetato de uranilo y citrato de plomo.

Este proceso se llevó a cabo en la Unidad de Preparación de Muestras Biológicas (LPMB) del Servicio de Microscopía Electrónica del Centro de Instrumentación Científica (CIC) de la Universidad de Granada siguiendo el protocolo establecido para este tipo de microscopía por Renau y Megías (1998).

E.2.3. Preparación de las muestras biológicas para análisis con SEM

En primer lugar las muestras fueron fijadas en una solución de glutaraldehído al 2.5% en tampón cacodilato 0.1M, pH=7 durante dos horas a 4°C. Posteriormente se realizaron tres lavados de las muestras con el mismo tampón en intervalos de 15 minutos y a temperatura constante de 4°C.

A continuación se procedió al postfijado con tetróxido de osmio al 1% en oscuridad durante 1 hora, a temperatura ambiente. Tras el postfijado se realizaron tres lavados en agua destilada con intervalos de 5 minutos entre cada uno.

Una vez en este punto del proceso, las muestras fueron deshidratadas en un gradiente de concentraciones crecientes de etanol, siguiendo el siguiente protocolo:

- 1.- Etanol al 50% durante 15 minutos
- 2.- Etanol al 70% durante 15 minutos
- 3.- Etanol al 90% durante 15 minutos
- 4.- Etanol al 100% durante 15 minutos

Las muestras fueron desecadas mediante el método por Punto Crítico (Anderson 1951) con Dióxido de Carbono (CO₂). Este procedimiento fue realizado en un Secador de Punto Crítico Polaron CPD7501.

Posteriormente fueron cubiertas por evaporación de Carbón empleando un evaporador de carbon Hitachi (Japan) aquellas muestras que iban a ser observadas en el microscopio de barrido de alta resolución.

Para hacer electroconductor a cada uno de los preparados que se deseaba observar con SEM sin alta resolución, se montaron las muestras en pletinas de plata y se espolvorearon con aleación de oro/paladio hasta un grosor de unos 250 Å.

En ambos casos las muestras fueron unidas a un soporte de acrílico con pegamento, que se dividió en dos piezas cortadas con un disco de diamante, para poder observar la superficie del interior del coágulo.

El proceso descrito anteriormente se llevó a cabo en la Unidad de Preparación de Muestras Biológicas (LPMB) del Servicio de Microscopía Electrónica del Centro de Instrumentación Científica (CIC) de la Universidad de Granada.

E.2.4. Citometría de flujo para la caracterización del coágulo de PRP

Tras el estudio mediante SEM y TEM de los coágulos de PRP y PPP, se procedió a realizar una técnica de citometría de flujo para confirmar que el tipo celular predominante en el plasma rico en plaquetas son plaquetas, y no otras células de origen sanguíneo. Para ello se empleó un anticuerpo monoclonal, el CD41-PE (Caltag Laboratorios, Burlingame, CA, Estados Unidos), específico para una glucoproteína de membrana de plaquetas humanas: el CD41 [(GpII_b-III_a (a_{11b}B₃)]. Se aplicaron 5 µl de este anticuerpo sobre cada una de las 20 muestras de 20 µl de PRP que se emplearon para este ensayo, dejando incubar durante 20 minutos. Posteriormente, por cada muestra se aplicó una cantidad de 0.5 ml de lisina (BD PharM Lyse™, Becton Dickinson Biosciences Pharmingen, San Jose, California, Estados Unidos). Finalmente, se lavó con abundante PBS hasta enrasar el tubo de ensayo y se realizó una lectura y análisis de citometría de flujo mediante FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA).

E.2.5. Caracterización Bioquímica mediante Western Blot

Siguiendo el procedimiento descrito en el apartado D.2.1., se obtuvo una muestra de coágulo de PRP por cada paciente. Paralelamente se preparó la cámara de electroforesis y se virió el gel inferior, añadiendo alcohol isopropílico para evitar las burbujas y enrasando el gel. Pasados unos minutos, cuando gelificó el gel inferior se retiró el alcohol isopropílico con papel de filtro y se añadió el gel superior, colocando inmediatamente después el peine que conforma los pocillos con cuidado de evitar la formación de burbujas. Una vez gelificó el gel superior, se retiró el peine y se situó la cámara en el interior de la cubeta de electroforesis, a la cual se añadió el tampón de electroforesis dejando que rebosara. Posteriormente se rellenó cada pocillo del gel superior con 15 µl de muestra de coágulo de PRP, previamente diluida en sample buffer en una proporción aproximada de 1mg de muestra por ml. Se conectó la electroforesis en las siguientes condiciones: 60V y 45 mA durante unos 120 minutos.

Finalizado el proceso de corrido proteico se procedió a la transferencia de las proteínas. Para ello se dispuso el tampón de transferencia en la cubeta correspondiente, poniendo por este orden: 2 rectángulos de papel Whatman, un rectángulo de nitrocelulosa que estuvo inmerso en agua milliQ durante 10 minutos, el gel de electroforesis con la cara que contiene las proteínas mirando hacia la nitrocelulosa tras hacerle un corte en una esquina que permitiera el posterior reconocimiento de la orientación y otros 2 rectángulos de papel Whatman, evitando la formación de burbujas intermedias. Todo este conjunto se mantuvo sumergido durante 20 minutos en el tampón. A continuación se posicionó el “sandwich” en el aparato de transferencia con los siguientes parámetros: 25V y 60 mA durante 50 minutos. Cuando terminó la transferencia se separó el gel y se desechó. La nitrocelulosa se mantuvo durante 60 minutos en 20 ml de solución de bloqueo a temperatura ambiente.

Tras el bloqueo la membrana de nitrocelulosa se incubó ésta con el anticuerpo primario del factor de crecimiento que se deseaba detectar, el cual se añadió a la solución de bloqueo en proporción 1/200. La nitrocelulosa se dejó en movimiento-agitación durante 24 horas a 4°C. Tras el tiempo de incubación se realizaron tres lavados de 5 minutos también en movimiento continuo. Seguidamente se incubó la membrana de nitrocelulosa con el anticuerpo secundario, que se añade a 20 ml de solución de bloqueo, dejándola en movimiento durante 2 horas a temperatura ambiente. Pasado este periodo se hicieron de nuevo 3 lavados de 5 minutos, también en movimiento, para facilitar la retirada del anticuerpo secundario, con lo que la membrana de nitrocelulosa se encontró preparada para el revelado del Western Blot.

E.2.6. Cultivo de las células

E.2.6.1. MG63

Inicialmente, las células sufrieron un proceso de descongelación en el cual la ampolla en la que se almacenan en congelación se dejó a temperatura ambiente durante 1 minuto y posteriormente se transfirió a un baño de agua a

37°C durante 1 o 2 minutos, sin sumergir totalmente la ampolla, hasta la descogelación. La ampolla se limpió con alcohol al 70% antes de abrirla. Se pipetearon 0.5 ml de medio previamente calentado a 37°C y se transfirió todo el contenido a un tubo Eppendorf estéril. Se rellenó de medio y se centrifugó la muestra durante 5 minutos a 80-100 G. Posteriormente se resuspendieron las células en el volumen apropiado de medio de cultivo y se incubaron en las condiciones adecuadas.

El medio de cultivo empleado consistió en EMEM con BSS de Earle junto con 2mM de glutamina modificado conteniendo: 1.0 mM de piruvato sódico, 0.1 mM de aminoácidos no esenciales (NEAA), 1.5 g/L de bicarbonato sódico, suplementado con un 10% de FBS inactivado. Los cultivos se introdujeron en la estufa de cultivo a 37°C y un 5% de CO₂. Para el mantenimiento de los cultivos el medio fue renovado cada 2 ó 3 días.

E.2.6.2. DOK

Las células fueron descongeladas siguiendo el procedimiento expuesto anteriormente para MG63.

El cultivo de las células se realizó con medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que contenía 2mM de glutamina + 5 µg/ml de hidrocortisona + un 10% de FBS inactivado. Los cultivos se introdujeron en la estufa de cultivo a 37°C y un 5% de CO₂. El medio fue renovado cada 2 ó 3 días.

E.2.7. Tipaje de las líneas celulares

Las células en cultivo de la línea MG63 fueron separadas empleando PBS y EDTA, mientras que las células del modelo epitelial DOK se separaron del Falcon de cultivo aplicando EDTA y tripsina. Posteriormente, en ambos tipos celulares, la suspensión fue centrifugada y se decantó el sobrenadante. Las células fueron resuspendidas en solución tampón (PBS), obteniendo un botón de precipitado celular con el que se trabajó.

Para tipar ambas líneas se realizó una batería de anticuerpos para los siguientes marcadores: CD45, CD14, HLA-ABC, CCR5, CXCR3, CXCR4, CD95, HLA-DR, CD55, CD59, CD 56, CD38, CD10, CD20, CD3, CD19, CKA-PE y CK18-FITC y EPCAM. De todos estos marcadores CD3, CD19, CKA-PE y CK18-FITC requerían la permeabilización de las células antes de ser aplicados.

El procedimiento para la aplicación de los anticuerpos que no necesitaban permeabilización celular consistió en la aplicación de 5 μ l de anticuerpo por cada 20 μ l de células en tubos de ensayo estériles, adecuados al citómetro de flujo que se utilizó. Se dejó incubar el preparado a temperatura ambiente durante 20 minutos. Posteriormente se añadió una cantidad de 0.5 ml de lisina y se lavó abundantemente con PBS hasta llenar el tubo de ensayo, con lo cual la muestra estaba preparada para la lectura en el citómetro de flujo.

En el caso de los anticuerpos que necesitaban de permeabilización se empleó el kit de fijación y permeabilización para citometría de flujo de Dako Cytomation (Glostrup, Dinamarca). En primer lugar se aplicaron 100 μ l de solución A del kit sobre 20 μ l de células y se dejó incubar durante 15 minutos. A continuación se lavó con PBS y se centrifugaron las muestras durante 5 minutos en la centrifugadora Eppendorf 5810 R. Pasados dichos 5 minutos las muestras fueron decantadas y secadas, para después recibir 5 μ l de anticuerpo monoclonal y 100 μ l de solución B del kit. Se dejó incubar esta preparación durante otros 15 minutos. Finalmente la muestra fue lavada con abundante PBS, estando preparada para su lectura mediante análisis de citometría de flujo.

Las muestras fueron leídas y se registraron 5000 parámetros para cada muestra usando el software CellQuest. Los ajustes para todos esos parámetros fueron optimizados al inicio del estudio y se mantuvieron constantes durante todos los subsiguientes análisis.

E.2.8. Caracterización morfológica de las líneas celulares

Las líneas celulares fueron caracterizadas morfológicamente, tanto en cultivo como aisladas, antes de ser cocultivadas con los coágulos de PRP o PPP. Para ello fueron empleadas técnicas de microscopía óptica y de microscopía electrónica de transmisión y de barrido, tanto de alta como de baja resolución, siguiendo los protocolos de preparación de muestras descritos previamente.

E.2.9. Cocultivo de los coágulos de PRP y PPP con las líneas celulares

Se prepararon 6 coágulos de PRP y 6 coágulos de PPP por cada donante usando el procedimiento descrito en el apartado D.2.1. Posteriormente se depositó cada una de estas muestras en un pocillo debidamente identificado de una microplaca estéril Iwaki (Japón) de 24 pocillos. Cada pocillo que estaba destinado a albergar alguna muestra recibió 0.5 ml de medio de cultivo RPMI sin suero fetal bovino. Una vez separadas las líneas celulares de su soporte de cultivo por el procedimiento descrito en el apartado D.2.7., se añadieron 4×10^4 células MG63 en 40 μ l de suspensión, rociando aleatoriamente la superficie de un total de 3 muestras de PRP y 3 muestras de PPP. Igualmente, se sembraron 4×10^4 células DOK en 40 μ l de suspensión sobre un total de 3 muestras de PRP y 3 muestras de PPP. De este modo se prepararon 20 microplacas que contenían 12 muestras divididas en 4 grupos por cada placa de cultivo: Un primer grupo representado por 3 muestras de PRP con células MG63, un segundo grupo de 3 muestras de PPP junto a células MG63, un tercer grupo que contenía 3 muestras de PRP en cocultivo con células DOK y el cuarto grupo de 3 muestras de PPP junto a células de la línea DOK (Imagen 16). Una vez preparadas, las muestras se introdujeron en condiciones de cultivo, a 37°C y un 5% de CO₂. El medio no fue renovado a lo largo de esta experiencia.

Las microplacas fueron mantenidas hasta 72 horas en la estufa de cultivo y se analizaron a tres tiempos distintos: 0 horas, 24 horas y 72 horas. Para cada tiempo se extrajo una muestra de cada grupo por microplaca de

cultivo y con la ayuda de un bisturí estéril se dividió cada muestra en 3 partes para ser analizada por tres procedimientos distintos: SEM, TEM e inmunohistoquímico, aplicando la metodología recogida en los apartados D.2.2., D.2.3. y D.2.10.

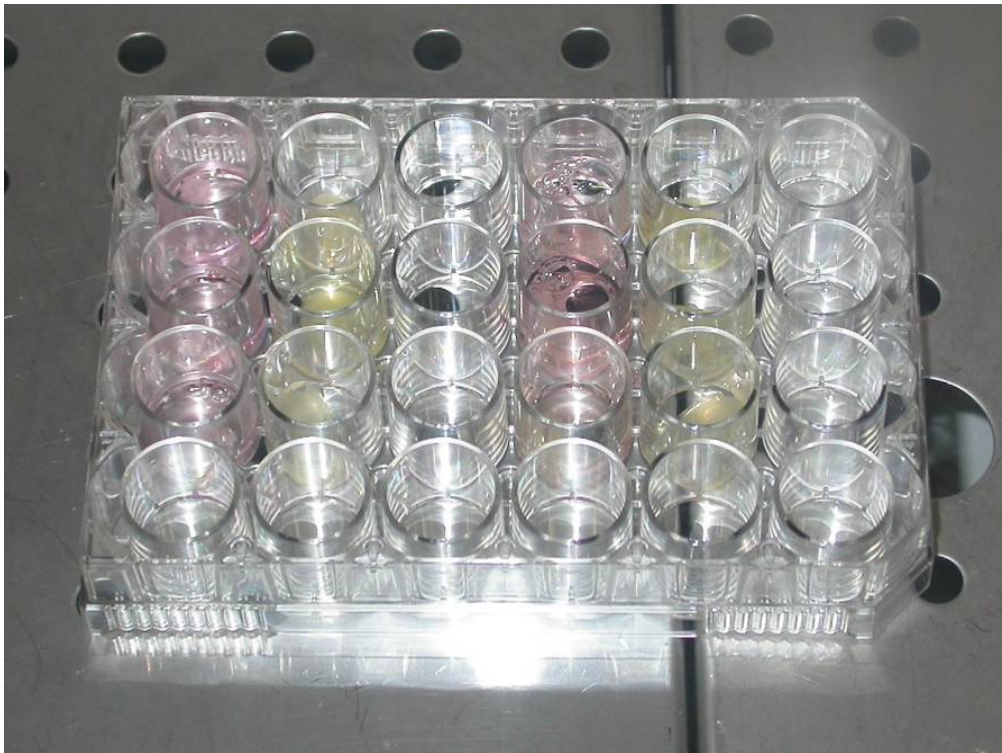


Imagen 16. Microplaca para cultivo de los coágulos de PRP y PPP con las líneas MG63 y DOK.

E.2.10. Técnica de inmunohistoquímica

Las distintas muestras, que serían analizadas mediante procedimientos de inmunohistoquímica, consistentes en coágulos de PRP y PPP cultivados a distintos tiempos junto con células MG63 y DOK, inmediatamente tras ser extraídas del cultivo fueron identificadas e incluidas en O.C.T. (Sakura Tissue – Tek^R, Japón), para posteriormente ser congeladas a -40°C , provocando su fijación. Empleando un criostato (Microm HM500, Walldorf, Germany) se obtuvieron diversos cortes de $3\ \mu\text{m}$ de las distintas muestras, que fueron colocados en portaobjetos de vidrio con poli-L-lisina al 0.02%, un adhesivo para secciones de tejidos.

Posteriormente se siguió el siguiente procedimiento de tinción para inmunohistoquímica:

1.- Bloqueo de la peroxidasa endógena: Se sumergieron las muestras en solución de peróxido de hidrógeno durante 10-15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad, para después aclararlas en TBS 3 veces durante 5 minutos.

2.- Incubación del anticuerpo primario: Se cubrieron las secciones con el anticuerpo correspondiente siguiendo las instrucciones del fabricante de cantidad y tiempo de aplicación para cada uno de los anticuerpos seleccionados, descritos en el apartado D.1.7. Posteriormente se lavaron las muestras con TBS 3 veces durante 5 minutos cada vez.

3.- Incubación del polímero conjugado con peroxidasa y fracción de inmunoglobulina F (ab'): Se aplicaron 100 μ l del Reactivo A del kit MASVISION a cada una de las muestras y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Pasado este tiempo, se lavaron las muestras de nuevo con TBS 3 veces durante 5 minutos.

4.- Realización del revelado de inmunotinción: Para preparar la mezcla sustrato/cromógeno se añadieron 50 μ l del Reactivo B del kit MASVISION a 1 ml de agua destilada y se mezcló bien. A continuación se añadieron 50 μ l del Reactivo C y 50 μ l del Reactivo D y se mezcló bien de nuevo para obtener finalmente la solución sustrato cromógeno. Esta mezcla se añadió a cada una de las muestras en cantidad necesaria hasta cubrir completamente los portas. Se incubó este preparado a temperatura ambiente durante aproximadamente 10 minutos, para después aclarar con agua destilada 3 veces durante 5 minutos.

5.- Intensificación de la tinción: Se aplicó el Reactivo E del kit de forma que cubrió las secciones, dejándolo un tiempo de entre 1 y 2 minutos a temperatura ambiente.

6.- Contraste de la muestra: Se cubrió la muestra con hematoxilina para tinción de contraste (Reactivo F del kit MASVISION), durante 1-2 minutos. Se lavaron las muestras con agua bidestilada.

7.- Aclarado y montaje: Finalmente, tras el lavado con agua, se deshidrataron las muestras por pasos sucesivos en soluciones de alcohol de concentración creciente, se aclararon y fueron montadas con medio de montaje permanente (Bálsamo de Canadá) con su correspondiente cubreobjetos.

F. RESULTADOS

F. RESULTADOS

F.1. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DEL COÁGULO DE PRP Y PPP

Se llevó a cabo la caracterización morfológica del coágulo de plasma rico en plaquetas y del coágulo de plasma pobre en plaquetas utilizando técnicas de citometría de flujo y mediante un análisis ultraestructural de dichas muestras realizado con microscopía electrónica de barrido (SEM) y de transmisión (TEM).

F.1.1. Citometría de flujo para CD41

El estudio citofluorimétrico de los elementos formes presentes en las distintas muestras de coágulo de PRP, tras su incubación con el anticuerpo monoclonal que detecta el antígeno de superficie plaquetario CD41-PE, mostró una fuerte positividad de expresión del mismo (**Figura 1**). Por este motivo se puede afirmar que los constituyentes celulares que se encuentran en mayor proporción dentro del coágulo de plasma rico en plaquetas son, efectivamente, plaquetas.

F.1.2. Microscopía electrónica de barrido

El análisis mediante SEM de las distintas muestras de PPP reveló la presencia de una malla de filamentos distribuidos al azar, entre los cuales quedaron lo que parecían ser restos de membranas celulares y espacios de formas y tamaños variables (**Figura 2**). Este modelo ultraestructural del entramado fibrilar se repitió en todos los casos analizados. Dichos filamentos fueron identificados como fibrina (**Figura 3**).

El análisis mediante SEM de la estructura del coágulo de PRP reveló una ultraestructura filamentosa que respondía al patrón expresado en el coágulo de PPP, sin embargo, numerosos elementos celulares podían ser

visualizados atrapados entre los filamentos de fibrina y ocupando los espacios variables del entramado fibrilar (**Figuras 4 y 5**). Estos elementos celulares presentaban una morfología oval y/o aplanada coincidente con la morfología descrita para los elementos plaquetarios activados. Además, mostraban numerosas vesículas de secreción sobre la superficie celular. Estos resultados son compatibles con los obtenidos tras el análisis por citometría de flujo. Acompañando a estos elementos formes plaquetarios, la malla se encontraba ocupada por restos de membranas celulares, así como debridados celulares que corresponden a plaquetas degranuladas (**Figuras 6 y 7**).

F.1.3. Microscopía electrónica de transmisión

El análisis ultraestructural de los cortes ultrafinos del coágulo de PPP mediante TEM mostró la presencia de una malla constituida por elementos fibrilares seccionados en múltiples planos y distribuidos al azar. No fue objetivable la presencia de elementos formes de origen sanguíneo, pero se pudieron observar restos de membranas celulares colapsadas. Estas imágenes son compatibles con los resultados obtenidos en los análisis mediante SEM (**Figura 8**).

El análisis mediante TEM del coágulo de PRP, confirmó la existencia tanto de elementos fibrilares (identificados como fibrina) como celulares (identificados como plaquetas) que se encontraban atrapados en el interior del entramado fibrilar (**Figura 9**). En el citoplasma de los elementos plaquetarios se observaron lisosomas, gránulos densos y gránulos alfa, redondeados y elongados, fundamentalmente localizados bajo la membrana plasmática; así como cuerpos mitocondriales, pequeños y ovales; estructuras bandeadas de microtúbulos y microfilamentos periféricos; un retículo endoplasmático rugoso (RER) de morfología variable junto a una pequeña proporción de ribosomas libres en el citoplasma y, por último, algunos sideromas (**Figuras 10, 11 y 12**).

F.2. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DEL COÁGULO DE PRP

En el presente estudio se han utilizado técnicas de electroforesis de proteínas en SDS-PAGE y posterior transferencia y detección mediante Western Blotting para valorar la presencia de los factores de crecimiento plaquetarios con mayor implicación en la regeneración osteo-epitelial dentro de distintas muestras de PRP. Para ello, se emplearon diferentes anticuerpos monoclonales que reconocen epítomos concretos, altamente específicos para VEGF, PDGF-A, TGF- β 1, b-FGF, IGF-1 y EGF (ver apartado D.1.5.1.). Nuestros resultados han puesto en evidencia un patrón de bandas electroforéticas de diferentes pesos moleculares para la muestras de PRP (45 KDa para VEGF, 25 KDa para TGF- β 1, entre 16 y 18 KDa para bFGF, 15 KDa para PDGF-A, 7.6 KDa para IGF-1 y 6.4 KDa para EGF), pesos correspondientes a aquellos que caracterizan a los factores de crecimiento analizados. Así, confirmamos la existencia de los mismos en el coágulo de PRP (**Figura 13 y Tabla 3**).

F.3. LÍNEAS CELULARES Y COÁGULO DE PRP/PPP: CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA E INMUNOHISTOQUÍMICA

F.3.1. Caracterización de la línea MG63

F. 3.1.1. Microscopía óptica

La línea celular MG63 fue, en primer lugar, estudiada bajo microscopio óptico de inversión, útil para visualización y seguimiento de células en cultivo. Se observó un cultivo celular en monocapa y confluyente, de células pleomórficas, con variaciones en la forma y en el tamaño, en las que predominan las formas estrelladas, de amplio citoplasma, del cuál emergen numerosas y largas prolongaciones. Junto a las células de morfología estrellada se observan, en menor proporción, células de morfología fusiforme o alargada. Al mismo tiempo se identificó la presencia, en pequeña proporción, de células redondeadas y altamente refringentes, las cuales se encontraban flotando en el sobrenadante del cultivo, supuestamente en estado quiescente (**Figura 14**).

F. 3.1.2. Microscopía electrónica de barrido y transmisión

El análisis por SEM de las células constituyentes de la línea MG63 adheridas al frasco de cultivo mostró que las células presentaban una morfología similar a la observada mediante microscopía óptica, es decir, se visualizó un cultivo de células poligonales, mayoritariamente estrelladas, con extensas prolongaciones citoplasmáticas (**Figuras 15 y 16**).

El análisis mediante SEM de las células en situación de aislamiento del cultivo reveló como la mayoría de estas células presentaban una morfología que difería de la que se apreció para las células adheridas al frasco de cultivo y que se ha detallado más arriba. En esta situación las células MG63 se mostraban con una morfología esférica, una superficie celular muy irregular donde podía apreciarse una gran cantidad y variedad de elementos vesiculares, así como prolongaciones citoplasmáticas (**Figura 17**). También se encontraron, en menor

proporción, células de morfología bipolar, con engrosamiento nuclear casi centrado en el citoplasma el cuál queda casi en su totalidad circunscrito a las dos grandes prolongaciones citoplásmicas que definen su morfología (**Figura 18**).

El análisis mediante TEM de las células MG63 aisladas del cultivo celular muestra la morfología propia de células resuspendidas con un núcleo de contorno irregular, múltiples nucleolos y un amplio citoplasma, en el que se observan numerosas organelas que caracterizan a los tumores osteogénicos como son el gran número de mitocondrias, un RER bien desarrollado y de disposición perinuclear que se continúa con cisternas del REL dilatadas y cargadas de material de síntesis y transferencia no bien identificado. También se identificaron numerosos ribosomas libres intracitoplasmáticos sugerentes de alta actividad metabólica (**Figura 19**).

Cabe destacar la existencia de innumerables fagosomas que incluían tanto residuos orgánicos (organelas), como material de electrodensidad variable. Se observó una gran red de microtúbulos y microfilamentos que se distribuían fundamentalmente alrededor del núcleo por el citoplasma. Finalmente, se observaron cuerpos apoptóticos en los cuales quedan reflejados la desestructuración de las crestas mitocondriales y la doble membrana de las mismas (**Figura 20**).

F. 3.1.3. Tipaje mediante Citometría de Flujo

El análisis mediante citometría de flujo de la expresión de distintos marcadores por parte de la línea MG63 permitió su tipaje celular (**Tabla 4**).

Al margen del control positivo (HLA-ABC), los marcadores que expresaron una marcada positividad fueron CD10, CD55, CD56, CD59 y CD95, mientras que el marcador CXCR3 se expresó más levemente, todos los demás fueron expresados negativamente (**Figuras 21 a 31**).

F. 3.1.4. Caracterización morfológica de los cocultivos de MG63

Cocultivo de MG63 y coágulo de PRP

0 horas

El análisis mediante SEM de las células MG63 en cocultivo con el coágulo de PRP en tiempo "0" ha demostrado, por un lado, la presencia de un material que a 620 aumentos muestra un aspecto esponjoso y a 7540 aumentos una consistencia fibrilar, que identificamos como fibrina a la superficie de la cual se encuentran adheridos escasos elementos celulares de la línea en estudio (**Figura 32**). Estas células muestran una morfología esférica, con una superficie cargada de elementos de secreción, de aspecto similar al observado para estas mismas células en situación de aislamiento en la caracterización basal (**Figura 33**). El estudio de MG63 en cocultivo con el coágulo de PRP a tiempo "0" usando TEM, mostró la presencia de elementos fibrilares seccionados en las diferentes direcciones del espacio y elementos celulares dispuestos en la periferia de las fibras y contactando con éstas. Las células son pleomórficas, predominando la morfología esferoidal, con un núcleo polimorfo (redondeado, ovalado o irregular) en ocasiones con invaginaciones y proyecciones de cromatina condensada, con uno o varios nucleolos sin evidencia de cuerpos densos filamentosos. En el citoplasma hay gran presencia de RER, con relativa abundancia de polirribosomas libres, además de un aparato de Golgi desarrollado, con gránulos de material denso en su vecindad. Las mitocondrias, que se encuentran esparcidas por el citoplasma, son muy variables en tamaño y forma. Fue detectada la presencia de lisosomas, siderosomas, algunas gotas lipídicas y partículas de glucógeno aisladas (**Figura 34**). La membrana celular es de bordes irregulares y muestra prolongaciones que establecen relaciones superficiales con la fibrina (**Figura 35**).

24 horas

El análisis ultraestructural por SEM de las muestras del cocultivo tras 24 horas mostró imágenes que representaban una situación de mayor colonización

de la superficie del coágulo, en la que las células establecen relaciones evidentes con la malla de fibrina (**Figura 36**), pero con una moderada abundancia celular (**Figura 37**). El estudio con TEM reveló la presencia de células MG63 dispuestas sobre la superficie del coágulo de PRP. Dichas células se mostraron más electrolúcidas, con un gran incremento de su citoplasma en relación al núcleo celular, en el que los cuerpos vesiculares de diferente índole habían aumentado y diversificado su presencia. Fue llamativa la aparición de material procedente de la secreción celular, de características similares a las del interior celular. Gran parte de este material, que se encontró englobado por membranas, se ubicaba interpuesto entre las células y la malla de fibrina, siendo compatible con la secreción de material osteoide, propio de células de esta estirpe (**Figura 38**).

72 horas

Tras el estudio por SEM de la línea MG63 a las 72 horas de cocultivo con PRP, se observó como las células muestran un mayor pleomorfismo, con un aumento de la presencia de células ovaladas, alargadas y fusiformes (**Figura 39**). Algunas de las células exponían una superficie similar a la observada en tiempo "0", con abundantes elementos de secreción (**Figura 40**). Además, un gran número de células comienzan a emitir pseudópodos, en forma de prolongación principal de la cual parten prolongaciones secundarias (Imagen en "Pata de ganso") (**Figura 41**). En el análisis por TEM se observaron uniones más íntimas entre las células y el material fibrilar (**Figura 42**). Se pudo visualizar una formación de elementos de unión, así como lo que parece el comienzo de fenómenos de englobamiento del material fibrilar por parte de las células (**Figura 43**).

Cocultivo de MG63 y coágulo de PPP

0 horas

El análisis al SEM de las células MG63 en cocultivo con el coágulo de PPP en tiempo "0" ha demostrado, por un lado, la existencia de un entramado fibrilar que hemos identificado anteriormente como fibrina, distribuido al azar con una escasa

presencia de elementos formes pertenecientes a la línea MG63 (**Figura 44**). Cuando estas mismas muestras fueron analizadas mediante TEM encontramos secciones realizadas en distintos planos de corte del material fibrilar (fibrina) y orientadas en las diferentes direcciones del campo analizado, siendo imposible encontrar en los cortes realizados la presencia de células dispuestas en la superficie del coágulo. Entre los elementos fibrilares se visualizan algunos restos celulares consistentes en porciones citoplasmáticas rodeadas de membrana plasmática, con formaciones electrodensas y un punteado denso de distribución homogénea compatible con elementos ribosómicos libres incluidos en un citoplasma claro (**Figura 45**).

24 horas

El estudio mediante SEM de las muestras obtenidas a las 24 horas tras cocultivo de las células de la línea MG63 con PPP, habla de una abundante presencia de estas células, que crecen adheridas a la superficie de coágulo de fibrina (**Figura 46**). Estas células desplegaban una morfología preponderantemente esferoidal. Se observó un patente crecimiento en el que las células MG63 se encuentran adyacentes unas a otras. Algunos de estos elementos celulares comienzan a emitir prolongaciones que se introducen entre los cuerpos celulares de las células adyacentes en dirección a la profundidad del coágulo (**Figura 47**). Al igual que lo observado para los tiempos 0 y 24 horas en las muestras obtenidas del cocultivo de MG63 en coágulo de PRP, las células presentaron en su superficie numerosos elementos vesiculares de secreción y microvellosidades cortas de disposición al azar. En las imágenes obtenidas mediante TEM se observó como las células mostraban un citoplasma cargado de elementos formes, entre los que destacaron las numerosas mitocondrias en las que se podían apreciar sus crestas, numerosos cuerpos vesiculares intracitoplasmáticos claros que recuerdan a los cuerpos vesiculares lipoideos, cuerpos vesiculares con material denso incluido, abundante material electrodense que podemos identificar como ribosomas libres. Fue muy interesante la observación de formaciones secretoras cubiertas de membrana e inclusión de material denso, similar al intracitoplasmático, que queda dispuesto en la vecindad celular, en ocasiones entre los elementos fibrilares de la muestra. También llamó enormemente la atención la existencia de acúmulos de material amorfo adyacente y en contacto con tramos de las membranas celulares,

de características similares a las inclusiones vesiculares tanto intra como extracitoplasmáticas y que son compatibles con material osteoide. Este material se pone claramente en evidencia en la **Figura 48**, en la que podemos observar un gran acúmulo de material osteoide interpuesto entre las numerosas secciones del material fibrilar del coágulo de PPP. En estas muestras también observamos áreas de íntima relación entre las células MG63 y la fibrina. Es remarcable la observada existencia esporádica de invaginaciones de fondo esférico que engloban material fibrilar y que recuerda a alguna de las fases de los procesos de fagocitosis celular (**Figura 49**).

72 horas

Tras el análisis por SEM de las muestras obtenidas a las 72 horas se observó un mayor pleomorfismo celular, donde predominan las formas fusiformes. Además, se apreció un incremento de las prolongaciones citoplasmáticas de estas células de estirpe ósea (**Figuras 50 y 51**).

El estudio de las imágenes obtenidas mediante TEM tras el análisis de estas muestras fue ciertamente sugerente. Las células presentaban un citoplasma con un gran incremento vesicular en comparación con las imágenes correspondientes a las muestras tras 24 horas de cocultivo, con vesículas que despliegan un gran abanico de heterogeneidad tanto en lo que refiere a sus tamaños como a su composición. También se observó la existencia de material osteoide interpuesto entre las membranas celulares y las secciones fibrilares adyacentes (**Figura 52**). Se evidenció igualmente, un incremento de las prolongaciones citoplasmáticas, las cuales rodeaban, prácticamente encerrando, a los elementos fibrilares, como se observa en la **Figura 53**, en donde se puede ver la existencia de un gran fagosoma en cuyo interior destaca un material de electrodensidad similar a la que ofrecen los acúmulos fibrilares rodeados por las prolongaciones celulares de la MG63. Asimismo descubrimos la presencia de elementos de unión física entre las membranas celulares y los elementos fibrilares, posiblemente a través de hemidesmosomas

F. 3.1.5. Caracterización inmunohistoquímica: Cocultivos de MG63

Las muestras fueron analizadas mediante microscopía óptica. Se evaluó la expresión de los distintos marcadores por parte de las células MG63 presentes en las muestras. De este modo, fue establecida una valoración para todas las muestras a partir de la cual se realizó una media ponderada de la expresión de dichos marcadores (**Tabla 5**).

Cocultivo de MG63 y coágulo de PRP

CD10

El análisis de la expresión de CD10 en las células MG63 cocultivadas con los coágulos de PRP mostró una conversión hacia la positividad a las 24 horas de incubación con el coágulo de PRP, manteniéndose esta expresión a las 72 horas de cultivo.

CD56

El análisis de la expresión de CD56 en las células MG63 reveló una inexistencia de la expresión de este marcador a todos los tiempos (**Figura 54**).

DESMINA

La incubación de los cortes criocongelados, contituidos por células MG63 cocultivadas en superficie del coágulo de PRP, mediante el anticuerpo monoclonal anti-desmina mostró una expresión negativa de este marcador en el citoplasma de las células analizadas para los tres tiempos establecidos.

VIMENTINA

El análisis de la expresión de vimentina indicó positividad citoplasmática de esta molécula en células presentes en la muestra tomada a las 24 horas, disminuyendo dicha expresión hacia las 72 horas (**Figura 55**).

CITOQUERATINAS

No se observó positividad expresión de estas moléculas en las células MG63 durante los diferentes tiempos analizados (**Figura 56**).

Ki67

El análisis de la expresión de la molécula Ki67, mostró resultados positivos en las células presentes en las muestras obtenidas del cocultivo tras 24 y 72 horas, pero con una intensidad muy discreta en ambos tiempos (**Figura 57**).

Cocultivo de MG63 y coágulo de PPP

CD10

La expresión de la molécula CD10 se mostró negativa sobre estas células en todos los tiempos analizados (**Figura 58**).

CD56

Se observó una expresión inexistente para la molécula de adhesión CD56 en las células de la línea MG63 en cocultivo con PPP.

DESMINA

La expresión de la molécula de desmina fue inexistente en las células MG63 cocultivadas con PPP en los tres tiempos analizados (**Figura 59**).

VIMENTINA

La expresión de la molécula de vimentina fue detectada en las muestras obtenidas tras 24 horas de cocultivo con moderada intensidad, disminuyendo su expresión a las 72 horas de seguimiento.

CITOQUERATINAS

No se encontró expresión de las citoqueratinas por parte de las células MG63 durante las primeras 24 horas de cocultivo con PPP, positivándose dicha expresión a las 72 horas de seguimiento en algunas células (**Figura 60**).

Ki67

La proteína Ki67 mostró un patrón de expresión similar al observado para las células de la línea MG63 aplicadas en cocultivo con PRP, pero algo más enlentecido, ya que se pudo detectar una muy baja positividad de expresión de este marcador a las 72 horas del seguimiento.

F.3.2. Caracterización de la línea DOK

F. 3.2.1. Microscopía óptica

La línea celular DOK fue estudiada para establecer su caracterización morfológica, en primer lugar, bajo microscopio óptico de inversión, observándose un cultivo celular en monocapa sin superposición y confluyente, con poco pleomorfismo, en el que predominaban las formas celulares alargadas y/o fusiformes, con algunas de morfología “en cáliz” (**Figura 61**).

F. 3.2.2. Microscopía electrónica de barrido y transmisión

El análisis mediante SEM y TEM de las células correspondientes a la línea DOK reveló la morfología de superficie de las células que corresponden a esta línea celular, tanto aisladas como adheridas a la superficie del recipiente de cultivo. El análisis de las células constituyentes de la línea DOK adheridas al recipiente de cultivo mostraron un crecimiento “en placa” con mayor pleomorfismo celular que en el caso del estudio al microscopio óptico. Observamos un cultivo con células poligonales irregulares, alargadas y fusiformes, en menor cuantía esféricas, donde predominan voluminosas prolongaciones citoplasmáticas, de las que algunas relacionan a las células entre sí (**Figuras 62 a 65**).

La mayoría de las células en situación de aislamiento del cultivo presentaron un gran pleomorfismo celular. Se visualizaron células de morfología esférica, con una superficie celular muy irregular donde pudo apreciarse una gran cantidad y variedad de elementos vesiculares; de morfología poligonal con engrosamiento central que reflejaba la localización del núcleo y prolongaciones citoplásmicas cortas (**Figuras 66 y 67**).

El estudio al TEM muestra elementos celulares de morfología fusiforme o arriñonada con abundante citoplasma y núcleos pleomórficos con profundas indentaciones de la membrana nuclear (**Figura 68**). El citoplasma es denso, con numerosas organelas entre las que destacan las mitocondrias de mediano tamaño y

estructuras vacuoladas polarizadas. Se observa la red de RER acompañado de grandes y abundantes del REL. Acúmulos de ribosomas libres así como gran cantidad de glucógeno disperso homogéneamente por el citoplasma caracterizan a estas células. Sin embargo la característica más evidente y fundamental desde el punto de vista ultraestructural es el acúmulo en el citoplasma de material fibrilar/lamelar yuxtapuesto compatible con material queratoideo (queratina). Por último, son células cuya membrana citoplasmática se caracteriza por presentar innumerables prolongaciones cortas dirigidas al azar que recuerdan de algún modo a las microvellosidades características de las células digestivas (**Figura 69**).

F. 3.2.3. Tipaje mediante citometría de flujo

La línea DOK, de estirpe epitelial, fue tipada mediante un análisis por citometría de flujo (**Tabla 4**), con el que se registró la expresión de distintos marcadores.

Los marcadores que se expresaron con una marcada positividad, aparte del control positivo (HLA-ABC) fueron CCR5, CD10, CD55, CD59, CD95 y EPCAM.

CXCR3, CXCR4, CD56, CKA y CK18 se expresaron con menos intensidad, mientras que el resto no fueron expresados (**Figuras 70 a 80**).

F. 3.2.4. Caracterización morfológica de los cocultivos de DOK

Cocultivo de DOK y coágulo de PRP

0 horas

El análisis por SEM de las células DOK en cocultivo con el coágulo de PRP en tiempo "0" demostró, por un lado, la presencia del material fibrilar mencionado previamente, el cual fue identificado como fibrina, al que se encontraban adheridos a su superficie escasos elementos celulares de la línea DOK. Estas pocas células, que se presentaron con una morfología alargada,

mostraban una superficie celular similar a la observada para estas mismas células en situación de adherencia al recipiente de cultivo de cultivo (**Figura 81**). El estudio mediante TEM de las muestras de DOK en cocultivo con el coágulo de PRP a tiempo "0", hizo imposible la detección de elementos celulares. Por el contrario, mostró la presencia de fibrina seccionada en las diferentes direcciones del espacio y restos celulares de contornos muy irregulares con amplias invaginaciones que rodean al material fibrilar que albergan (**Figura 82**).

24 horas

El estudio de las muestras por SEM a las 24 horas de cocultivo reveló un incremento del pleomorfismo celular respecto de las células presentes en las muestras obtenidas a tiempo 0, observándose la presencia de gran número de células ovaladas, alargadas y fusiformes. Las células aplanadas se encontraban dispuestas formando un gran tapizado celular sobre la superficie fibrilar, al que se superponían células de morfología oval/esferoidal (**Figura 83**). Sobre las superficies celulares se concentraban pequeñas formaciones a modo de "microvellosidades" y abundante material de secreción celular electrolúcido (**Figura 84**). El análisis por TEM de las muestras reveló que las células presentes en relación al coágulo se mostraban más electrolúcidas, con un gran incremento de su citoplasma con respecto al núcleo celular (**Figura 85**). En el citoplasma se vio como incrementó el número y se diversificó la presencia de cuerpos vesiculares de diferente índole (**Figura 86**).

72 horas

El estudio empleando SEM de las muestras obtenidas a las 72 horas mostró una situación similar a la obtenida para 24 horas (**Figura 87**). Sin embargo fue evidenciable la presencia de relaciones establecidas entre la malla de fibrina a través de prolongaciones muy llamativas (**Figura 88**). Igualmente, en el análisis de las muestras mediante TEM se observó la existencia uniones intercelulares más íntimas con el material fibrilar, incluso con la formación inicial de elementos de unión. Se observa un gran incremento de material de alta densidad (negro) tanto en el interior del citoplasma como acompañando y/o adherido al material fibrilar extracelular (**Figura 89 y 90**).

Cocultivo de DOK y coágulo de PPP

0 horas

El análisis al SEM de las muestras del coágulo de PPP en cocultivo con células DOK obtenidas a tiempo "0" demostró la abundante presencia del material fibrilar que identificamos como fibrina, en ausencia de elementos formes de cualquier tipo (**Figura 91**). El estudio mediante TEM de estas mismas muestras reveló la presencia del entramado de fibrina seccionado en las diferentes direcciones del espacio, en presencia de lo que se identificó como restos celulares (**Figura 92**). No fue posible la detección de elementos celulares pertenecientes a la línea DOK.

24 horas

El estudio con SEM de las muestras obtenidas a las 24 horas de cocultivo de las células de la línea DOK con PPP, permitió observar algunos elementos celulares dispuestos sobre el coágulo, formando un discreto tapizado celular sobre la superficie fibrilar (**Figura 93**). La morfología de estas células fue caracterizada como predominantemente esférica. Sobre sus superficies celulares se concentraban pequeñas formaciones a modo de "microvellosidades" y abundante material de secreción celular blanquecino (**Figura 94**).

En el análisis de estas muestras al TEM, se observó como las células se mostraban más claras, con un gran incremento de su citoplasma en relación al núcleo celular, en el que los cuerpos vesiculares de diferente índole habían aumentado y diversificado su presencia (**Figura 95**). El hallazgo más llamativo en la observación de estas muestras fue el alto grado de interacción que se observó entre las propias células y entre las células y la malla de fibrina perteneciente al coágulo (**Figura 96**), estableciéndose relaciones evidentes entre la membrana de los elementos celulares y la fibrina, llegando incluso a quedar filamentos de esta última englobados por la propia membrana de la célula (**Figuras 97 y 98**).

72 horas

La observación de las muestras de coágulo de PPP que había sido cocultivado con células DOK durante 72 horas puso de manifiesto la existencia de una mayor presencia celular ocupando la superficie del coágulo (**Figura 99**). La mayoría de estas células presentaban una morfología que recuerda la observada en las células caracterizadas en su disposición en el frasco de cultivo, disponiéndose sobre la superficie del coágulo en forma de estructuras aplanadas de tonalidad oscura. El resto de células presentaron una morfología esferoidal, con actividad secretora, compatible con las imágenes obtenidas en la caracterización de las células aisladas de cultivo pertenecientes a esta línea (**Figura 100**).

Tras el estudio con TEM se pudo igualmente observar la presencia de células de la línea DOK dispuestas sobre el coágulo de PPP. Dichas células presentaban una morfología alargada y aplanada, correspondiente a los hallazgos descritos en la caracterización por SEM. Las células pudieron encontrarse dispuestas unas sobre otras en la superficie del coágulo, estableciendo marcadas relaciones de membrana entre ellas, adquiriendo una organización que recuerda a la disposición estratificada celular de un epitelio (**Figura 101**). Asimismo, se observaron uniones íntimas con el material fibrilar, con la formación inicial de elementos de unión (**Figura 102**).

F. 3.2.5. Caracterización inmunohistoquímica: Cocultivos de DOK

Una vez procesadas, las muestras fueron analizadas mediante microscopía óptica, evaluándose la expresión de los distintos marcadores por parte de las células DOK que se disponían en relación al coágulo, ya fuera de PRP o PPP. De este modo, fue establecida una valoración para todas las muestras a partir de la cual se realizó una media ponderada de la expresión de estos marcadores (**Tabla 5**).

Cocultivo de DOK y coágulo de PRP

CD10

No se detectó la expresión de CD10 en células DOK en ninguna de las muestras obtenidas a 24 o 72 horas. A tiempo "0" fue imposible su valoración por inexistencia de celularidad en relación a la superficie del coágulo (**Figura 103**).

CD56

No se observó expresión positiva de la molécula CD56 a ningún tiempo de evaluación en ninguna de las células DOK presentes en las muestras que se obtuvieron tras el cocultivo de esta línea celular con las muestras de coágulo de PRP.

DESMINA

La expresión de esta molécula en el citoplasma de las células analizadas fue negativa en todos los tiempos de cultivo. No fue valorable el tiempo "0", por las razones anteriormente expuestas.

VIMENTINA

La incubación de cada una de las muestras de DOK junto con PPP junto el anticuerpo monoclonal anti-vimentina no ha mostrado expresión citoplasmática de esta molécula en todos los tiempos analizados.

CITOQUERATINAS

El análisis de expresión de citoqueratinas se ha realizado mediante la incubación con el anticuerpo monoclonal anti-CK AE1/AE3. Existe expresión de estas moléculas en las células DOK durante las primeras 24 horas, disminuyendo su expresión hacia las 72 horas del cocultivo con PRP (**Figura 104**).

Ki67

No hemos observado expresión para Ki67 en las células DOK que se cocultivaron junto a las muestras de PRP.

Cocultivo de DOK y coágulo de PPP

CD10

No se observó expresión para la molécula CD10 en células DOK cocultivadas con PPP, tanto a tiempo 0 como a 24 y 72 horas.

CD56

Idéntico patrón de expresión de CD56 que para el cocultivo con PRP. No hemos detectado expresión alguna de CD56 sobre las células DOK en los tres tiempos analizados.

DESMINA

La expresión de la proteína de filamentos intermedios desmina fue negativa en el citoplasma de las células analizadas. Este patrón de expresión se reflejó en los tiempos 24 y 72 horas utilizados. A tiempo "0" fue imposible su valoración por inexistencia de celularidad en relación al coágulo.

VIMENTINA

La incubación de este material citológico mediante el anticuerpo monoclonal anti-vimentina no ha mostrado expresión citoplasmática de esta molécula en todos los tiempos analizados durante el cocultivo con PPP.

CITOQUERATINAS

Existió expresión de las citoqueratinas en el citoplasma de las células DOK durante las primeras 24 horas, incrementando su expresión hacia las 72 horas de cocultivo con PPP (**Figura 105**).

Ki67

La expresión de la proteína Ki67, negativa durante las primeras 24 horas. en cocultivo con PPP, tornó ligeramente hacia la positividad a las 72 horas del seguimiento, pero con una representación muy escasa en las células presentes en relación al coágulo.

G. FIGURAS Y TABLAS

G. FIGURAS Y TABLAS

G.1. Figuras

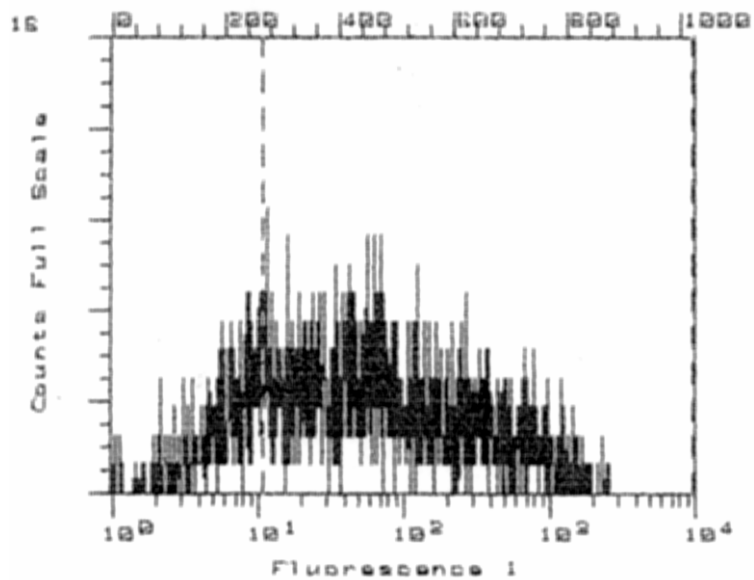


Figura 1. CD41-PE positivo.

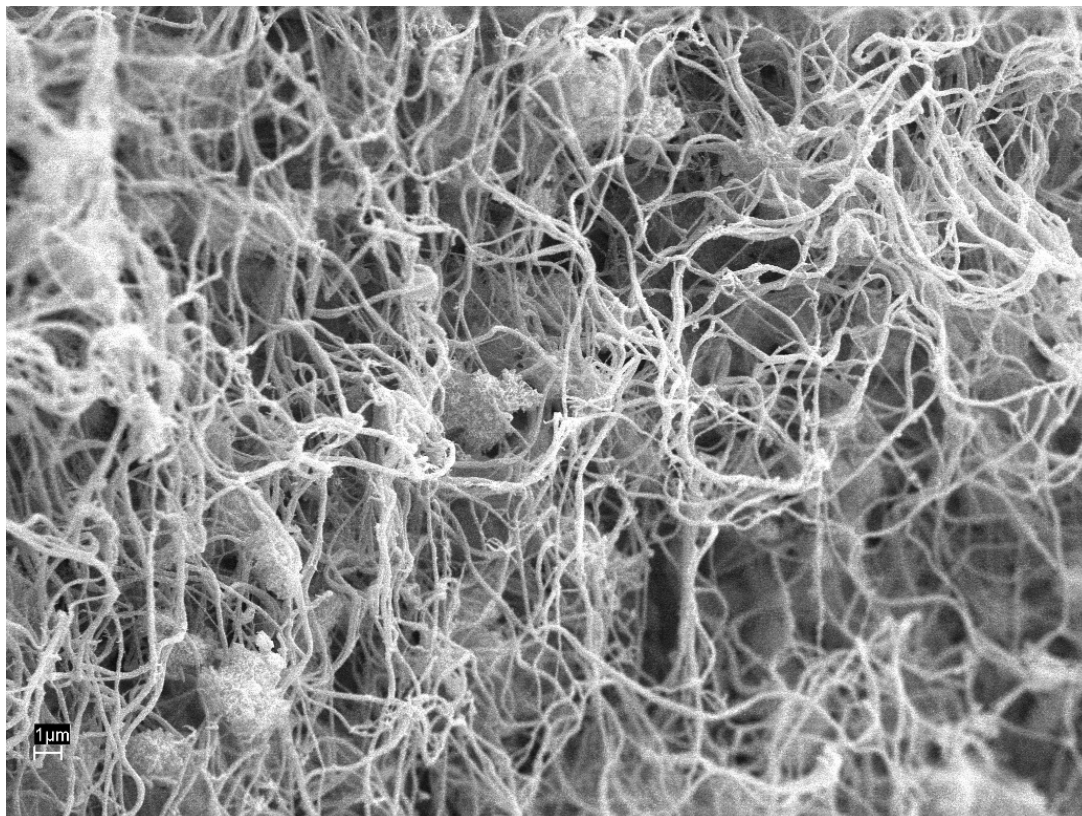


Figura 2. SEM del coágulo de PPP.

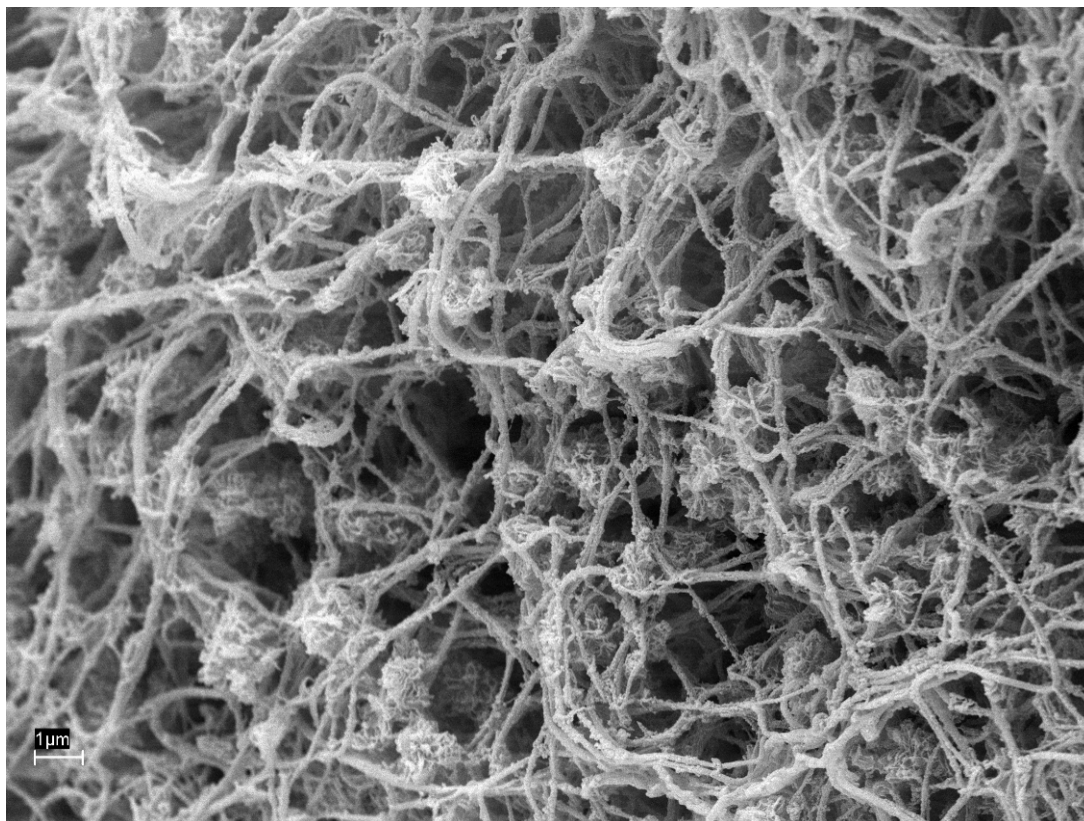


Figura 3. SEM del coágulo de PPP.

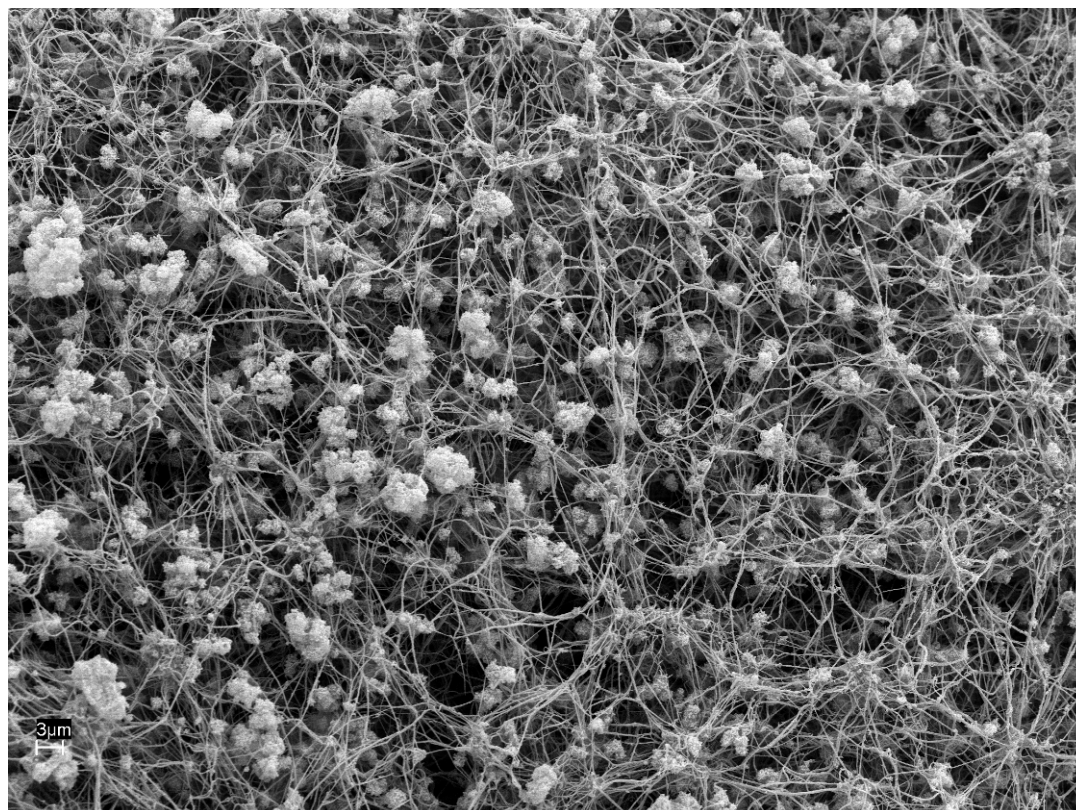


Figura 4. SEM del coágulo de PRP.

Se puede observar una imagen similar a migas de pan sobre un entramado fibrilar.

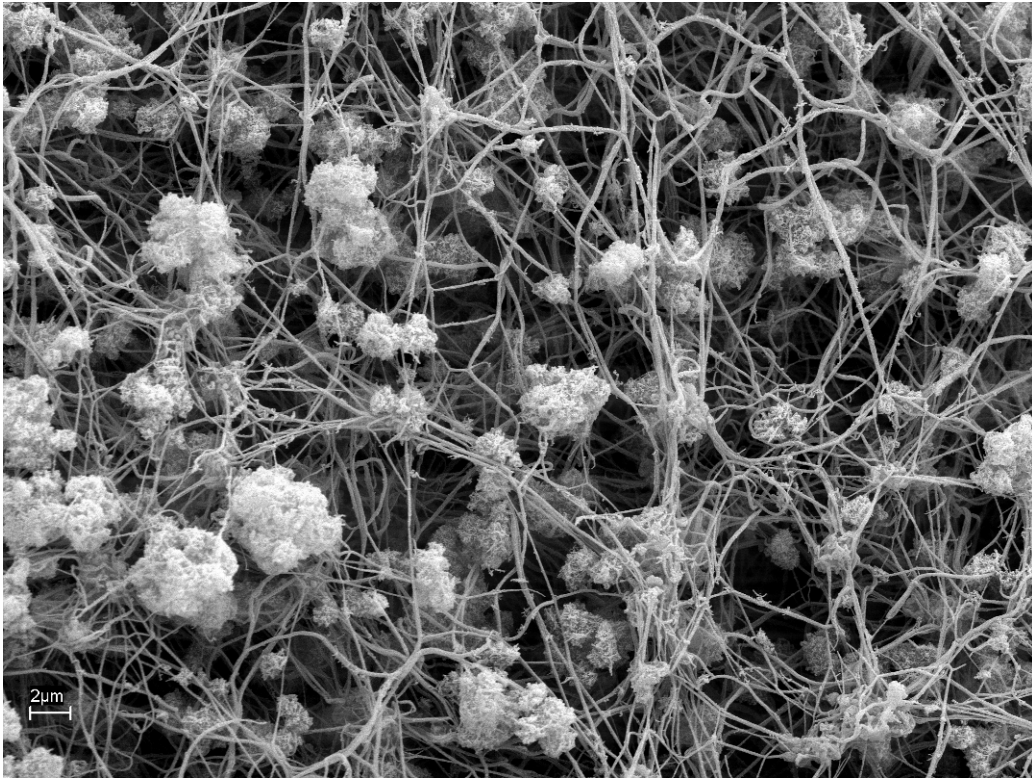


Figura 5. SEM del coágulo de PRP.

En esta imagen se pueden observar restos plaquetarios atrapados en la malla de fibrina.

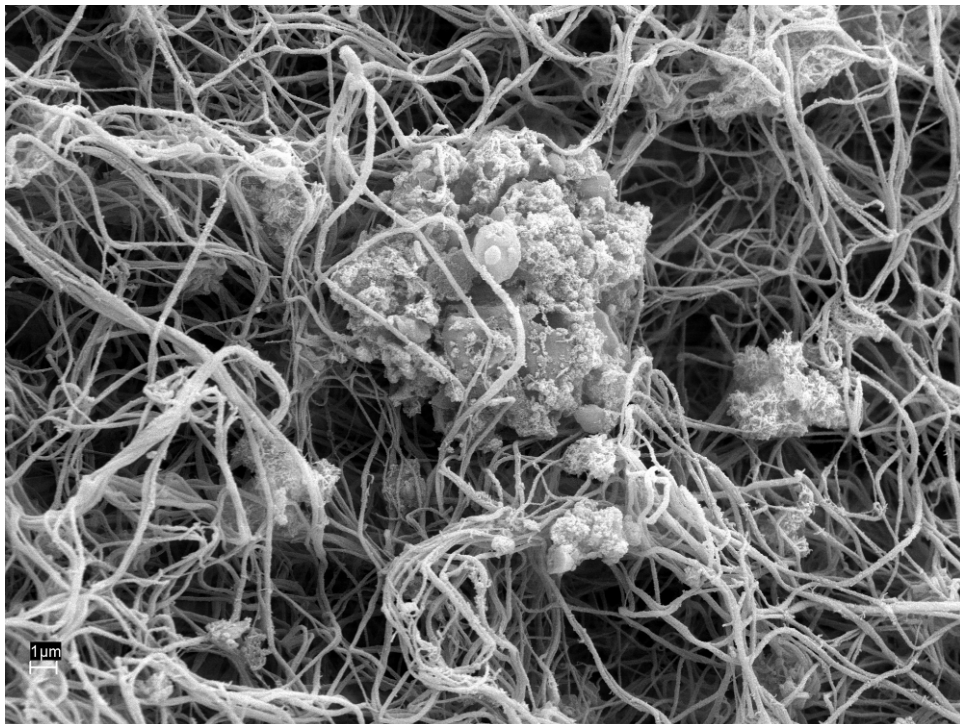


Figura 6. SEM del coágulo de PRP.

Es posible identificar agregados plaquetarios en relación al entramado de fibrina.

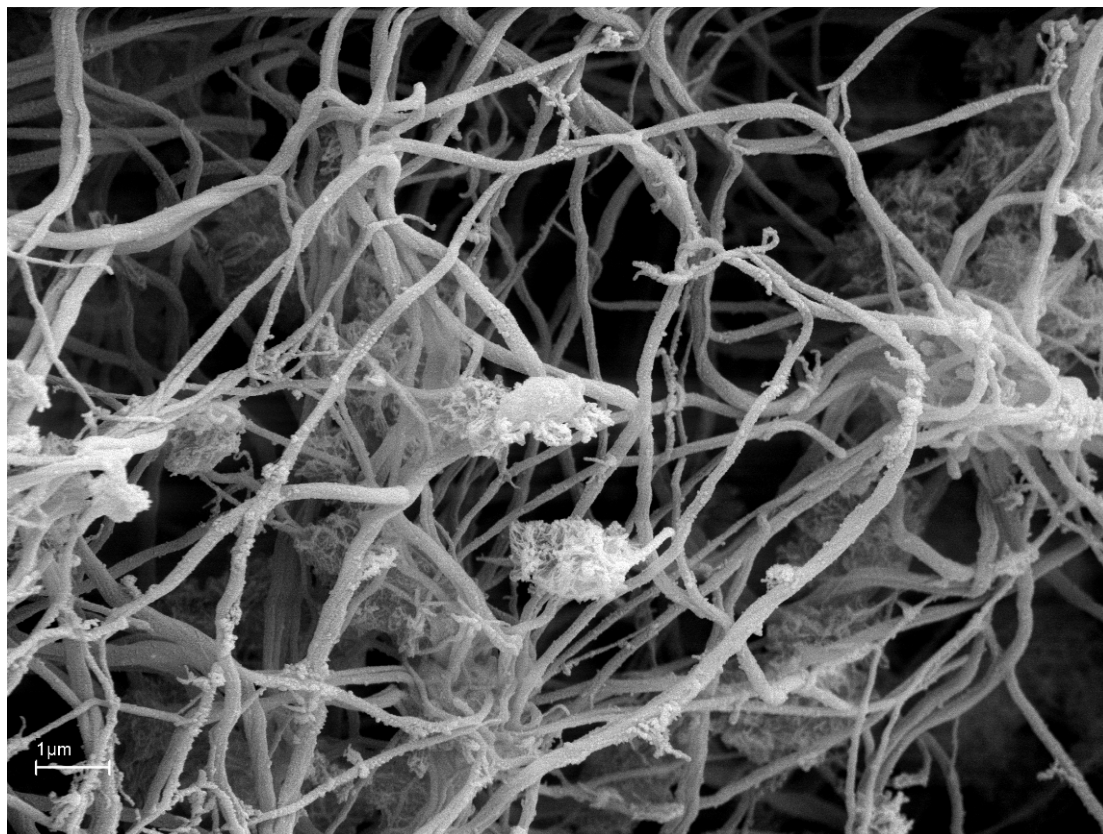


Figura 7. SEM del coágulo de PRP.

Elemento plaquetario degranulándose, liberando al medio extracelular su contenido granular.



Figura 8. TEM del coágulo de PPP (10000X)

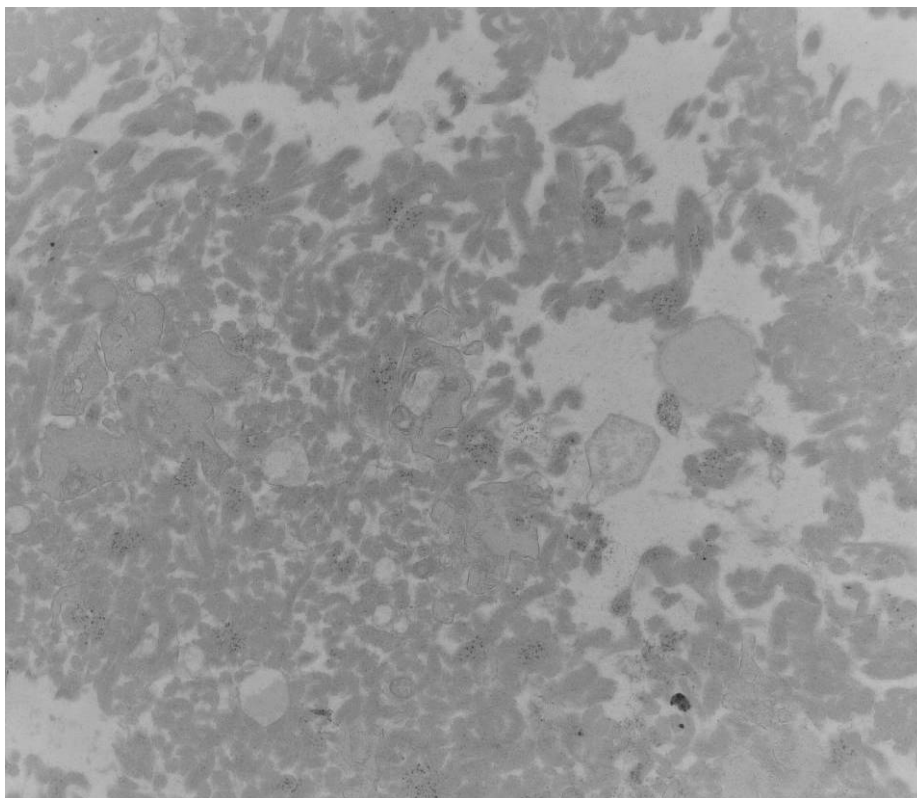


Figura 9. TEM del coágulo de PRP. Elementos fibrilares y celulares (4000X)

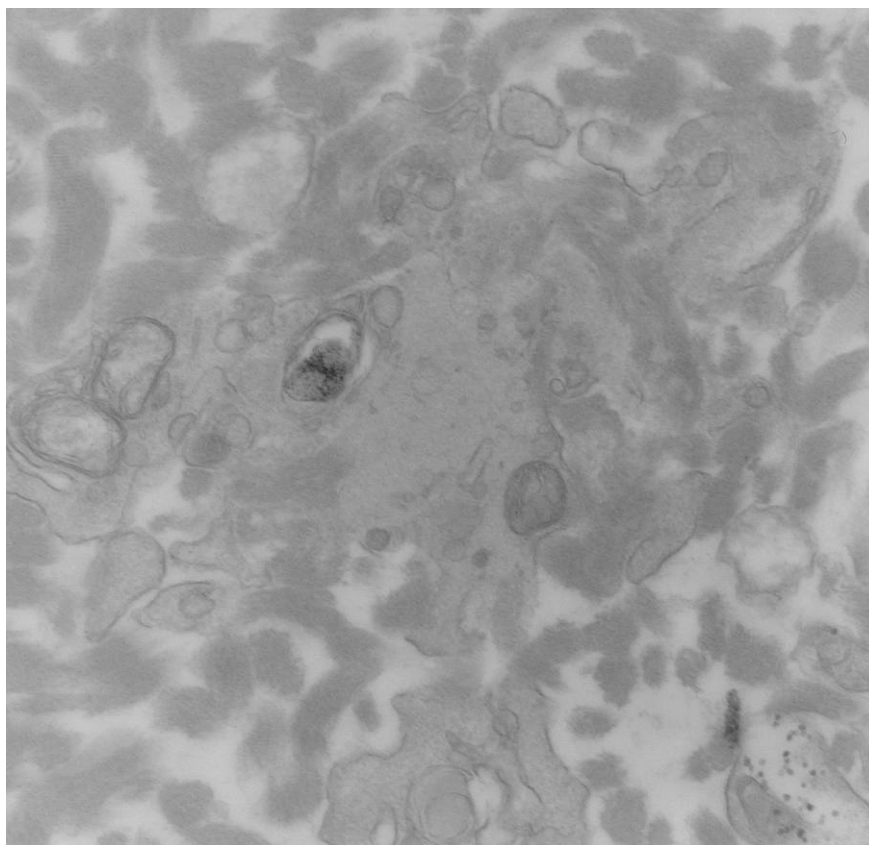


Figura 10. TEM del coágulo de PRP. Detalle de un elemento plaquetario degranulándose.

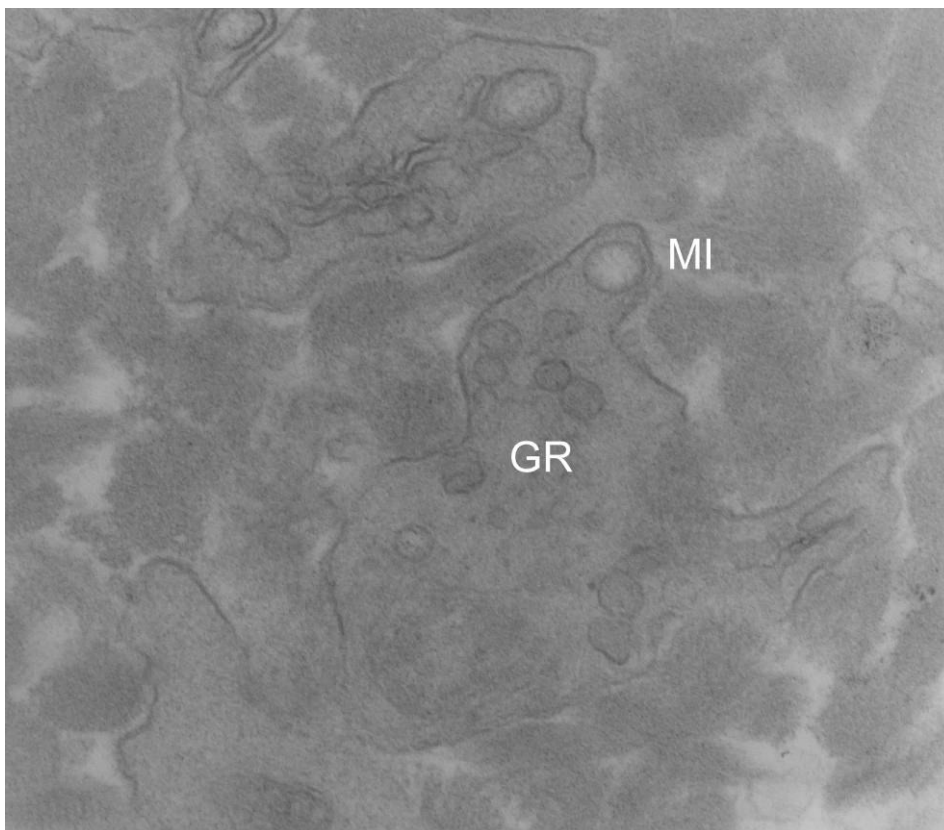


Figura 11. TEM del coágulo de PRP. Gránulos α (GR) y Mitocondrias (MI) (25000X)

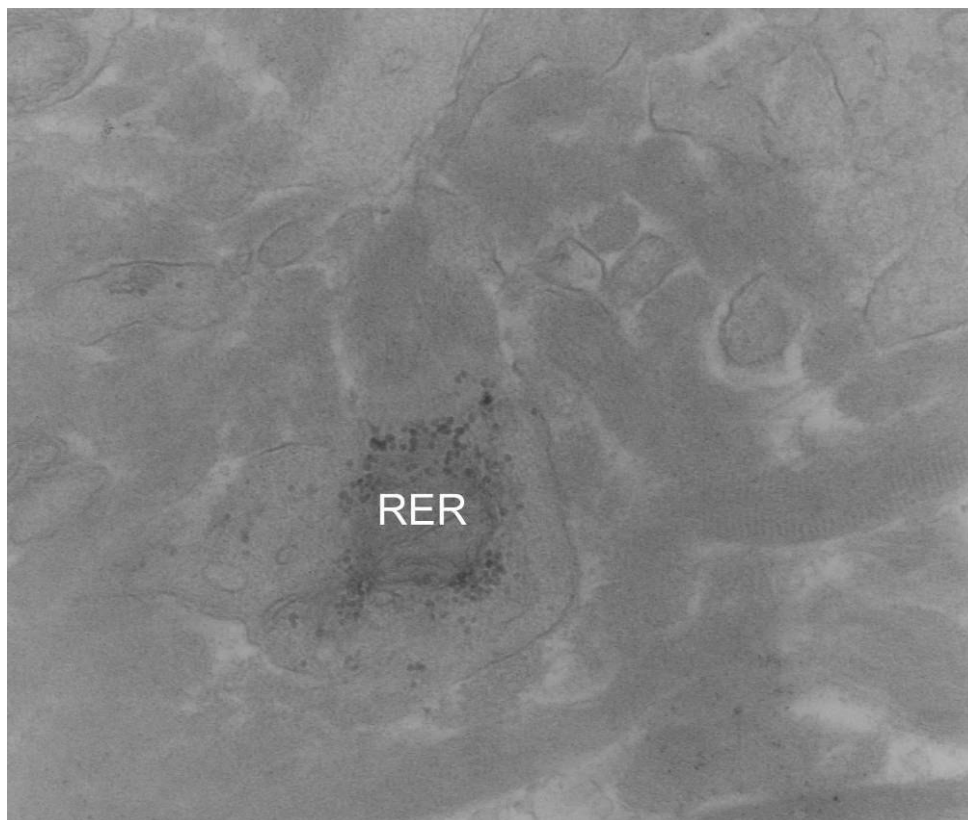


Figura 12. TEM del coágulo de PRP. Retículo endoplasmático rugoso (RER) (16000X)

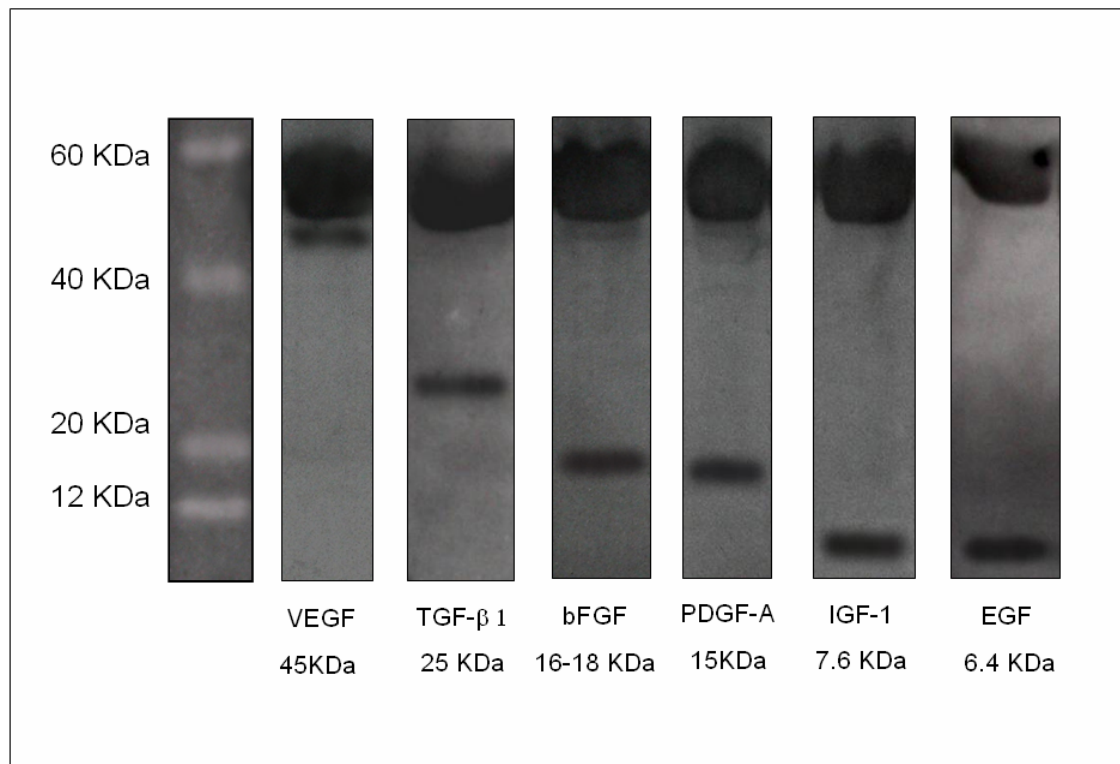


Figura 13. Resultados positivos para la detección de los distintos GFs propuestos en este estudio mediante Western Blot.

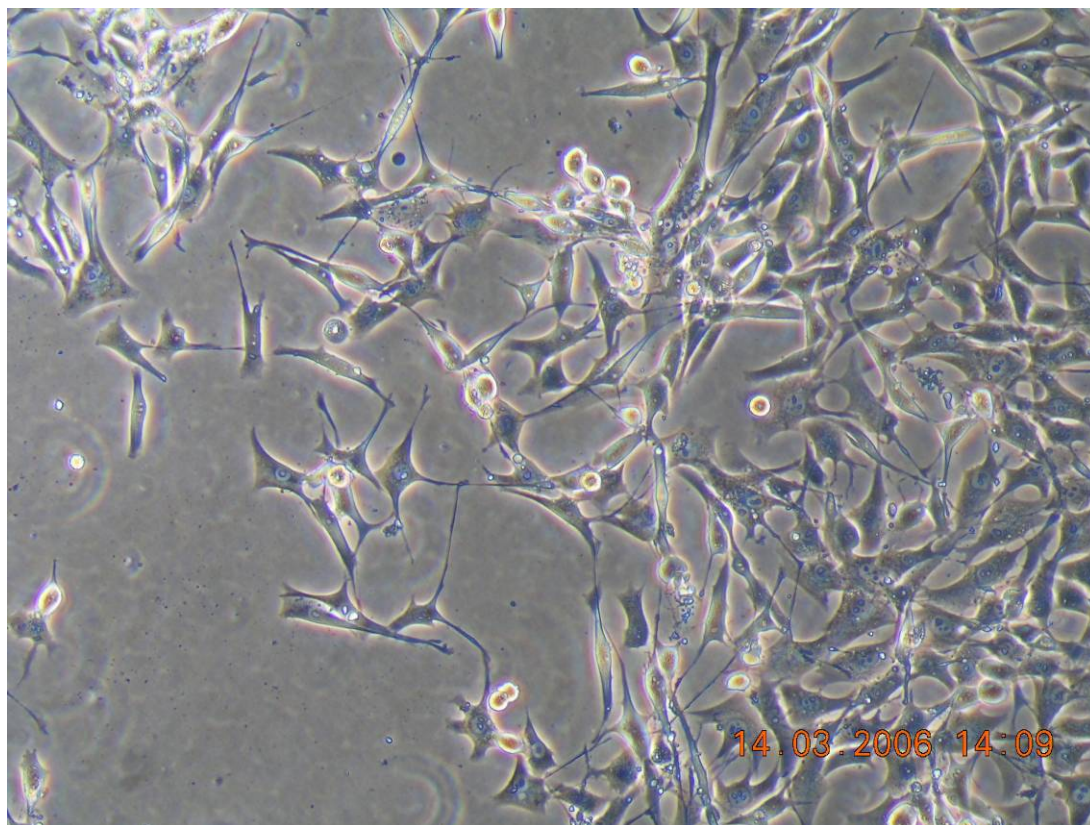


Figura 14. Imagen de microscopía óptica del cultivo de MG63 (100X).

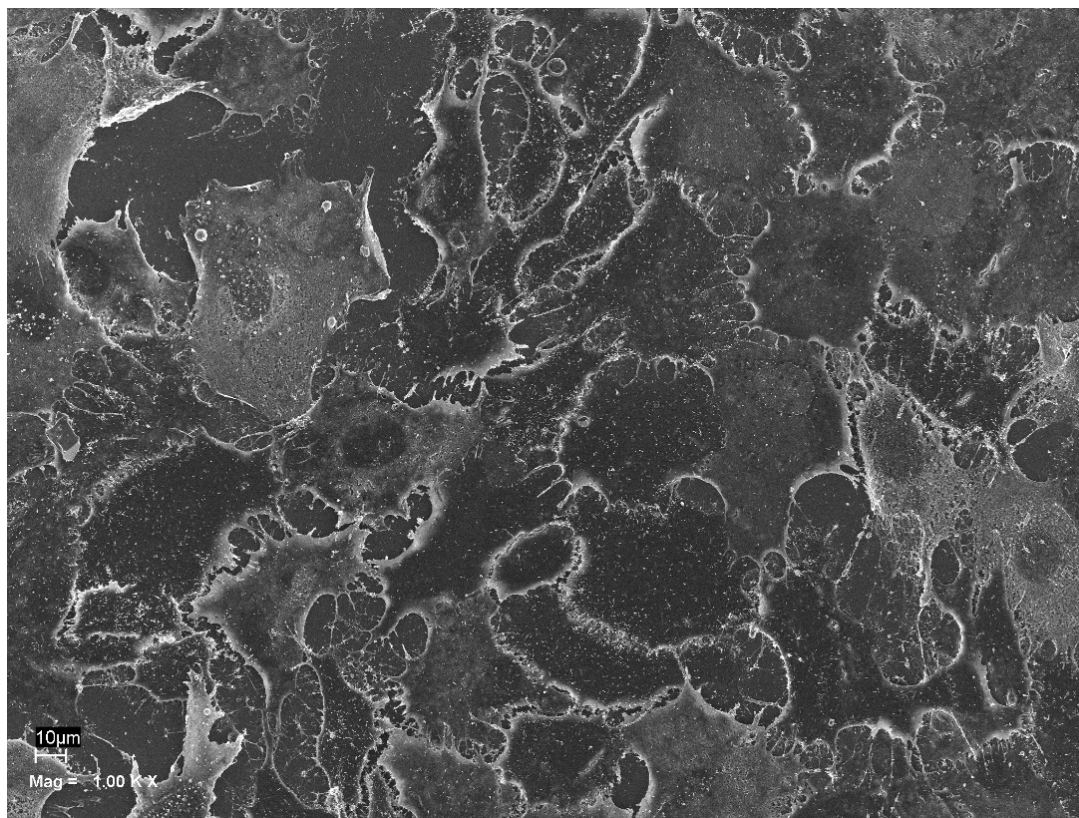


Figura 15. Caracterización morfológica por SEM. Imagen del cultivo de MG63.

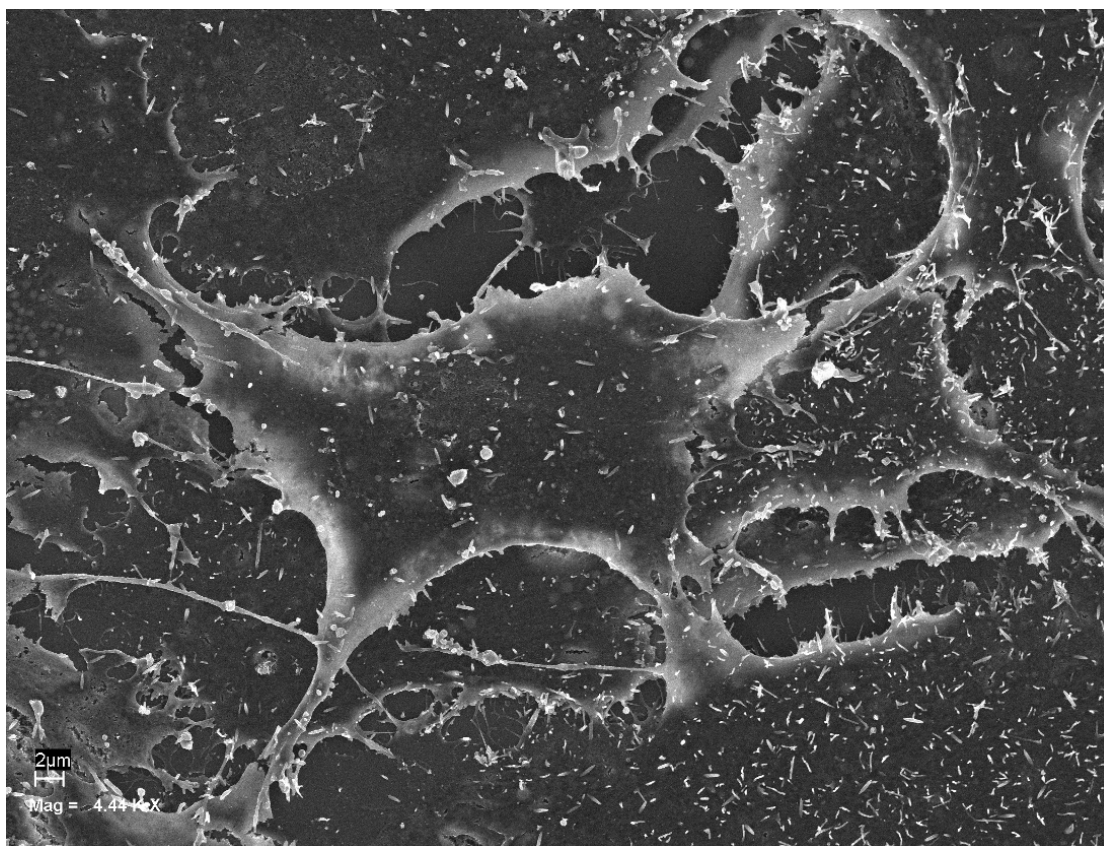


Figura 16. Caracterización morfológica por SEM de una célula MG63 en cultivo.

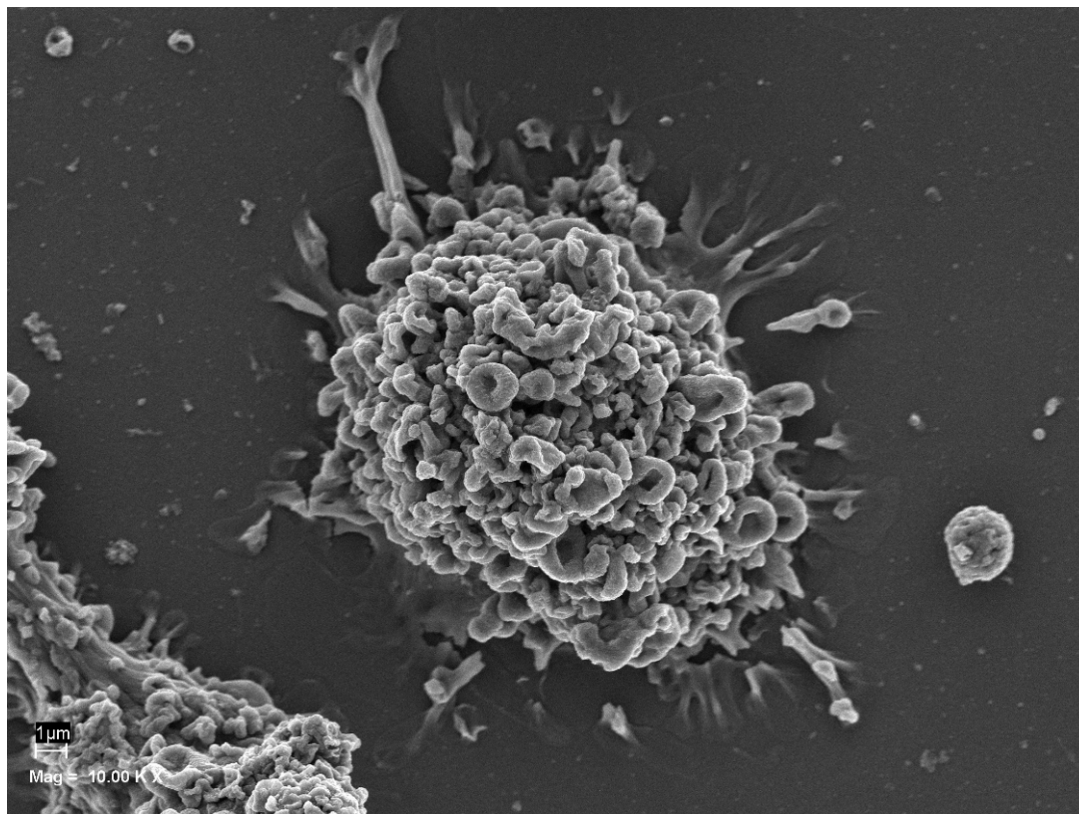


Figura 17. Caracterización morfológica por SEM. Imagen de una célula de MG63 aislada.

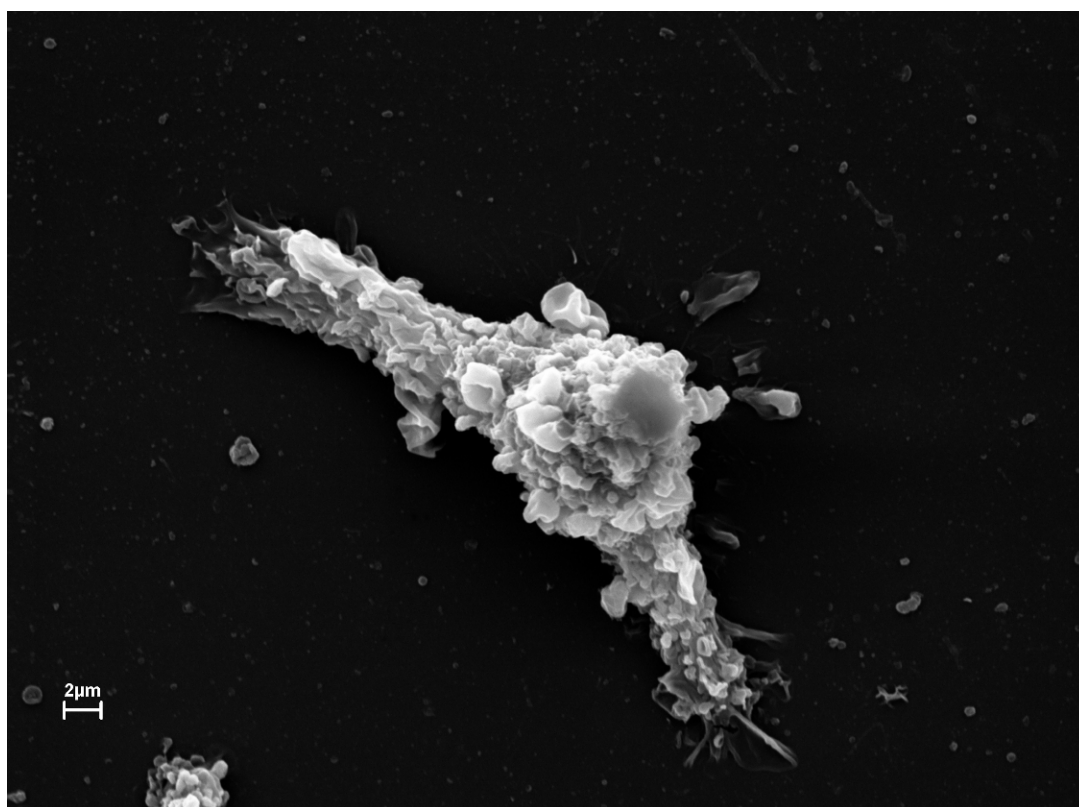


Figura 18. Caracterización morfológica por SEM. Imagen de una célula de MG63 aislada.

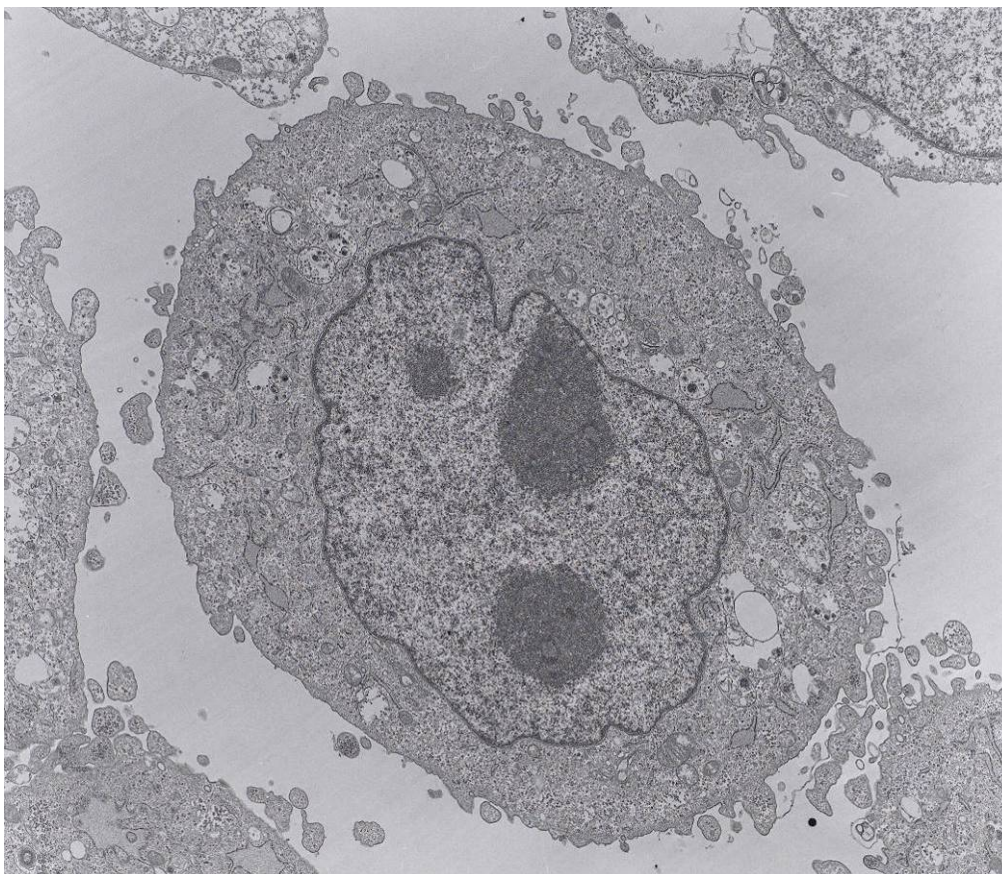


Figura 19. Caracterización morfológica por TEM de una célula MG63 aislada (3150X)

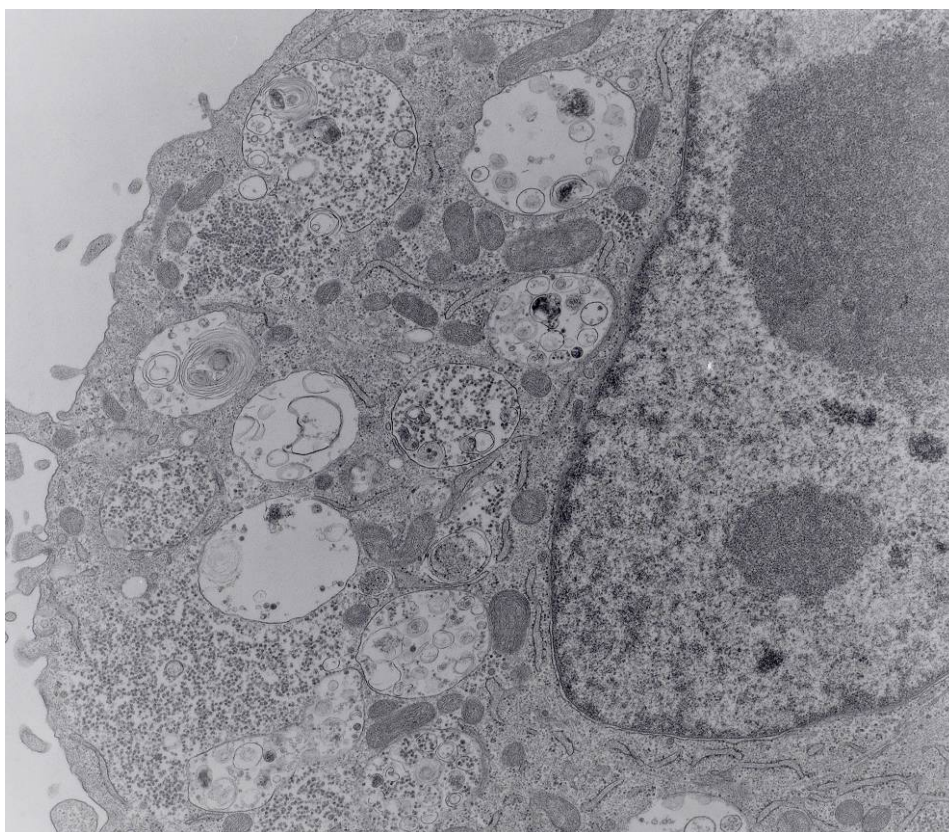


Figura 20. Caracterización morfológica por TEM de una célula MG63 aislada (10000X)

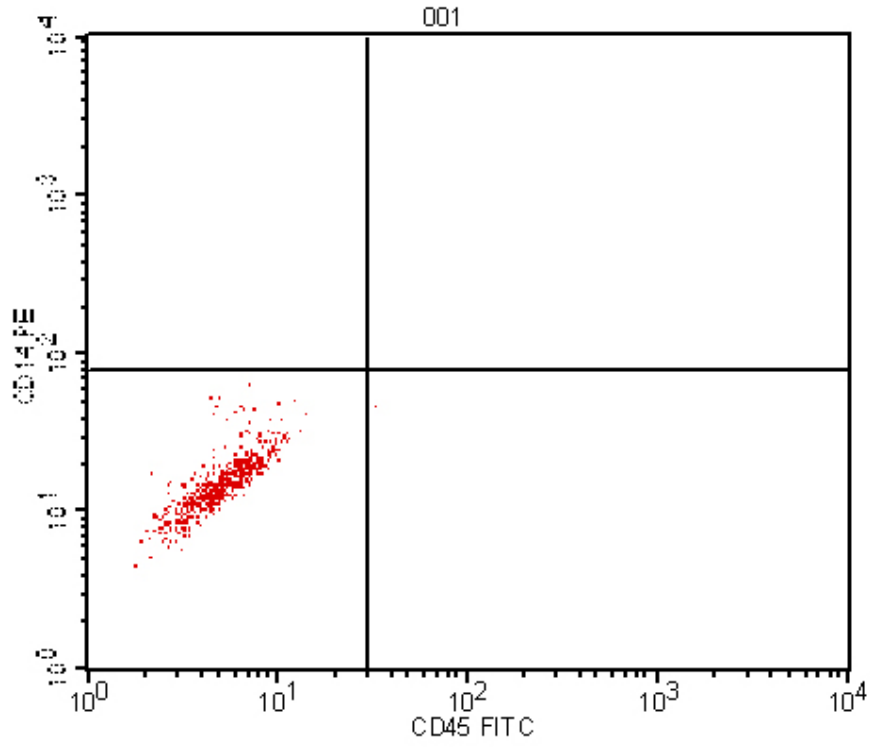


Figura 21. Citometría de flujo. Control negativo (CD14 / CD45) en la línea MG63.

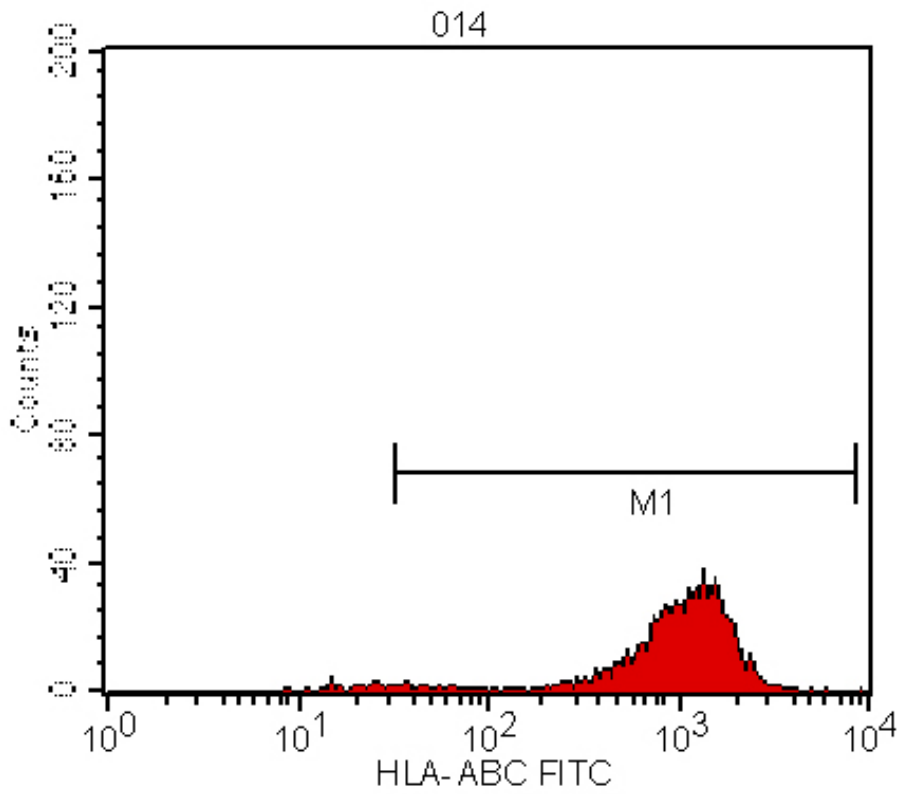


Figura 22. Citometría de flujo. Control positivo (HLA-ABC) en la línea MG63.

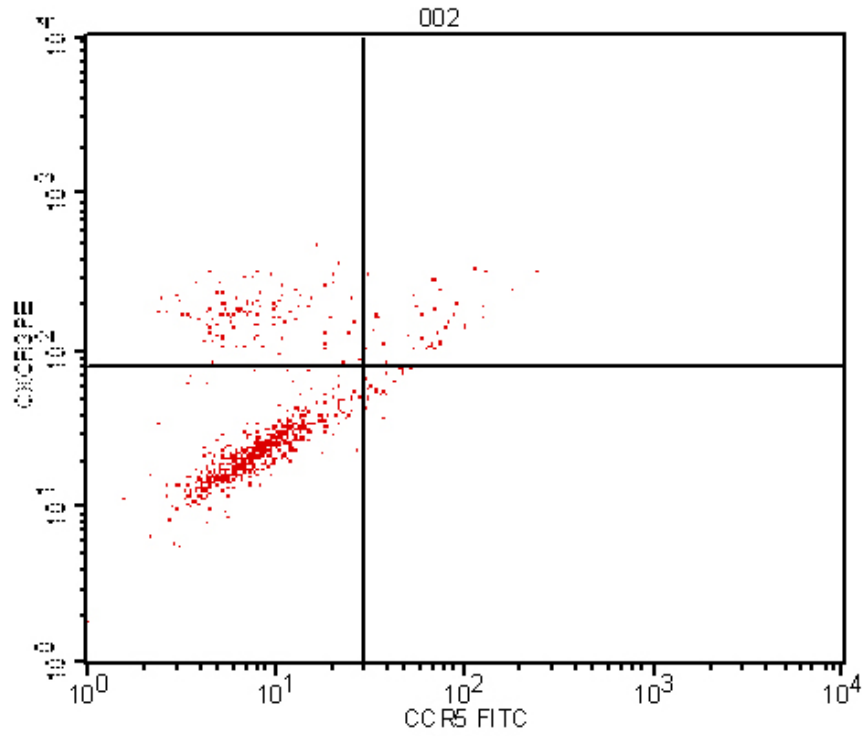


Figura 23. Citometría de flujo. Negatividad para CCR5 y ligera positividad para CXCR3 en la línea MG63.

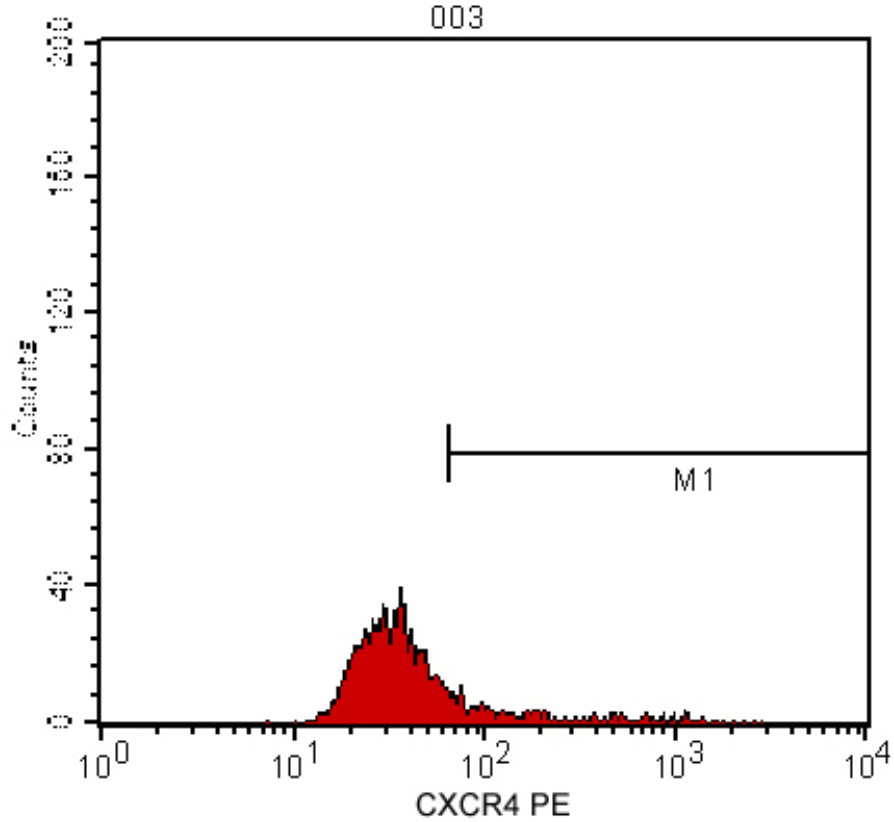


Figura 24. Citometría de flujo. Negatividad para CXCR4 en la línea MG63.

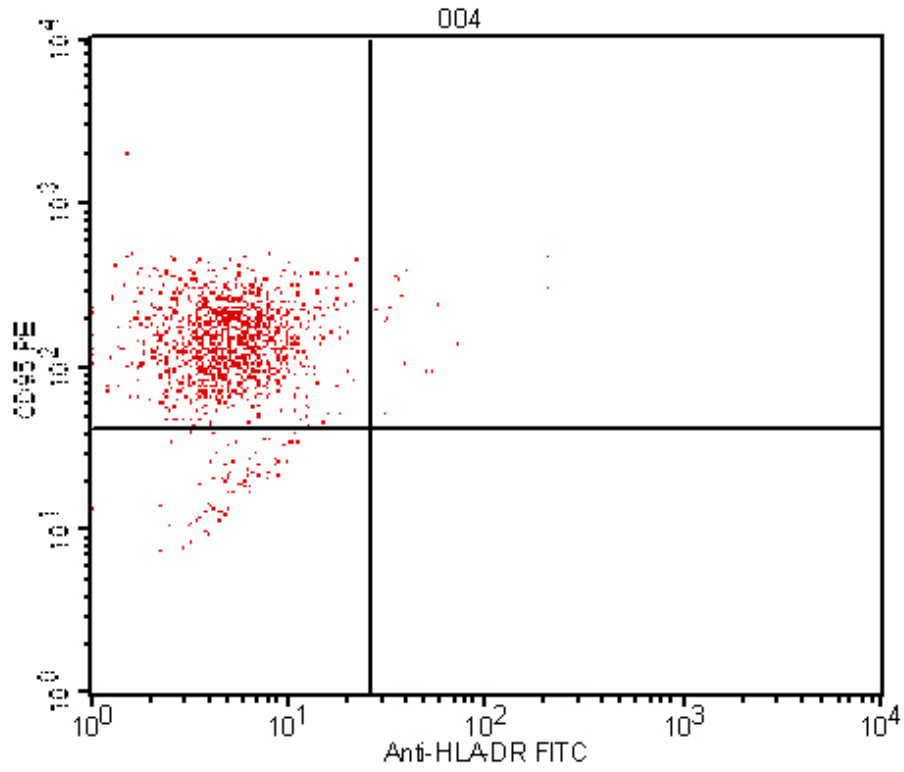


Figura 25. Citometría de flujo. Positividad para CD95 y negatividad para HLA-DR en la línea MG63.

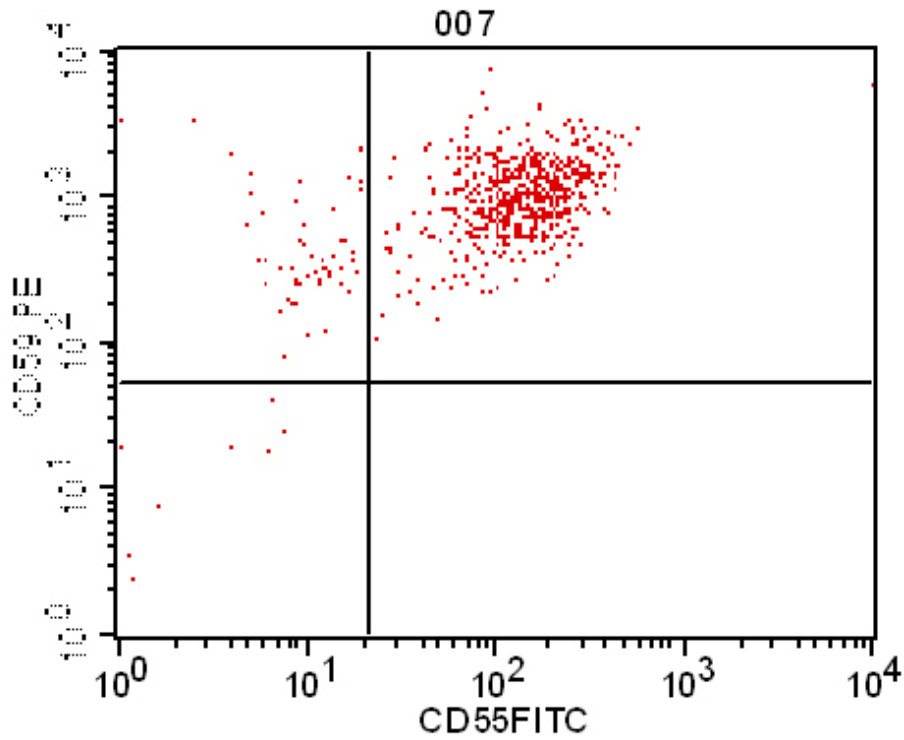


Figura 26. Citometría de flujo. Positividad CD55 y CD59 en la línea MG63.

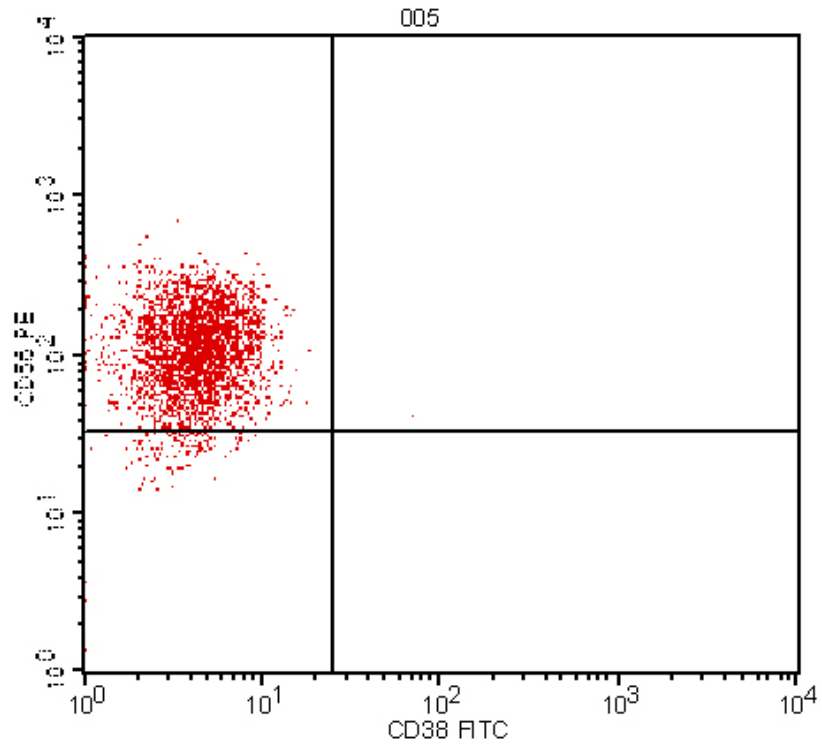


Figura 27. Citometría de flujo. Positividad para CD56 y negatividad para CD38 en la línea MG63.

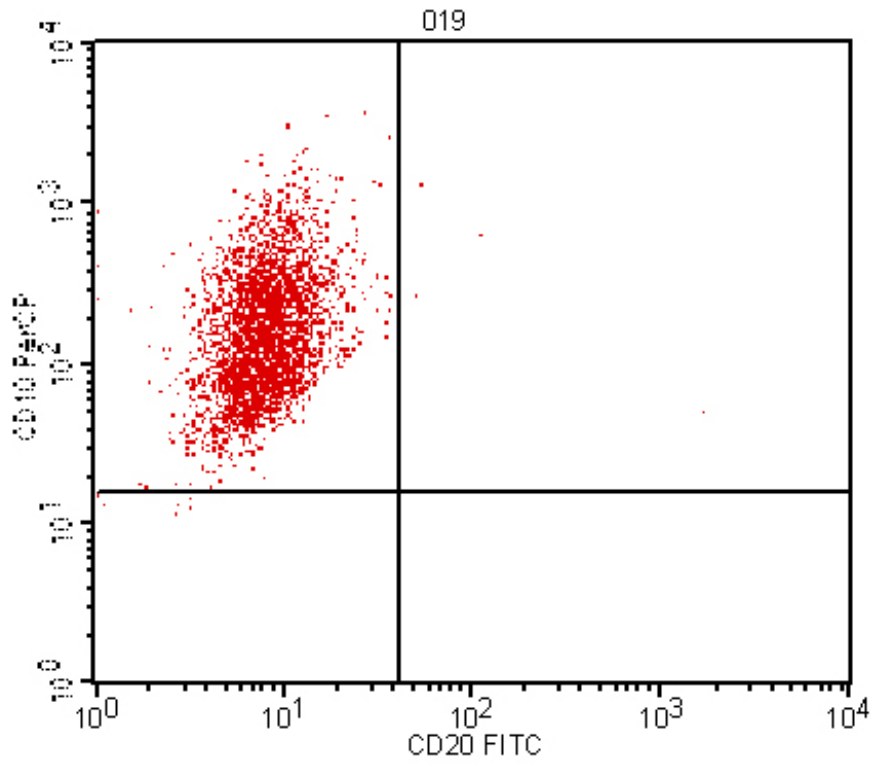


Figura 28. Citometría de flujo. Positividad para CD10 y negatividad para CD20 en la línea MG63.

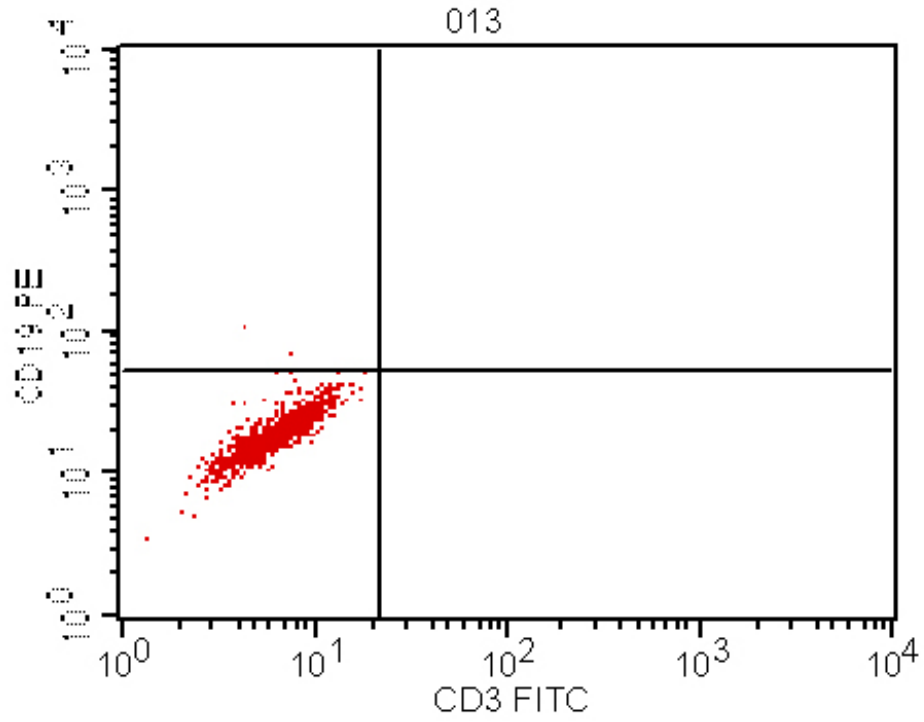


Figura 29. Citometría de flujo. Negatividad para CD3 y CD19 en la línea MG63.

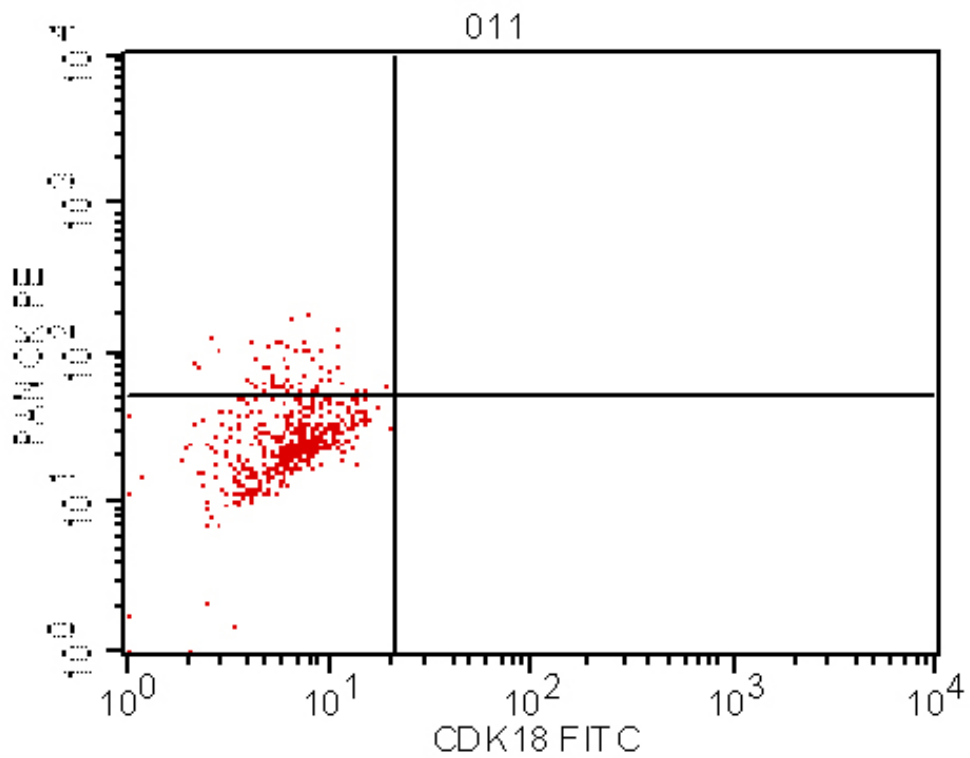


Figura 30. Citometría de flujo. Negatividad para CDK18 y PAN-CK en la línea MG63.

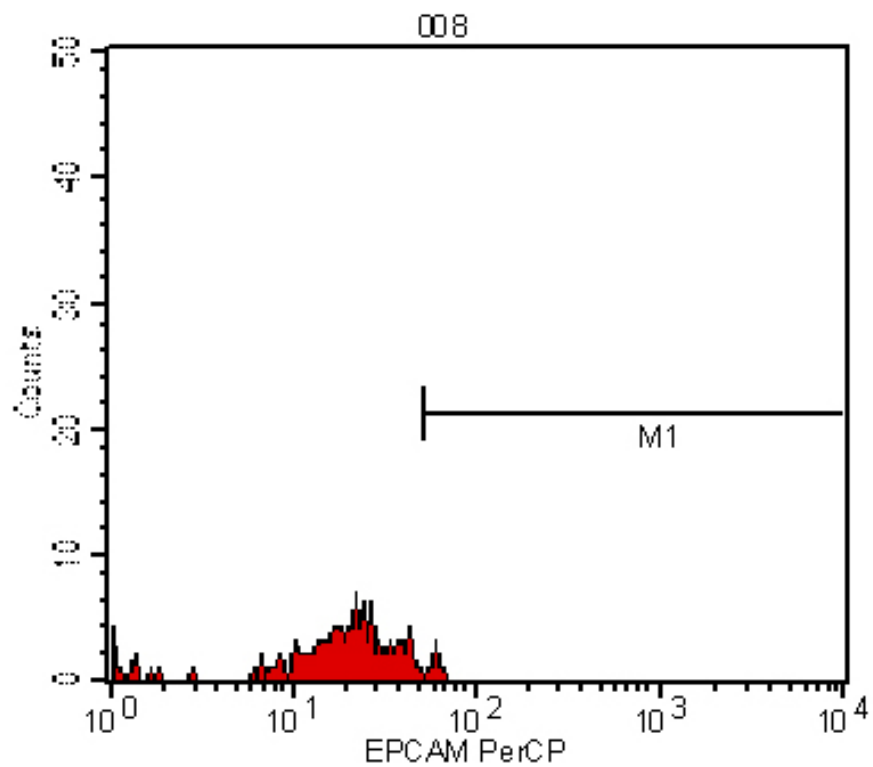


Figura 31. Citometría de flujo. Negatividad para EPCAM en la línea MG63.

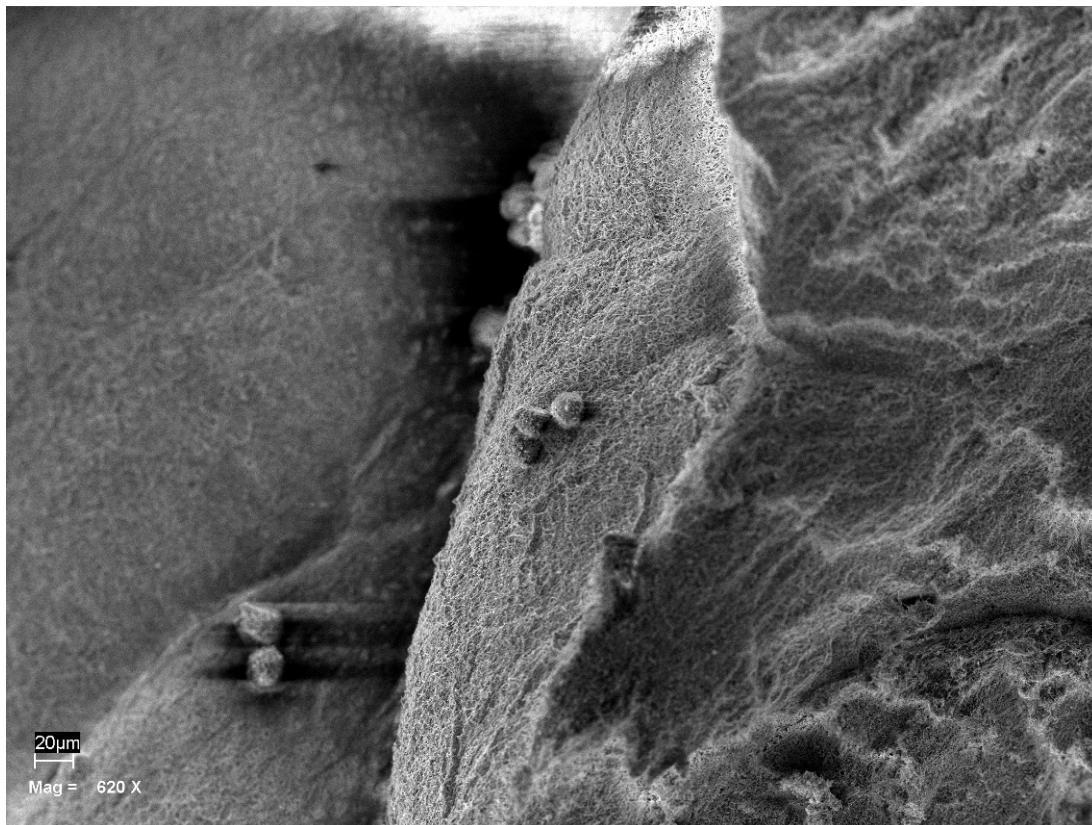


Figura 32. Imagen por SEM del coágulo de PRP tras cocultivo con células MG63 a 0 horas.

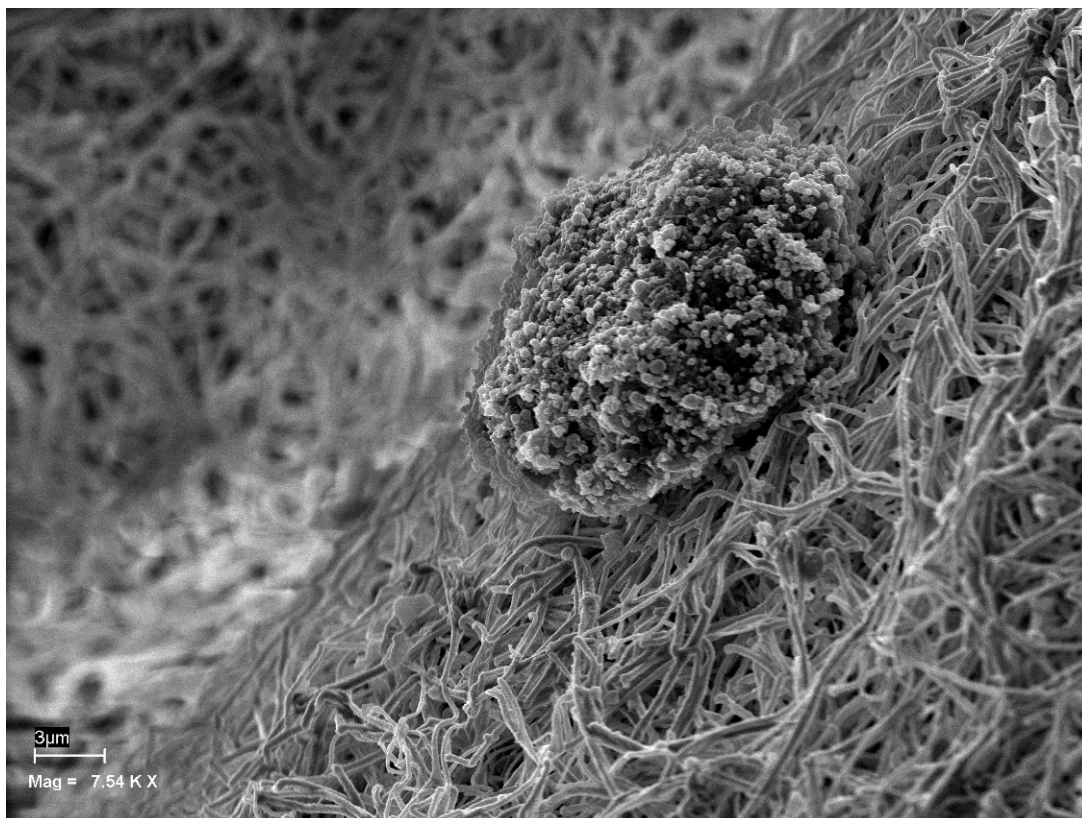


Figura 33. Imagen por SEM del coágulo de PRP tras cocultivo con células MG63 a 0 horas.

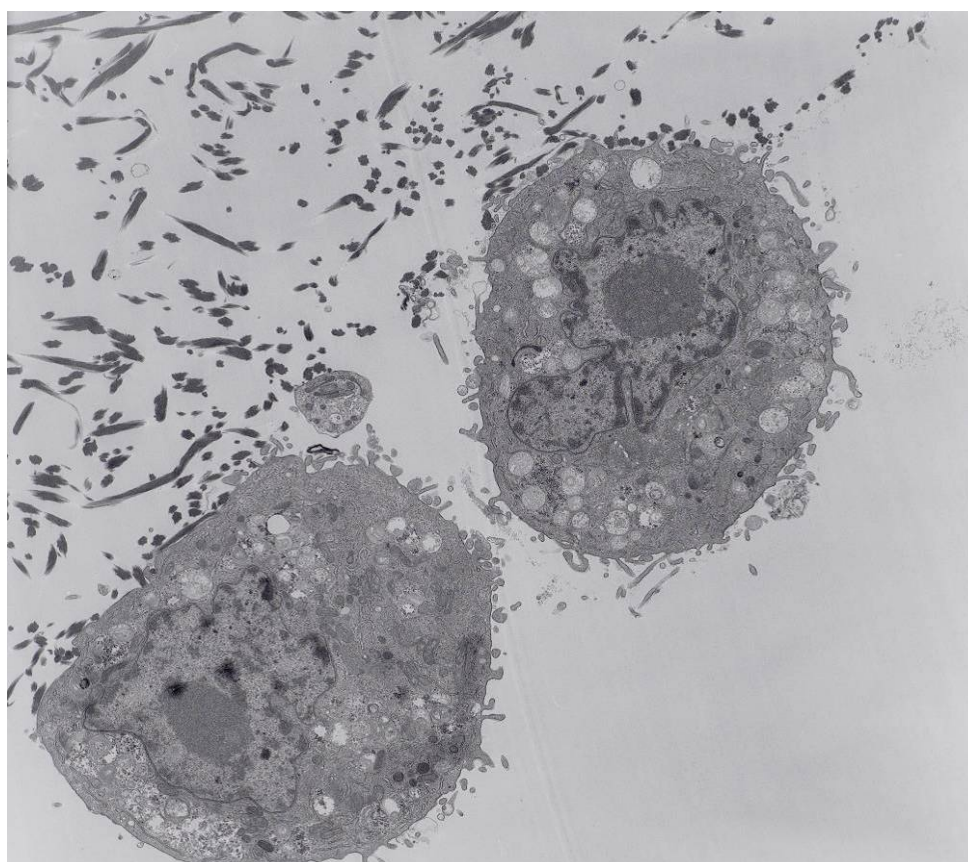


Figura 34. Imagen por TEM del coágulo de PRP tras cocultivo con MG63 a 0 horas (3150X)

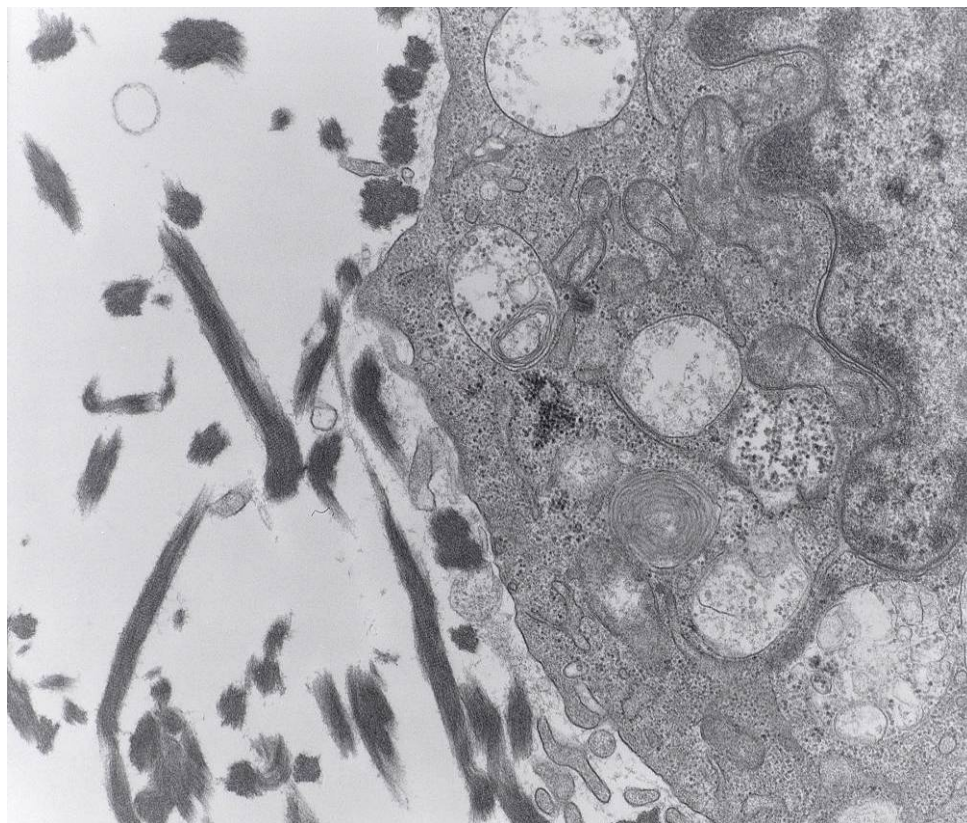


Figura 35. Imagen por TEM del coágulo de PRP tras cocultivo con MG63 a 0 horas (16000X)

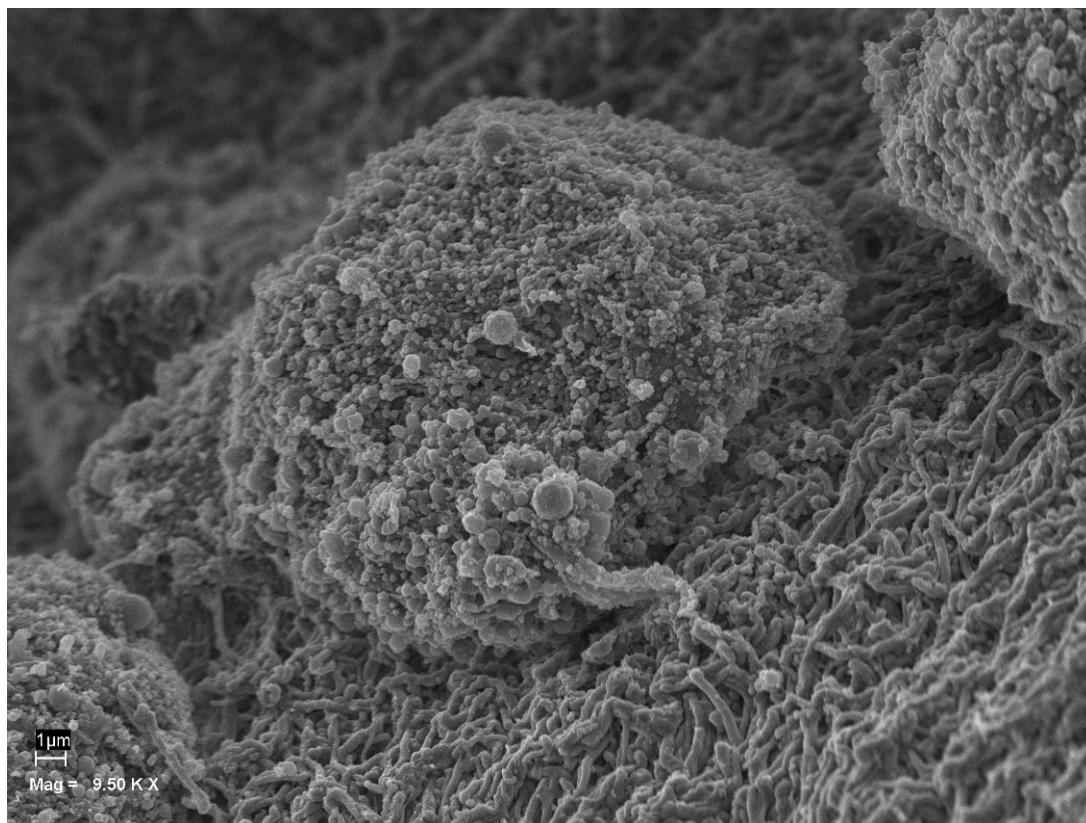


Figura 36. Imagen por SEM del coágulo de PRP tras cocultivo con células MG63 a 24 horas.

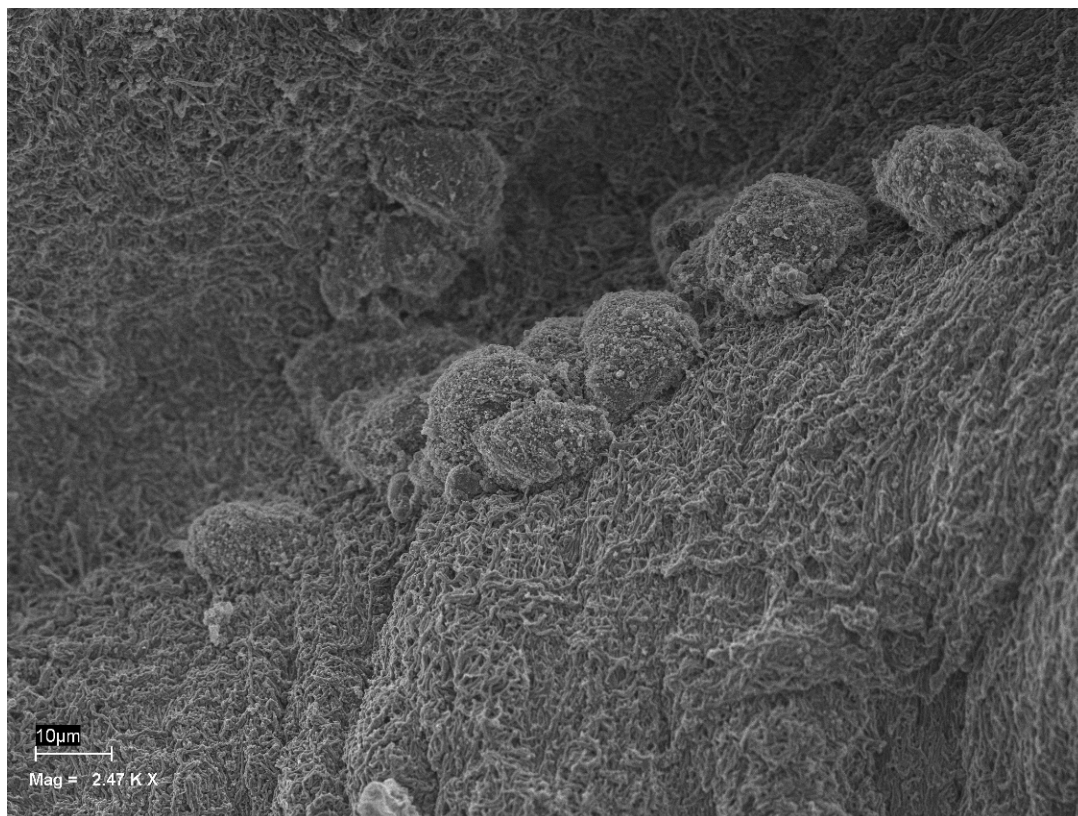


Figura 37. Imagen por SEM del coágulo de PRP tras cocultivo con células MG63 a 24 horas.

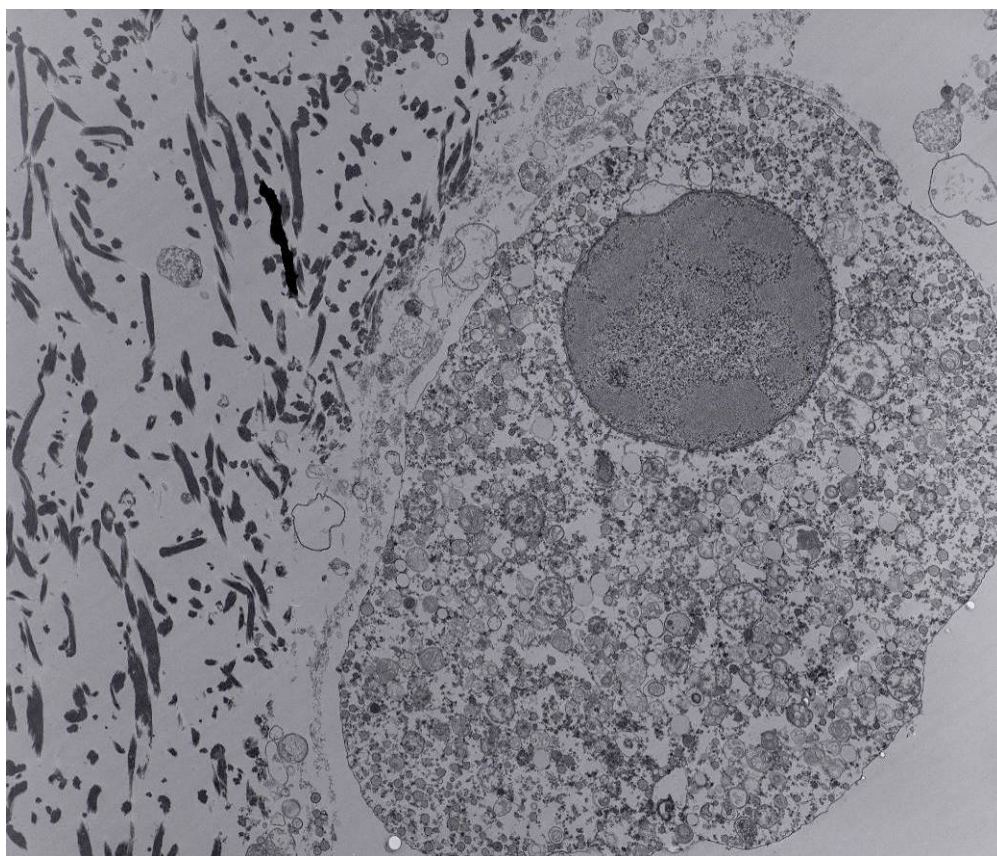


Figura 38. Imagen por TEM del coágulo de PRP tras cocultivo con MG63 a 24 horas (3150X)

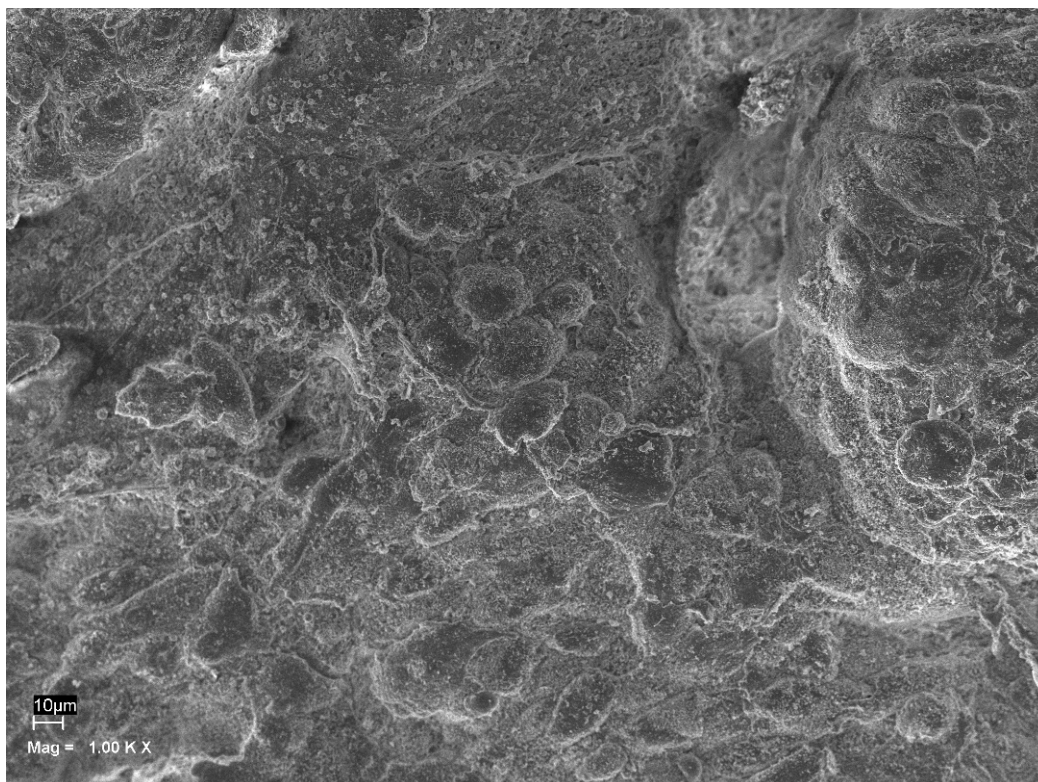


Figura 39. Imagen por SEM del coágulo de PRP tras cocultivo con células MG63 a 72 horas.

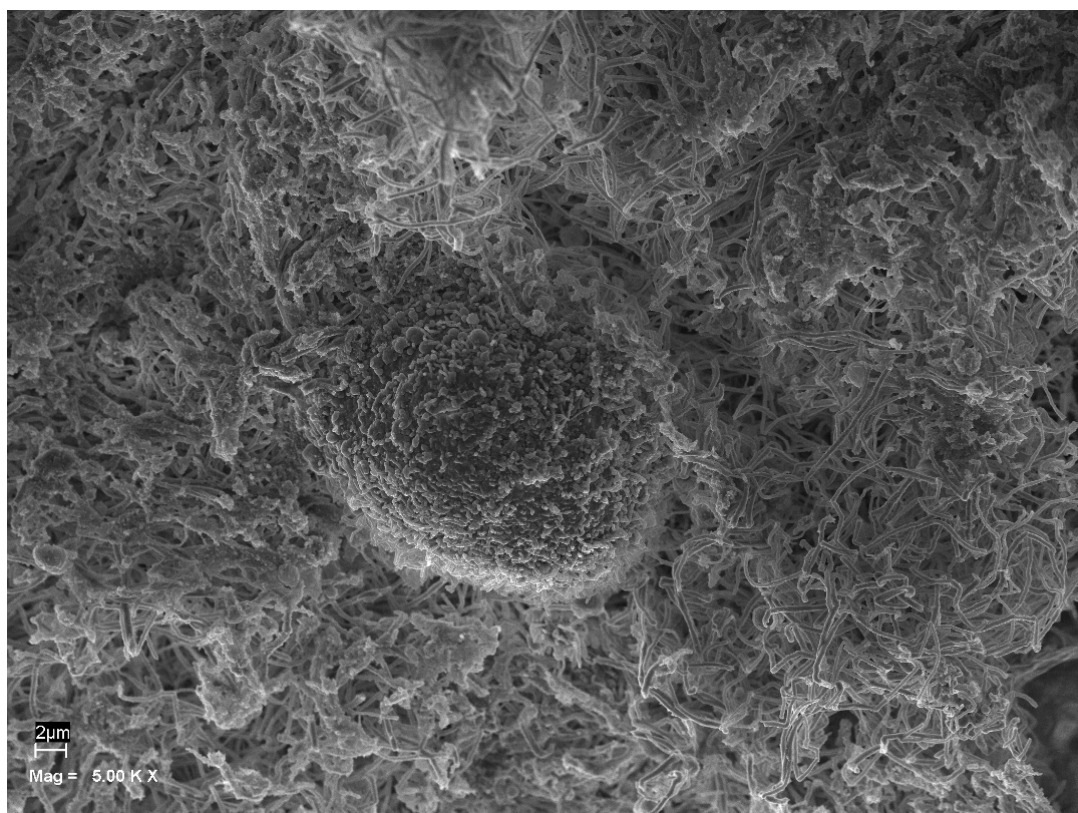


Figura 40. Imagen por SEM del coágulo de PRP tras cocultivo con células MG63 a 72 horas.
Detalle de una célula MG63 en relación al coágulo de PRP.

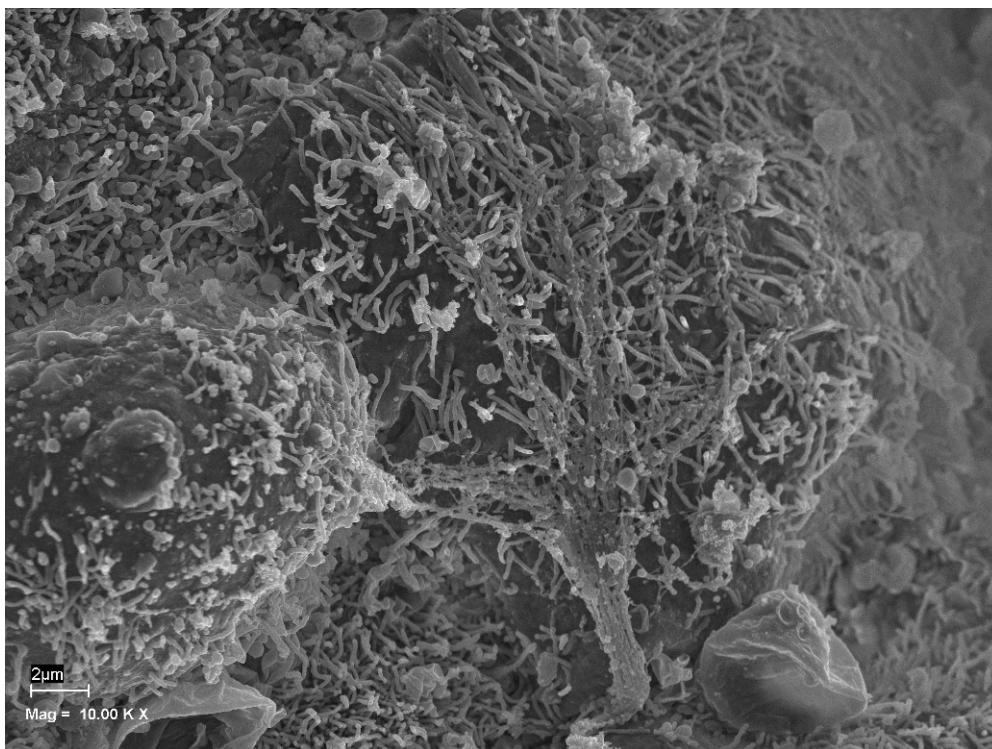


Figura 41. Imagen por SEM del coágulo de PRP tras cocultivo con células MG63 a 72 horas.

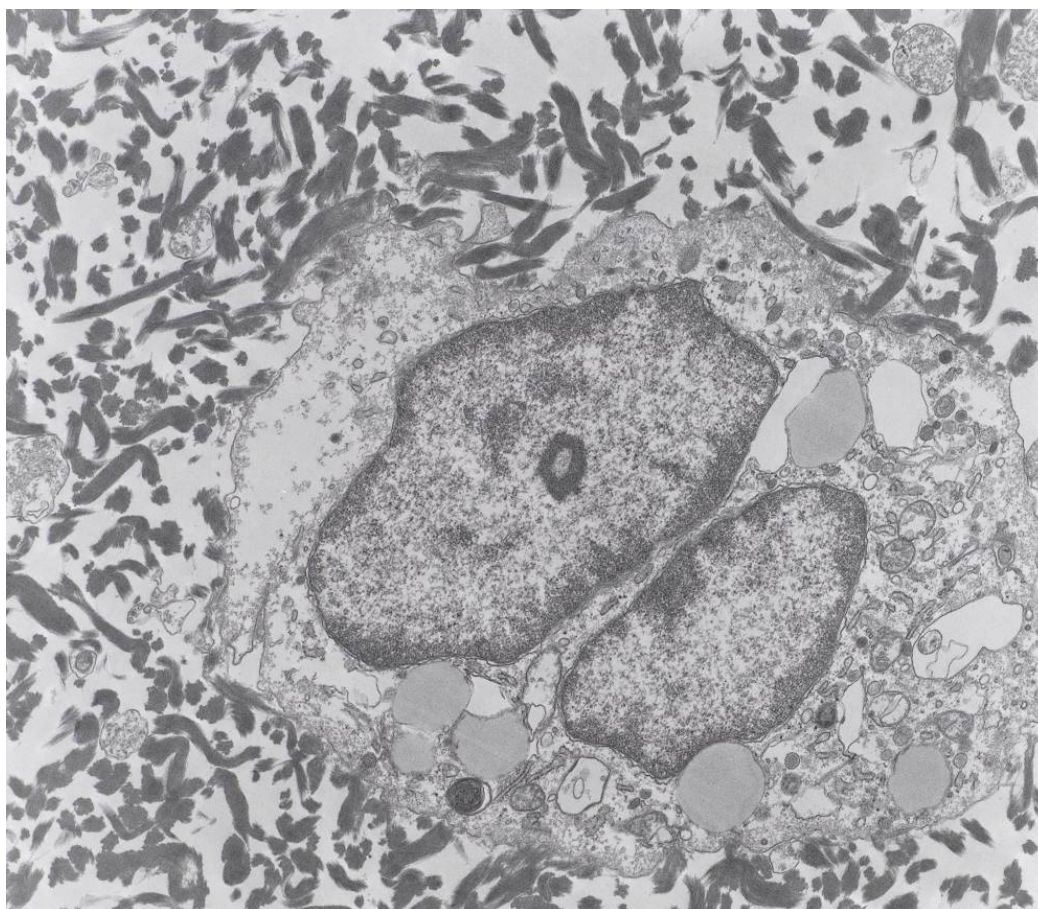


Figura 42. Imagen por TEM del coágulo de PRP tras cocultivo con MG63 a 72 horas (6300X)

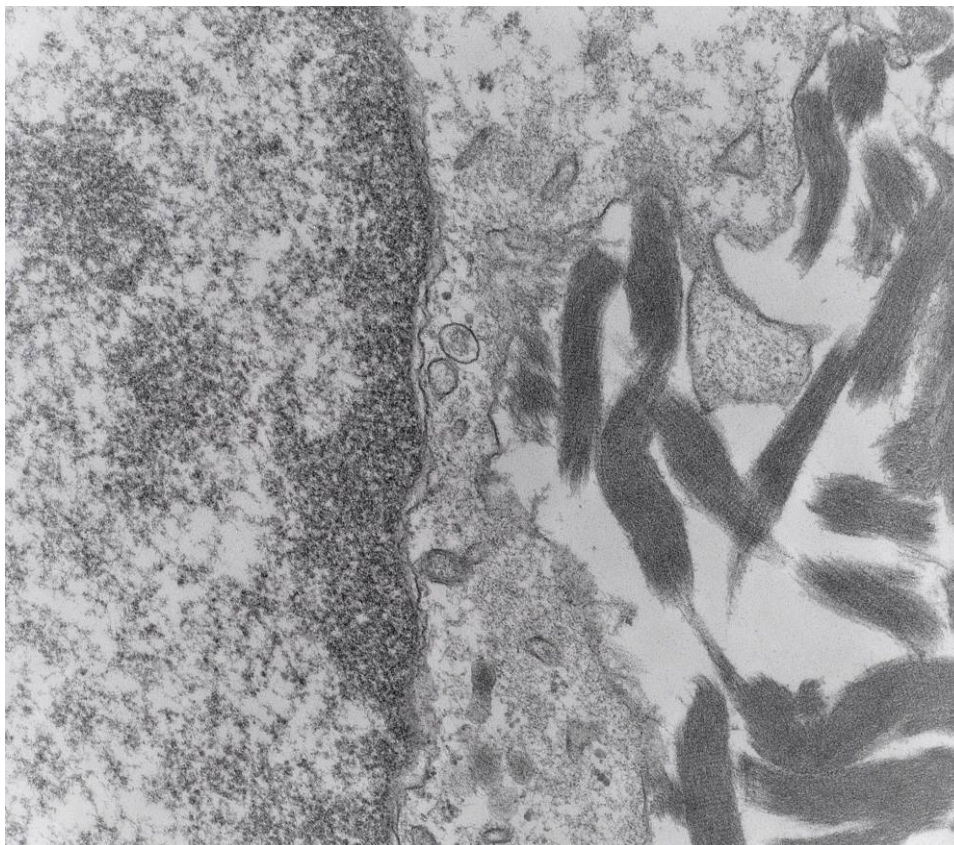


Figura 43. Imagen por TEM del coágulo de PRP tras cocultivo con MG63 a 72 horas (25000X)

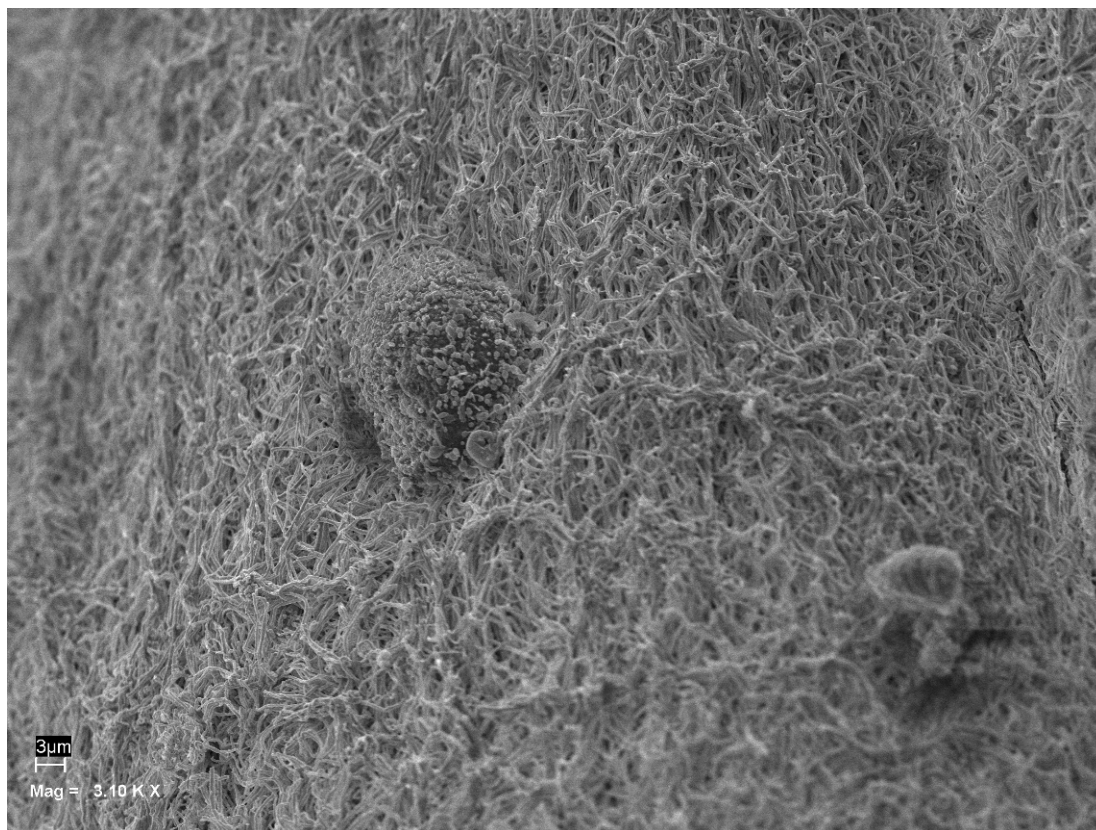


Figura 44. Imagen por SEM del coágulo de PPP tras cocultivo con células MG63 a 0 horas.



Figura 45. Imagen por TEM del coágulo de PPP tras cocultivo con MG63 a 0 horas (4000X)

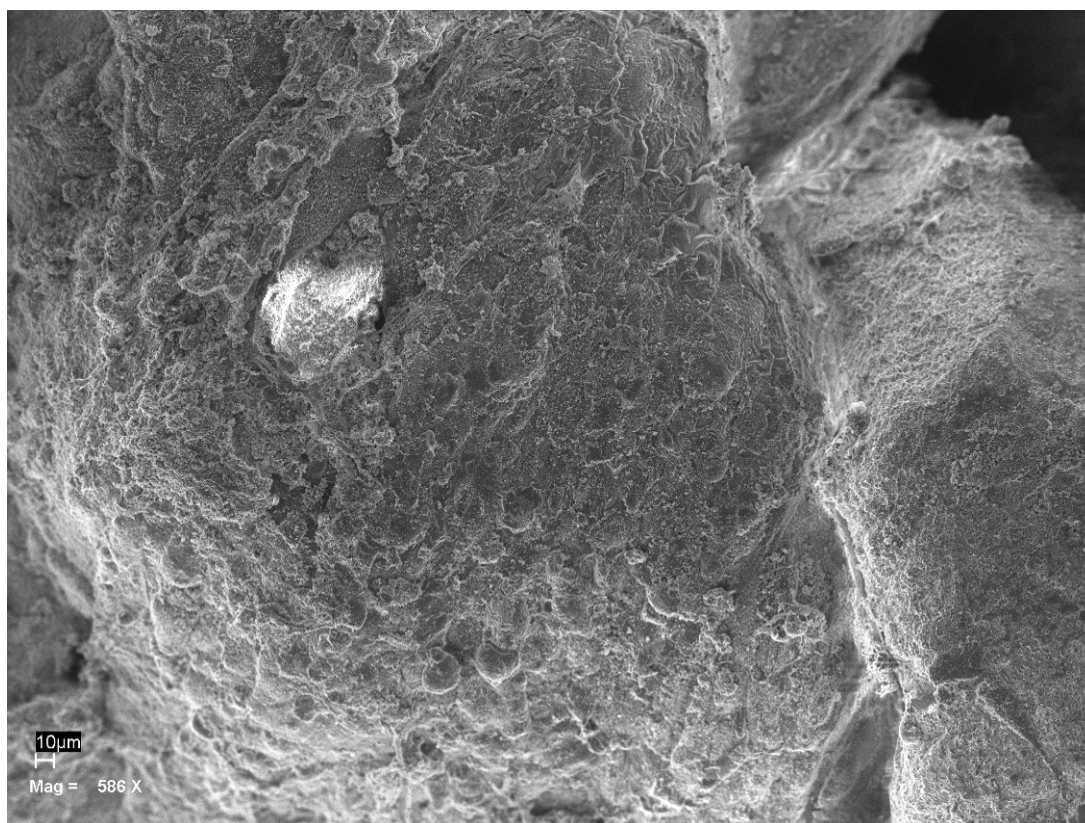


Figura 46. Imagen por SEM del coágulo de PPP tras cocultivo con células MG63 a 24 horas.

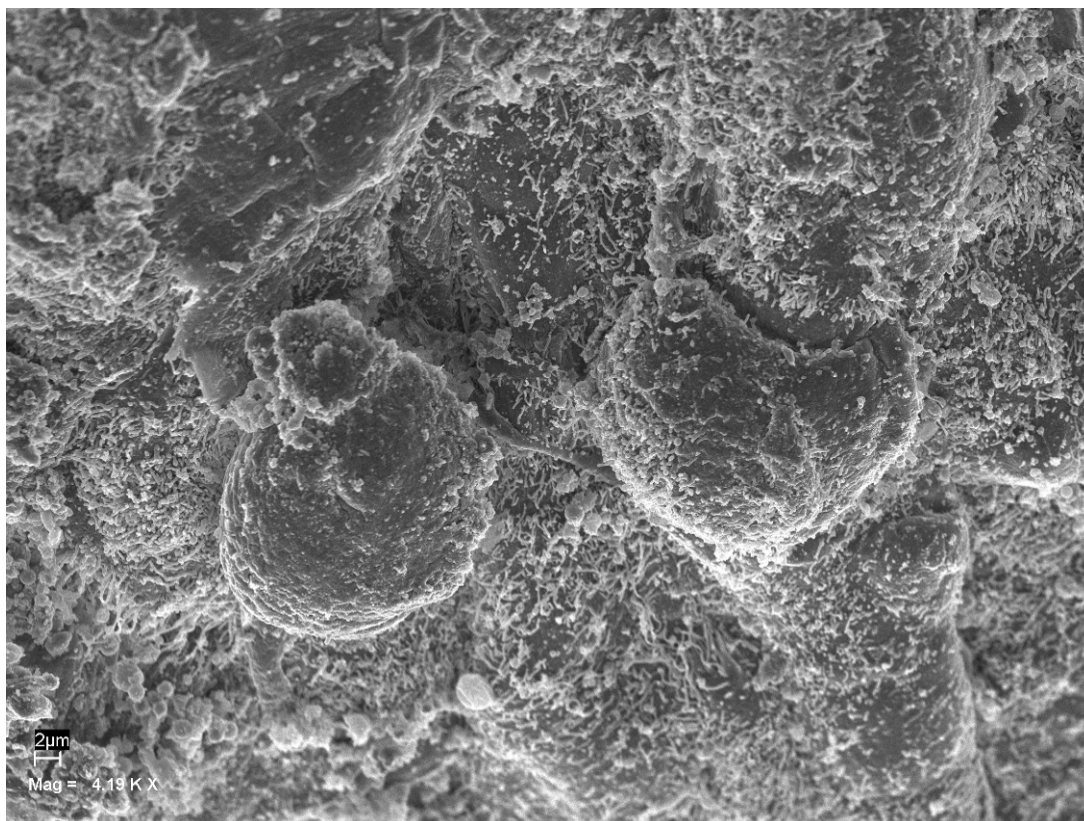


Figura 47. Imagen por SEM del coágulo de PPP tras cocultivo con células MG63 a 24 horas.

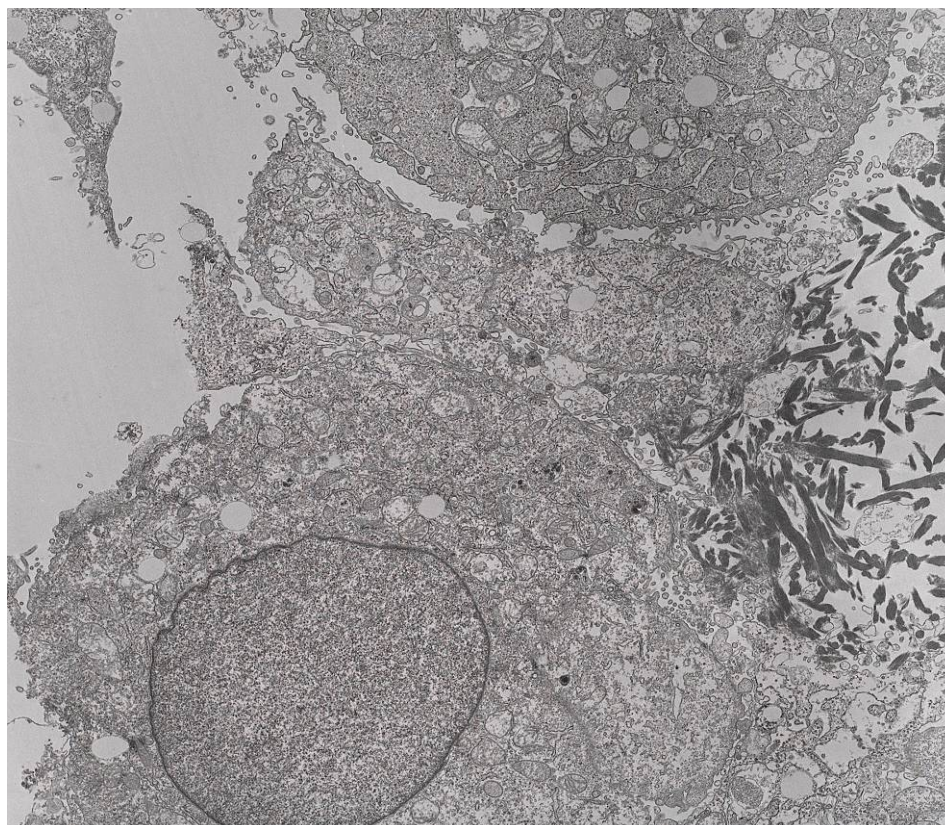


Figura 48. Imagen por TEM del coágulo de PPP tras cocultivo con MG63 a 24 horas (4000X)

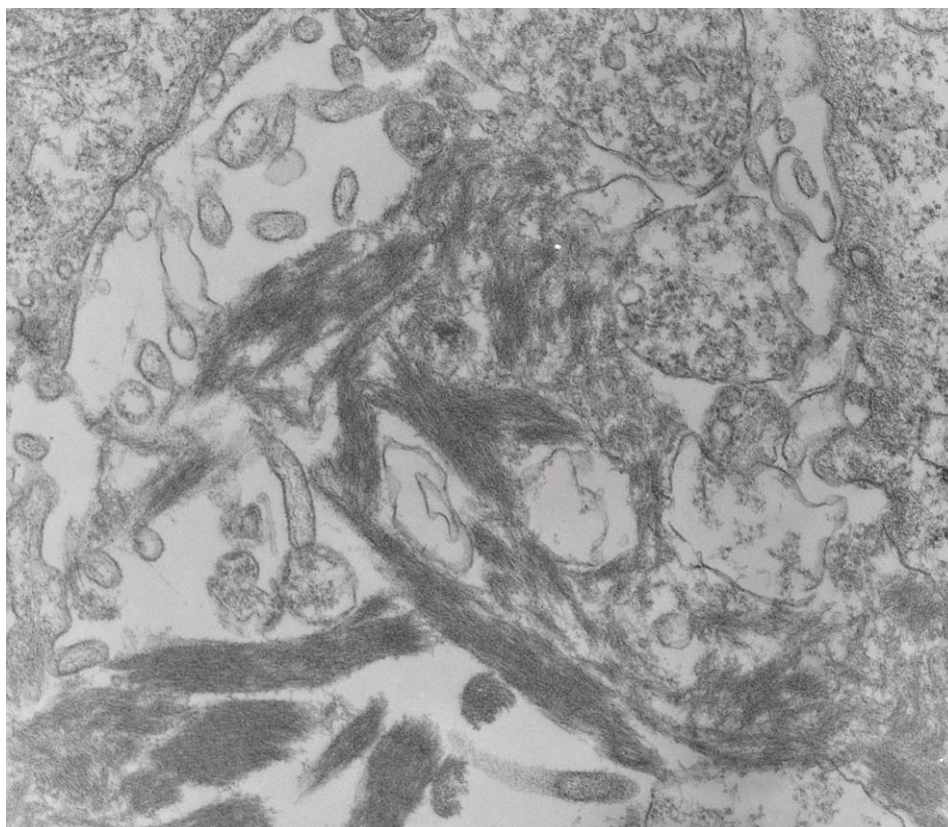


Figura 49. Imagen por TEM del coágulo de PPP tras cocultivo con MG63 a 24 horas (25000X)

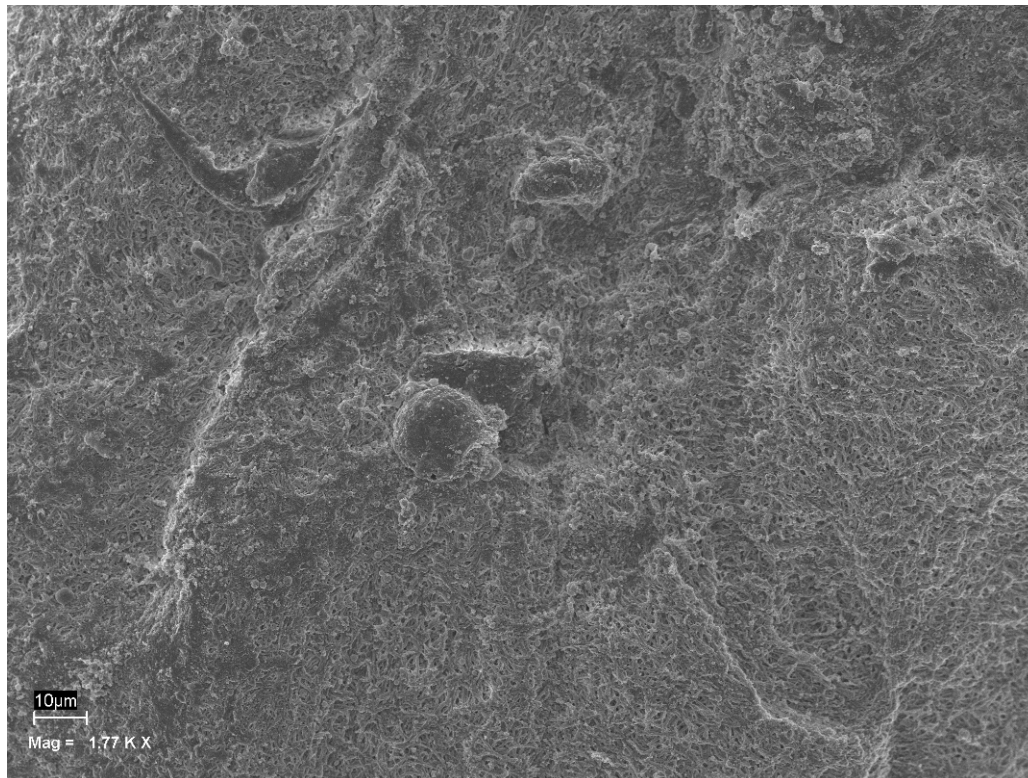


Figura 50. Imagen por SEM del coágulo de PPP tras cocultivo con células MG63 a 72 horas.

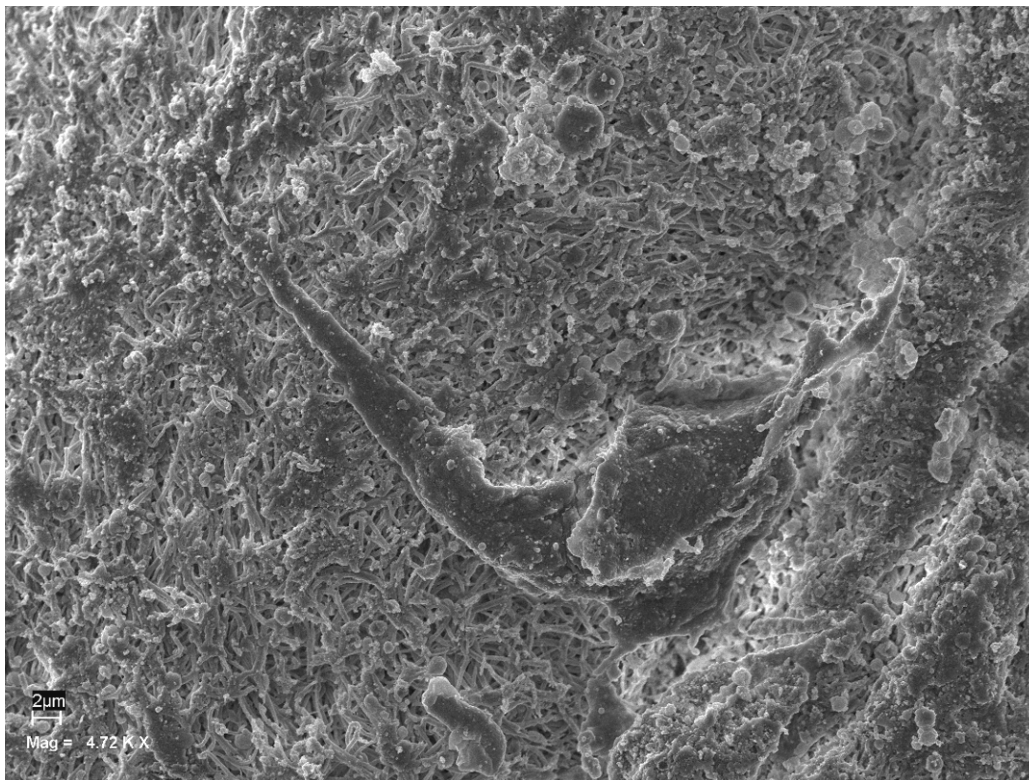


Figura 51. Imagen por SEM del coágulo de PPP tras cocultivo con células MG63 a 72 horas.

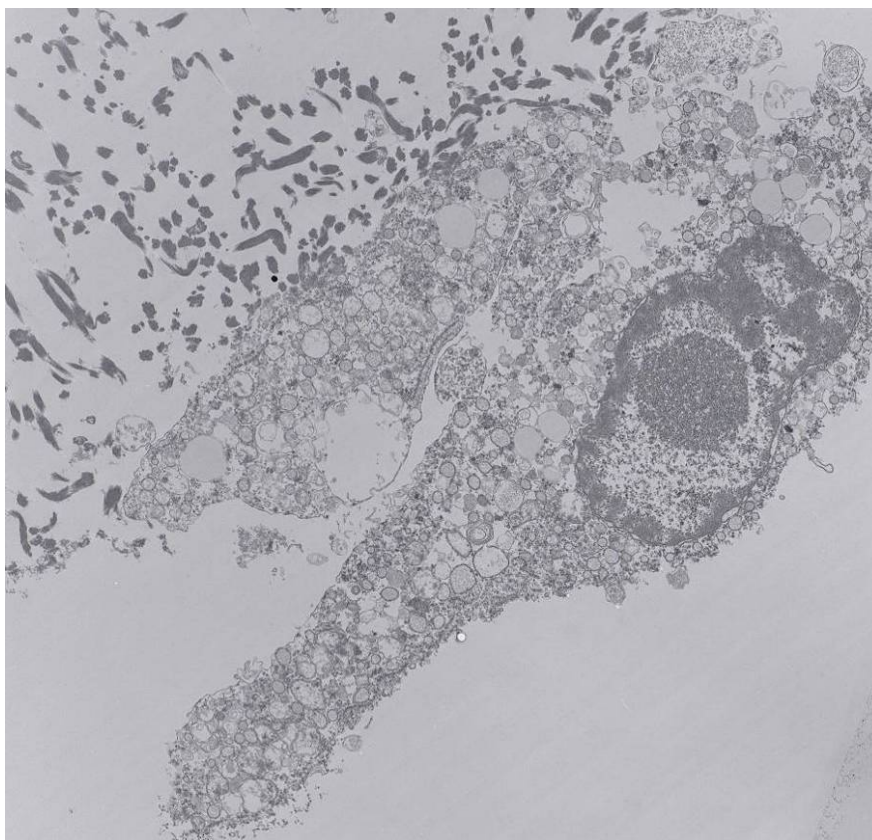


Figura 52. Imagen por TEM del coágulo de PPP tras cocultivo con MG63 a 72 horas (3150X)

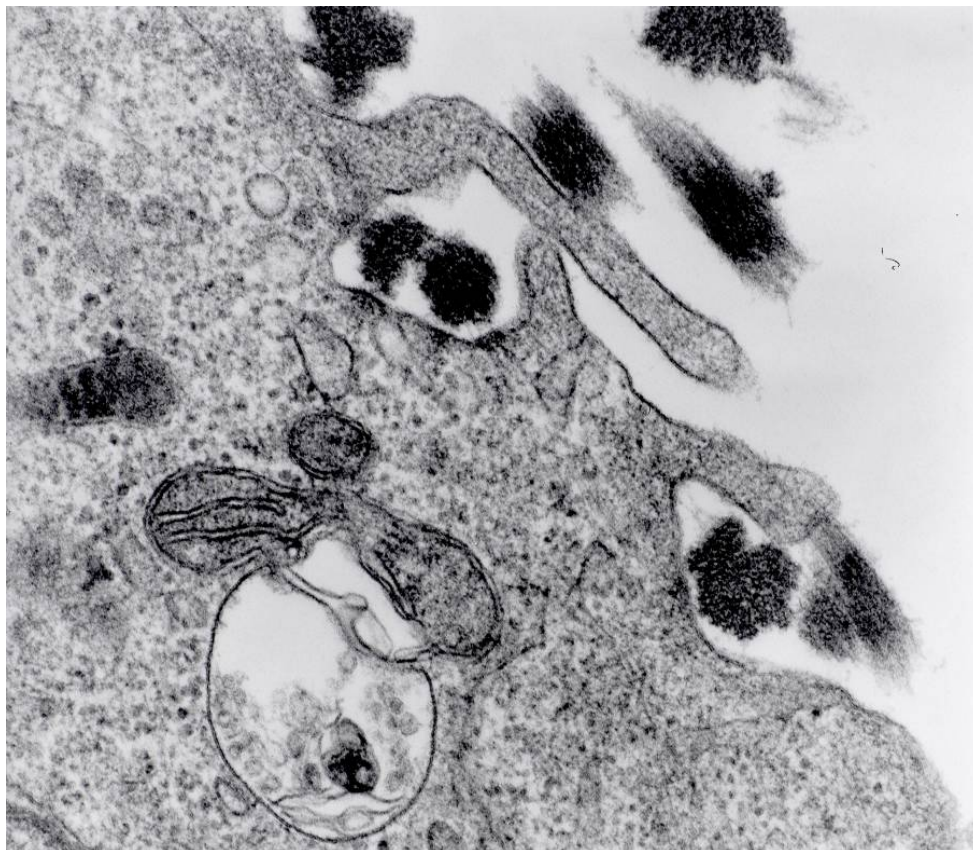


Figura 53. Imagen por TEM del coágulo de PPP tras cocultivo con MG63 a 72 horas (50000X)

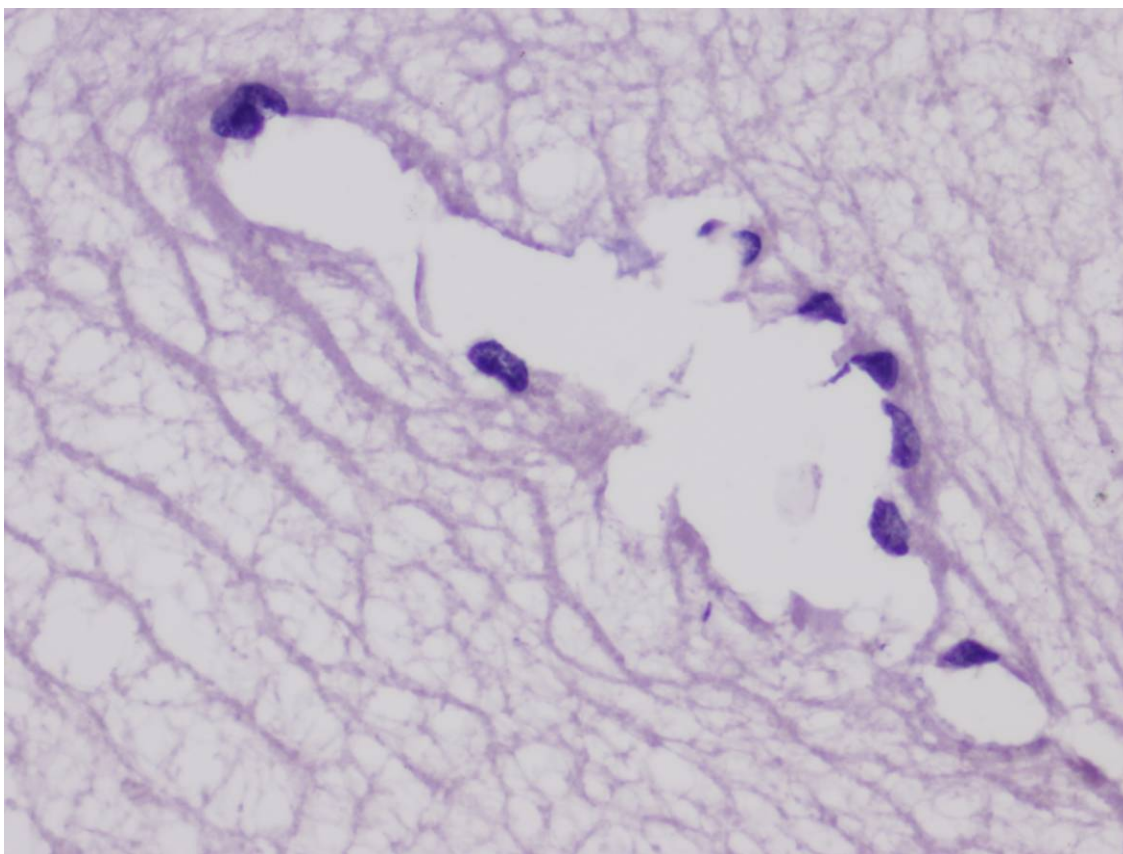


Figura 54. Muestra de MG63+PRP a 72h. CD56 negativo (40X)

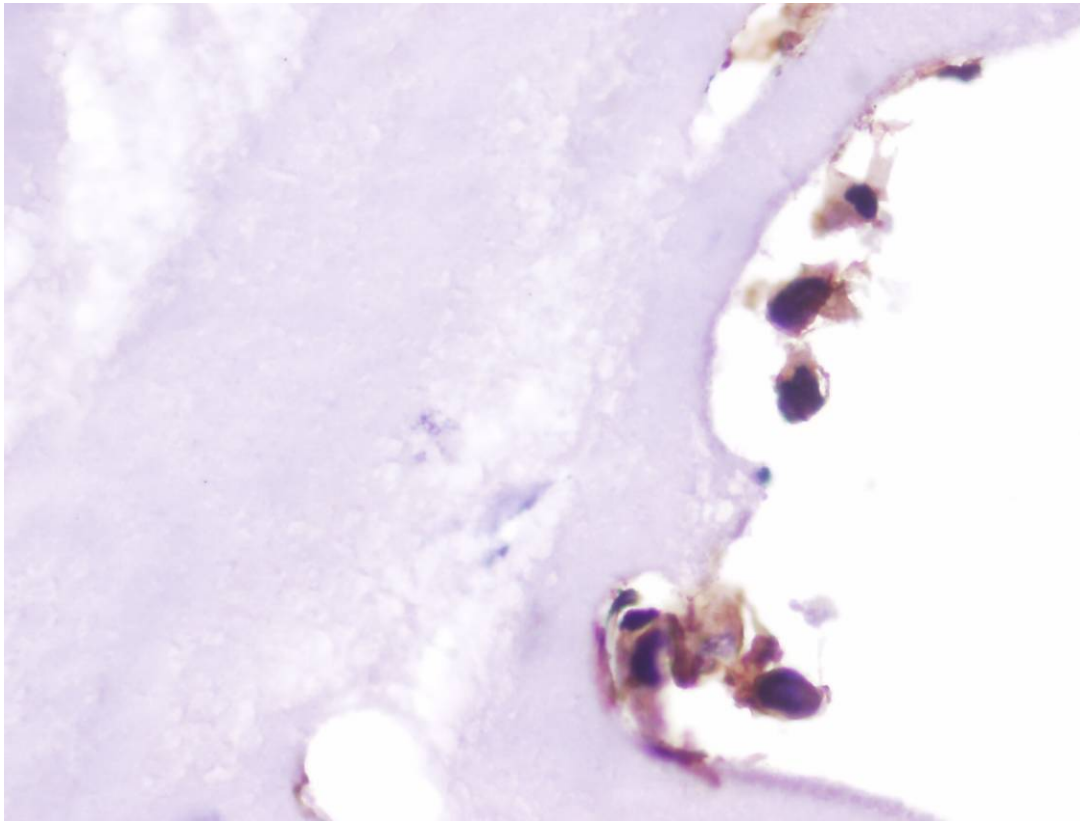


Figura 55. Muestra de MG63+PRP a 24h. Vimentina positiva (40X)

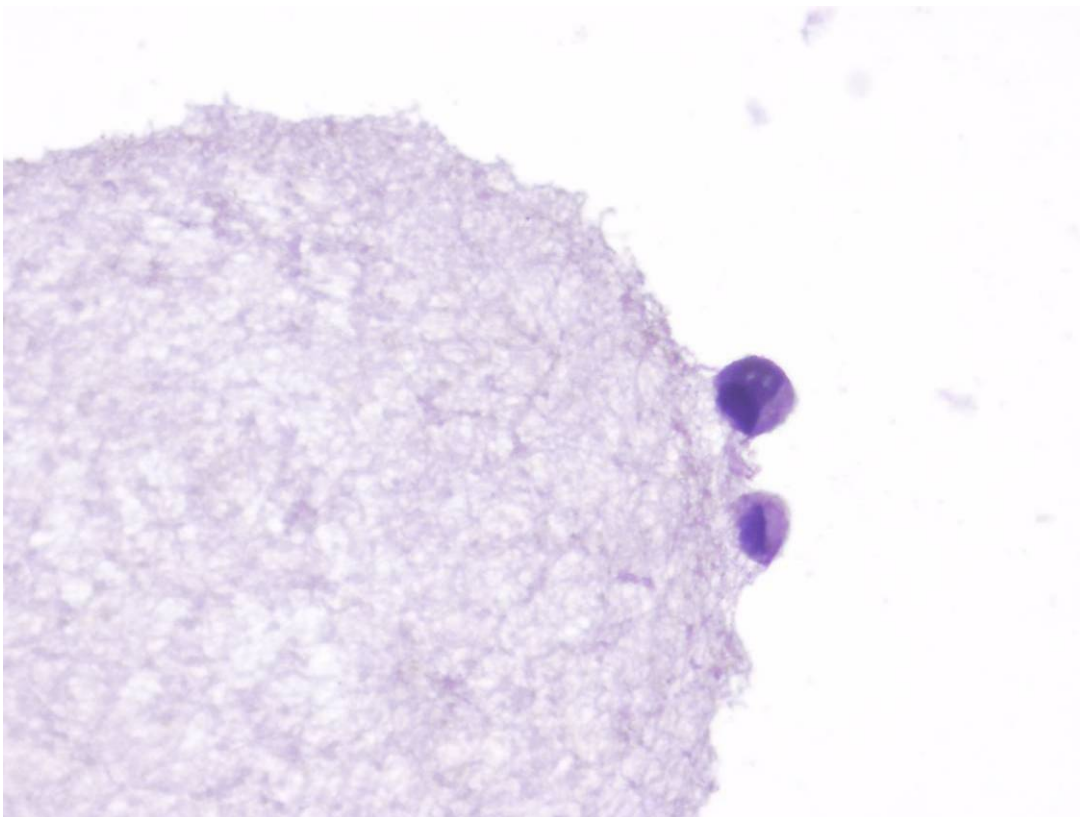


Figura 56. Muestra de MG63+PRP a 0h. CK AE1/AE3 negativa. Nótese la escasez celular (40X)

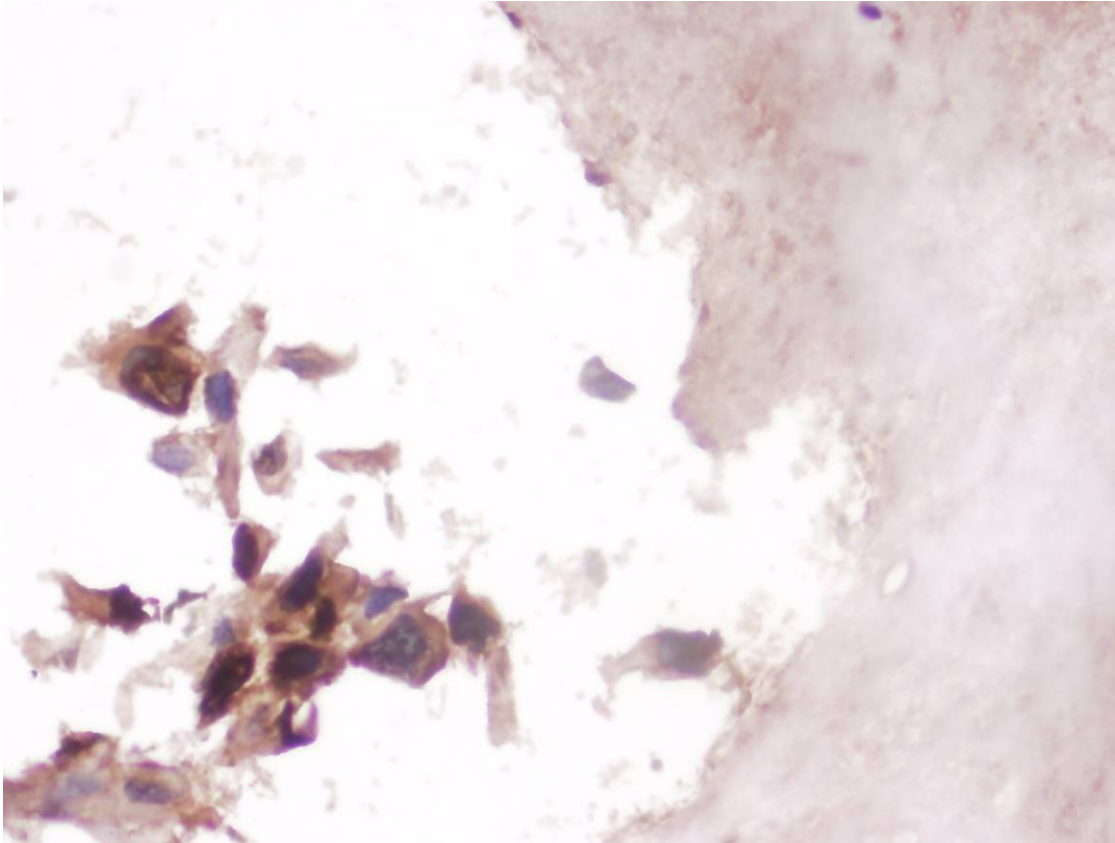


Figura 57. Muestra de MG63+PRP a 24h. Ki67 positivo (40X)

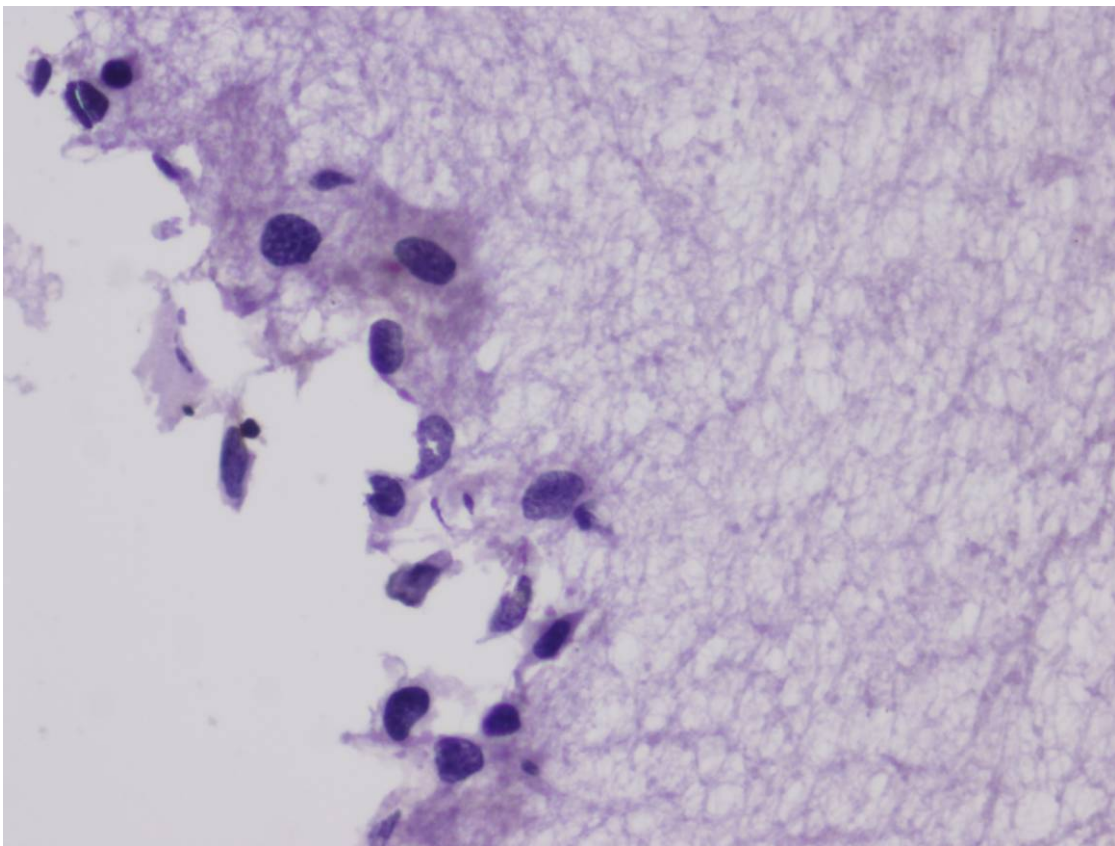


Figura 58. Muestra de MG63+PPP a 72h. CD10 negativo (40X)

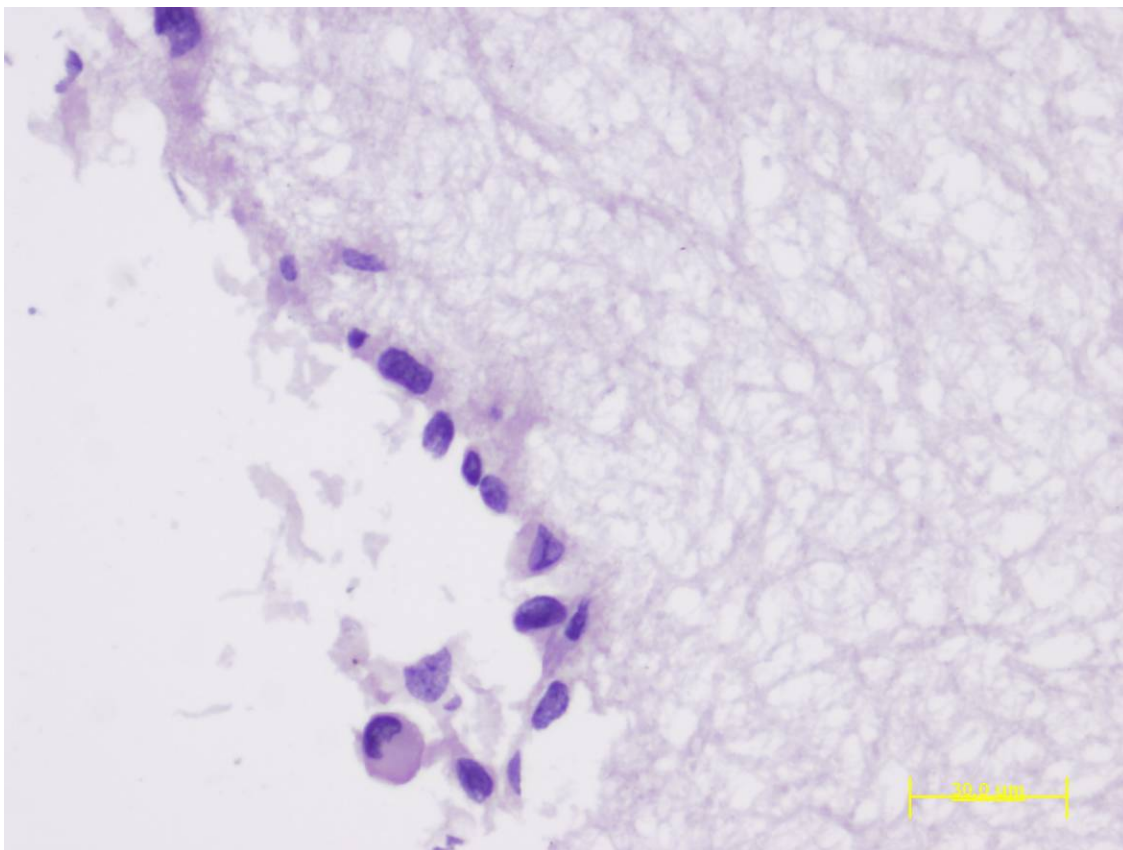


Figura 59. Muestra de MG63 PPP 72h. Desmina negativa (40X)

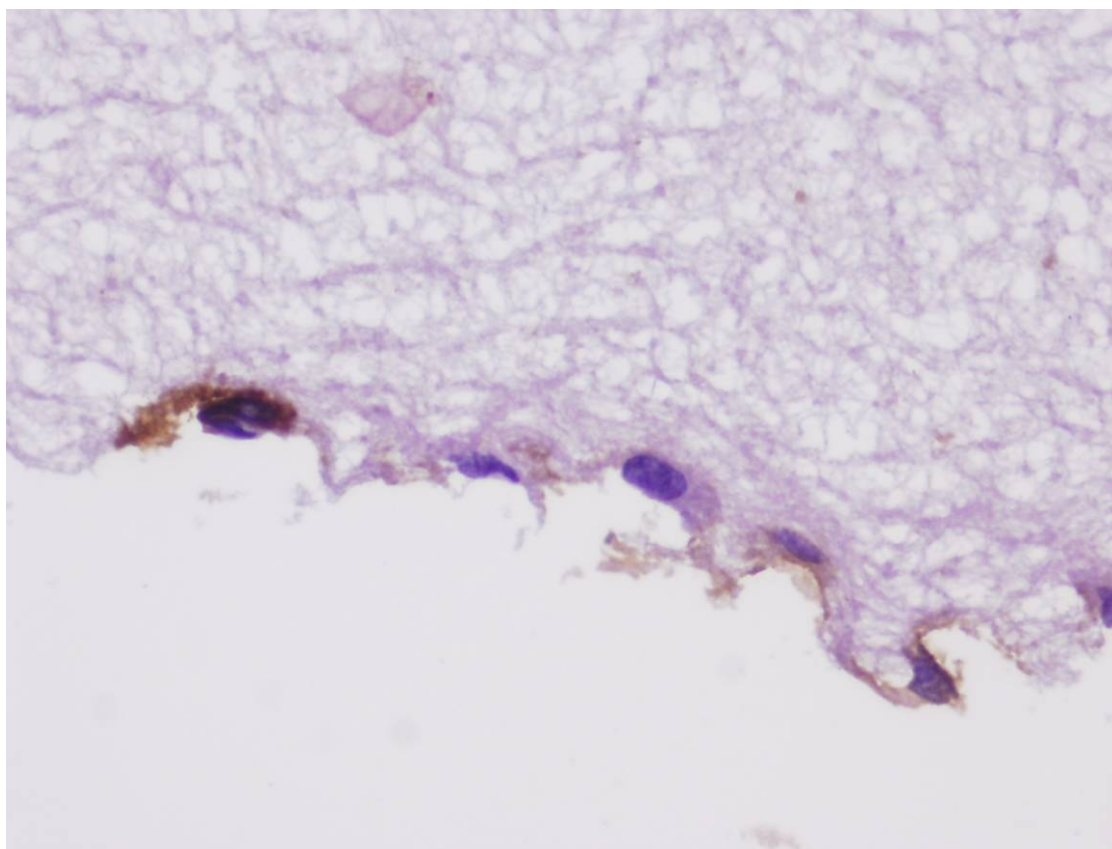


Figura 60. Muestra de MG63+PPP a 72h. CK AE1/AE3 positiva en algunas células (60X)

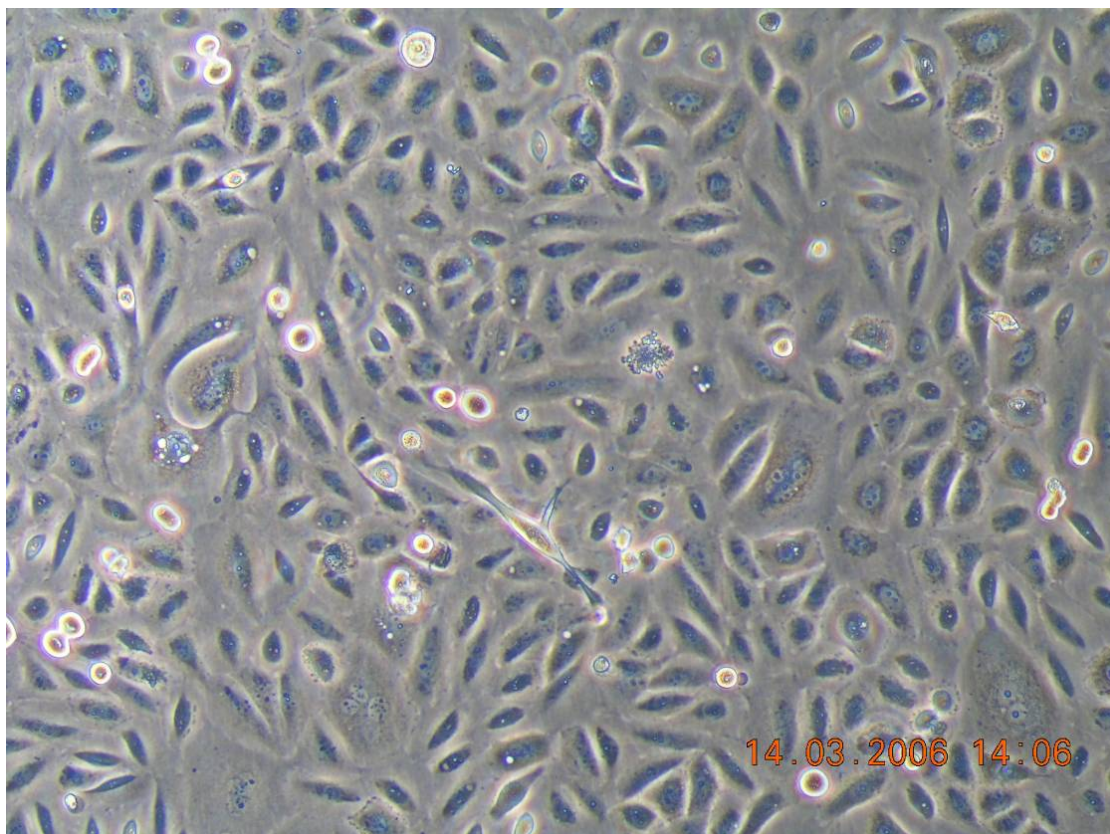


Figura 61. Imagen de microscopía óptica del cultivo de DOK (100X).

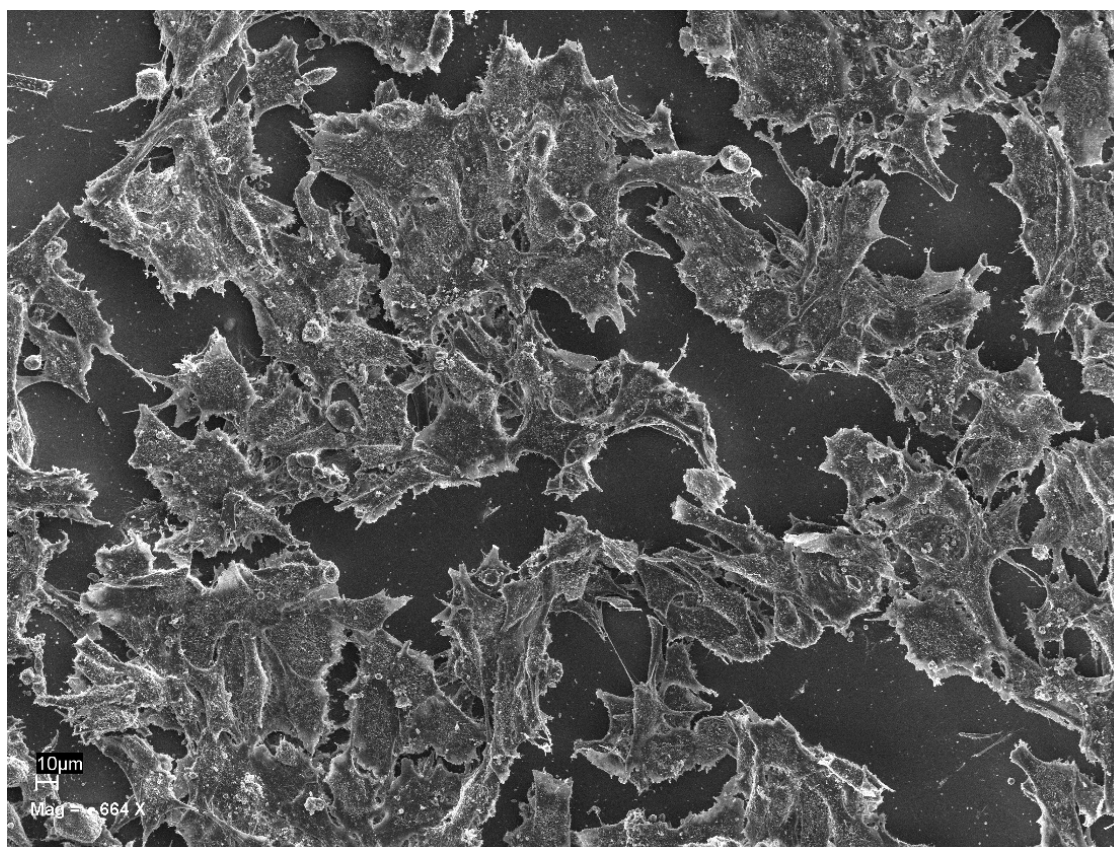


Figura 62. Caracterización morfológica por SEM. Imagen del cultivo de DOK.

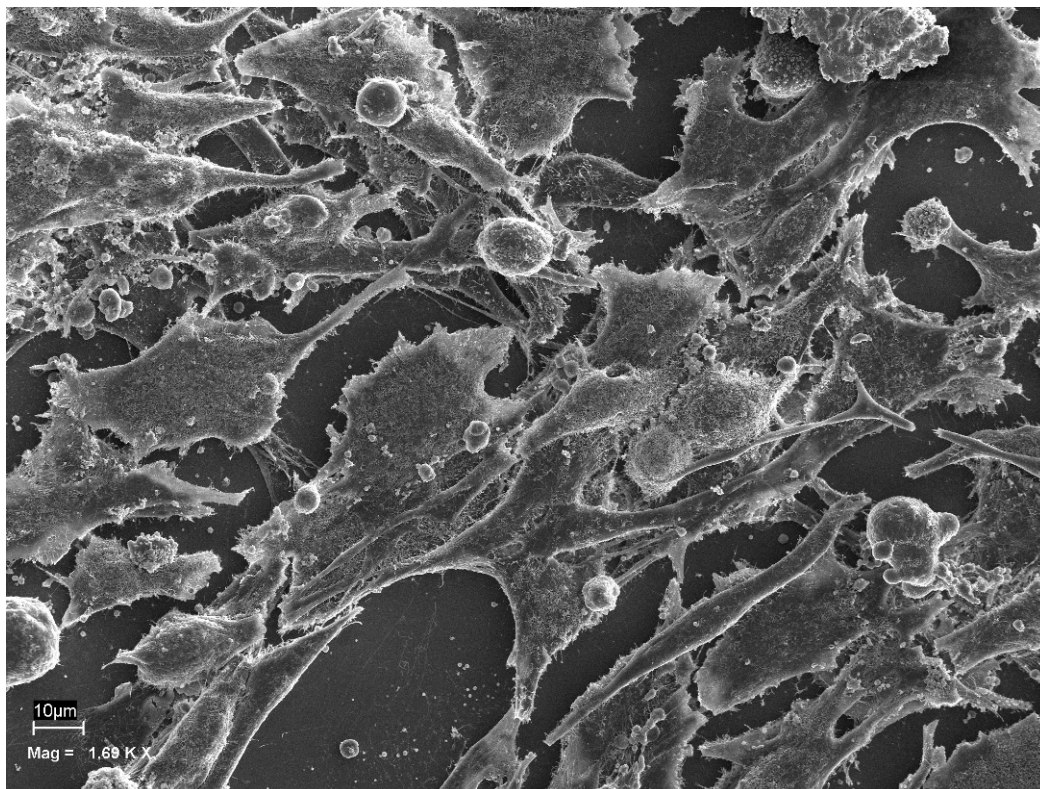


Figura 63. Caracterización morfológica por SEM. Imagen del cultivo de DOK.

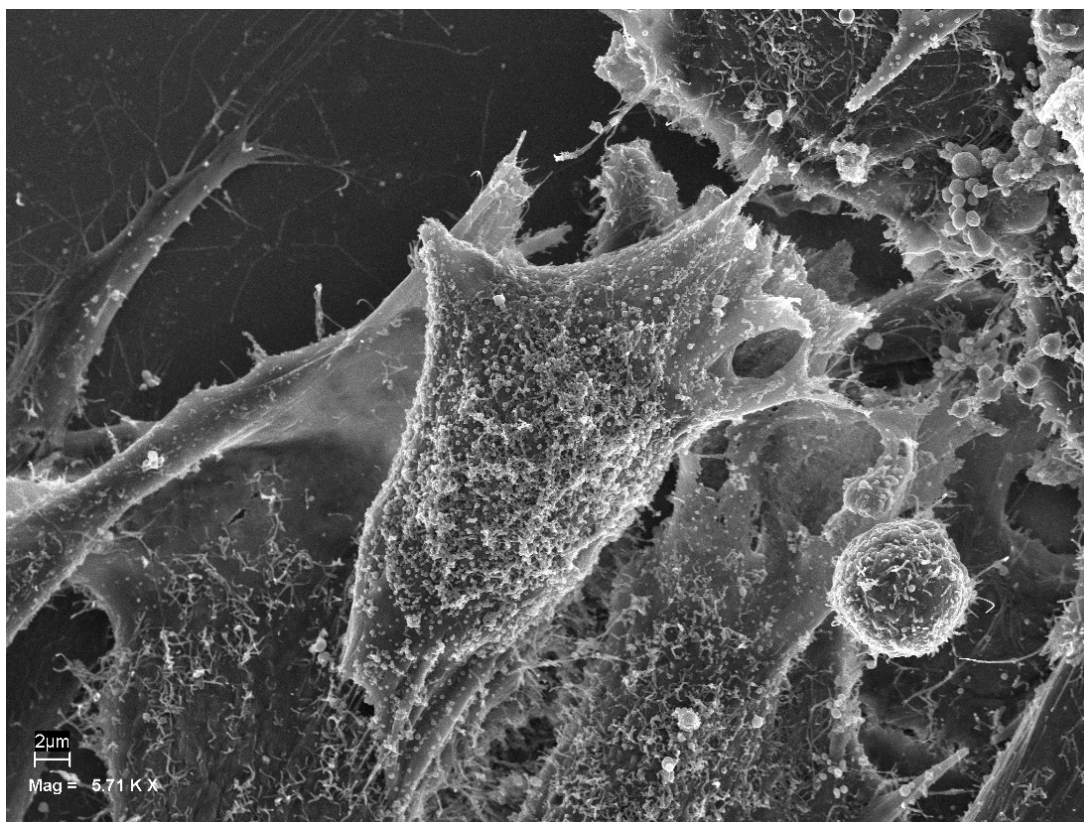


Figura 64. Caracterización morfológica por SEM. Detalle de una célula DOK en cultivo celular.

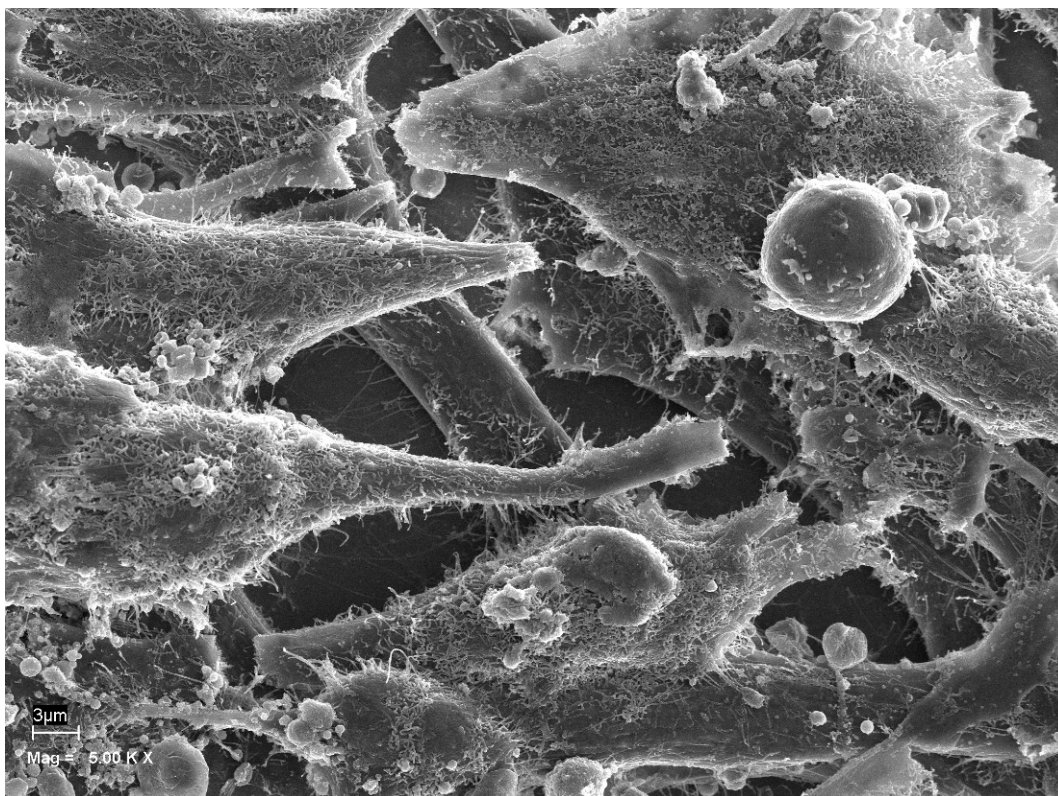


Figura 65. Caracterización morfológica por SEM.
Detalle las relaciones intercelulares en cultivo de DOK.

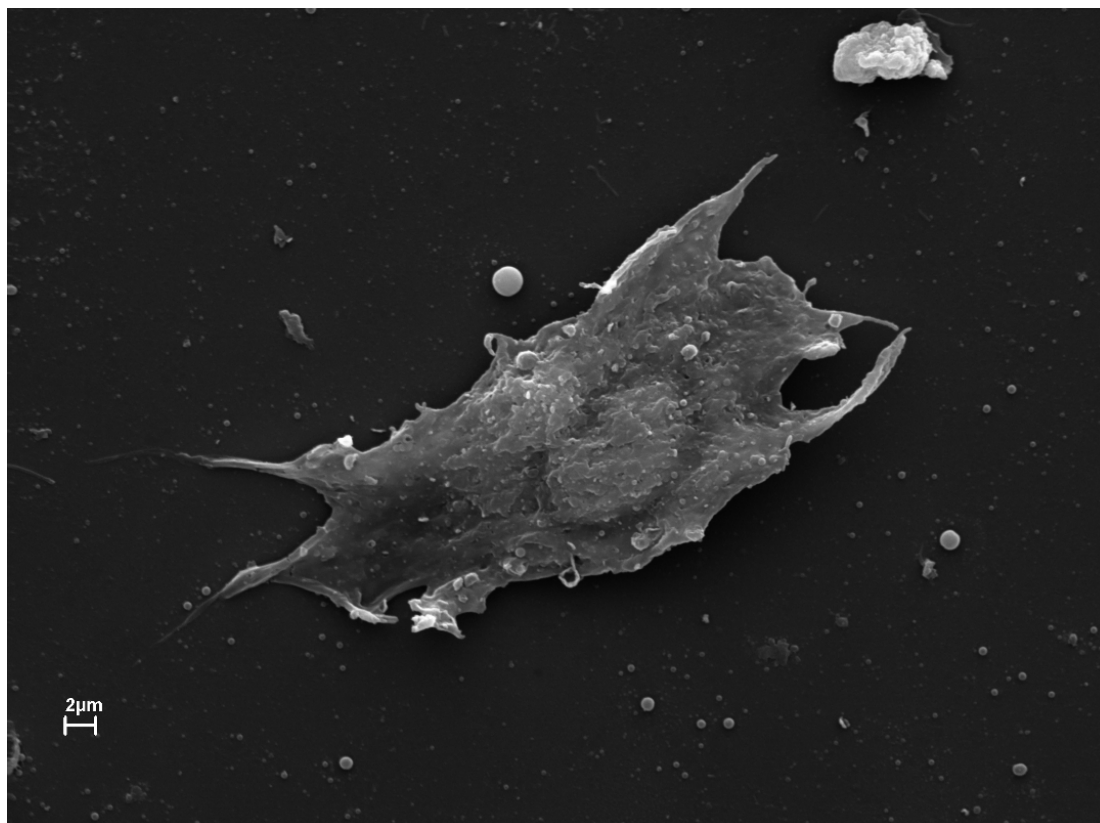


Figura 66. Caracterización morfológica por SEM. Imagen de una célula DOK aislada.

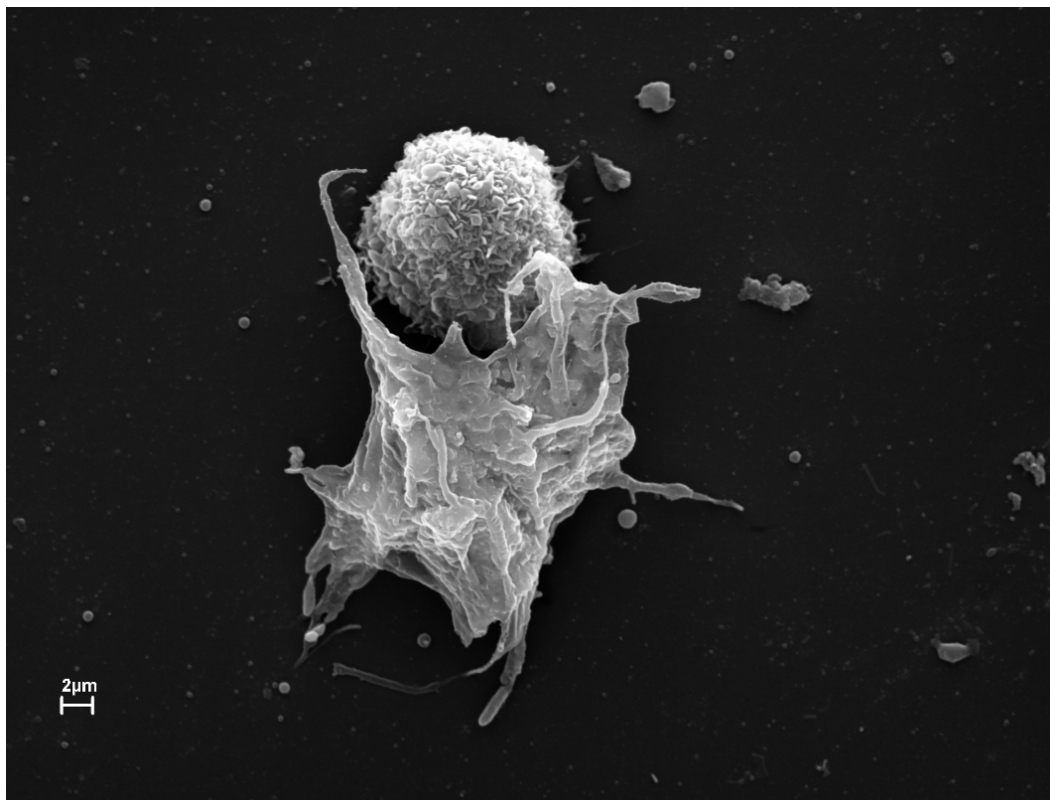


Figura 67. Caracterización morfológica por SEM. Imagen de dos células DOK aisladas en con distinta morfología.

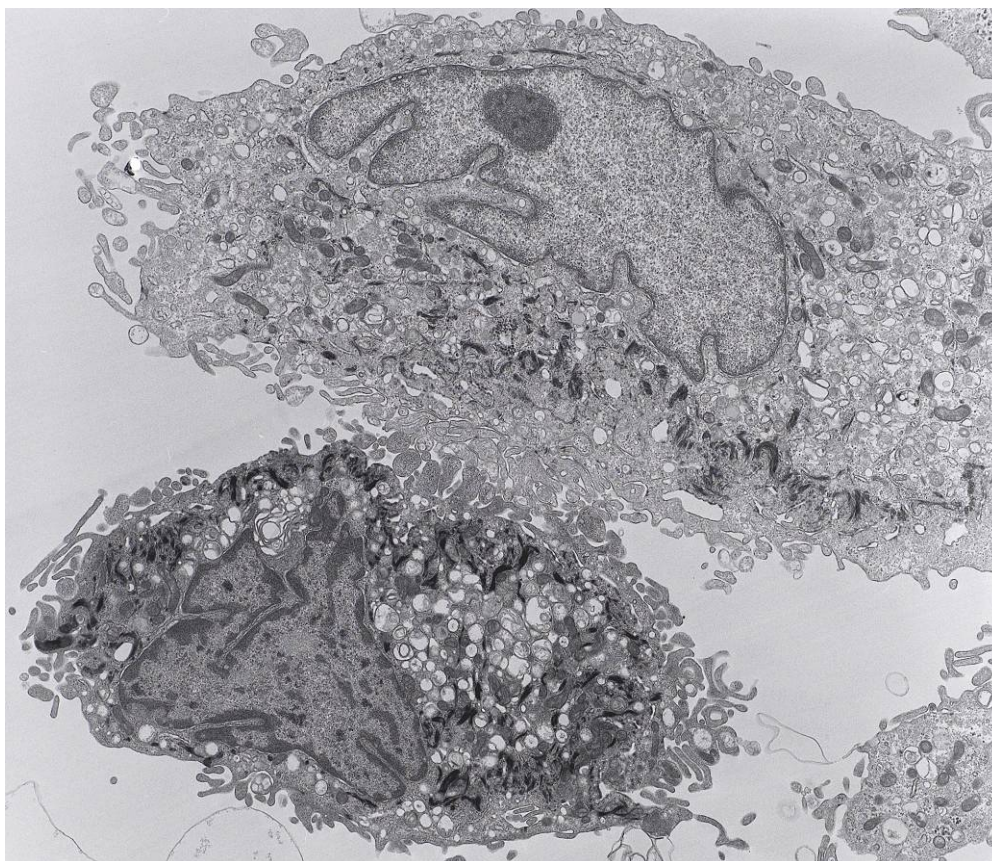


Figura 68. Caracterización morfológica por TEM de la línea DOK (4000X)

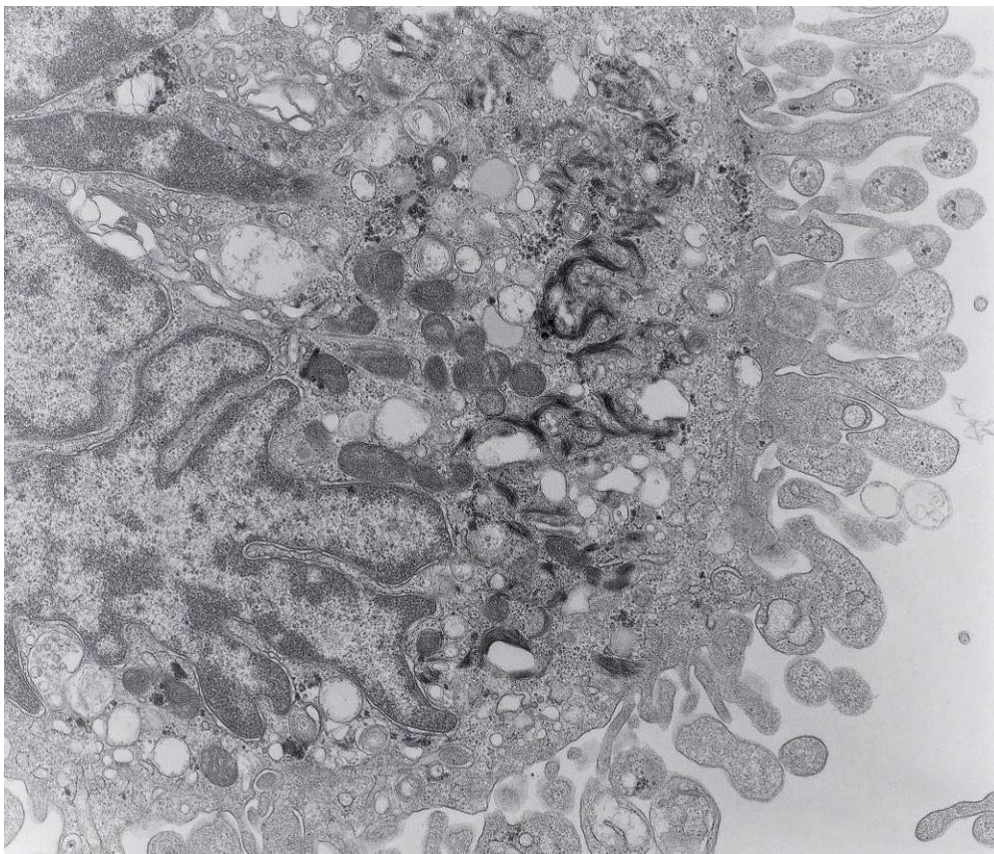


Figura 69. Caracterización morfológica por TEM de la línea DOK (8000X)

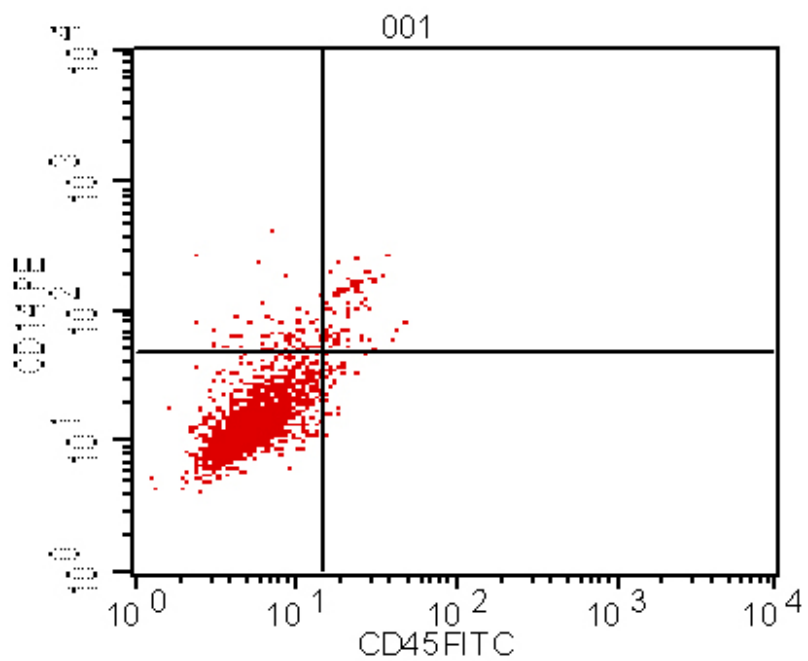


Figura 70. Citometría de flujo. Control negativo (CD14 / CD45) en la línea DOK.

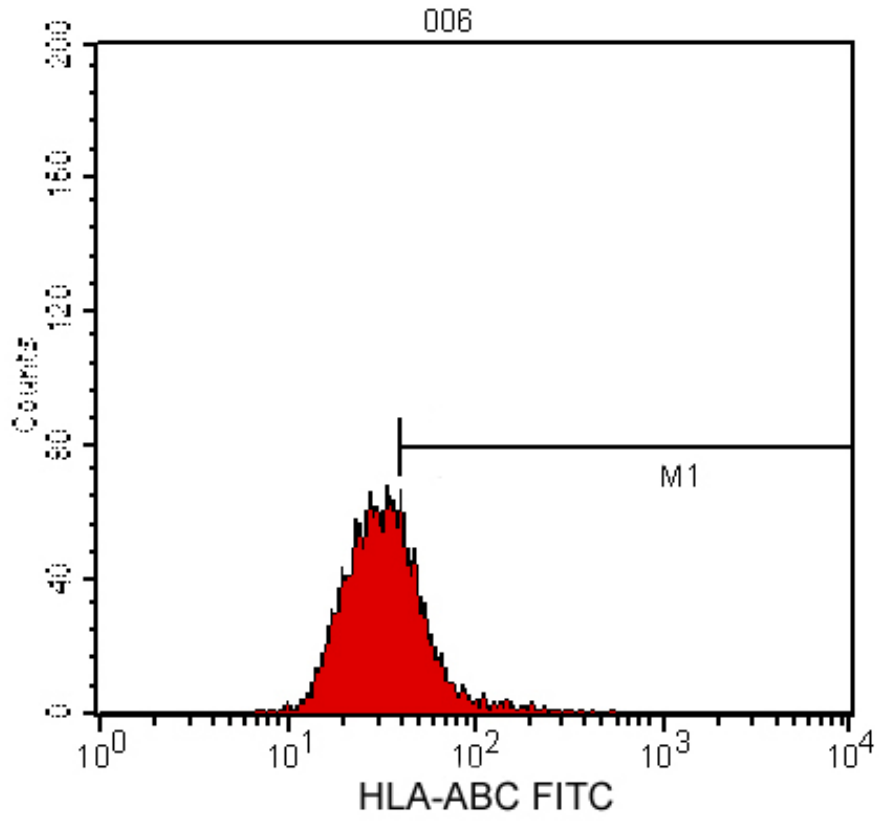


Figura 71. Citometría de flujo. Control positivo (HLA-ABC) en la línea DOK.

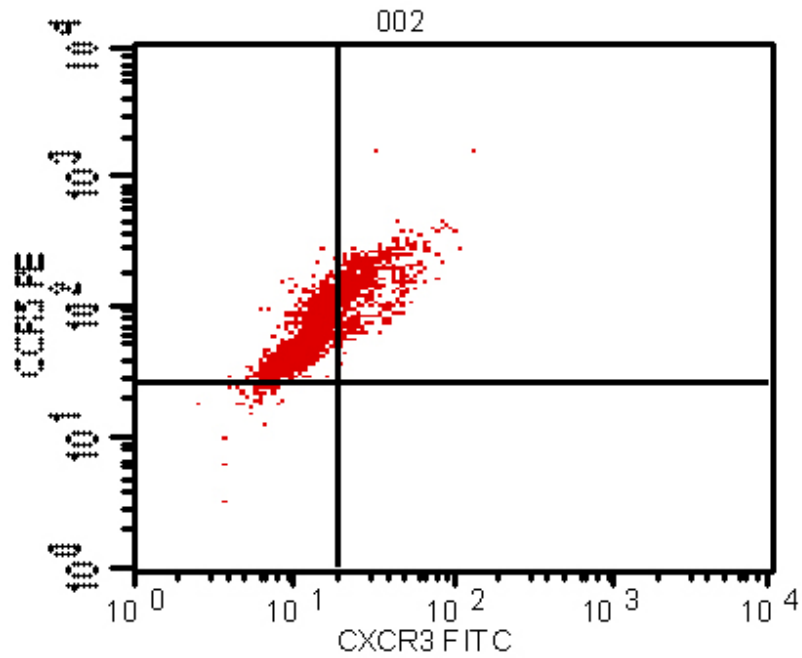


Figura 72. Citometría de flujo. Positividad para CCR5 y CXCR3 en la línea DOK.

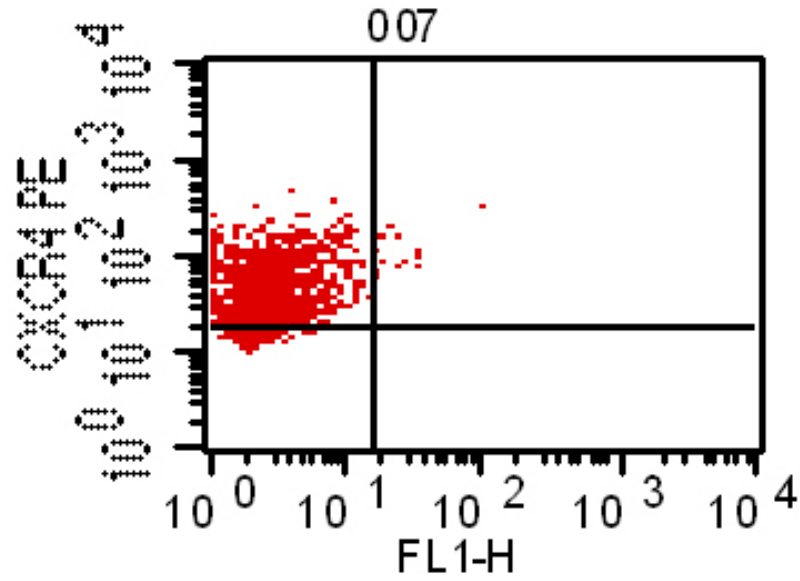


Figura 73. Citometría de flujo. Positividad para CXCR4 en la línea DOK.

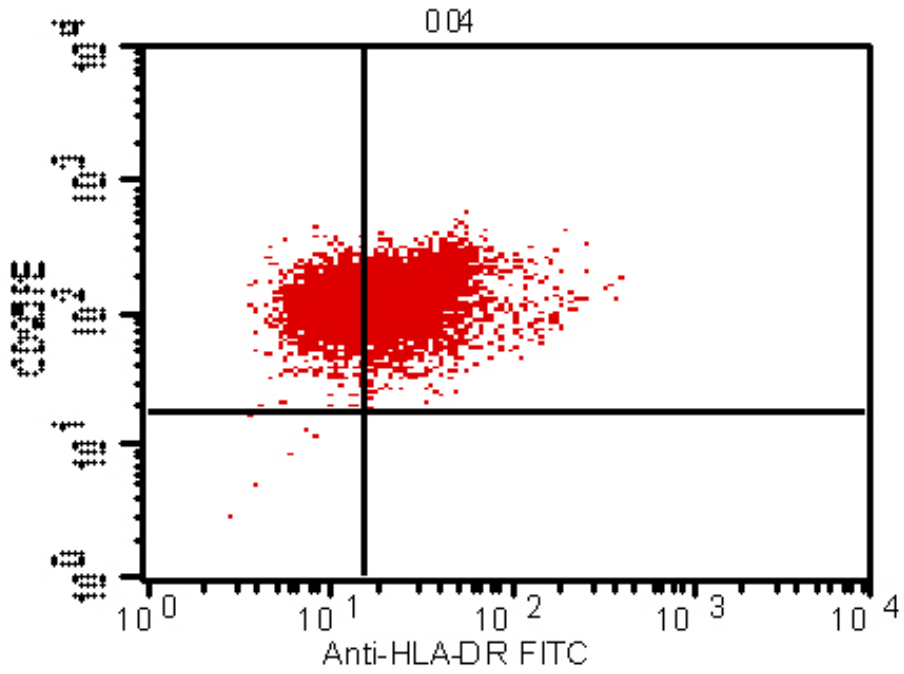


Figura 74. Citometría de flujo. Positividad para CD95 y HLA-DR en la línea DOK.

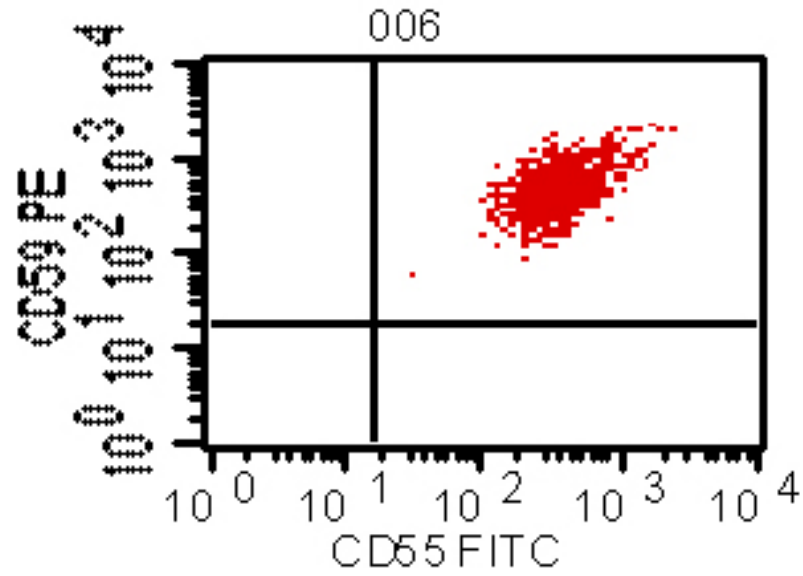


Figura 75. Citometría de flujo. Positividad para CD55 y CD59 en la línea DOK.

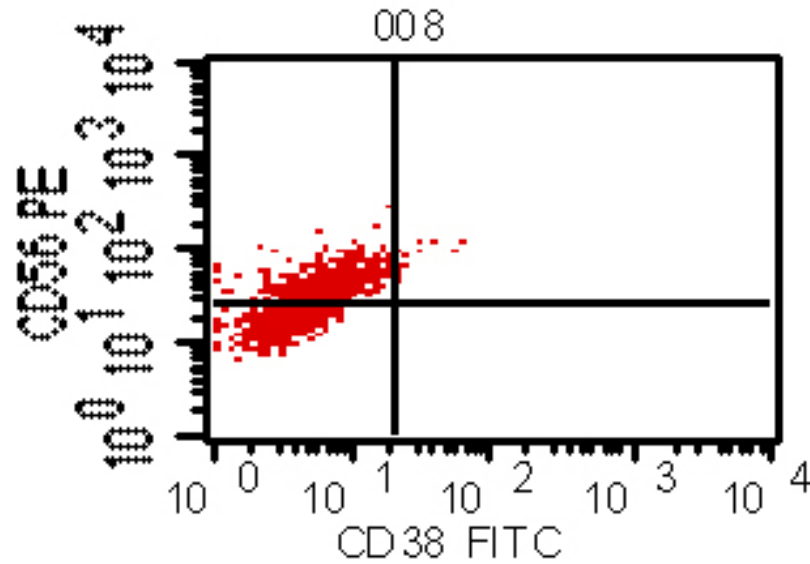


Figura 76. Citometría de flujo. Positividad para CD56 y negatividad para CD38 en la línea DOK.

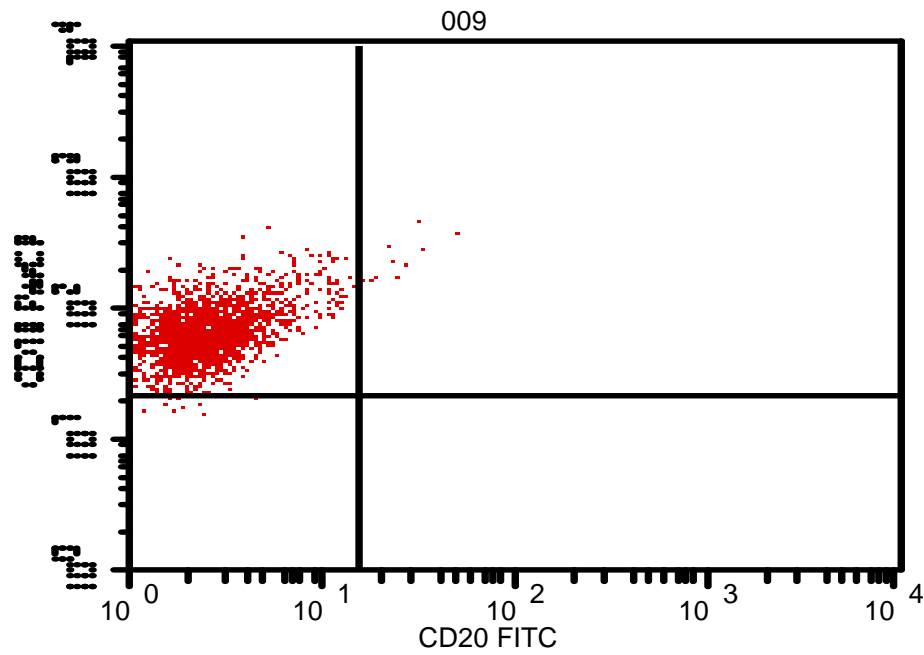


Figura 77. Citometría de flujo. Positividad para CD10 y negatividad para CD20 en la línea DOK.

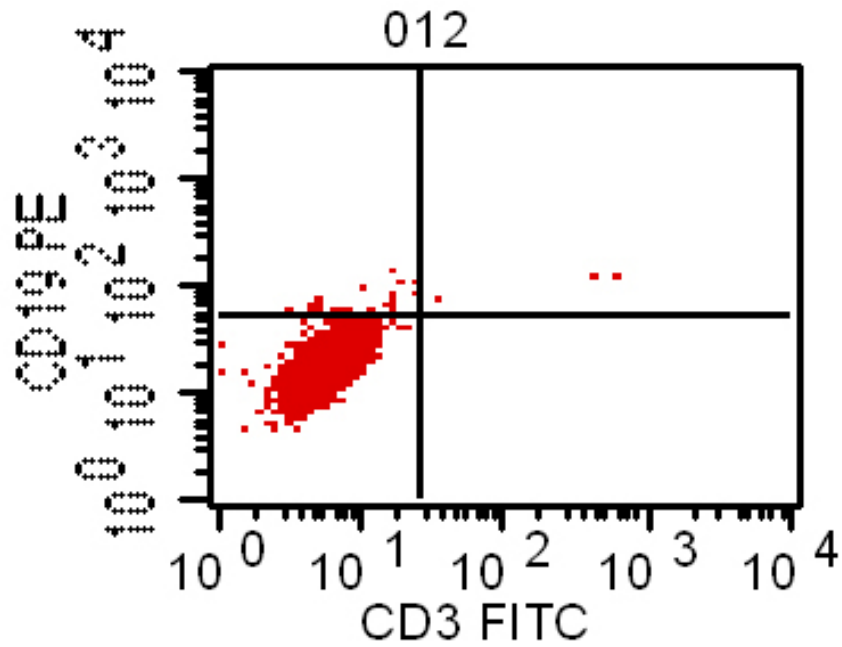


Figura 78. Citometría de flujo. Negatividad para CD3 y CD19 en la línea DOK.

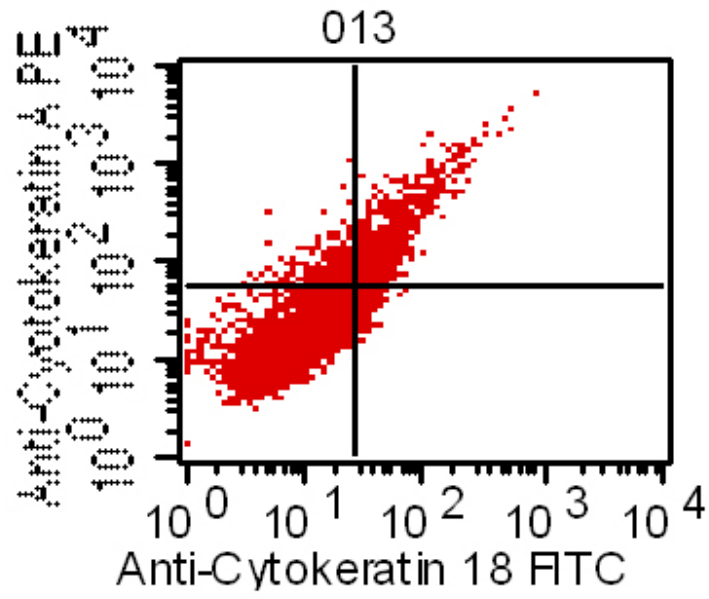


Figura 79. Citometría de flujo. Positividad moderada para CK-A y CDK18 en la línea DOK.

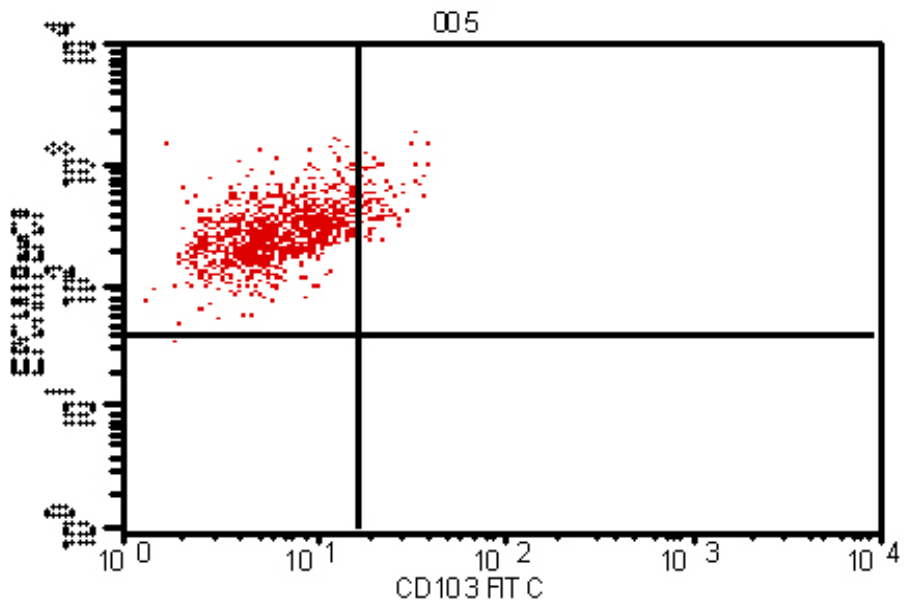


Figura 80. Citometría de flujo. Marcada positividad para EPCAM en la línea DOK.

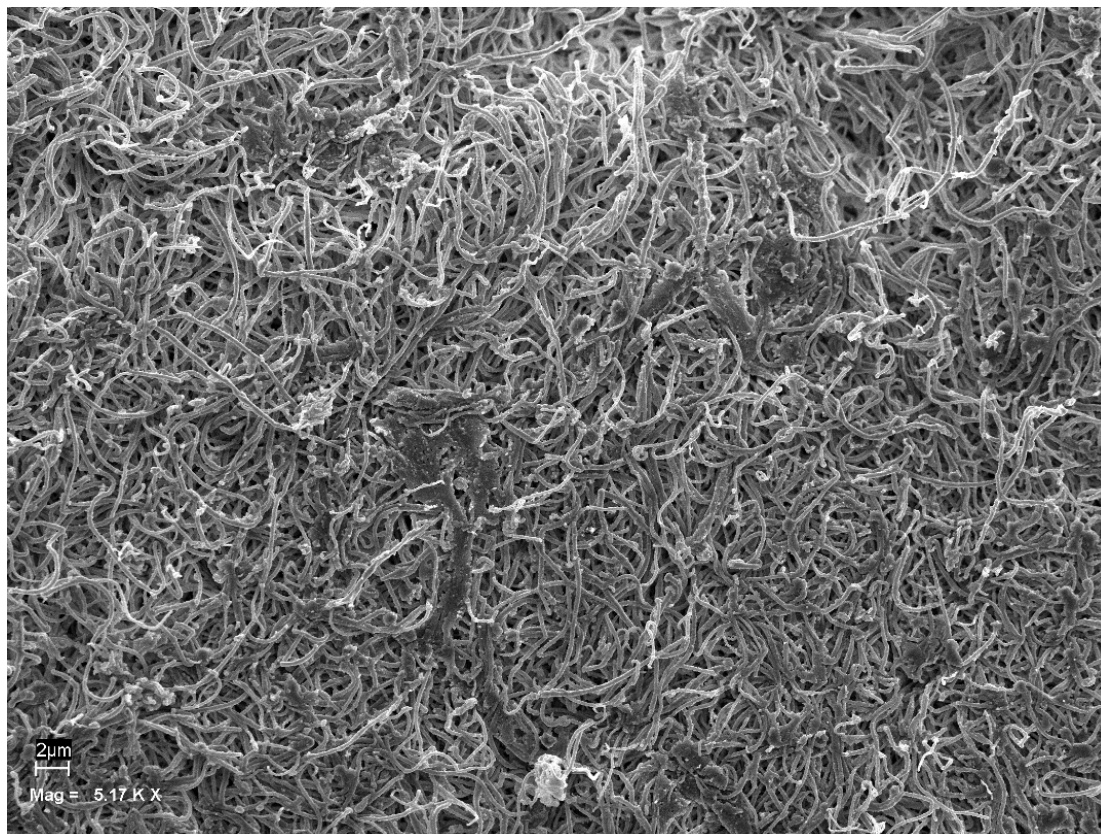


Figura 81. Imagen por SEM del coágulo de PRP tras cocultivo con células DOK a 0 horas.

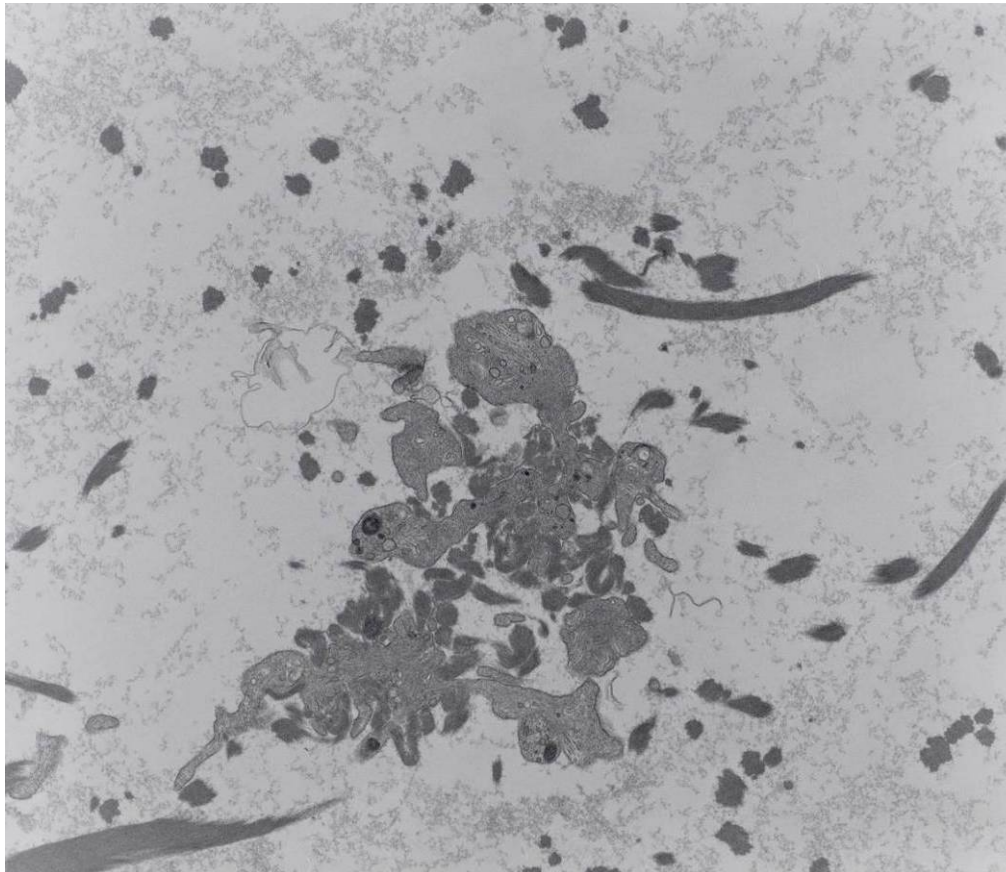


Figura 82. Imagen por TEM del coágulo de PRP tras cocultivo con DOK a 0 horas (4000X)

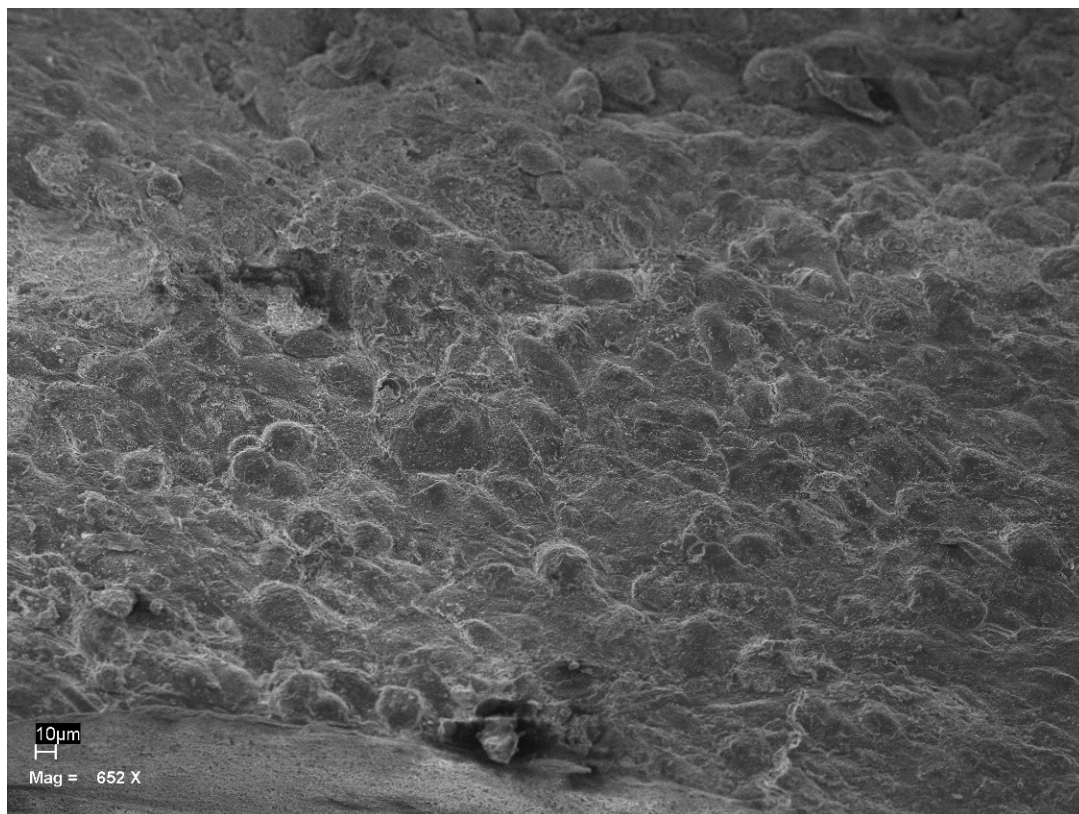


Figura 83. Imagen por SEM del coágulo de PRP tras cocultivo con células DOK a 24 horas.

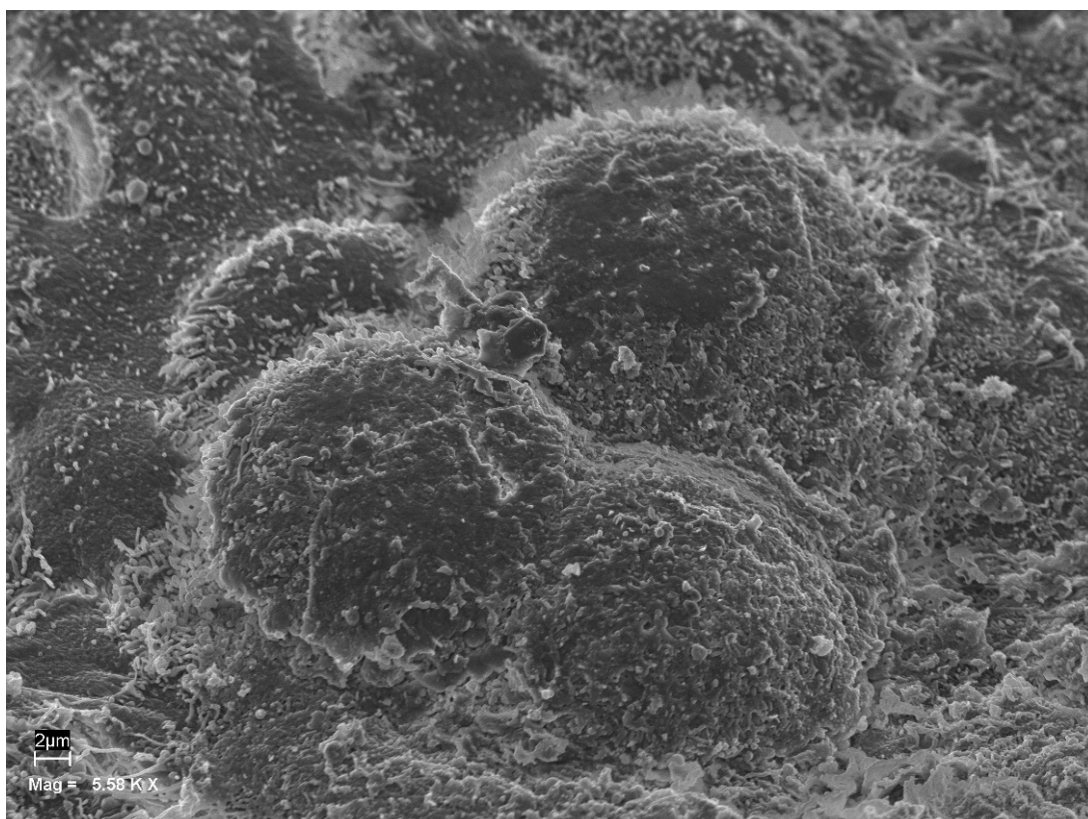


Figura 84. Imagen por SEM del coágulo de PRP tras cocultivo con células DOK a 24 horas.

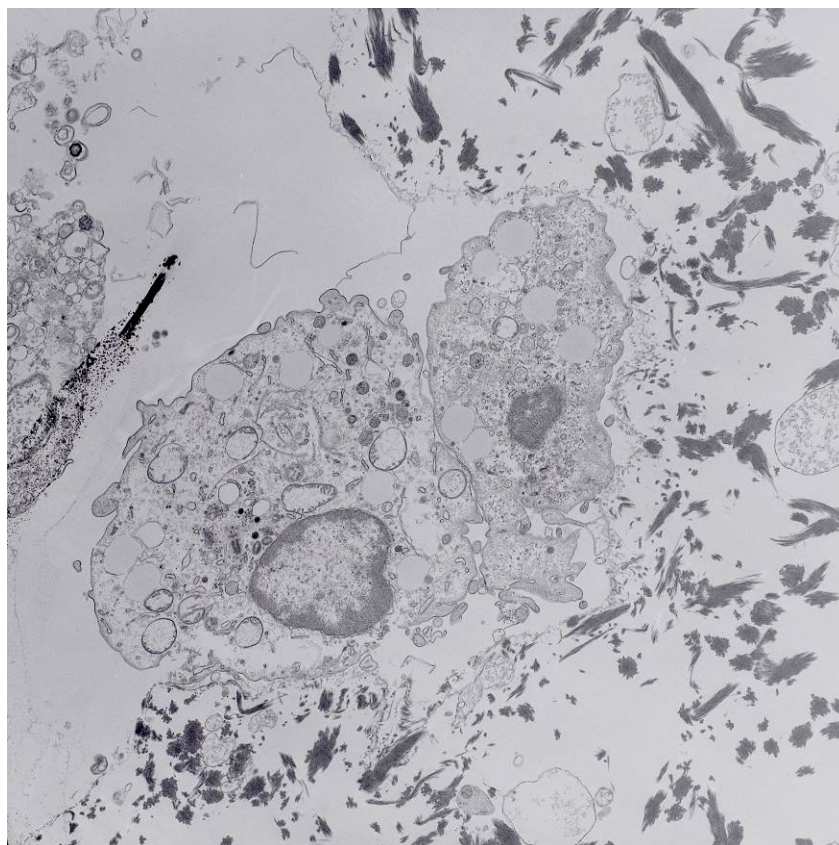


Figura 85. Imagen por TEM del coágulo de PRP tras cocultivo con DOK a 24 horas (3150X)

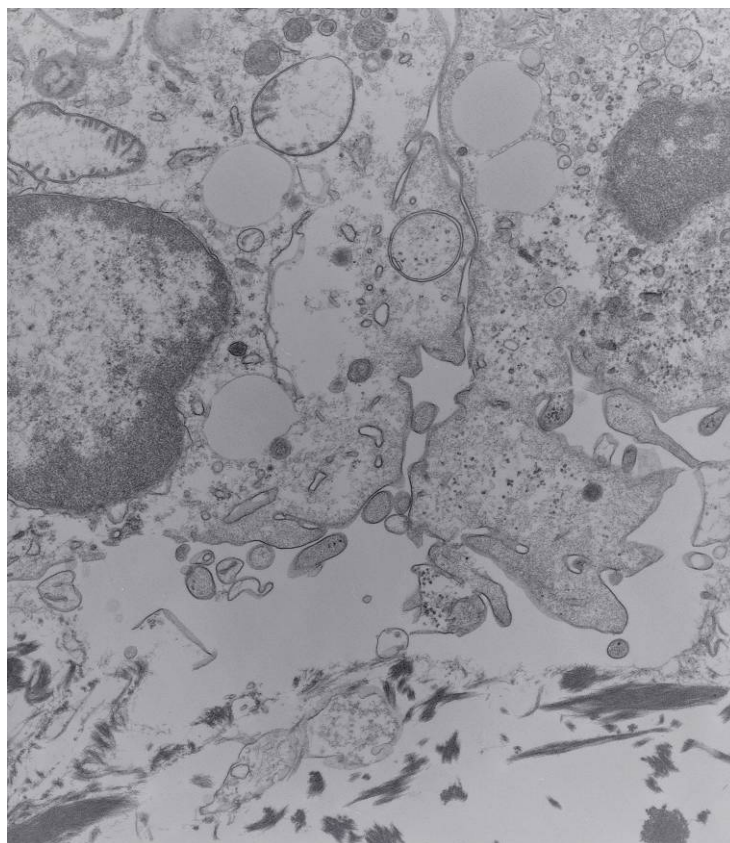


Figura 86. Imagen por TEM del coágulo de PRP tras cocultivo con DOK a 24 horas (10000X)

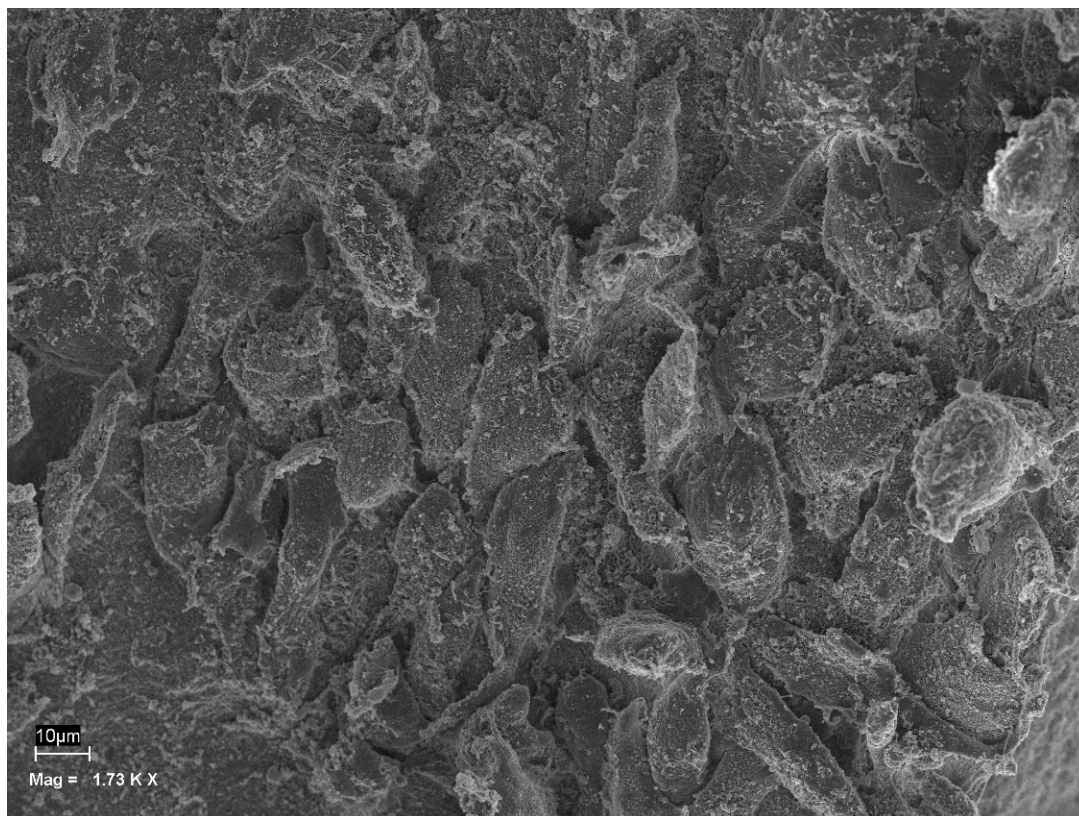


Figura 87. Imagen por SEM del coágulo de PRP tras cocultivo con células DOK a 72 horas.

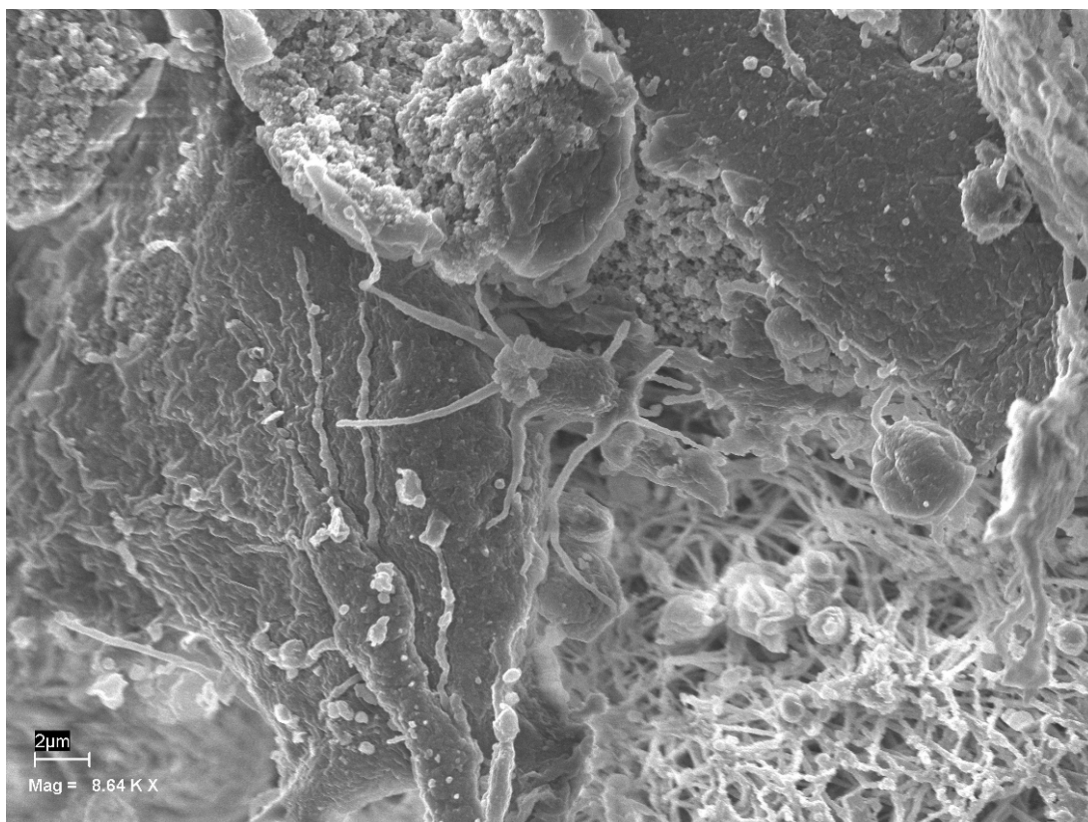


Figura 88. Imagen por SEM del coágulo de PRP tras cocultivo con células DOK a 72 horas.

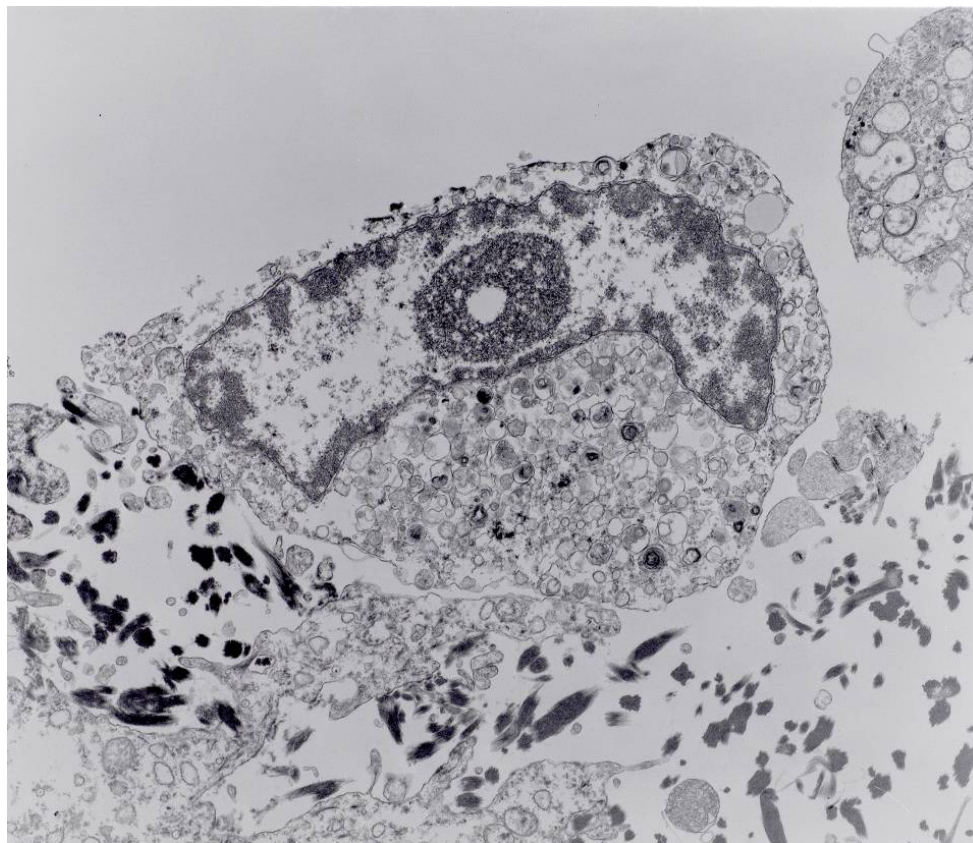


Figura 89. Imagen por TEM del coágulo de PRP tras cocultivo con DOK a 72 horas (5000X)

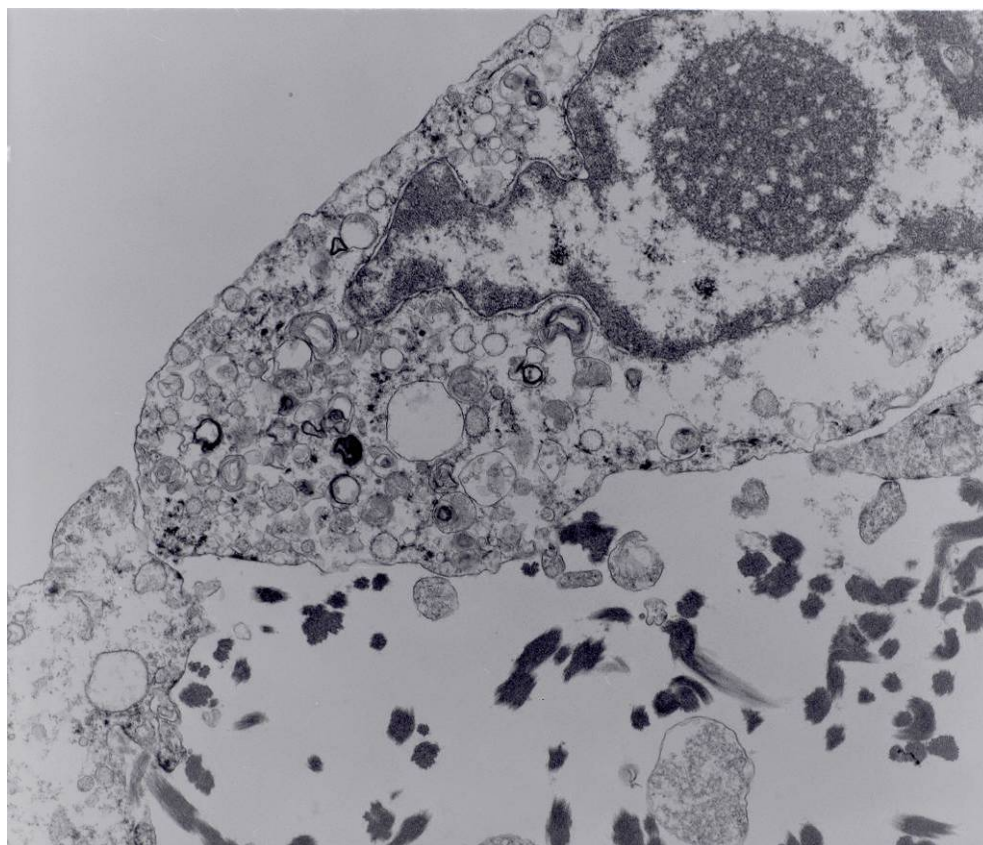


Figura 90. Imagen por TEM del coágulo de PRP tras cocultivo con DOK a 72 horas (8000X)

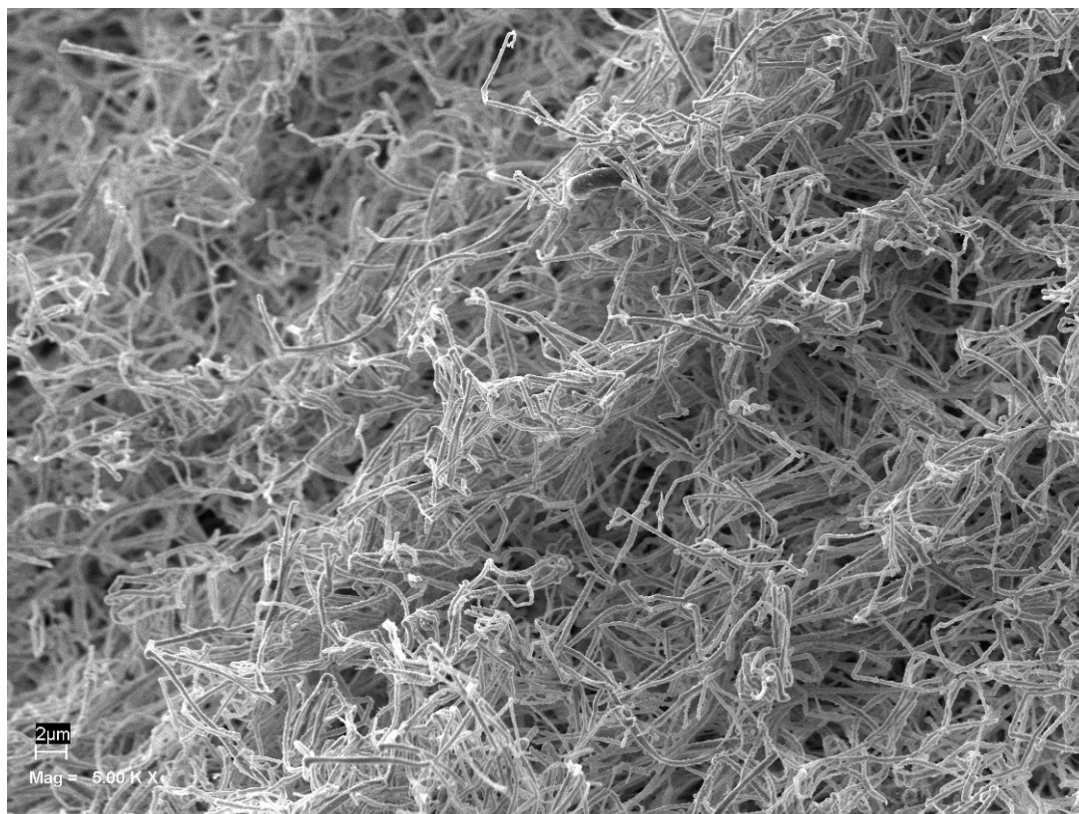


Figura 91. Imagen por SEM del coágulo de PPP tras cocultivo con células DOK a 0 horas.

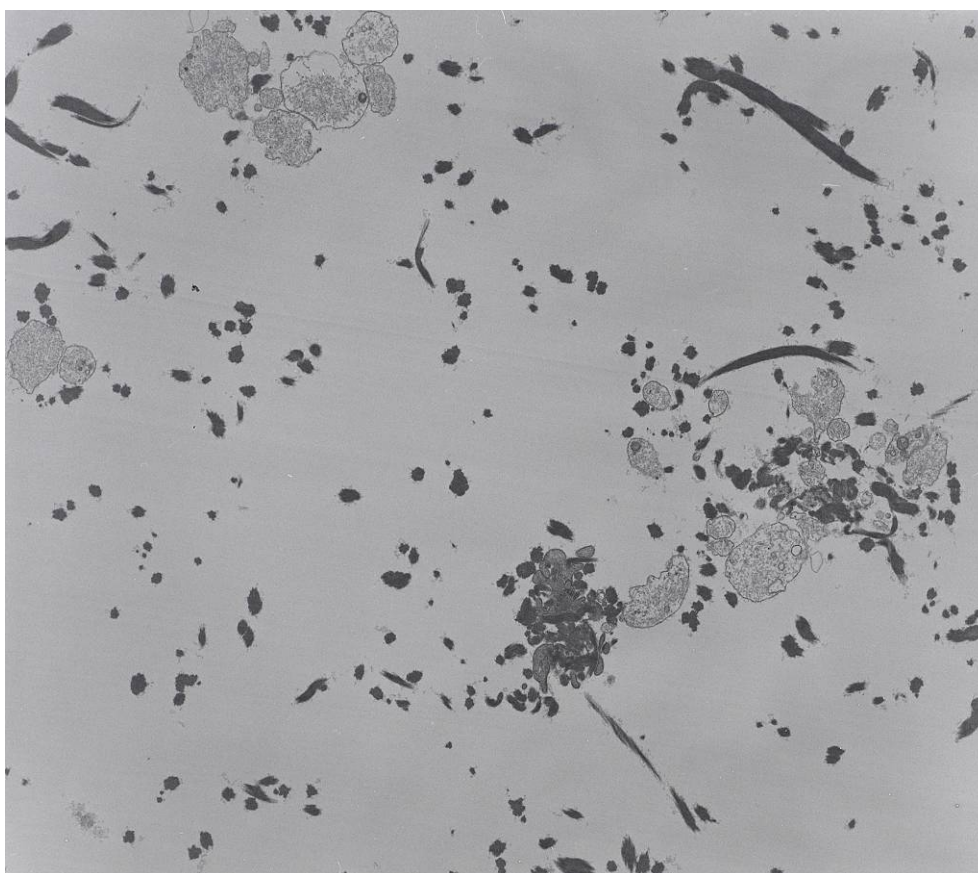


Figura 92. Imagen por TEM del coágulo de PPP tras cocultivo con DOK a 0 horas (4000X)

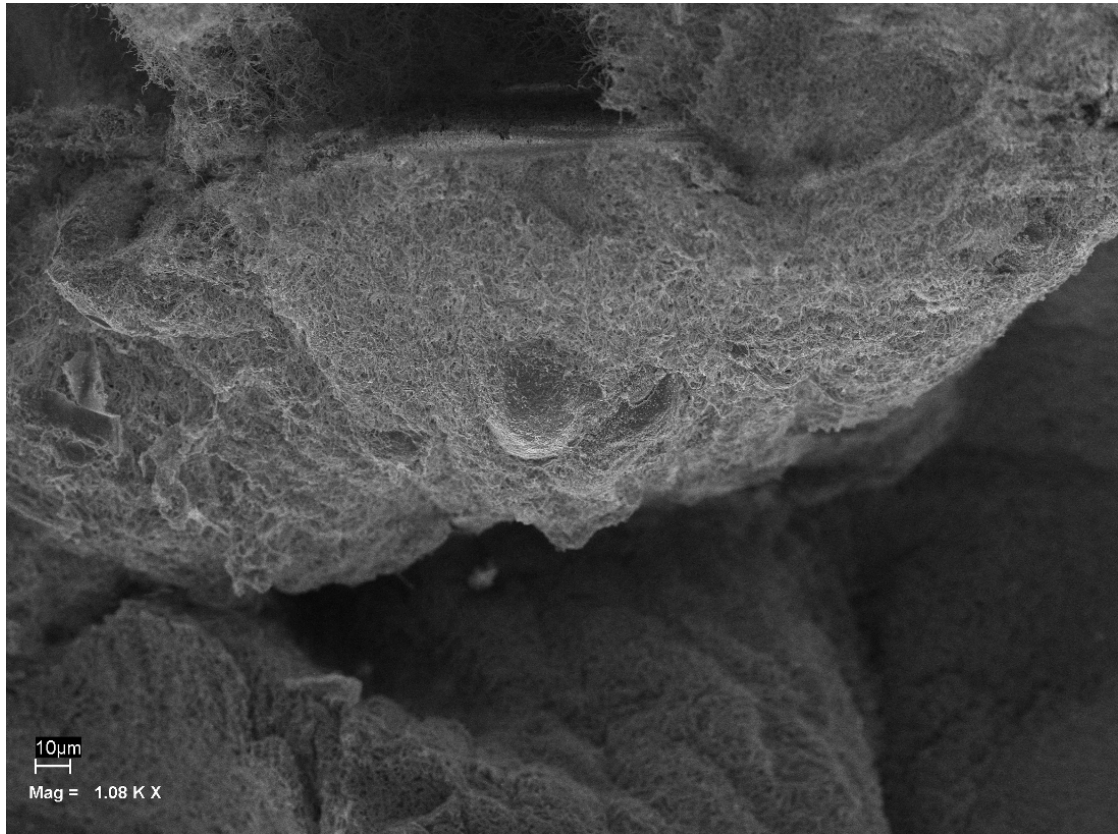


Figura 93. Imagen por SEM del coágulo de PPP tras cocultivo con células DOK a 24 horas.

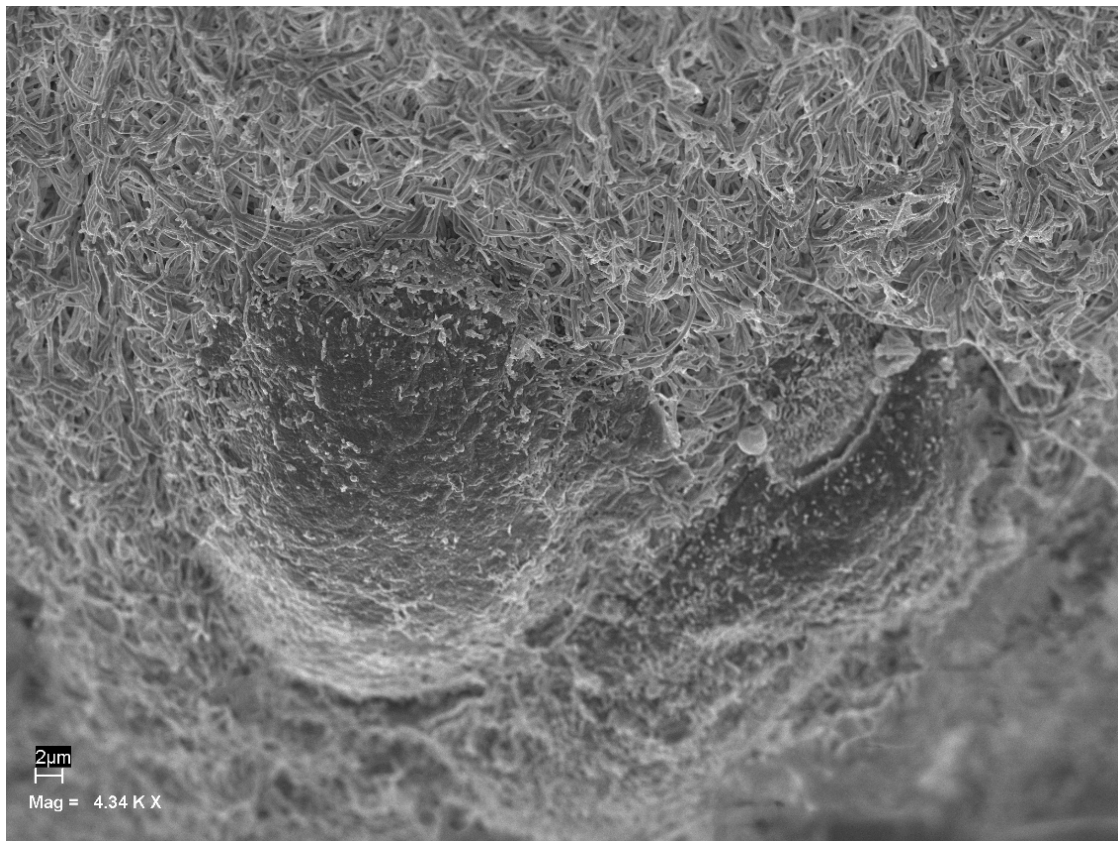


Figura 94. Imagen por SEM del coágulo de PPP tras cocultivo con células DOK a 24 horas.

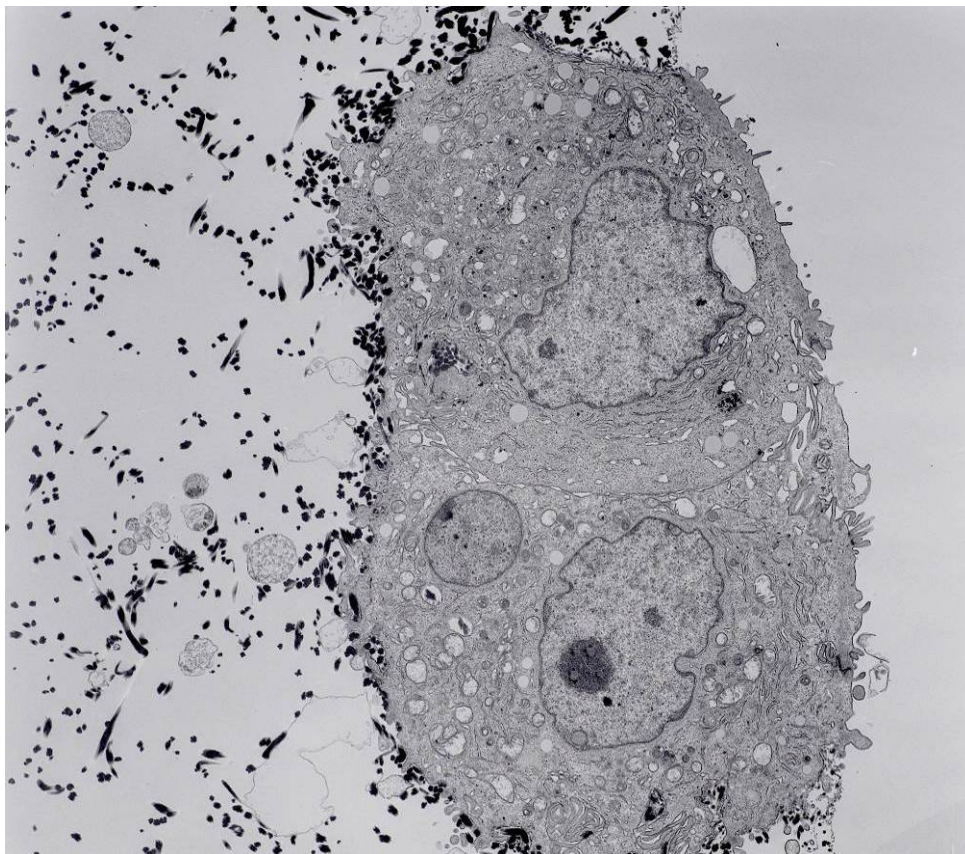


Figura 95. Imagen por TEM del coágulo de PPP tras cocultivo con DOK a 24 horas (4000X)

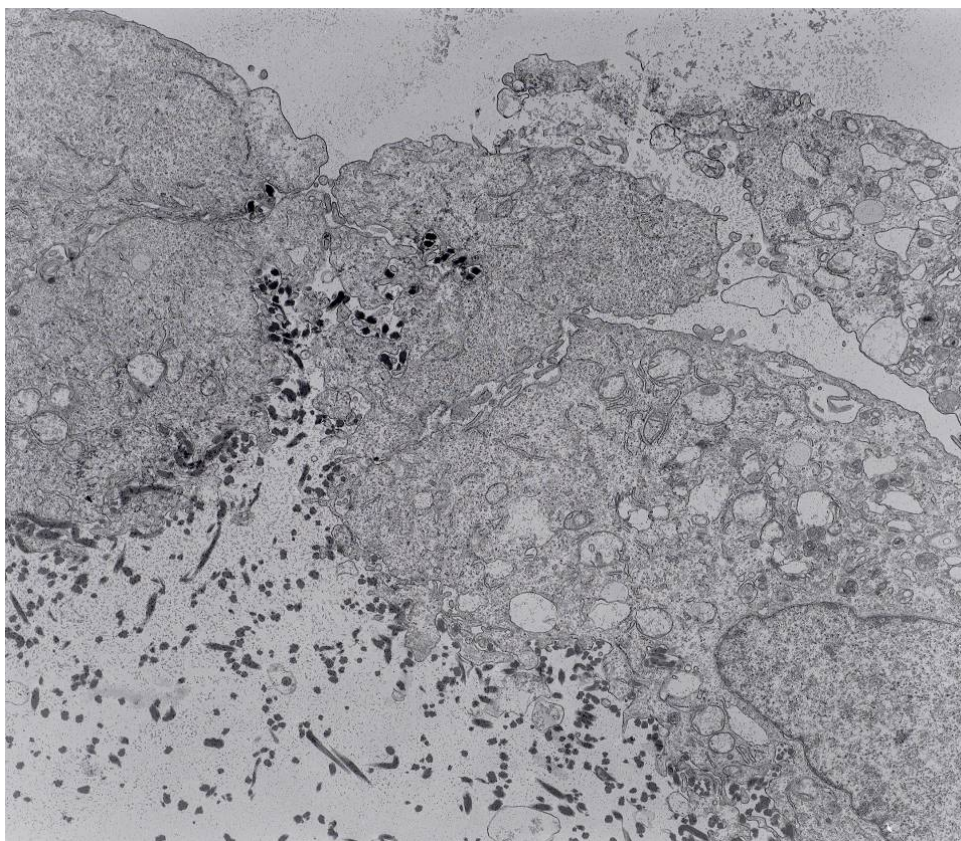


Figura 96. Imagen por TEM del coágulo de PPP tras cocultivo con DOK a 24 horas (3150X)

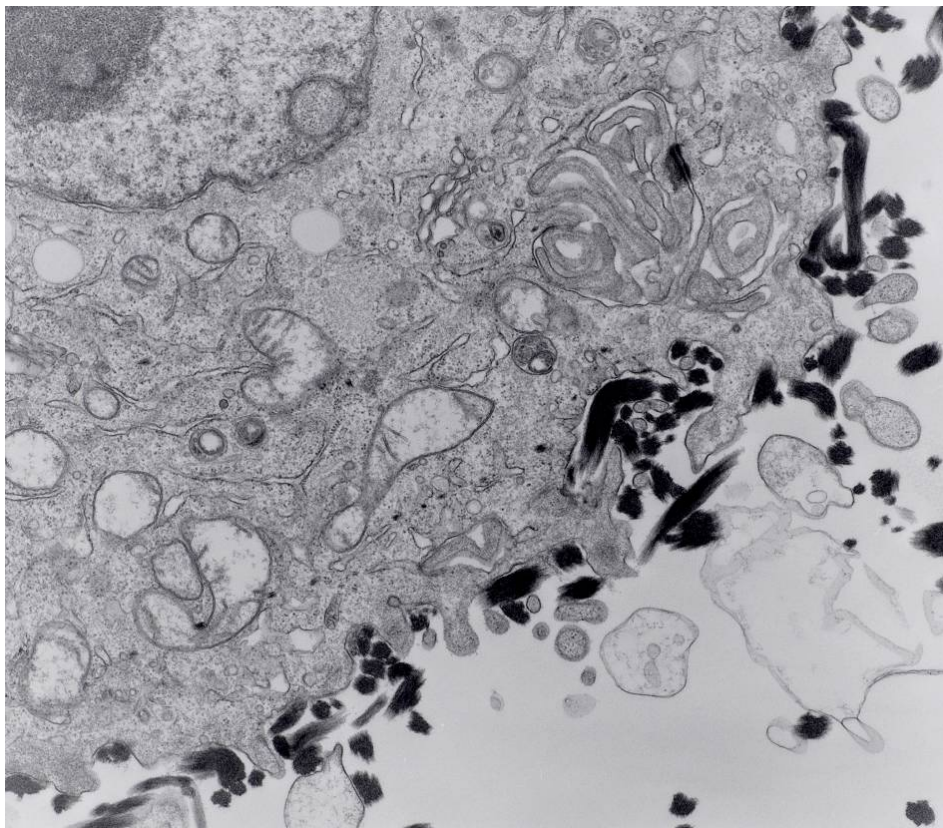


Figura 97. Imagen por TEM del coágulo de PPP tras cocultivo con DOK a 24 horas (10000X)

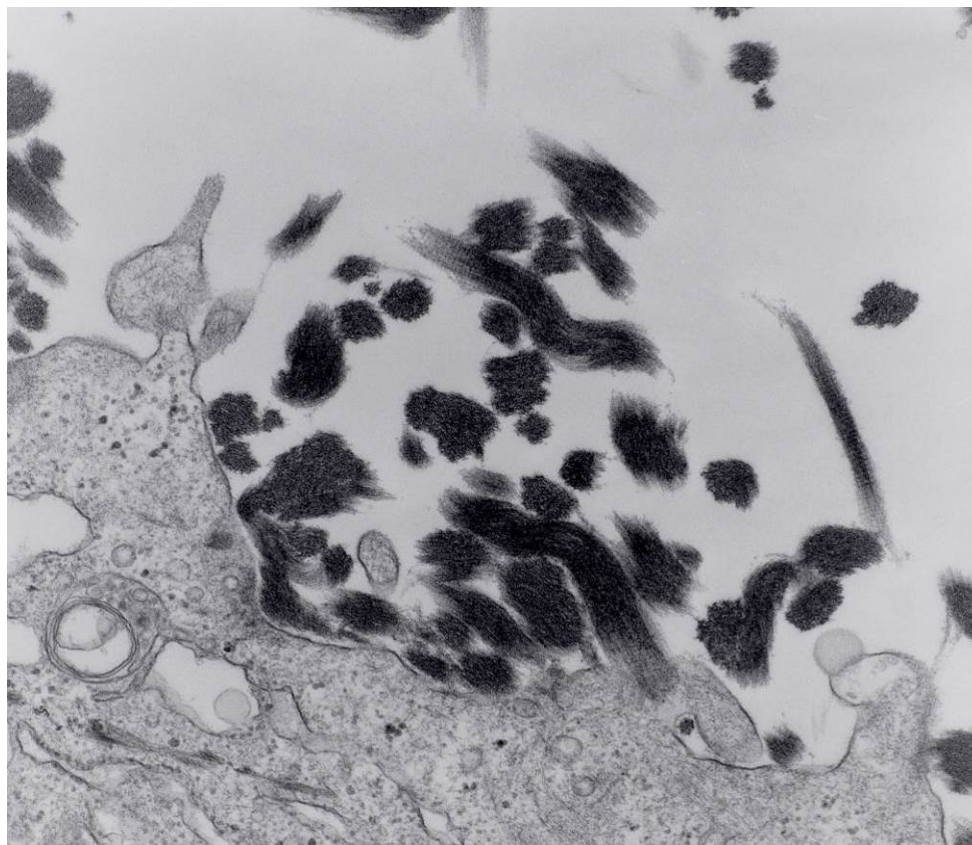


Figura 98. Imagen por TEM del coágulo de PPP tras cocultivo con DOK a 24 horas (25000X)

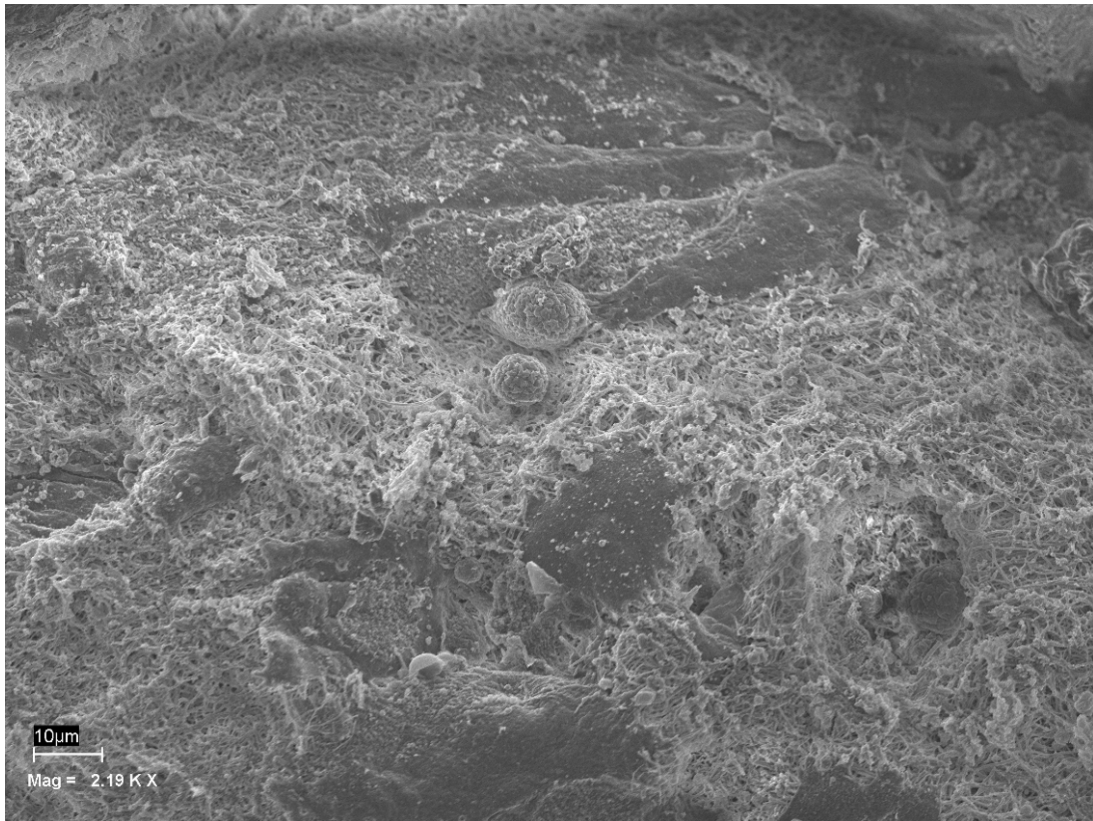


Figura 99. Imagen por SEM del coágulo de PPP tras cocultivo con células DOK a 72 horas.

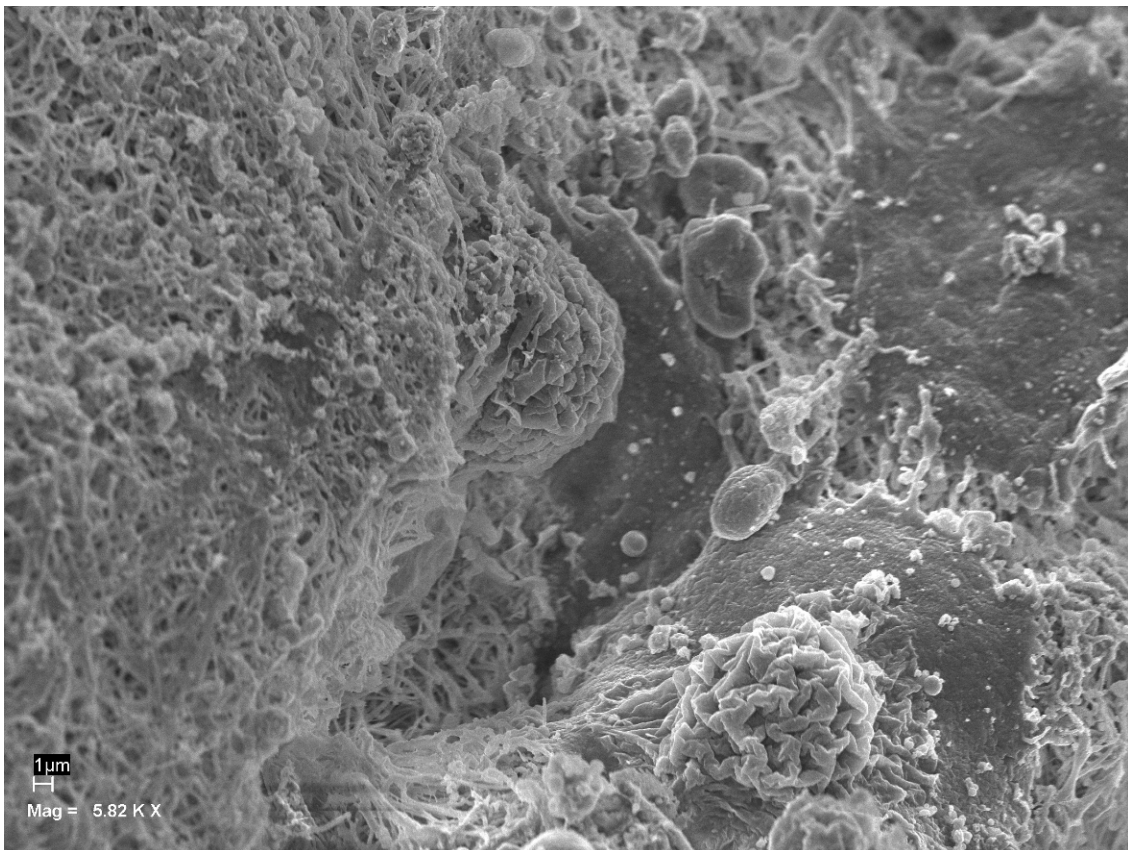


Figura 100. Imagen por SEM del coágulo de PPP tras cocultivo con células DOK a 72 horas.

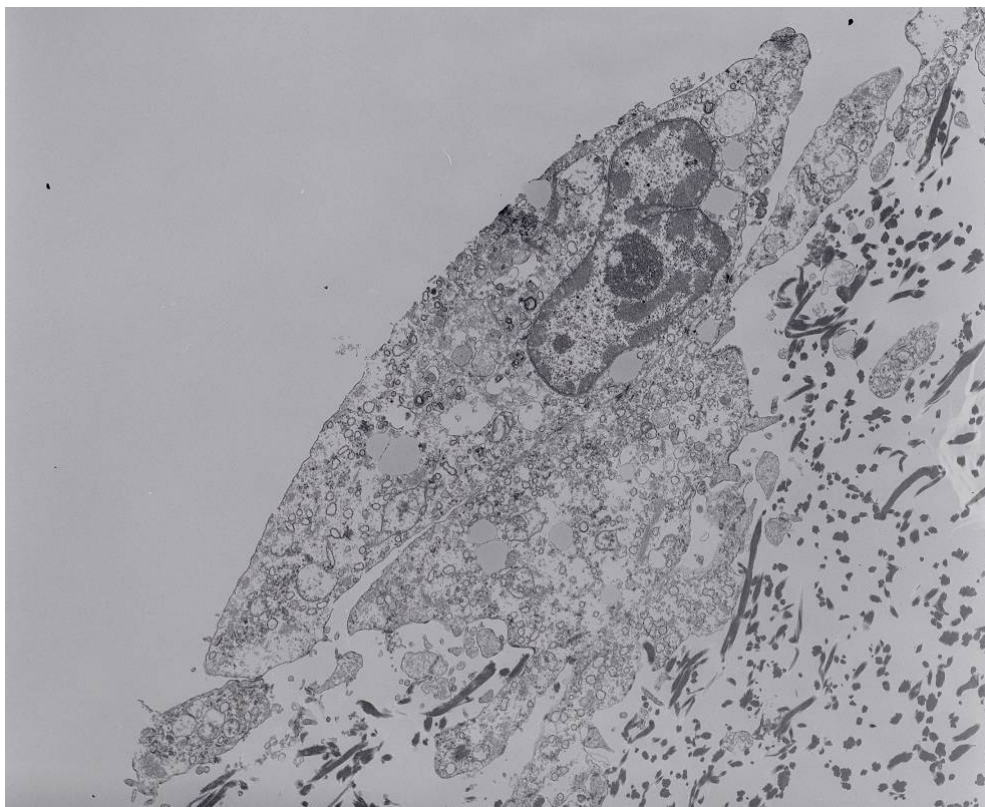


Figura 101. Imagen por TEM del coágulo de PPP tras cocultivo con DOK a 72 horas (2500X)

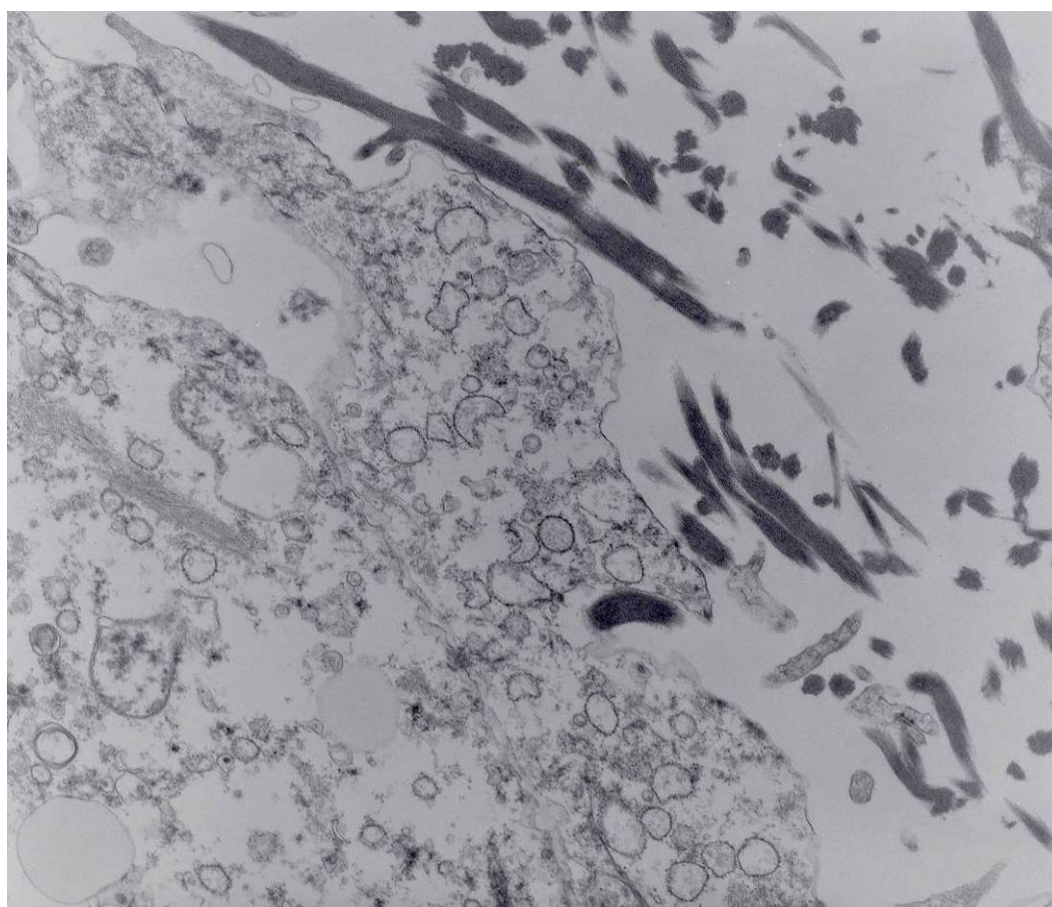


Figura 102. Imagen por TEM del coágulo de PPP tras cocultivo con DOK a 72 horas (10000X)

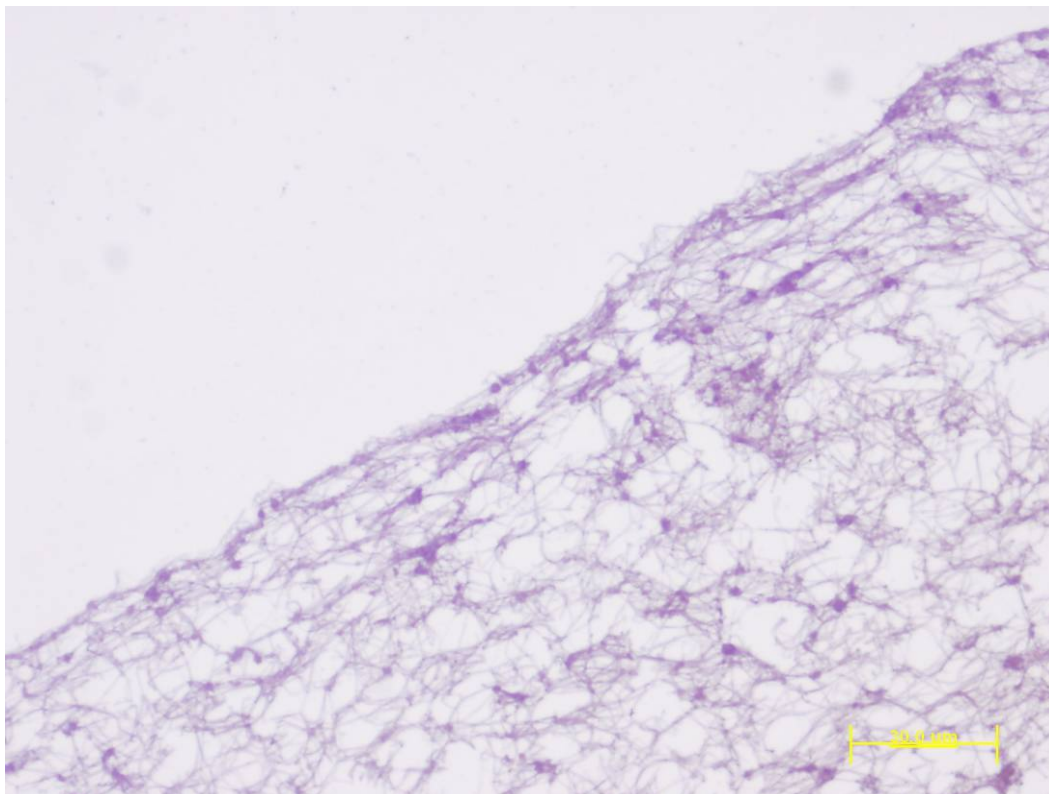


Figura 103. Muestra de DOK+PRP a 0h. Ausencia de células DOK, aunque se observan plaquetas (40X)

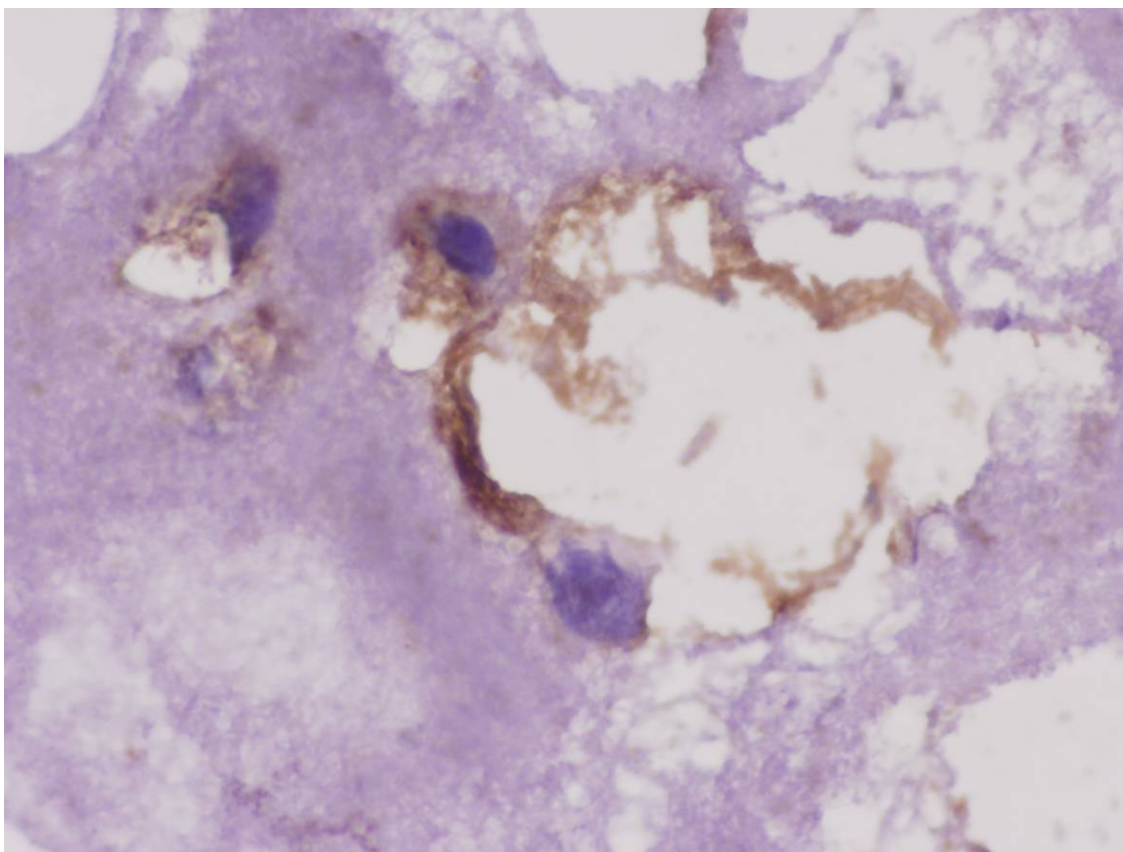


Figura 104. Muestra de DOK+PRP a 24h. CK AE1/AE3 positiva (60X)

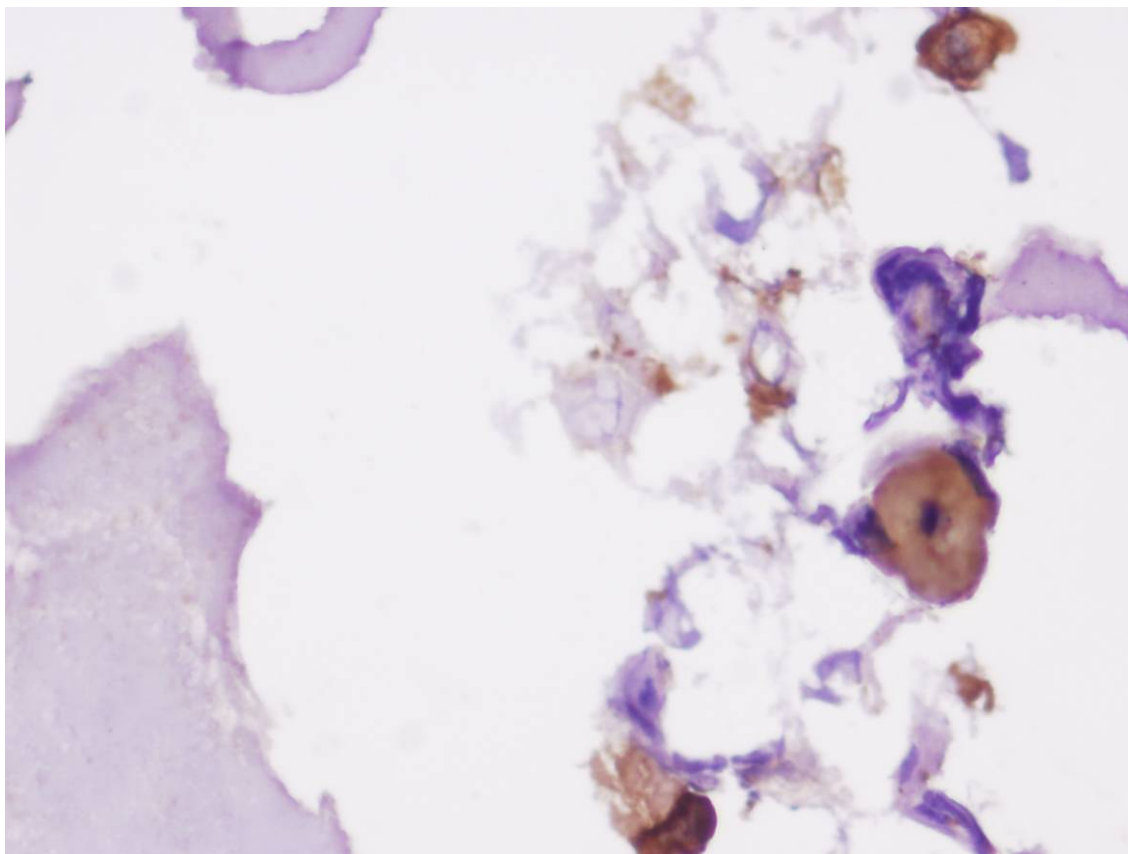


Figura 105. Muestra de DOK+PPP a 24h. CK AE1/AE3 positiva (60X)

G.2. Tablas

Gránulos α	Gránulos δ	Lisosomas
<p><u>PROTEOGLICANOS:</u></p> <p>Específicos: Tromboglobulina β y PF4</p> <p>Ag para la TGβ: CTAP-III, NAP-2, PBP</p> <p>No específicos: Serglicina ,HRGP</p>	<p><u>NUCLEÓTIDOS:</u></p> <p>Adenosinas: ATP y ADP</p> <p>Guaninas: GTP y GDP</p>	<p><u>PROTEASAS ÁCIDAS:</u></p> <p>Catepsina D y E</p> <p>Hidrolasas / Colagenasa</p> <p>Carboxipeptidasas A y B</p> <p>Prolinacarboxipeptidasa</p> <p>Fosfatasa ácida / Arilsulfatasa</p>
<p><u>PROTEÍNAS ASOCIADAS A MEMBRANA:</u></p> <p>P-selectina</p> <p>GMP33</p> <p>GPIV</p> <p>GPIIb/IIIa</p> <p>Osteonectina</p>	<p><u>AMINAS:</u></p> <p>Serotonina (5-HT)</p> <p>Histamina</p>	<p><u>GLUCOHIDROLASAS:</u></p> <p>Heparinasa</p> <p>β-N-acetil-glucosaminidasa</p> <p>β-Glucuronidasa / β- Galactosidasa</p> <p>β-Glicerofosfatasa</p> <p>α-D-Glucosidasa / β-D-Glucosidasa</p> <p>α-L-Fucosidasa / β-D-Fucosidasa</p> <p>α-L-Arabinosidasa / α-D-Manosidasa</p>
<p><u>FACTORES DE LA HEMOSTASIA:</u></p> <p>- Fibrinógeno (Factor I) y Factores V, VII, XI, XIII</p> <p>- Proteína S, Kininógenos, Plasminógeno</p>	<p><u>CACIONES BIVALENTES:</u></p> <p>Calcio</p> <p>Magnesio</p> <p>Pirofosfato</p>	<p><u>OTRAS ENZIMAS:</u></p> <p>Elastasa</p> <p>GMP33</p> <p>LAMP-1 / LAMP-2</p>
<p><u>FACTORES MITOGÉNICOS:</u></p> <p>PDGF, TGF-β-1, VEGF, IGF-1, bFGF, EGF, ECGF, HGF</p>		
<p><u>OTROS FACTORES MITOGÉNICOS:</u></p> <p>Esfingosin 1-fosfato, IL 1-β, IL 8</p>		
<p><u>INHIBIDORES DE LA FIBRINOLISIS:</u></p> <p>Inhibidor de la α2-plasmina</p> <p>Inhibidor-I del activador del plasminógeno</p> <p>Antitripsina α2</p>		
<p><u>GLUCOPROTEÍNAS ADHESIVAS:</u></p> <p>Fibrinógeno</p> <p>Fibronectina / Vitronectina</p> <p>Factor de von Willebrand</p> <p>Trombospondina</p> <p>Laminina 8</p>		
<p><u>OTRAS PROTEÍNAS:</u></p> <p>Multimerina (GPIa)</p> <p>Albúmina</p> <p>Inmunoglobulinas: IgG, IgA e IgM</p> <p>Inhibidor C1 del complemento</p>		

Tabla 1. Contenido molecular más remarcable de los gránulos plaquetarios

(Gemmell & Park 2000; Rendu & Brohard-Bohn 2001; King & Reed 2002; Reed 2002; Anitua et al. 2004)

FACTOR	NOMBRE	SINÓNIMOS
I	Fibrinógeno	-
II	Protrombina	-
III	Tromboplastina	Tromboquinasa
IV	Calcio	-
V	Proacelerina	Globulina acelerada (Ac-G)
VI	No asignado	Antiguo nombre para el Factor Va
VII	Proconvertina	Factor estable o SPCA
VIII	Globulina antihemofílica (PTC)	Factor antihemofílico A
IX	Componente de la tromboplastina (PTC)	Factor antihemofílico B
X	Factor Stuart-Prover	Autoprotrombina C
XI	Antecedente de la tromboplastina (PTA)	Factor antihemofílico C
XII	Factor Hageman	Factor contacto o Glass Factor
XIII	Fibrinasa	Factor estabilizador de la fibrina o Factor Laki-Lorand

Tabla 2. Factores de la coagulación.

DONANTES	VEGF	TGF- β 1	bFGF	PDGF-A	IGF-1	EGF
	PRP	PRP	PRP	PRP	PRP	PRP
P.G.	+	+	+	+	+	+
J.F.	+	+	+	+	+	+
O.C.	+	+	+	+	+	+
S.R.	+	+	+	+	+	+
J.L.	+	+	+	+	+	+
G.A.	+	+	+	+	+	+
V.R.	+	+	+	+	+	+
G.G.	+	+	+	+	+	+
M.Z.	+	+	+	+	+	+
E.M.	+	+	+	+	+	+
E.F.	+	+	+	+	+	+
F.G.	+	+	+	+	+	+
I.M.	+	+	+	+	+	+
J.S.	+	+	+	+	+	+
D.G.	+	+	+	+	+	+
A.A.	+	+	+	+	+	+
R.G.	+	+	+	+	+	+
C.F.	+	+	+	+	+	+
L.G.	+	+	+	+	+	+
L.F.	+	+	+	+	+	+

Tabla 3. Expresión de los distintos GFs plaquetarios buscados mediante Western Blot en PRP.

Negatividad (-) / Positividad (+)

MARCADORES	CÉLULAS	
	MG63	DOK
CD45/CD14 (Control negativo)	-	-
HLA-ABC (Control positivo)	++	++
CCR5	-	++
CXCR3	+	+
CXCR4	-	+
CD95	++	++
HLA-DR	-	+
CD55	++	++
CD59	++	++
CD56	++	+
CD38	-	-
CD10	++	++
CD20	-	-
CD3	-	-
CD19	-	-
CKA PE	-	+
CK18 FITC	-	+
EPCAM	-	++

Tabla 4. Marcadores antigénicos en las células MG63 y DOK tras tipaje celular.

Negatividad (-) Positividad moderada (+) Alta positividad (++)

MARCADORES	MG63						DOK					
	PRP			PPP			PRP			PPP		
	0h	24h	72h	0h	24h	72h	0h	24h	72h	0h	24h	72h
CD10	X	+	+	X	-	-	X	-	-	X	-	-
CD56	X	-	-	X	-	-	X	-	-	X	-	-
DESMINA	X	-	-	X	-	-	X	-	-	X	-	-
VIMENTINA	X	++	+	X	++	+	X	-	-	X	-	-
CK AE1/AE3	X	-	-	X	-	+	X	++	++	X	+	++
KI67	X	+	+	X	-	+	X	-	-	X	-	+

Tabla 5. Resultados de Inmunohistoquímica.

Expresión del marcador

-: No se expresa el marcador

+: Marcador expresado por < 10% de las células presentes

++: Marcador expresado por 10% - 50% de las células presentes

+++: Marcador expresado por > 50% de las células presentes

X: Ausencia o escasez de células.

H. DISCUSIÓN

H. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se ha pretendido ampliar el conocimiento sobre las bases biológicas que deben sustentar al empleo clínico del PRP y otros productos análogos ricos en plaquetas. En contra de lo deseable, es posible encontrar en la literatura científica una gran variedad de protocolos diseñados para la obtención de preparados autólogos derivados de la sangre del paciente que son aplicados con diversas finalidades quirúrgicas y en cuyo contenido destaca una alta concentración de elementos plaquetarios. Todos los métodos propuestos comparten un patrón común en el que se provoca la separación de una cantidad variable de la sangre del paciente en distintas fracciones mediante un proceso de centrifugado, para posteriormente extraer el volumen plasmático que alberga las plaquetas y que será aplicado con fines regenerativos (Marx et al., 1998; Anitua 1999; Landesberg et al. 2000; Sonnleitner et al., 2000; Gonshor 2002; Efeoglu et al., 2004). Estos métodos se distinguen fundamentalmente entre técnicas de doble o simple centrifugado y en el tipo de activador que se emplea para gelificar la fracción plasmática extraída.

Curiosamente, todos los autores reportan excelentes resultados para el protocolo de centrifugado que proponen en cuanto a la obtención de un producto rico en plaquetas que contiene altas concentraciones de factores de crecimiento de origen plaquetario. El porcentaje de incremento de plaquetas que se refleja en los estudios disponibles en la literatura científica en función a los distintos protocolos propuestos va desde el 150% (Landesberg et al., 2000) al 404% (Marx et al., 1998) sobre la concentración plaquetaria en sangre normal (Marx 2004). Parece ser que se obtiene una mayor concentración plaquetaria y, por tanto, una mayor concentración de factores de crecimiento mediante el empleo de técnicas de doble centrifugado (Appel et al., 2002; Weibrich et al., 2005). Sin embargo, esto no debe ser necesariamente considerado una ventaja, ya que la dosis óptima de factores de crecimiento necesaria para provocar regeneración tisular aún no ha sido establecida en función de los condicionantes clínicos y el tipo de tejido que se pretende

regenerar. Se ha observado como la administración continuada a bajas dosis de PDGF en cultivos de osteoblastos de origen animal estimula la función osteoblástica, mientras que su aplicación continuada a altas dosis provoca la inhibición de la actividad de estas células (Hsieh & Graves 1998). Estos hallazgos se encuentran alineados con lo reportado en otros estudios *in vitro* recientemente publicados en los que se ha observado una inhibición de los fenómenos proliferativos en cultivos de células osteoblásticas al aplicar PRP con altas concentraciones plaquetarias, mientras que concentraciones más reducidas conseguían provocar una estimulación más adecuada de la diferenciación y proliferación de estas células (Arpornmaeklong et al., 2004; Choi et al., 2005; Graziani et al., 2006), lo que sugiere la existencia de un posible fenómeno de sobresaturación celular que podría evitar la inducción de fenómenos de proliferación y diferenciación celular. En este mismo sentido, Weibrich y colaboradores han observado en un estudio llevado a cabo sobre un modelo animal como la aplicación de un preparado con una concentración plaquetaria moderada (con un incremento de alrededor del 250%) induce una estimulación óptima de la regeneración ósea periimplantaria, mientras que altas concentraciones podrían incluso conducir a un efecto inhibitorio de los procesos regenerativos (Weibrich et al., 2004). Por tanto, surge una pregunta: ¿Cuál es el protocolo que nos hace obtener un producto más adecuado?

Algunos estudios han evaluado una posible influencia de la edad, el sexo y el número de plaquetas en sangre circulante del donante sobre la concentración de plaquetas (Weibrich et al., 2001) y la concentración de factores de crecimiento (Weibrich et al., 2002a) presentes en preparados ricos en plaquetas producidos por distintos métodos, no habiendo sido capaces de establecer una correlación significativa. Estos hallazgos podrían justificar que todos los autores que proponen distintos métodos para obtener PRP encuentren su protocolo como válido, sea cual sea la metodología empleada. Por lo tanto, a la espera de trabajos científicos más clarificadores al respecto, qué protocolo de centrifugado usar para obtener preparados autólogos ricos en plaquetas parece depender fundamentalmente de cuestiones económicas y de planificación operatoria, en cuanto a la cantidad de concentrado plaquetario que el cirujano pueda necesitar para llevar a cabo la intervención.

En nuestro estudio hemos utilizado un protocolo de un solo centrifugado, basado en la técnica propuesta por Anitua (1999; 2001), por distintas razones. En primer lugar, los volúmenes de sangre requeridos para llevar a cabo esta técnica son muy reducidos, pudiendo obtener una cantidad de preparado autólogo suficiente que se ajusta a las necesidades impuestas por el tipo de estudio diseñado. En segundo lugar, la técnica es muy sencilla metodológicamente y es rápida de ejecutar, mostrándose como un protocolo fácilmente reproducible, lo que es muy interesante para el desarrollo del trabajo de investigación, en el que se manejaron multitud de muestras. En tercer lugar, esta metodología no requiere el empleo de una maquinaria ni un material fungible especialmente costoso, lo que la convierte en una técnica favorable desde un punto de vista económico. En cuarto y último lugar, una importante ventaja de este protocolo es el tipo de activador de la coagulación que se emplea: Cloruro de Calcio (Cl_2Ca).

En la descripción de las primeras técnicas de obtención de PRP se preconizó el uso de una mezcla de trombina bovina y Cl_2Ca como solución activadora de la porción de plasma extraída tras el proceso de centrifugado (Marx et al., 1998). Algunas voces se alzaron en contra de usar trombina bovina debido al riesgo de provocar coagulopatías relacionadas con el factor V que pudieran comprometer la vida del paciente (Landesberg et al., 1998). Para obviar ese problema se ha propuesto activar la coagulación del plasma rico en plaquetas con trombina autóloga (Kassolis et al., 2000), trombina de origen humano (Tisseel^R) (Sonnleitner et al., 2000), o incluso empleando un péptido agonista para el receptor de la trombina (TRAP) (Landesberg et al., 2005; Tsay et al., 2005) con el que, además de evitar los problemas de reacciones adversas, se obtendría una rápida coagulación del gel (9.25 minutos por 100 mmol/Litro de TRAP). Pese a la polémica asociada a la trombina bovina, aún no se ha demostrado que la aplicación de concentrados plasmáticos de plaquetas activados con trombina bovina pudiera desencadenar coagulopatías indeseables, aunque sustituir su uso ha sido sugerido para evitar ese riesgo (Sanchez et al., 2003a).

Sin embargo, desde nuestro punto de vista, su uso implica otra serie de inconvenientes. En primer lugar, el uso adicional de trombina encarece el coste del proceso de preparación. En segundo lugar, existe el riesgo de transmisión de enfermedades virales de origen bovino. Pero lo que es más importante, la trombina es conocida por ser un potente activador de las plaquetas, actuando como agonista fuerte (Furman et al., 1998), lo que provocaría una liberación rápida y masiva del contenido plaquetario, incluidos los gránulos α . De este modo, la secreción precoz de los gránulos α desembocaría en la liberación, entre otras moléculas, de factores de crecimiento, proteínas conocidas por su gran labilidad y una baja supervivencia plasmática, lo que podría conllevar la desnaturalización prematura de estos agentes y la consiguiente inutilización de los mismos, lo que podría distorsionar los resultados de este trabajo. Al contrario que la trombina, el Calcio, o factor IV de la coagulación, es un agonista débil de los procesos de activación plaquetarios (Gemmell & Park 2000). Por tanto, el uso de Cl_2Ca , que se disocia en iones de Cl^- y Ca^{++} , siendo este último el activador real, es en nuestra opinión una opción más adecuada para conseguir la coagulación de la muestra de plasma, buscando la facilidad de manejo de la muestra y la activación débil de las plaquetas. De este modo se evitarían los mencionados problemas de liberación exacerbada del contenido plaquetario, la aparición de reacciones inmunes adversas y, además, es un producto con un coste muy bajo, con el que se consigue la coagulación de las muestras de PRP y PPP en aproximadamente 12 minutos según el procedimiento que hemos seguido.

Hasta el momento actual, gran parte del conocimiento relacionado con el empleo de estos derivados sanguíneos autólogos con fines regenerativos emana esencialmente de la descripción de su utilidad clínica y de los beneficiosos efectos que derivan de su aplicación, pero de forma sorprendente en ausencia de un estudio que evidencie los constituyentes del coágulo. Hablamos, por tanto, de la aplicación clínica de un producto sin una base científica sólida que ayude a explicar los efectos terapéuticos reales que este material biológico pueda ejercer. Por ello, el primer objetivo que se planteó dentro de esta línea de investigación fue la caracterización morfológica de los coágulos de PRP y PPP.

Utilizando técnicas de estudio ultraestructural, mediante microscopía electrónica, hemos evidenciado la constitución del gel de PRP y PPP que el clínico utiliza directamente sobre sus pacientes. Nuestros resultados demuestran y confirman las sospechas de que el gel de PRP está constituido por una malla de fibras distribuidas al azar (fibrina), conformando un entramado ocupado por elementos celulares identificados como plaquetas. Los resultados aportados por este estudio concuerdan con el modelo propuesto en un reciente trabajo llevado a cabo por Dohan y colaboradores, en el que se presenta una recreación tridimensional virtual, de lo que debería encontrarse en el PRP, intentando ilustrar como sería la relación fibrilar, celular y molecular que se da en dichos coágulos (Dohan et al., 2006). Hay que resaltar, que para llevar a cabo la caracterización de estos elementos formes sanguíneos, las plaquetas, utilizamos técnicas de citofluorometría de flujo (FACS) basadas en procedimientos inmunocitoquímicos como la inmunofluorescencia indirecta (IIF), aplicando el anticuerpo monoclonal CD41-PE, que reconoce específicamente una glicoproteína de superficie que define esta población celular (Fernández et al., 2006, aceptado en 2005).

Tras demostrar que las células presentes en mayor proporción en el PRP obtenido por el método descrito en este estudio son plaquetas, se puede descartar la presencia en cantidades indeseables de otras células de origen sanguíneo tales como monocitos/macrófagos o linfocitos. La posibilidad de obtener un preparado que contenga plaquetas como elemento forme mayoritario despejaría las preocupaciones expuestas al respecto por algunos autores, los cuales, tras emplear PRP en un modelo experimental animal en el que no se alcanzaron los resultados regenerativos esperados, justificaron estos hallazgos con la elevada tasa de leucocitos presentes, cuyos productos de secreción podrían interferir con la regeneración ósea (Li et al., 2004). Estas células leucocitarias podrían liberar o promover la secreción por parte de otras células del entorno de mediadores biológicos proinflamatorios o quimiotácticos para tipos celulares como los osteoclastos, cuya activación podría interferir con los propósitos regeneradores que se persiguen.

Del mismo modo, se hizo patente que no sólo es posible la activación plaquetaria in vitro en el gel de PRP, sino que, como indicaron Lemons y colaboradores (2000), se puede inducir la liberación controlada de los gránulos de las plaquetas y su contenido al medio, lo que sería muy interesante desde el punto de vista de la aplicación de factores de crecimiento plaquetarios con fines terapéuticos.

Si bien, y como hemos mencionado anteriormente, no existían en la literatura estudios que proporcionaran evidencias científicas acerca de la constitución del PRP y del PPP, de igual forma no es posible encontrar datos que proporcionen evidencia de la presencia de factores de crecimiento plaquetarios en el coágulo de PRP que el clínico utiliza en el momento de su acto terapéutico. Hasta ahora, la gran mayoría de los estudios que han localizado algunos de los factores de crecimiento plaquetarios en el PRP se han llevado a cabo metodológicamente sobre la fracción correspondiente del centrifugado sin aplicar el agente gelificador (Marx et al., 1998; Zimmerman et al. 2001; Weibrich et al., 2002b, 2003a, 2003b, 2005; Eppley et al., 2004), pero no directamente sobre el coágulo de PRP que se emplea clínicamente. A nuestro entender, el análisis de la presencia de factores de crecimiento plaquetarios directamente sobre este coágulo, proporcionaría una dimensión muy ajustada a la realidad clínica, ya que es el PRP en este estado gelificado como es utilizado por el profesional en su quehacer diario.

Teniendo en cuenta este planteamiento, nos propusimos profundizar en el conocimiento bioquímico del gel de PRP, concretamente, en la detección de una serie de factores de crecimiento plaquetarios: VEGF, TGF β 1, bFGF, PDGF-A, IGF-1 y EGF. Éstos fueron seleccionados en función tanto de una revisión de los factores mitogénicos que habían sido identificados en el interior de los gránulos α (Tabla 1), como de aquellos que, atendiendo a las propiedades reportadas en la literatura científica, pudieran tener una mayor influencia sobre las células implicadas en los procesos de regeneración osteoepitelial. Para alcanzar este objetivo, utilizamos técnicas de extracción de proteínas, electroforesis en SDS-PAGE e identificación mediante Western Blotting, las cuales han servido para evidenciar la presencia de dichos factores de

crecimiento en coágulos de PRP obtenidos de distintos donantes. Estos resultados nos permiten afirmar que nos encontramos ante la primera identificación simultánea de estos 6 factores de crecimiento plaquetarios “in situ” sobre este material biológico gelificado, lo que demuestra su presencia como constituyentes del coágulo de PRP.

Ahora bien, si nuestros resultados suponen un avance novedoso en el conocimiento del coágulo de PRP, no es menos cierto que plantean nuevos interrogantes. En este sentido, la reflexión surge rápidamente: ya hemos identificado los factores de crecimiento en el coágulo de PRP que, en términos clínicos, supone decir que el odontólogo proporciona realmente estos factores de crecimiento al paciente, pero ¿son activos?

No hay que olvidar, que la técnica utilizada por nosotros, el Western blot, así como cualquiera de las otras técnicas que pudiesen ser aplicadas para este fin, como por ejemplo la técnica de ELISA, permiten detectar la presencia de moléculas determinadas, y más concretamente de epítomos de ellas, mediante su unión a reactivos inmunológicos de alta especificidad, como son los anticuerpos monoclonales. Sin embargo, los factores de crecimiento son proteínas cuya acción es muy local (Vilcek 2003) y que poseen una vida media muy corta ya que, una vez son liberadas por parte de las células secretoras, pueden sufrir un proceso de desnaturalización por la acción de enzimas proteolíticas, verse inmersos en fenómenos de endocitosis o ser solubilizados por el propio elemento de vehiculización (Giannobile 1996). Por ejemplo, PDGF no puede ser detectado en sangre circulante en condiciones normales y cuando es inyectado intravenosamente su vida media es de 2 minutos (Nimni 1997). A la luz de estos datos es inevitable plantearse serias dudas en cuanto a la variable cantidad de factores de crecimiento con posibilidad de ejercer su acción biológica que se liberarían por coágulo de PRP aplicado. En vista a estas limitaciones es lógico preguntarse cómo sería posible hacer, mediante la aplicación de PRP, una estimulación selectiva de un tejido en concreto que interese regenerar en un determinado escenario clínico o experimental, ya que el medio de aplicación y la dosis a administrar de cada uno de los factores de crecimiento plaquetarios pueden ser factores críticos a la hora de modular la

actividad celular en el sentido deseado (Hokugo et al., 2005). Creemos que esta cuestión debe representar uno de los interrogantes a resolver antes de protocolizar la aplicación rutinaria de productos ricos en plaquetas en la clínica diaria.

Una serie de reflexiones siguen a la anterior: ¿Son estos factores de crecimiento los únicos o principales responsables de los efectos biológicos que subyacen a la mejora de las condiciones de regeneración tisular?, ¿Es el componente fibrilar del coágulo el que media solo y exclusivamente en los procesos biológicos que conducen a estos efectos regeneradores y los consiguientes resultados clínicos? O ¿Se complementan en esta modulación positiva el entramado fibrilar y diversos elementos plasmáticos, entre los que se encuentran los factores de crecimiento, actuando conjuntamente?

Para intentar resolver estas interrogantes, diseñamos una experiencia *in vitro* que permitiera, en primer lugar, poner en evidencia la interrelación existente entre los componentes constitutivos del coágulo de PRP y PPP y dos modelos celulares que representan a los tipos celulares implicados en los procesos de regeneración osteoepitelial oral y, en segundo lugar, analizar el comportamiento de estas células, en términos de proliferación y diferenciación en distintos intervalos de tiempo hasta 72 horas, tiempo en el que finaliza la fase de hemostasia e inflamación inicial, en la que interactúan el coágulo sanguíneo y las células con potencial regenerativo (Kiritsy et al., 1993).

En base a los hallazgos de caracterización morfológica sabemos que el PPP está constituido en su inmensa mayoría por material fibrilar identificado como fibrina, por ello representa un modelo aislado para el estudio de las posibles interacciones y efectos biológicos con elementos formes de origen diverso. Por otro lado, sabemos como el PRP suma al material fibrilar los elementos formes sanguíneos, inexistentes en el modelo de PPP, identificados en su mayoría como plaquetas, que aportan diversos factores de crecimiento. Junto a los dos modelos experimentales de coágulo, elegimos la internacionalmente contrastada línea celular osteoblástica humana MG63 como modelo osteogénico (Kue et al., 1999; Bächle & Kohal 2004), y la también

reconocida línea celular de origen humano DOK como modelo epitelial (Chang et al., 1992).

Las distintas muestras de coágulo y los modelos celulares fueron interrelacionados sembrando un número de células definido de ambas estirpes celulares sobre los coágulos de PPP y de PRP. Este procedimiento, en términos de cultivos celulares, es denominado cocultivo, el cual se realizó sobre placas estériles para cultivos celulares con pocillos de fondo plano a los que se les añadió medio de cultivo RPMI en ausencia de suero bovino fetal inactivado que se sabe contiene factores de crecimiento cuya presencia podría interferir en los resultados obtenidos así como en su interpretación.

Para valorar los cambios morfofuncionales celulares derivados del cocultivo se recurrió a la caracterización previa de las líneas celulares DOK y MG63 en condiciones basales, tanto en cultivo como aisladas, valiéndonos de técnicas de microscopía óptica y electrónica. El estudio mediante microscopía óptica invertida, utilizada como metodología de análisis y seguimiento de células en cultivo (Helmrich & Barnes 1998), mostró como las células de la línea MG63 y DOK presentaban un gran pleomorfismo celular, observándose células con morfología estrellada, fusiforme y esférica, muchas de las cuales desplegaban grandes prolongaciones citoplasmáticas. De igual forma, el análisis mediante microscopía electrónica de barrido puso de manifiesto las diferentes morfologías celulares así como las prolongaciones citoplasmáticas emitidas por ambos tipos celulares durante en su cultivo. En cambio al ser observadas en condiciones de aislamiento del frasco de cultivo mediante SEM y TEM se pudo ver como predominaba la morfología celular esférica o globular de las células. A nuestro juicio, estos hallazgos iniciales ponen en evidencia que los resultados que se obtienen al trabajar con estos modelos celulares pueden estar influenciados por la presencia de células aisladas, en grupo o dispuestas en monocapa adheridas al sustrato, en el momento del procesamiento.

Tras caracterizar ultraestructuralmente en condiciones basales los dos modelos celulares utilizados en nuestro diseño experimental, procedimos al

estudio de la relación de éstos con los coágulos de PRP y PPP. En este sentido, los resultados derivados del estudio ultraestructural mediante SEM y TEM de las distintas muestras obtenidas a partir del modelo que aquí se propone han permitido objetivar una serie de fenómenos de gran importancia. En primer lugar se observó como, tanto para las células de la línea MG63 como DOK, es necesario un tiempo inicial para que ocurran fenómenos de adherencia celular a la estructura en malla que caracteriza tanto al PRP como al PPP. Avala este resultado, la escasa o nula presencia de ambos tipos celulares adheridos a la malla del coágulo a tiempo "0". Esto pone en evidencia que la interrelación existente entre el coágulo de fibrina y las células osteogénicas utilizadas afecta fundamentalmente al fenómeno de adherencia célula-fibrilar y a unos aspectos fenotípicos particulares del proceso de diferenciación celular. En segundo lugar, y relacionado con el proceso de diferenciación celular, observamos una gran cantidad de elementos vesiculares de secreción a nivel de la membrana celular y en el espacio extracelular, acompañado de un notable incremento de material amorfo pericelular de características similares al material osteoide. Para nosotros, este resultado sugiere que, en el contexto del modelo de regeneración ósea, las células MG63 incrementan su grado de diferenciación funcional y evocan las funciones que caracterizan in vivo las células destinadas a la regeneración ósea (Garant 2003). En tercer lugar, el mantenimiento del cocultivo en el tiempo, cursó con un incremento de las morfologías celulares fusiformes y con la aparición de prolongaciones citoplasmáticas que profundizaban en la superficie del coágulo y que abrazan a las fibras constituyentes del mismo; un claro signo de que las células, tanto MG63 como DOK, alcanzaban progresivamente una más estrecha relación física con las muestras de coágulo, fenómeno en el que la fibrina juega un papel primordial (Nehls & Herrmann 1996). Sin embargo, el hallazgo más interesante fue la observación de fenómenos de fagocitosis del material fibrilar por parte de las células MG63 que se encontraban en relación al coágulo de PRP y PPP tras 72 horas de cocultivo. Este evento se podría explicar en que las células correspondientes a la línea MG63, tras adherirse inicialmente a la estructura fibrilar del coágulo de PRP y/o PPP, madurarían esta adherencia mediante el establecimiento de medios de unión bien diferenciados, como los hemidesmosomas, y emitiendo prolongaciones

citoplasmáticas que engloban a este material fibrilar, para posteriormente internalizarlo como un gran fagosoma con objeto de iniciar su degradación intracelular, empleando el material fibrilar como sustrato metabólico (Imagen 53). Al mismo tiempo se pudo ver como estas células sintetizan, en sus bien desarrollados RER y aparato de Golgi, material osteoide destinado a ocupar el espacio aparecido como consecuencia de la fagocitosis de dicho material fibrilar.

En armonía con lo expuesto por Yamada y colaboradores (2004), que en un estudio sobre modelo animal observaron como la aplicación de un andamiaje con células pluripotenciales mesenquimales junto con un concentrado plaquetario es capaz de estimular la regeneración ósea de manera más eficaz que la mera aplicación de la malla con células indiferenciadas, pensamos que nuestros hallazgos permiten valorar al entramado de fibrina constituyente de los coágulos de PRP y PPP como un conductor de la organización celular en los procesos regenerativos, actuando a modo de andamiaje, y como un inductor de la diferenciación morfo-funcional de las células osteogénicas y epiteliales implicadas en la regeneración tisular. A la luz de estas observaciones se abre la puerta al empleo de estos preparados como un soporte biológico autólogo para transportar distintos tipos celulares, agentes bioactivos o fármacos que al ser aplicados en la zona deseada ayuden resolver situaciones de daño tisular por traumatismos o infecciones, como ha sido sugerido recientemente (Yazawa et al., 2003; Jung et al., 2005).

Tras evidenciar, mediante técnicas de análisis ultraestructural, la existencia de eventos de diferenciación celular y fenómenos de interacción célula-coágulo nos propusimos encontrar marcadores bioquímico-moleculares que reflejaran este grado de diferenciación morfofuncional anteriormente comentado. Para ello se planteó realizar un análisis de la expresión de diversos marcadores por parte de las células de las líneas MG63 y DOK mediante técnicas de inmunohistoquímica. Este nuevo objetivo nos planteaba la necesidad de caracterizar en estos términos las células MG63 y DOK escogidas como modelos experimentales, ya que no existía, hasta entonces, un estudio de estas características en la literatura científica consultada. Para

ello se llevó a cabo una técnica de citometría de flujo con anticuerpos monoclonales específicos para CD45, CD14, HLA-ABC, CCR5, CXCR3, CXCR4, CD95, HLA-DR, CD55, CD59, CD 56, CD38, CD10, CD20, CD3, CD19, CKA-PE y CK18-FITC y EPCAM.

Una vez establecido el tipaje celular (Tabla 4), se seleccionaron los marcadores que, habiendo expresado positividad en ambas líneas, fueron considerados más interesantes por sus implicaciones biológicas dentro de los eventos celulares que se querían analizar en el contexto de este trabajo como fueron CD10 y CD56, además de otros marcadores clásicos de proliferación celular (Ki67) y de diferenciación epitelial (CK AE1/AE3) y mesenquimal (Desmina y Vimentina). Si bien, los marcadores objeto final de nuestro estudio quedaron finalmente acotados a aquellos que creíamos más relevantes para alcanzar los objetivos de esta investigación, no quisimos perder la ocasión de analizar la expresión de otros marcadores que pudieran tener importancia en los procesos de adhesión, quimiotaxis, proliferación y diferenciación celular por parte de las células MG63 y DOK, abriendo así nuevas posibilidades y perspectivas a desarrollar por nosotros u otros investigadores en un futuro inmediato y que podrían complementar las bases científicas de la utilización terapéutica del PRP.

Como se indicó anteriormente, en la mayoría de los muestras obtenidas a tiempo "0" existía una escasa o nula presencia de elementos formes, tanto de células MG63 como DOK, sobre la superficie de los coágulos de PRP y PPP, lo que hizo imposible realizar una valoración ponderada fiable de los resultados de la expresión de los marcadores de diferenciación y proliferación elegidos para el estudio por inmunohistoquímica (Figura 103). Si observamos atentamente la metodología de cocultivo empleada en nuestro modelo experimental, en el que las células fueron sembradas sobre los distintos coágulos, se puede justificar esa falta de celularidad en que las células sembradas sobre el coágulo se deslizarían sobre su superficie depositándose en el pocillo de cultivo. De este modo, la interacción con las muestras de PRP y PPP se establecería a partir del momento "0". Este hecho demuestra que, dentro de los límites de este estudio, no existe una interacción precoz o inmediata significativa de las células

empleadas como modelo osteoepitelial con los sustratos de PRP o PPP. Por lo tanto, es entendible que en el tiempo "0" la expresión de los marcadores es un fiel reflejo del estado de caracterización basal de esta línea celular.

El análisis de la expresión de los marcadores por parte de las células MG63 en las muestras de cocultivo junto con coágulos de PRP y PPP mostró la disminución de la expresión de CD10, una metaloproteasa que se expresa en células sensibles a diversas hormonas y péptidos moduladores, que ejerce su función degradando esos elementos proteicos del entorno celular, disminuyendo su concentración y la respuesta biológica de la célula diana (Oliva 2004). La baja expresión de CD10 dejaría a estas células más expuestas frente a posibles acciones hormonales y peptídicas y, por tanto, habría una mayor probabilidad de modulación celular a partir de la acción de diversos mediadores de naturaleza proteica. En este contexto, es lógico pensar que para alcanzar y mantener un mayor grado de diferenciación en las células osteogénicas MG63 sería necesario un mayor efecto biológico hormonal y peptídico. CD56 se ha relacionado con la activación de receptores de factores de crecimiento como el FGF (Kiselyov et al., 2005). La disminución en la expresión de CD56 desde el tiempo basal "0" hacia las 72 horas de cocultivo podría indicar una menor necesidad de las células MG63 a la estimulación y/o modulación del crecimiento celular por parte de diversos factores mitogénicos. El análisis inmunohistoquímico mostró además una disminución progresiva de la expresión de vimentina, un filamento intermedio considerado un óptimo marcador de diferenciación de células mesenquimales. Es conocido como una expresión alta de vimentina se encuentra inversamente relacionada con un mayor grado de diferenciación celular (Duprey & Paulin 1995). Por ello, podemos decir, que el cocultivo de las células MG63, tanto con el coágulo de PRP como con el de PPP, provoca un aumento de su grado de diferenciación. Este dato bioquímico-molecular concuerda con los datos obtenidos mediante las técnicas de estudio ultraestructural que hemos venido utilizando para este estudio, las cuales han revelado signos evidentes de diferenciación morfológica. Además, esta idea queda apoyada por la inexistente expresión de desmina, la cual tiene su expresión máxima y casi exclusiva en el tejido muscular estriado con diferenciación terminal; es decir, cuando la célula

mesenquimal indiferenciada de la que es originaria la célula muscular estriada ha seguido una de las líneas de diferenciación posible, la diferenciación muscular (Costa et al., 2004). Por ello, es esperable que las células osteogénicas, y en concreto las MG63, tipo celular proveniente de otro de los grandes caminos de diferenciación mesenquimal, sean negativas a la expresión de esta proteína marcadora, la desmina. La expresión de CKAE1/AE3, citoqueratinas, no es un hallazgo relacionado con tipos celulares de origen mesenquimal. La sola y leve expresión a las 72 horas de cocultivo con PRP, parece estar más relacionada con la propia idiosincrasia de las células MG63 que con una significación en la diferenciación de las mismas. No hay que olvidar que las células de la línea MG63, pese a ser un excelente y contrastado modelo biológico osteogénico, son de origen tumoral, lo que podría explicar la aparición de aberraciones cromosómicas que incluyen numerosas alteraciones genéticas que podrían modular de forma no bien conocida la expresión de gran multitud de proteínas impropias de esta estirpe celular. Por último la expresión de Ki67, un marcador nuclear de proliferación celular (Scholzen & Gerdes 2000), por parte de las células MG63 que se disponían en relación a los coágulos de PRP y PPP se estableció como muy discreta a lo largo de las 72 horas de cocultivo. Se conoce, como existe una relación inversa entre los procesos de diferenciación y proliferación celulares, es decir, cuando las células se están diferenciando, disminuye su tasa de proliferación, lo que justifica la baja expresión de este marcador en este modelo osteogénico.

El análisis de la expresión de marcadores de diferenciación y proliferación en las células de la línea de origen epitelial DOK ha mostrado algunas coincidencias en la expresión de marcadores con las células osteogénicas MG63. La expresión de las moléculas CD56 y CD10 y del marcador de proliferación Ki67 es similar al de las células osteogénicas MG63; por tanto, los mismos comentarios y argumentos utilizados previamente son aplicables en este contexto. La negatividad en la expresión de desmina y vimentina era esperable ya que son marcadores de células mesenquimales, y no epiteliales, y se efectuaron como control negativo. El principal hallazgo fue la observación del aumento de expresión de citoqueratinas por parte de las células DOK a lo largo del tiempo de cultivo tanto para PRP como para PPP.

Este hallazgo se encuentra en concordancia con nuestros resultados ultraestructurales que evidencian un mayor grado de diferenciación celular morfológica de las células DOK hacia las 72 hrs de postcultivo. Igualmente, son resultados que se encuentran de acuerdo con lo indicado por otros estudios *in vitro* en los cuales células de origen epitelial aisladas expresan gran cantidad de estas moléculas (Gasparoni et al., 2005). Además, fue muy llamativo que la expresión más alta de estas moléculas se consiguió con más rapidez en el caso del cocultivo con PRP que con PPP. Esta observación, que no tiene un reflejo claro en nuestro estudio ultraestructural, podría reflejar la única evidencia de que diversos factores plaquetarios, no necesariamente factores de crecimiento, podrían modular o intervenir en el proceso de diferenciación de células de origen epitelial, en nuestro caso de las células DOK.

La concordancia entre los hallazgos morfológicos ultraestructurales con los obtenidos mediante procedimientos cito e inmunohistoquímicos indican que el modelo biológico aquí desarrollado y la tecnología utilizada para su estudio se muestran muy eficaces para el análisis de la influencia del PRP frente al PPP en el proceso altamente complejo de regeneración osteo-epitelial. En este sentido, todos los resultados, observaciones y evidencias derivados de nuestros estudios ultraestructurales, son aplicables tanto para el modelo de cocultivo con PRP como de PPP, como se desprende del análisis de las imágenes presentadas. Por tanto, esto induce a pensar que los posibles efectos que pudieran ejercer los factores de crecimiento que son liberados por las plaquetas englobadas en el coágulo de PRP sobre las células incubadas en cocultivo son irrelevantes, al menos, durante el período inicial de 72 horas postcocultivo.

Esta conclusión, que contrasta con los resultados presentados por otros estudios *in vitro* que encuentran una clara modulación positiva de los procesos de diferenciación y proliferación de células relacionadas con la regeneración osteoespitelial en tiempos similares a través de los factores de crecimiento contenidos en las plaquetas (Okuda et al., 2003; Ogino et al., 2006), es acorde con los resultados aportados por un ensayo *in vitro* de reciente publicación, en el que no se observaron diferencias significativas en la influencia de coágulos

de PRP o PPP sobre la proliferación y diferenciación de osteoblastos y fibroblastos humanos (Cenni et al., 2005). La reflexión aquí expuesta se encuentra en concordancia con lo expuesto por Kawase y colaboradores en un interesante trabajo publicado en 2003, en el que se sugiere que la secuencia de beneficiosos eventos clínicos observados en el paciente como consecuencia de la utilización del PRP en los diferentes campos de la patología oral podría ser explicada merced a la interrelación que los distintos tipos celulares implicados en la regeneración osteoepitelial establecen y mantienen con la estructura fibrilar, a modo de soporte y matriz conductora, en combinación con la modulación ejercida por los factores de origen plaquetario presentes en el PRP (Kawase et al., 2003). En base a esta idea, la acción biológica del entramado de fibrina cobraría una gran importancia sobre la capacidad moduladora de los factores de crecimiento dentro de los procesos de regeneración y reparación tisular.

En conclusión, a la luz de los resultados obtenidos en este trabajo de investigación, se puede afirmar que el empleo de preparados autólogos obtenidos de la sangre del paciente, no debe venir dado por el hecho de que sean ricos o no en plaquetas, sino por la presencia de fibrina y otras proteínas estructurales, como la fibronectina y la vitronectina, presentes en el coágulo sanguíneo, característica que comparten tanto el coágulo de PRP como el de PPP.

Finalmente queremos reseñar que con la presentación de este trabajo de Tesis Doctoral creemos aportar importantes hallazgos que pueden ser de utilidad para el avance del conocimiento científico relacionado con el uso clínico de estos productos de origen sanguíneo, aunque indudablemente otros muchos interrogantes en relación a este tema se encuentran a la espera de ser respondidos, algunos de los cuales pretendemos abordar con mayor profundidad en próximas experimentaciones.

I. CONCLUSIONES

I. CONCLUSIONES

1.- La caracterización morfológica del coágulo de plasma rico en plaquetas evidenció que consta esencialmente de una malla de fibrina en relación a una gran cantidad de elementos formes sanguíneos, que en su mayoría son plaquetas. Igualmente se pudo constatar que el coágulo de plasma pobre en plaquetas consta esencialmente de un entramado de fibrina en ausencia aparente de plaquetas u otras células sanguíneas que preserven una integridad citoestructural.

2.- Existen, al menos, seis factores de crecimiento plaquetarios distintos dentro del coágulo de plasma rico en plaquetas que es aplicado clínicamente.

3.- Los resultados derivados del estudio del modelo propuesto en este trabajo ponen en entredicho la influencia que los factores de crecimiento plaquetarios poseen sobre la modulación de las células implicadas en la regeneración osteoepitelial.

4.- La validación experimental del modelo biológico coágulo-célula abre la puerta a nuevas terapias basadas en la posibilidad de usar estas matrices autólogas como transportadores biológicos de fármacos, agentes bioactivos o células pluripotenciales o aplicarlas a modo de membranas autólogas conductoras de la respuesta celular regenerativa.

J. BIBLIOGRAFÍA

J. BIBLIOGRAFÍA

Abba, A.K., Lichtman, A.H. & Pober, J.S. (2002a) Células y tejidos del sistema inmunitario. En: *Inmunología celular y molecular*. Eds.: Abba, A.K. et al. MacGraw-Hill Interamericana. 4ª Edición, Madrid, pp 20.

Abba, A.K., Lichtman, A.H. & Pober, J.S. (2002b) Anticuerpos y antígenos. En: *Inmunología celular y molecular*. Eds.: Abba, A.K. et al. MacGraw-Hill Interamericana. 4ª Edición, Madrid, pp 46.

Ablin, A.R., Kushner, J.H., Murphy, A. & Zippin, C. (1961) Platelet enumeration in the neonatal period. *Pediatrics* **28**: 822-824.

Aghaloo, T.L., Moy, P.K. & Freymiller, E.G. (2002) Investigation of platelet-rich plasma in rabbit cranial defects: A pilot study. *Journal of Oral & Maxillofacial Surgery* **60**: 1176-1181.

Aghaloo, T.L., Moy, P.K. & Freymiller, E.G. (2005) Evaluation of platelet-rich plasma in combination with freeze-dried bone in the rabbit cranium. A pilot study. *Clinical Oral Implants Research* **16**: 250-257.

Anderson, T.F. (1951) Technique for the preservation of three-dimensional structure preparing specimens for the electron microscope. *New York Academic Science* **13**: 130-133.

Anitua, E. (1999) Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **14**: 529-535.

Anitua E. (2001) The use of plasma-rich growth factors (PRGF) in oral surgery. *Practical Procedures in Aesthetic Dentistry* **13**: 487-493.

Anitua, E., Andia, I., Ardanza, B., Nurden, P. & Nurden, A.T. (2004) Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thrombosis & Haemostasis* **91**: 4-15.

Antenucci, E.L. (2000) Integration of lasers into a soft tissue management program. *Dental Clinics of North America* **44**: 811-819.

Antoniades, H.N. & Owen, A.J. (1982) Growth factors and regulation of cell growth. *Annual Review of Medicine* **33**: 445-463.

Anzano, M.A., Roberts, A.B. & Sporn, M.B. (1986) Anchorage-independent growth of primary rat embryo cells is induced by platelet-derived growth factor and inhibited by type-beta transforming growth factor. *Journal of Cellular Physiology* **126**: 312-318.

Appel, T.R., Potzsch, B., Muller, J., von Lindern, J.J., Berge, S.J. & Reich, R.H. (2002) Comparison of three different preparations of platelet concentrates for growth factor enrichment. *Clinical Oral Implants Research* **13**: 522-528.

Armelin, H.A. (1990) Peptide growth factors and cell cycle control. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **44**: 103-108.

Arpornmaeklong, P., Kochel, M., Depprich, R., Kubler, N.R. & Wurzler, K.K. (2004) Influence of platelet-rich plasma (PRP) on osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells: An in vitro study. *International Journal of Oral Maxillofacial Surgery* **33**: 60-70.

Asahara, T., Chen, D., Tsurumi, Y., Kearney, M., Rossow, S., Passeri, J., Symes, J.F. & Isner, J.M. (1996) Accelerated restitution of endothelial integrity and endothelium-dependent function after phVEGF165 gene transfer. *Circulation* **94**: 3291-3302.

Assoian, R.K., Komoriya, A., Meyers, C.A. Miller, D.M., Sporn, M.B. (1983) Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major

storage site, purification, and characterization. *Journal of Biological Chemistry* **258**: 7155-7160.

Assoian, R.K., Fleurdelys, B.E., Stevenson, H.C., Miller, P.J., Madtes, D.K., Raines, E.W., Ross, R. & Sporn, M.B. (1987) Expression and secretion of type beta transforming growth factor by activated human macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* **84**: 6020-6024.

Babbush, C.A., Kevy, S.V. & Jacobson, M.S. (2003) An in vitro and in vivo evaluation of autologous platelet concentrate in oral reconstruction. *Implant Dentistry* **12**: 24-34.

Bächle, M & Kohal R.J. (2004) A systematic review of the influence of different titanium surfaces on proliferation, differentiation and protein synthesis of osteoblast-like MG63 cells. *Clinical Oral Implants Research* **15**: 683-692.

Bakker, A.J., Gorgels, J.P., Draaisma, J., Jongendijk, M., Altena, L., Hamersma, A. & Weiland, A. (1992) Simple method for correcting total protein in plasma for actual fibrinogen content. *Clinical Chemistry* **38**: 2221-2223.

Baird, A., Mormede, P. & Bohlen, P. (1985) Immunoreactive fibroblast growth factor in cells of peritoneal exudate suggests its identity with macrophage-derived growth factor. *Biochemical Biophysical Research Communications* **126**: 358-364.

Bartek, J., Lukas, J. & Bartkova, J. (1999) Perspective: defects in cell cycle control and cancer. *Journal of Pathology* **187**: 95-99.

Bartold, P.M. & Raben, A. (1996) Growth factor modulation of fibroblasts in simulated wound healing. *Journal of Periodontal Research* **31**: 205-216.

Bartold, P.M., McCulloch, C.A., Narayanan, A.S. & Pitaru, S. (2000) Tissue engineering: a new paradigm for periodontal regeneration based on molecular and cell biology. *Periodontology 2000* **24**: 253-269.

Beck, L.S., Wong, R.L, DeGuzman, L., Lee, W.P., Ongpipattanakul, B. & Nguyen, T.H. (1998) Combination of bone marrow and TGF-beta1 augment the healing of critical-sized bone defects. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **87**: 1379-1386.

Becker, A.J., Mc Culloch, E.A. & Till, J.E. (1963) Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* **197**: 452-454.

Bennett, J.S. (2001) Platelet-fibrinogen interactions. *Annals of the New York Academy of Sciences* **936**: 340–354.

Bennett, N.T. & Schultz, G. (1993a) Growth Factors and wound healing: Biochemical properties of Growth Factors and their receptors. *American Journal of Surgery* **165**: 728-737.

Bennett, N.T. & Schultz, G. (1993b) Growth Factors and wound healing: Part II. Role in normal and chronic wound healing. *American Journal of Surgery* **166**: 74-80.

Bergel, S. (1909) Wirkungen des fibrins. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* **35**: 633.

Berlanga, O., Emambokus, N. & Frampton, J. (2005) GPIIb (CD41) integrin is expressed on mast cells and influences their adhesion properties. *Experimental Hematology* **33**: 403-412.

Betsholtz, C., Johnsson, A., Heldin, C.H., Westermark, B., Lind, P., Urdea, M.S., Eddy, R., Shows, T.B., Philpott, K., Mellor, A.L., Knott, T.J. & Scott, J. (1986) cDNA sequence and chromosomal localization of human platelet-derived growth factor chains and its expression in tumour cell lines. *Nature* **320**: 695-699.

Bhanot, S. & Alex, J.C. (2002) Current applications of platelet gels in facial plastic surgery. *Facial Plastic Surgery* **18**: 27-33.

Billiau, A., Edy, V.G., Heremans, H., Van Damme, J., Desmyter, J., Georgiades, J.A. & De Somer, P. (1977) Human interferon: mass production in a newly established cell line, MG-63. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy* **12**: 11-15.

Blom, S., Holmstrup, P. & Dabelsteen, E. (1994) A comparison of the effect of epidermal growth factor, platelet-derived growth factor, and fibroblast growth factor on rat periodontal ligament fibroblast-like cells' DNA synthesis and morphology. *Journal of Periodontology* **65**: 373-378.

Bocci, V. (1970) Metabolism of plasma proteins. *Archivio di Fisiologia* **67**: 314-444.

Bonthron, D.T., Morton, C.C., Orkin, S.H. & Collins, T. (1988) Platelet-derived growth factor A chain: gene structure, chromosomal location, and basis for alternative mRNA splicing. *Proceedings of the Nacional Academy of Sciences of the united Status of America* **85**: 1492-1496.

Boyan, L.A., Bhargava, G., Nishimura, F., Orman, R., Price, R. & Terranova, V.P. (1994) Mitogenic and chemotactic responses of human periodontal ligament cells to the different isoforms of platelet-derived growth factor. *Journal of Dental Research* **73**: 1593-1600.

Brissenden, J.E., Ullrich, A. & Francke, U. (1984) Human chromosomal mapping of genes for insulin-like growth factors I and II and epidermal growth factor. *Nature* **310**: 781-784.

Brown, G.L., Nanney, L.B., Griffen, J., Cramer, A.B., Yancey, J.M., Curtsinger, L.J. 3rd., Holtzin, L., Schultz, G.S., Jurkiewicz, M.J. & Lynch, J.B. (1989) Enhancement of wound healing by topical treatment with epidermal growth factor. *New England Journal of Medicine* **321**: 76-79.

Brown, D.C. & Gatter, K.C. (2002) Ki67 protein: the immaculate deception? *Histopathology* **40**: 2-11.

Camargo, P.M., Lekovic, V., Weinlaender, M., Vasilic, N., Madzarevic, M. & Kenney, E.B. (2002) Platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral combined with guided tissue regeneration in the treatment of intrabony defects in humans. *Journal of Periodontal Research* **37**: 300.

Camargo, P.M., Lekovic, V., Weinlaender, M., Vasilic, N., Madzarevic, M. & Kenney, E.B. (2005) A reentry study on the use of bovine porous bone mineral, GTR, and platelet-rich plasma in the regenerative treatment of intrabony defects in humans. *International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry* **25**: 49-59.

Capetanaki, Y.G., Ngai, J. & Lazarides, E. (1984). Characterization and regulation in the expression of a gene coding for the intermediate filament protein desmin. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **81**: 6909-6913.

Carlson, N.E. & Roach, R.B. Jr. (2002) Platelet-rich plasma: clinical applications in dentistry. *Journal of the American Dental Association* **133**: 1383-1386.

Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoek, A., Harpal, K., Eberhardt, C., Declercq, C., Pawling, J., Moons, L., Collen, D., Risau, W. & Nagy, A. (1996) Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* **380**: 435-439.

Carpenter, G. & Wahl, M.I. (1990) The epidermal growth factor family. In: Peptide growth factors and their receptors, Roberts, A.B. (eds.). Ed.: Springer-Verlag, 1^a Edición. Berlin, pp. 69-171.

Cenni, E., Ciapetti, G., Pagani, S., Perut, F., Giunti, A. & Baldini, N. (2005) Effects of activated platelet concentrates on human primary cultures of fibroblasts and osteoblasts. *Journal of Periodontology* **76**: 323-328.

Centrella, M., McCarthy, T.L. & Canalis, E. (1987) Transforming growth factor beta is a bifunctional regulator of replication and collagen synthesis in osteoblast-enriched cell cultures from fetal rat bone. *Journal of Biological Chemistry* **262**: 2869-2874.

Chan, K. & Spencer, E.M. (1998) Megakaryocytes endocytose insulin-like growth factor (IGF) I and IGF-binding protein-3: a novel mechanism directing them into alpha granules of platelets. *Endocrinology* **139**: 559-565.

Chang, S.E., Foster, S., Betts, D. & Marnock, W.E. (1992) DOK, a cell line established from human dysplastic oral mucosa, shows a partially transformed non-malignant phenotype. *International Journal of Cancer* **52**: 896-902.

Cheifetz, S., Weatherbee, J.A., Tsang, M.L., Anderson, J.K., Mole, J.E., Lucas, R. & Massague, J. (1987) The transforming growth factor-beta system, a complex pattern of cross-reactive ligands and receptors. *Cell* **48**: 409-415.

Cheifetz, S., Bassols, A., Stanley, K., Ohta, M., Greenberger, J. & Massague, J. (1988) Heterodimeric transforming growth factor beta. Biological properties and interaction with three types of cell surface receptors. *Journal of Biological Chemistry* **263**: 10783-10789.

Choi, B.H., Han, S.G., Kim, S.H., Zhu, S.J., Huh, J.Y., Jung, J.H., Lee, S.H. & Kim, B.Y. (2005) Autologous fibrin glue in peripheral nerve regeneration in vivo. *Microsurgery* **25**: 495-499

Choi, B.H., Zhu, S.J., Kim, B.Y., Huh, J.Y., Lee, S.H. & Jung, J.H. (2005) Effect of platelet-rich plasma (PRP) concentration on the viability and proliferation of alveolar bone cells: an in vitro study. *International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery* **34**: 420-424.

Clauss, M., Grell, M., Fangmann, C., Fiers, W., Scheurich, P. & Risau, W. (1996) Synergistic induction of endothelial tissue factor by tumor necrosis factor and

vascular endothelial growth factor: functional analysis of the tumor necrosis factor receptors. *FEBS Letters* **390**: 334-338.

Cohen, S. (1962) Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *Journal of Biological Chemistry* **237**: 1555-1562.

Cooper, G. M. (2002) El ciclo celular. En: La Célula. Cooper, G.M. (eds.) Ed. Marban, 2ª Edición. Madrid, pp. 571-607.

Corsair, A. (1997) The effects of a CO2 laser on the healing of a bone defect. *Dentistry Today* **16**: 66-69.

Costa, M.L., Escaleira, R., Cataldo, A., Oliveira, F. & Mermelstein, C.S. (2004) Desmin: molecular interactions and putative functions of the muscle intermediate filament protein. *Brazilian Journal of Medical & Biological Research* **37**: 1819-1830.

Coulier, F., Pontarotti, P., Roubin, R., Hartung, H., Goldfarb, M. & Birnbaum, D. (1997) Of worms and men: an evolutionary perspective on the fibroblast growth factor (FGF) and FGF receptor families. *Journal of Molecular Evolution* **44**: 43-56.

Crewther, W.G., Dowling, L.M., Steiner, P.M. & Parry, D.A.D. (1983) Structure of intermediate filament. *International Journal of Biological Macromolecules* **5**: 267-274.

Cross, M.J. & Claesson-Welsh, L. (2001) FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends in Pharmacological Science* **22**: 201-207.

Crovetti, G., Martinelli, G., Issi, M., Barone, M., Guizzardi, M., Campanati, B., Moroni, M. & Carabelli, A. (2004) Platelet gel for healing cutaneous chronic wounds. *Transfusion & Apheresis Science* **30**: 145-151.

Danesh-Meyer, M.J., Filstein, M.R. & Shanaman, R. (2001) Histological evaluation of sinus augmentation using platelet rich plasma (PRP): a case series. *Journal of the International Academy of Periodontology* **3**: 48-56.

Davie, E.W., Fujikawa, K. & Kisiel, W. (1991) The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. *Biochemistry* **30**: 10363-10370.

Davis, B.R. & Sandor, G.K. (1998) Use of fibrin glue in maxillofacial surgery. *Journal of Otolaryngology* **27**: 107-112.

de Obarrio, J.J., Arauz-Dutari, J.I., Chamberlain, T.M. & Croston, A. (2000) The use of autologous growth factors in periodontal surgical therapy: platelet gel biotechnology--case reports. *International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry* **20**: 486-497.

Delafontaine, P., Song, Y.H. & Li, Y. (2004) Expression, regulation, and function of IGF-1, IGF-1R, and IGF-1 binding proteins in blood vessels. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* **24**: 435-444.

Della Valle, A., Sammartino, G., Marenzi, G., Tia, M., Espedito di Lauro, A., Ferrari, F. & Lo Muzio, L. (2003) Prevention of postoperative bleeding in anticoagulated patients undergoing oral surgery: use of platelet-rich plasma gel. *Journal of Oral & Maxillofacial Surgery* **61**: 1275-1278.

Dennison, D.K., Vallone, D.R., Pinero, G.J., Rittman, B., Caffesse, R.G. (1994) Differential effect of TGF-beta 1 and PDGF on proliferation of periodontal ligament cells and gingival fibroblasts. *Journal of Periodontology* **65**: 641-648.

Derynck, R., Jarrett, J.A., Chen, E.Y., Eaton, D.H., Bell, J.R., Assoian, R.K., Roberts, A.B., Sporn, M.B. & Goeddel, D.V. (1985) Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells. *Nature* **316**: 701-705.

Dionne, C.A., Crumley, G., Bellot, F., Kaplow, J.M., Searfoss, G., Ruta, M., Burgess, W.H., Jaye, M. & Schlessinger, J. (1990) Cloning and expression of two distinct high-affinity receptors cross-reacting with acidic and basic fibroblast growth factors. *EMBO Journal* **9**: 2685-2692.

Dohan, D.M., Choukroun, J., Diss, A., Dohan, S.L., Dohan, A.J., Mouhyi, J. & Gogly, B. (2006) Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part II: Platelet-related biologic features. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology & Endodontics* **101**: E45-E50.

Duprey, P. & Paulin, D. (1995) What can be learned from intermediate filament gene regulation in the mouse embryo. *International Journal of Developmental Biology* **39**: 443-457.

Dvorak, H.F. (2000) VPF/VEGF and the angiogenic response. *Seminars in Perinatology* **24**: 75-78.

Efeoglu, C., Akcay, Y.D. & Erturk, S. (2004) A modified method for preparing platelet-rich plasma: an experimental study. *Journal of Oral & Maxillofacial Surgery* **62**: 1403-1407.

Ensoli, B., Sgadari, C., Barillari, G. & Monini, P. (2003) The fibroblast growth factors. In: *The cytokine handbook*. Vol. 2 Eds.: Thomson, A.W. & Lotze, M.T. Academic Press, 4ª Edición. Avon, pp. 747-781.

Eppley, B.L., Woodell, J.E. & Higgins, J. (2004) Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plastic & Reconstructive Surgery* **114**: 1502-1508.

Erdos, E.G., Schulz, W.W., Gafford, J.T. & Defendini, R. (1985) Neutral metalloendopeptidase in human male genital tract. Comparison to angiotensin I-converting enzyme. *Laboratory Investigation* **52**: 437-447.

Eriksson, A.C. & Whiss, P.A. (2005) Measurement of adhesion of human platelets in plasma to protein surfaces in microplates. *Journal of Pharmacological & Toxicological Methods* **52**: 356-365.

Faler, B.J., Macsata, R.A., Plummer, D., Mishra, L. & Sidawy, A.N. (2006) Focus on Basic Science: Transforming Growth Factor-beta and Wound Healing. *Perspectives in Vascular Surgery & Endovascular Therapy* **18**: 55-62.

Fennis, J.P., Stoelinga, P.J. & Jansen, J.A. (2002) Mandibular reconstruction: a clinical and radiographic animal study on the use of autogenous scaffolds and platelet-rich plasma. *International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery* **31**: 281-286.

Fennis, J.P., Stoelinga, P.J. & Jansen, J.A. (2004) Mandibular reconstruction: a histological and histomorphometric study on the use of autogenous scaffolds, particulate cortico-cancellous bone grafts and platelet rich plasma in goats. *International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery* **33**: 48-55.

Fernández-Barbero, J.E., Galindo, P., Ávila, G., Caba, O., Sánchez-Fernández, E. & Wang, H-L. (2006) Flow cytometric and morphological characterization of platelet-rich plasma gel. *Clinical Oral Implants Research* (**En prensa**).

Ferrara, N., Houck, K., Jakeman, L. & Leung, D.W. (1992) Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocrine Reviews* **13**: 18-32.

Ferrara, N. (1996) Vascular endothelial growth factor. *European Journal of Cancer* **32A**: 2413-2422.

Ferrara, N. (2000) Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. *Recent Progress in Hormone Research* **55**: 15-35

Folkman, J. (1995) Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Medicine* **1**: 27-31.

Franchini, M., Dupplicato, P., Ferro, I., De Gironcoli, M. & Aldegheri, R. (2005) Efficacy of platelet gel in reconstructive bone surgery. *Orthopedics* **28**: 161-163.

French, J.E. (1967) Blood platelets: Morphologic studies on their properties and life cycle. *British Journal of Haematology* **13**: 595.

Freymler, E.G. & Aghaloo, T.L. (2004) *Platelet-rich plasma: ready or not?* *Journal of Oral & Maxillofacial Surgery* **62**: 484-488.

Frolik, C.A., Dart, L.L., Meyers, C.A., Smith, D.M. & Sporn, M.B. (1983) Purification and initial characterization of a type beta transforming growth factor from human placenta. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **80**: 3676-3680.

Froum, S.J., Wallace, S.S., Tarnow, D.P. & Cho, S.C. (2002) Effect of platelet-rich plasma on bone growth and osseointegration in human maxillary sinus grafts: three bilateral case reports. *International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry* **22**: 45-53.

Fuerst, G., Gruber, R., Tangl, S., Zechner, W., Haas, R., Mailath, G., Sanroman, F. & Watzek, G. (2003a) Sinus grafting with autogenous platelet-rich plasma and bovine hydroxyapatite. A histomorphometric study in minipigs. *Clinical Oral Implants Research* **14**: 500-508.

Fuerst, G., Gruber, R., Tangl, S., Sanroman, F. & Watzek, G. (2003b) Enhanced bone-to-implant contact by platelet-released growth factors in mandibular cortical bone: a histomorphometric study in minipigs. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **18**: 685-690.

Fuerst, G., Tangl, S., Gruber, R., Gahleitner, A., Sanroman, F. & Watzek, G. (2004a) Bone formation following sinus grafting with autogenous bone-derived cells and bovine bone mineral in minipigs: preliminary findings. *Clinical Oral Implants Research* **15**: 733-740.

Fuerst, G., Gruber, R., Tangl, S., Sanroman, F. & Watzek, G. (2004b) Effects of fibrin sealant protein concentrate with and without platelet-released growth factors on bony healing of cortical mandibular defects. An experimental study in minipigs. *Clinical Oral Implants Research* **15**: 301-307.

Furman, M.I., Liu, L., Benoit, S.E., Becker, R.C., Barnard, M.R. & Michelson, A.D. (1998) The cleaved peptide of the thrombin receptor is a strong platelet agonist. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **95**: 3082-3087.

Gandhi, A., Dumas, C., O'connor, J.P., Parsons, J.R. & Lin, S.S. (2006) The effects of local platelet rich plasma delivery on diabetic fracture healing. *Bone* **38**: 540-546.

Garant, P.R. (2003) Bone. In: Oral Cells and Tissues. Garant, P.R. editor Ed.: Quintessence Publications. 1ª Edición, Chicago, pp. 195-238.

Gartner, L.P. & Hiatt, J.L. (2003) Atlas en Color de Histología. Ed. Lippincott Williams & Wilkins. 3ª Edición, Madrid.

Gasparoni, A., Squier, C.A & Fonzi, L. (2005) Cytokeratin changes in cell culture systems of epithelial cells isolated from oral mucosa: a short review. *Italian Journal of Anatomy & Embryology* **110**: 75-82.

Gehring, S., Hoerauf, H., Laqua, H., Kirchner, H. & Kluter, H. (1999) Preparation of autologous platelets for the ophthalmologic treatment of macular holes. *Transfusion* **39**: 144-148.

Gemmell, C.H. & Park, J.Y. (2000) Initial blood interactions with endosseous implant materials. In: Bone Engineering. Davies, J.E. editor. Ed: em2 Inc. 1ª Edición, Toronto, pp. 113.

Gerard, D., Carlson, E.R., Gotcher, J.E. & Jacobs, M. (2006) Effects of platelet-rich plasma on the healing of autologous bone grafted mandibular defects in dogs. *Journal of Oral & Maxillofacial Surgery* **64**: 443-451.

Giannobile, W.V. (1996) Periodontal tissue engineering by growth factors. *Bone* **19(1 Suppl)**: 23S-37S.

Gonshor, A. (2002) Technique for producing platelet-rich plasma and platelet concentrate: background and process. *International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry* **22**: 547-557.

González Moles, M.A. (2001) Aspectos moleculares del cáncer oral. En: *Precáncer y Cáncer Oral*. Ediciones Avances, 1ª Edición. Madrid, pp. 83-94.

Gospodarowicz, D., Neufeld, G.&, Schweigerer, L. (1987) Fibroblast growth factor: structural and biological properties. *Journal of Cell Physiology - Supplement* **5**: 15-26.

Graves, D.T., Antoniades, H.N., Williams, S.R. & Owen, A.J. (1984) Evidence for functional platelet-derived growth factor receptors on MG-63 human osteosarcoma cells. *Cancer Research* **44**: 2966-2970.

Graves, D.T., Valentin-Opran, A., Delgado, R., Valente, A.J., Mundy, G. & Piche, J. (1989) The potential role of platelet-derived growth factor as an autocrine or paracrine factor for human bone cells. *Connective Tissue Research* **23**: 209-218.

Graves, D.T. & Cochran, D.L. (1990) Mesenchymal cell growth factors. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* **1**: 17-36.

Graves, D.T. & Cochran, D.L. (1991) Biologically active mediators: platelet-derived growth factor, monocyte chemoattractant protein-1, and transforming growth factor-beta. *Current Opinion in Dentistry* **1**: 809-815.

Graves DT, Kang YM, Kose KN. (1994) Growth factors in periodontal regeneration. *Compendium Suppl* **18**: S672-7; quiz S714-7.

Graziani, F., Ivanovski, S, Ducci, F., Tonetti M. & Gabriele, M. (2006) The in vitro effect of different PRP Concentrations on osteoblasts and fibroblasts. *Clinical Oral Implants Research* **17**: 212-219.

Greaves, M.F., Hariri, G., Newman, R.A., Sutherland, D.R., Ritter, M.A. & Ritz, J. (1983) Selective expression of the common acute lymphoblastic leukemia (gp 100) antigen on immature lymphoid cells and their malignant counterparts. *Blood* **61**: 628-639.

Griffin, T.J. & Cheung, W.S. (2004) Treatment of gingival recession with a platelet concentrate graft: a report of two cases. *International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry* **24**: 589-595.

Gronwald, R.G., Seifert, R.A. & Bowen-Pope, D.F. (1989) Differential regulation of expression of two platelet-derived growth factor receptor subunits by transforming growth factor-beta. *Journal of Biological Chemistry* **264**: 8120-8125.

Gruber, R., Karreth, F., Frommlet, F., Fischer, M.B. & Watzek, G. (2003) Platelets are mitogenic for periosteum-derived cells. *Journal of Orthopaedic Research* **21**: 941-948.

Gusterson, B.A., Monaghan, P., Mahendran, R., Ellis, J. & O'Hare, M.J. (1986) Identification of myoepithelial cells in human and rat breasts by anti-common acute lymphoblastic leukemia antigen antibody A12. *Journal of the National Cancer Institute* **77**: 343-349.

Hajjar, C.A., Esmon, N.L., Marcus, A.J. & Muller, W.A. (2005) Función vascular en la hemostasia. En: Hematología, Vol. 2. Beutler et al., eds. Ed.: Marbán. 6ª Edición, Madrid, pp. 1451-1408.

Harrison, P. & Cramer, E.M. (1993) Platelet alpha-granules. *Blood Reviews* **7**: 52-62.

Hart, C.E., Forstrom, J.W., Kelly, J.D., Seifert, R.A., Smith, R.A., Ross, R., Murray, M.J. & Bowen-Pope, D.F. (1988) Two classes of PDGF receptor recognize different isoforms of PDGF. *Science* **240**: 1529-1531.

Hayward, C.P.M. (1997) Inherited disorders of platelet α -granules. *Platelets* **8**: 197-209.

Heckman, J.D., Aufdemorte, T.B. & Athanasiou, K.A. (1995) Treatment of acute osteotomy defects in the dog radius with TGF-B1. *Transitional Orthopaedic Research Society* **20**: 590.

Heijl, L., Heden, G., Svärstrom, G., Ostgren, A. (1997) Enamel matrix derivative (EMDOGAIN) in the treatment of intrabony periodontal defects. *Journal of Clinical Periodontology* **24**: 705-714.

Heldin, C.H., Backstrom, G., Ostman, A., Hammacher, A., Ronnstrand, L., Rubin, K., Nister, M. & Westermark, B. (1988) Binding of different dimeric forms of PDGF to human fibroblasts: evidence for two separate receptor types. *EMBO Journal* **7**: 1387-1393.

Heldin, C.H. & Westermark, B. (1990) Platelet-derived growth factor: mechanism of action and possible in vivo function. *Cell Regulation* **1**: 555-566.

Heldin, C.H. & Westermark, B. (1999) Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiology Reviews* **79**: 1283-1316.

Helmrich, A. & Barnes, D. (1984) Animal cell culture equipment and techniques. *Methods in Cell Biology* **57**: 3-17.

Hiramatsu, M., Kumegawa, M., Hatakeyama, K., Yajima, T., Minami, N. & Kodama, H. (1982) Effect of epidermal growth factor on collagen synthesis in

osteoblastic cells derived from newborn mouse calvaria. *Endocrinology* **111**: 1810-1816.

Hokugo, A., Ozeki, M., Kawakami, O., Sugimoto, K., Mushimoto, K., Morita, S. & Tabata, Y. (2005) Augmented bone regeneration activity of platelet-rich plasma by biodegradable gelatin hydrogel. *Tissue Engineering* **11**: 1224-1233.

Howe, P.H. (2003) Transforming growth factor β . In: The cytokine handbook. Vol. 2 Eds.: Thomson, A.W. & Lotze, M.T. Academic Press, 4^a Edición. Avon, pp. 1119-1152.

Howell, T.H., Martuscelli, G. & Oringer, J. (1996) Polypeptide growth factors for periodontal regeneration. *Current Opinion in Periodontology* **3**: 149-156.

Hsieh, S.C. & Graves, D.T. (1998) Pulse application of platelet-derived growth factor enhances formation of a mineralizing matrix while continuous application is inhibitory. *Journal of Cell Biochemistry* **69**: 169-180.

Huang, J.S., Huang, S.S. & Deuel, T.F. (1983) Human platelet-derived growth factor: radioimmunoassay and discovery of a specific plasma-binding protein. *Journal of Cellular Biology* **97**: 383-388.

Huang, L.H., Neiva, R.E., Soehren, S.E., Giannobile, W.V. & Wang, H.L. (2005) The effect of platelet-rich plasma on the coronally advanced flap root coverage procedure: a pilot human trial. *Journal of Periodontology* **76**: 1768-77.

Hughes, D.E., Wright, K.R., Mundy, G.R. & Boyce, B.F. (1994) TGF β 1 induces osteoclast apoptosis in vitro. *Journal of Bone & Mineral Research* **9**: 71-74.

Ilan, D.I. & Ladd, A.L. (2003) Bone graft substitutes. *Operative Techniques in Plastic and Reconstructive Surgery* **9**: 151-160.

Izaguirre-Avila, R. (1997) El descubrimiento de las plaquetas. *Revista Biomédica* **8**: 197-208.

Jakse, N., Tangl, S., Gilli, R., Berghold, A., Lorenzoni, M., Eskici, A., Haas, R. & Pertl, C. (2003) Influence of PRP on autogenous sinus grafts. An experimental study on sheep. *Clinical Oral Implants Research* **14**: 578-583.

Jansen, M., van Schaik, F.M., Ricker, A.T., Bullock, B., Woods, D.E., Gabbay, K.H., Nussbaum, A.L., Sussenbach, J.S. & Van den Brande, J.L. (1983) Sequence of cDNA encoding human insulin-like growth factor I precursor. *Nature* **306**: 609-611.

Jennings, L.K. & Phillips, O.R. (1982) Purification of glycoproteins Iib and III from human platelet membrane and characterization of calcium-dependent glycoprotein Iib-IIIa complex. *Journal of Biological Chemistry* **257**:10458-10466.

Jung, R.E., Schmoekel, H.G., Zwahlen, R., Kokovic, V., Hammerle, C.H. & Weber, F.E. (2005) Platelet-rich plasma and fibrin as delivery systems for recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Clinical Oral Implants Research* **16**: 676-682.

Junqueira, L.C. & Carneiro, J. (2005). *Histología Básica*. Ed. Masson. 6ª edición, Madrid.

Kassolis, J.D., Rosen, P.S. & Reynolds, M.A. (2000) Alveolar ridge and sinus augmentation utilizing platelet-rich plasma in combination with freeze-dried bone allograft: case series. *Journal of Periodontology* **71**: 1654-1661.

Kassolis, J.D. & Reynolds, M.A. (2005) Evaluation of the adjunctive benefits of platelet-rich plasma in subantral sinus augmentation. *Journal of Craniofacial Surgery* **16**: 280-287.

Kawase, T., Okuda, K., Wolff, L.F. & Yoshie, H. (2003) Platelet-rich plasma-derived fibrin clot formation stimulates collagen synthesis in periodontal ligament and osteoblastic cells in vitro. *Journal of Periodontology* **74**: 858-864.

Keating, A., Whalen, C.K. & Singer, J.W. (1983) Cultured marrow stromal cells express common acute lymphoblastic leukaemia antigen (CALLA): implications for marrow transplantation. *British Journal of Haematology* **55**: 623–628.

Kehrl, J.H., Roberts, A.B., Wakefield, L.M., Jakowlew, S., Sporn, M.B. & Fauci, A.S. (1986) Transforming growth factor beta is an important immunomodulatory protein for human B lymphocytes. *Journal of Immunology* **137**: 3855-3860.

Khan, S.N., Bostrom, M.P. & Lane, J.M. (2000) Bone growth factors. *Orthopedic Clinics of North America* **31**: 375-388.

Kim, E.S., Park, E.J. & Choung, P.H. (2001) Platelet concentration and its effect on bone formation in calvarial defects: an experimental study in rabbits. *Journal of Prosthetic Dentistry* **86**: 428-433.

Kim, S.G., Kim, W.K., Park, J.C. & Kim, H.J. (2002) A comparative study of osseointegration of Avana implants in a demineralized freeze-dried bone alone or with platelet-rich plasma. *Journal of Oral & Maxillofacial Surgery* **60**: 1018-1025.

Kimura, A., Ogata, H., Yazawa, M., Watanabe, N., Mori, T. & Nakajima, T. (2005) The effects of platelet-rich plasma on cutaneous incisional wound healing in rats. *Journal of Dermatological Science* **40**: 205-208.

King, S.M. & Reed, G.L. (2002) Development of platelet secretory granules. *Seminars in Cell Development & Biology* **13**: 293-302.

Kiritsy, C.P., Lynch, A.B. & Lynch, S.E. (1993) Role of growth factors in cutaneous wound healing: a review. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* **4**: 729-760.

Kiselyov, V.V., Soroka, V., Berezin, V. & Bock, E. (2005) Structural biology of NCAM homophilic binding and activation of FGFR. *Journal of Neurochemistry* **94**: 1169-1179.

Klinger, M.H.F. (1996) The storage lesion of platelets: ultrastructural and functional aspects. *Annals of Hematology* **76**: 103-112.

Klongnoi, B., Rupprecht, S., Kessler, P., Thorwarth, M., Wiltfang, J. & Schlegel, K.A. (2006) Influence of platelet-rich plasma on a bioglass and autogenous bone in sinus augmentation: An explorative study. *Clinical Oral Implants Research* **17**: 312-320.

Kohler, N. & Lipton, A. (1974) Platelets as a source of fibroblast growth-promoting activity. *Experimental Cell Research* **87**: 297-301.

Kohler, G. & Milstein, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**: 495-497.

Kue, R., Sohrabi, A., Nagle, D., Frondoza, C. & Hungerford, D. (1999) Enhanced proliferation and osteocalcin production by human osteoblast-like MG63 cells on silicon nitride ceramic discs. *Biomaterials* **20**: 1195-1201.

Landesberg, R., Moses, M. & Karpatkin, M. (1998) Risks of using platelet rich plasma gel. *Journal of Oral & Maxillofacial Surgery* **56**: 1116-1117.

Landesberg, R., Roy, M. & Glickman, R.S. (2000) Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. *Journal of Oral Maxillofacial Surgery* **58**: 297-300.

Landesberg, R., Burke, A., Pinsky, D., Katz, R., Vo, J., Eisig, S.B. & Lu, H.H. (2005) Activation of platelet-rich plasma using thrombin receptor agonist peptide. *Journal of Oral & Maxillofacial Surgery* **63**: 529-535.

LaRochelle, W.J., Jeffers, M., McDonald, W.F., Chillakuru, R.A., Giese, N.A., Lokker, N.A., Sullivan, C., Boldog, F.L., Yang, M., Vernet, C., Burgess, C.E., Fernandes, E., Deegler, L.L., Rittman, B., Shimkets, J., Shimkets, R.A.,

Rothberg, J.M. & Lichenstein, H.S. (2001) PDGF-D, a new protease-activated growth factor. *Nature Cell Biology* **3**: 517-521.

Laron, Z. (1999) Clinical use of somatomedin-1: yes or no? *Paediatric Drugs* **1**: 155-159.

Laron, Z. (2001) Insulin-like growth factor 1 (IGF-1): a growth hormone. *Molecular Pathology* **54**: 311-316.

Lazarides, E. & Hubbard, B.D. (1976) Immunological characterization of the subunit of the 100 A filaments from muscle cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **73**: 4344-4348.

Lazarides, E. (1980). Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. *Nature* **283**: 249-256.

Lee, D.C., Hinkle, L., Jackson, L.F., Li, S. & Wohler, S. (2003) EGF family ligands. In: The cytokine handbook. Vol. 2 Eds.: Thomson, A.W. & Lotze, M.T. Academic Press, 4^a Edición. Avon, pp. 962-967.

Lekovic, V., Camargo, P.M., Weinlaender, M., Vasilic, N. & Kenney, E.B. (2002) Comparison of platelet-rich plasma, bovine porous bone mineral, and guided tissue regeneration versus platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral in the treatment of intrabony defects: a reentry study. *Journal of Periodontology* **73**: 198-205.

Lekovic, V., Camargo, P.M., Weinlaender, M., Vasilic, N., Aleksic, Z. & Kenney, E.B. (2003) Effectiveness of a combination of platelet-rich plasma, bovine porous bone mineral and guided tissue regeneration in the treatment of mandibular grade II molar furcations in humans. *Journal of Clinical Periodontology* **30**: 746-751.

Lemons, P.P., Chen, D. & Whiteheart, S.W. (2000) Molecular mechanisms of platelet exocytosis: requirements for alpha-granule release. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **267**: 875-880.

Li, X., Ponten, A., Aase, K., Karlsson, L., Abramsson, A., Uutela, M., Backstrom, G., Hellstrom, M., Bostrom, H., Li, H., Soriano, P., Betsholtz, C., Heldin, C.H., Alitalo, K., Ostman, A. & Eriksson, U. (2000) PDGF-C is a new protease-activated ligand for the PDGF alpha-receptor. *Nature Cell Biology* **2**: 302-309.

Li, H., Zou, X., Xue, Q., Egund, N., Lind, M. & Bunger, C. (2004) Anterior lumbar interbody fusion with carbon fiber cage loaded with bioceramics and platelet-rich plasma. An experimental study on pigs. *European Spine Journal* **13**: 354-358.

Lodish, H., Berk, A., Zipursky, L.S., Matsudaira, P., Baltimore, D. & Darnell, J. (2000) Regulation of the eukaryotic cell cycle. In: *Molecular Cell Biology*. Ed.: Freeman W.H. & Co. 4ª Edición, New York.

Lowery, G.L., Kulkarni, S. & Pennisi, A.E. (1999) Use of autologous growth factors in lumbar spinal fusion. *Bone* **25(2 Suppl)**: 47S-50S.

Lozada, J.L., Caplanis, N., Proussaefs, P., Willardsen, J. & Kammeyer, G. (2001) Platelet-rich plasma application in sinus graft surgery: Part I--Background and processing techniques. *Journal of Oral Implantology* **27**: 38-42. – Pedir a Pablo, en trab de seno

Lynch, S.E., de Castilla, G.R., Williams, R.C., Kiritsy, C.P., Howell, T.H., Reddy, M.S. & Antoniades, H.N. (1991) The effects of short-term application of a combination of platelet-derived and insulin-like growth factors on periodontal wound healing. *Journal of Periodontology* **62**: 458-467.

Lyons, R.M., Keski-Oja, J. & Moses, H.L. (1988) Proteolytic activation of latent transforming growth factor-beta from fibroblast-conditioned medium. *Journal of Cell Biology* **106**: 1659-1665.

Mahendran, R., McIlhinney, R., O'Hare, M., Monaghan, P. & Gusterson, B. (1989) Expression of the common acute lymphoblastic leukaemia antigen (CALLA) in the human breast. *Molecular & Cellular Probes* **3**: 39-44.

Mallo-Pérez, L. & Sanz-Serrulla, J. (2004) Progreso en el arte y ciencia dental y bucal: Del ingenio a la tecnología. *RCOE* **9**: 667-681.

Man, D., Plosker, H. & Winland-Brown, J.E. (2001) The use of autologous platelet-rich plasma (platelet gel) and autologous platelet-poor plasma (fibrin glue) in cosmetic surgery. *Plastic & Reconstructive Surgery* **107**: 229-37; discussion 238-9.

Martin, P., Hopkinson-Woolley, J. & McCluskey, J. (1992) Growth factors and cutaneous wound repair. *Progress in Growth Factor Research* **4**: 25-44.

Martínez-Gonzalez, J.M., Cano-Sanchez, J., Gonzalo-Lafuente, J.C., Campo-Trapero, J., Esparza-Gomez, G. & Seoane, J. (2002) Do ambulatory-use Platelet-Rich Plasma (PRP) concentrates present risks? *Medicina Oral* **7**: 375-390. (Español)

Marx, R.E., Carlson, E.R., Eichstaedt, R.M., Schimmele, S.R., Strauss, J.E. & Georgeff, K.R. (1998) Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology & Endodontics* **85**: 638-646.

Marx, R.E. (2001) Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dentistry* **10**: 225-228.

Marx, R.E. (2004) Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *Journal of Oral & Maxillofacial Surgery* **62**: 489-496.

Massaro, A.R. (2002) The role of NCAM in remyelination. *Neurological Sciences* **22**: 429-435.

Matras, H. Chiari, F.M., Burkle, K. & Wickenhauser, J. (1978) [Surgical reconstruction of large dentigerous cyst cavities using bone transplants and fibrin glue] *Österreichische Zeitschrift für Stomatologie* **79**: 43-50. (Alemán)

Matras, H. (1982) The use of fibrin sealant in oral and maxillofacial surgery. *Journal of Oral & Maxillofacial Surgery* **40**: 617-622.

Matras, H. (1985) Fibrin seal: the state of the art. *Journal of Oral & Maxillofacial Surgery* **43**: 605-611.

Maupin, B. (1969) Blood platelets in man and animals. Ed. Pergamon Press. New York, pp. 106.

Mazor, Z., Peleg, M., Garg, A.K. & Luboshitz, J. (2004) Platelet-rich plasma for bone graft enhancement in sinus floor augmentation with simultaneous implant placement: patient series study. *Implant Dentistry* **13**: 65-72.

McKeehan, W.L., Wang, F. & Kan, M. (1998) The heparan sulfate-fibroblast growth factor family: diversity of structure and function. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* **59**: 135-176.

Menard, M., Meyers, K.M. & Prieur, D.J. (1990) Demonstration of secondary lysosomes in bovine megakaryocytes and platelets using acid phosphatase cytochemistry with cerium as a trapping agent. *Trombosis & Haemostasis* **63**: 127-132.

Merkx, M.A., Fennis, J.P., Verhagen, C.M. & Stoelinga, P.J. (2004) Reconstruction of the mandible using preshaped 2.3 mm titanium plates, autogenous particulate cortico-cancellous bone grafts and platelet rich plasma: a report on eight patients. *International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery* **33**: 733-739.

Metzgar, R.S., Borowitz, M.J., Jones, N.H. & Dowell, B.L. (1981) Distribution of common acute lymphoblastic leukemia antigen in nonhematopoietic tissues. *Journal of Experimental Medicine* **154**: 1249-1254.

Meyer-Ingold, W. & Eichner, W. (1995) Platelet-derived growth factor. *Cell Biology International* **19**: 389-398.

Milos, N.C. (1992) Mesoderm and jaw development in vertebrates: the role of growth factors. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* **4**: 73-91.

Moll, R., Franke, W.W., Schiller, D.L., Geiger, B. & Krepler, R. (1982) The catalog of human cytokeratins: Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* **31**: 11-24.

Morgorstern, E. (1997) Human platelet morphology/ultrastructure. En: Handbook of experimental pharmacology, vol 126. von Bruchhausen, F., Walter, U. (Editors). Springer Verlag Berlin. Heidelberg, pp:28-60.

Moses, H.L., Branum, E.L., Proper, J.A. & Robinson, R.A. (1981) Transforming growth factor production by chemically transformed cells. *Cancer Research* **41**: 2842-2848.

Mosesson, M.W., Siebenlist, K.R. & Meh, D.A. (2001) The structure and biological features of fibrinogen and fibrin. *Annals of the New York Academy of Science* **936**: 11-30.

Mosesson, M.W. (2005) Fibrinogen and fibrin structure and functions. *Journal of Thrombosis & Haemostasis* **3**: 1894-1904.

Moy, P.K., Lundgren, S., Holmes, R.E. (1993) Maxillary sinus augmentation: Histomorphometric analysis of graft materials for maxillary sinus floor augmentation. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **51**: 857-862.

Mumford, J.H., Carnes, D.L., Cochran, D.L. & Oates, T.W. (2001) The effects of platelet-derived growth factor-BB on periodontal cells in an in vitro wound model. *Journal of Periodontology* **72**: 331-340.

Mundy, G.R., Boyce, B., Hughes, D., Wright, K., Bonewald, L., Dallas, S., Harris, S., Ghosh-Choudhury, N., Chen, D., Dunstan, C., Izbicka, E. & Yoneda, T. (1995) The effects of cytokines and growth factors on osteoblastic cells. *Bone* **17(2 Suppl)**: 71S-75S.

Murray, A.W. (2004) Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell* **116**: 221-234.

Nagai, M., Sato, S., Kamoi, H. & Kamoi, K. (2005) Effects of application of platelet releasate in periodontal regeneration therapy. *International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry* **25**: 571-583.

Nakamura, T., Hanada, K., Tamura, M., Shibanushi, T., Nigi, H., Tagawa, M., Fukumoto, S., & Matsumoto, T. (1995) Stimulation of endosteal bone formation by systemic injections of recombinant basic fibroblast growth factor in rats. *Endocrinology* **136**: 1276-1284.

Nehls, V. & Herrmann, R. (1996) The configuration of fibrin clots determines capillary morphogenesis and endothelial cell migration. *Microvascular Research* **51**: 347-364.

Nimni, M.E. (1997) Polypeptide growth factors: targeted delivery systems. *Biomaterials* **18**: 1201-1225.

Nociti Jr, F.H., Stefani, C.M., Machado, M.A., Sallum, E.A., Toledo, S. & Sallum, A.W. (2000) Histometric evaluation of bone regeneration around immediate implants partially in contact with bone: a pilot study in dogs. *Implant Dentistry* **9**: 321-328.

Noda, M. & Vogel, R. (1989) Fibroblast growth factor enhances type beta 1 transforming growth factor gene expression in osteoblast-like cells. *Journal of Cell Biology* **109**: 2529-2535.

O'Keefe, E.J., Chiu, M.L. & Payne, R.E. Jr. (1988) Stimulation of growth of keratinocytes by basic fibroblast growth factor. *Journal of Investigation in Dermatology* **90**: 767-769.

Oates, T.W., Rouse, C.A. & Cochran, D.L. (1993) Mitogenic effects of growth factors on human periodontal ligament cells in vitro. *Journal of Periodontology* **64**: 142-148.

Ogino, Y., Ayukawa, Y., Kukita, T. & Koyano, K. (2006) The contribution of platelet-derived growth factor, transforming growth factor β -1 and insuline-like growth factor-I in platelet-rich plasma to the proliferation of osteoblast-like cells. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology & Endodontics* **101**: 724-729.

Ohya, M., Yamada, Y., Ozawa, R., Ito, K., Takahashi, M. & Ueda, M. (2005) Sinus floor elevation applied tissue-engineered bone. Comparative study between mesenchymal stem cells/platelet-rich plasma (PRP) and autogenous bone with PRP complexes in rabbits. *Clinical Oral Implants Reseach* **16**: 622-629.

Ojima, Y., Mizuno, M., Kuboki, Y. & Komori, T. (2003) In vitro effect of platelet-derived growth factor-BB on collagen synthesis and proliferation of human periodontal ligament cells. *Oral Diseases* **9**: 144-151.

Okuda, K., Kawase, T., Momose, M., Murata, M., Saito, Y., Suzuki, H., Wolff, L.F. & Yoshie, H. (2003) Platelet-rich plasma contains high levels of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta and modulates the proliferation of periodontally related cells in vitro. *Journal of Periodontology* **74**: 849-857.

Okuda, K., Tai, H., Tanabe, K., Suzuki, H., Sato, T., Kawase, T., Saito, Y., Wolff, L.F. & Yoshiex, H. (2005) Platelet-rich plasma combined with a porous hydroxyapatite graft for the treatment of intrabony periodontal defects in humans: a comparative controlled clinical study. *Journal of Periodontology* **76**: 890-898.

Oliva, E. (2004) CD10 expression in the female genital tract: does it have useful diagnostic applications? *Advances in Anatomic Pathology* **11**: 310-315.

Ornitz, D.M. & Itoh, N. (2001) Fibroblast growth factors. *Genome Biology* **2**: reviews3005.

Oyama, T., Nishimoto, S., Tsugawa, T. & Shimizu, F. (2004) Efficacy of platelet-rich plasma in alveolar bone grafting. *Journal of Oral Maxillofacial Surgery* **62**: 555-558.

Paques, M., Chastang, C., Mathis, A., Sahel, J., Massin, P., Dosquet, C., Korobelnik, J.F., Le Gargasson, J.F. & Gaudric, A. (1999) Effect of autologous platelet concentrate in surgery for idiopathic macular hole: results of a multicenter, double-masked, randomized trial. Platelets in Macular Hole Surgery Group. *Ophthalmology* **106**: 932-938.

Parise, L.V., Smyth, S.S. & Coller, B.S. (2005) Morfología bioquímica y función de las plaquetas. En: Hematología, Vol. 2. Beutler et al., eds. Ed.: Marbán. 6ª Edición, Madrid, pp. 1357-1408.

Parkar, M.H., Kuru, L., Giouzei, M. & Olsen, I. (2001) Expression of growth-factor receptors in normal and regenerating human periodontal cells. *Archives of Oral Biology* **46**: 275-284.

Partanen, J., Makela, T.P., Eerola, E., Korhonen, J., Hirvonen, H., Claesson-Welsh, L. & Alitalo, K. (1991) FGFR-4, a novel acidic fibroblast growth factor receptor with a distinct expression pattern. *EMBO Journal* **10**: 1347-1354.

Paulin, D. & Li, Z. (2004) Desmin: a major intermediate filament protein essential for the structural integrity and function of muscle. *Experimental Cell Research* **301**: 1-7.

Pesonen, K., Viinikka, L., Myllyla, G., Kiuru, J. & Perheentupa, J. (1989) Characterization of material with epidermal growth factor immunoreactivity in human serum and platelets. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **68**: 486-491.

Petrungaro, P.S. (2001) Using platelet-rich plasma to accelerate soft tissue maturation in esthetic periodontal surgery. *Compendium of Continuing Education in Dentistry* **22**: 729-732, 734, 736 passim; quiz 746.

Petrungaro, P.S. (2002) Treatment of the infected implant site using platelet-rich plasma. *Compendium of Continuing Education in Dentistry* **23**: 363-376.

Piche, J.E. & Graves, D.T. (1989) Study of the growth factor requirements of human bone-derived cells: a comparison with human fibroblasts. *Bone* **10**: 131-138.

Pierce, G.F., Mustoe, T.A., Altrrock, B.W., Deuel, T.F. & Thomason, A. (1991) Role of platelet-derived growth factor in wound healing. *Journal of Cellular Biochemistry* **45**: 319-326.

Pietrzak, W.S. & Eppley, B.L. (2005) Platelet rich plasma: biology and new technology. *Journal of Craniofacial Surgery* **16**: 1043-1054.

Plachokova, A.S., van der Dolder, J., Stoelinga, P.J. & Jansen J.A. (2006) The bone regenerative effect of platelet-rich plasma in combination with an osteoconductive material in rat cranial defects. *Clinical Oral Implants Research* **17**: 305-311.

Poltorak, Z., Cohen, T., Sivan, R., Kandelis, Y., Spira, G., Vlodavsky, I., Keshet, E. & Neufeld, G. (1997) VEGF145, a secreted vascular endothelial growth factor

isoform that binds to extracellular matrix. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 7151-7158.

Postlethwaite, A.E., Keski-Oja, J., Moses, H.L. & Kang, A.H. (1987) Stimulation of the chemotactic migration of human fibroblasts by transforming growth factor beta. *Journal of Experimental Medicine* **165**: 251-256.

Prosperi, E., Stivala, L.A., Scovassi, A.I. & Bianchi, L. (1997) Cyclins: relevance of subcellular localization in cell cycle control. *European Journal of Histochemistry* **41**: 161-168.

Pryor, M.E., Yang, J., Polimeni, G., Koo, K.T., Hartman, M.J., Gross, H., Agelan, A., Manns, J.M. & Wikesjo, U.M. (2005a) Analysis of rat calvaria defects implanted with a platelet-rich plasma preparation: radiographic observations. *Journal of Periodontology* **76**: 1287-1292.

Pryor, M.E., Polimeni, G., Koo, K.T., Hartman, M.J., Gross, H., April, M., Safadi, F.F. & Wikesjo, U.M. (2005b) Analysis of rat calvaria defects implanted with a platelet-rich plasma preparation: histologic and histometric observations. *Journal of Clinical Periodontology* **32**: 966-972.

Raghoobar, G.M., Schortinghuis, J., Liem, R.S., Ruben, J.L., van der Wal, J.E. & Vissink, A. (2005) Does platelet-rich plasma promote remodeling of autologous bone grafts used for augmentation of the maxillary sinus floor? *Clinical Oral Implants Research* **16**: 349-356.

Rall, L.B., Scott, J. & Bell, G.I. (1987) Human insulin-like growth factor I and II messenger RNA: isolation of complementary DNA and analysis of expression. *Methods in Enzymology* **146**: 239-248.

Reed, G.L. (2002) Platelet secretion. In: Platelets. Ed.: Michelson, A.D. Elsevier Science. 1ª Edición, San Diego, pp. 181-195.

Renau, J. & Megías, L. (1998) Manual de técnicas de microscopía electrónica (MET) Ed. Universidad de Granada. 1ª Edición, Granada.

Rendu, F. & Brohard-Bohn, B. (2001) The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets* **12**: 261-273.

Risau, W. (1997) Mechanisms of angiogenesis. *Nature* **386**: 671-674.

Robb-Smith, A.H. (1967) Why the platelets were discovered. *British Journal of Haematology* **13**: 618-637.

Roberts, H.R., Monroe III, D.M. & Hoffman, M. (2005) Biología molecular y bioquímica de los factores de la coagulación y de las vías de la hemostasia. En: Hematología, Vol. 2. Beutler et al., eds. Ed.: Marbán. 6ª Edición, Madrid, pp. 1357-1408.

Robey, P.G., Young, M.F., Flanders, K.C., Roche, N.S., Kondaiah, P., Reddi, A.H., Termine, J.D., Sporn, M.B. & Roberts, A.B. (1987) Osteoblasts synthesize and respond to transforming growth factor-type beta (TGF-beta) in vitro. *Journal of Cellular Biology* **105**: 457-463.

Robson, M.C., Phillips, L.G., Thomason, A., Robson, L.E. & Pierce, G.F. (1992) Platelet-derived growth factor BB for the treatment of chronic pressure ulcers. *Lancet* **339**: 23-25.

Rosenberg, E.S. & Torosian, J. (2000) Sinus grafting using platelet-rich plasma--initial case presentation. *Practical Procedures in Periodontics & Aesthetic Dentistry* **12**: 843-850.

Rosenkranz, S. & Kazlauskas, A. (1999) Evidence for distinct signaling properties and biological responses induced by the PDGF receptor alpha and beta subtypes. *Growth Factors* **16**: 201-216.

Ross, R., Glomset, J., Kariya, B. & Harker, L. (1974) A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **71**: 1207-1210.

Ross, R., Raines, E.W. & Bowen-Pope, D.F. (1986) The biology of platelet-derived growth factor. *Cell* **46**: 155-169.

Ross, M.H., Kaye, G.I. & Pawlina, W. (2004) La célula. En: Histología. Texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular. Ross et al., eds. Ed.: Panamericana, 4ª Edición. Buenos Aires, pp. 47-56.

Rossi, E.C. (1972) Comments on the early history of hemostasis. *Medicine Clinics of North America* **56**: 9-16.

Rothe, M. & Falanga, V. (1989) Growth factors. Their biology and promise in dermatologic diseases and tissue repair. *Archives of Dermatology* **125**: 1390-1398.

Rousou, J.A., Engelman, R.M. & Breyer, R.H. (1984) Fibrin glue: An effective hemostatic agent for nonsuturable intraoperative bleeding. *Annals of Thoracic Surgery* **38**: 409-410.

Rumalla, V.K. & Borah, G.L. (2001) Cytokines, growth factors, and plastic surgery. *Plastic & Reconstructive Surgery* **108**: 719-733.

Rutherford, R.B., Niekrash, C.E., Kennedy, J.E. & Charette, M.F. (1992) Platelet-derived and insulin-like growth factors stimulate regeneration of periodontal attachment in monkeys. *Journal of Periodontal Research* **27**: 285-290.

Salgado, R., Benoy, I., Bogers, J., Weytjens, R., Vermeulen, P., Dirix, L. & Van Marck, E. (2001) Platelets and vascular endothelial growth factor (VEGF): a morphological and functional study. *Angiogenesis* **4**: 37-43.

Sammartino, G., Tia, M., Marenzi, G., di Lauro, A.E, D'Agostino, E. & Claudio, P.P. (2005) Use of autologous platelet-rich plasma (PRP) in periodontal defect treatment after extraction of impacted mandibular third molars. *Journal of Oral & Maxillofacial Surgery* **63**: 766-770.

Sanchez, A.R., Sheridan, P.J. & Kupp, L.I. (2003a) Is platelet-rich plasma the perfect enhancement factor? A current review. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **18**: 93-103.

Sanchez, M., Azofra, J., Anitua, E., Andia, I., Padilla, S., Santisteban, J. & Mujika, I. (2003b) Plasma rich in growth factors to treat an articular cartilage avulsion: a case report. *Medicine & Science in Sports & Exercise* **35**: 1648-1652.

Sanchez, A.R., Sheridan, P.J., Eckert, S.E. & Weaver, A.L. (2005) Regenerative potential of platelet-rich plasma added to xenogenic bone grafts in peri-implant defects: A histomorphometric analysis in dogs. *Journal of Periodontology* **76**: 1637-1644.

Sarkar, M.R., Augat, P., Shefelbine, S.J., Schorlemmer, S., Huber-Lang, M., Claes, L., Kinzl, L. & Ignatius, A. (2006) Bone formation in a long bone defect model using a platelet-rich plasma-loaded collagen scaffold. *Biomaterials* **27**: 1817-1823.

Schaffner, P. & Dard, M.M. (2003) Structure and function of RGD peptides involved in bone biology. *Cellular & Molecular Life Sciences* **60**: 119-132.

Schlegel, K.A., Donath, K., Rupprecht, S., Falk, S., Zimmermann, R., Felszeghy, E. & Wiltfang, J. (2004) De novo bone formation using bovine collagen and platelet-rich plasma. *Biomaterials* **25**: 5387-5393.

Schluter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker MH, Key G, Flad HD, Gerdes J. (1993) The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *Journal of Cellular Biology* **123**: 513-522.

Schmitz, J.P. & Hollinger, J.O. (2001) The biology of platelet-rich plasma. *Journal of Oral & Maxillofacial Surgery* **59**: 1119-1121.

Schoenle, E., Zapf, J., Humbel, R.E. & Froesch, E.R. (1982) Insulin-like growth factor I stimulates growth in hypophysectomized rats. *Nature* **296**: 252-253.

Scholzen, T. & Gerdes, J. (2000) The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *Journal of Cellular Physiology* **182**: 311-322.

Seino, S., Seino, M., Nishi, S. & Bell, G.I. (1989) Structure of the human insulin receptor gene and characterization of its promoter. *Proceedures of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**: 114-118.

Seyedin, S.M., Segarini, P.R., Rosen, D.M., Thompson, A.Y., Bentz, H. & Graycar, J. (1987) Cartilage-inducing factor-B is a unique protein structurally and functionally related to transforming growth factor-beta. *Journal of Biological Chemistry* **262**: 1946-1949.

Shah, M., Revis, D, Herrick, S., Baillie, R., Thorgeirson, S., Ferguson, M. & Roberts, A. (1999) Role of elevated plasma transforming growth factor-beta1 levels in wound healing. *American Journal of Pathology* **154**: 1115-1124.

Shanaman, R., Filstein, M.R. & Danesh-Meyer, M.J. (2001) Localized ridge augmentation using GBR and platelet-rich plasma: case reports. *International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry* **21**: 345-355.

Sharma, J.N. & Mohsin, S.S. (1990) The role of chemical mediators in the pathogenesis of inflammation with emphasis on the kinin system. *Experimental Pathology* **38**: 73-96.

Shattil, S.J. (1999) Signaling through platelet integrin alpha IIb beta 3: inside-out, outside-in, and sideways. *Thrombosis & Haemostasis* **82**: 318-325.

Singh, J.P., Chaikin, M.A. & Stiles, C.D. (1982) Phylogenetic analysis of platelet-derived growth factor by radio-receptor assay. *Journal of Cellular Biology* **95**: 667-671.

Sixma, J.J., Slot, J.W. & Geuze, H.J. (1989) Immunocytochemical localization of platelet granule proteins. *Methods in Enzymology* **169**: 301-311.

Slater, M., Patava, J., Kingham, K. & Mason, R.S. (1995) Involvement of platelets in stimulating osteogenic activity. *Journal of Orthopaedic Research* **13**: 655-663.

Small, J.V. & Sobieszek, A. (1977) Studies on the function and composition of the 10-NM (100-A) filaments of vertebrate smooth muscle. *Journal of Cell Science*, **23**: 243-268.

Soffer, E., Ouhayoun, J.P. & Anagnostou, F. (2003) Fibrin sealants and platelet preparations in bone and periodontal healing. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology & Endodontics* **95**: 521-528.

Soma, Y. & Grotendorst, G.R. (1989) TGF-beta stimulates primary human skin fibroblast DNA synthesis via an autocrine production of PDGF-related peptides. *Journal of Cell Physiology* **140**: 246-253.

Sonnleitner, D., Huemer, P. & Sullivan, D.Y. (2000) A simplified technique for producing platelet-rich plasma and platelet concentrate for intraoral bone grafting techniques: a technical note. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **15**: 879-882.

Sporn, M.B., Roberts, A.B., Wakefield, L.M. & de Crombrughe, B. (1987) Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor-beta. *Journal of Cell Biology* **105**: 1039-1045.

Spritz, R.A., Strunk, K.M., Lee, S.T., Lu-Kuo, J.M., Ward, D.C., Le Paslier, D., Altherr, M.R., Dorman, T.E. & Moir, D.T. (1994) A YAC contig spanning a cluster

of human type III receptor protein tyrosine kinase genes (PDGFRA-KIT-KDR) in chromosome segment 4q12. *Genomics* **22**: 43143-43146.

Stathakis, N.E. & Mosesson, M.W. (1977) Interactions among heparin, cold-insoluble globulin, and fibrinogen in formation of the heparin-precipitable fraction of plasma. *Journal of Clinical Investigation* **60**: 855-865.

Stefani, C.M., Machado, M.A., Sallum, E.A., Sallum, A.W., Toledo, S. & Nociti, F.H. Jr. (2000) Platelet-derived growth factor/insulin-like growth factor-1 combination and bone regeneration around implants placed into extraction sockets: a histometric study in dogs. *Implant Dentistry* **9**: 126-131.

Steigmann, M. & Garg, A.K. (2005) A comparative study of bilateral sinus lifts performed with platelet-rich plasma alone versus alloplastic graft material reconstituted with blood. *Implant Dentistry* **14**: 261-266.

Stevens, A. & Lowe, J.S. (1998) *Histología Humana*. Ed. Harcourt Brace. 2ª Edición, Madrid.

Steiner, P.M. & Roop, D.R. (1988) Molecular and cellular biology of intermediate filaments. *Annual Reviews in Biochemistry* **57**: 593-525m

Sun, T.T., Tseng, S.C., Huang, A.J., Cooper, D., Schermer, A., Lynch, M.H., Weiss, R. & Elchner, R. (1985) Monoclonal antibody studies of mammalian epithelial keratins: A review. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **455**: 307-329.

Sun, Y., Zhang, W., Lu, Y., Hu, Y., Ma, F. & Cheng, W. (1996) Role of transforming growth factor beta (TGF-beta) in repairing of bone defects. *Chinese Medical Science Journal* **11**: 209-214.

Swain, B.T. & Ellis, C.N. (2004) Fibrin glue treatment of low rectal and pouch-anal anastomotic sinuses. *Diseases of the Colon & Rectum* **47**: 253-255.

Takeuchi, H., Awaji, M., Hashimoto, M., Nakano, Y., Mitsuhashi, N. & Kuwabara, Y. (1996) Reduction of adhesions with fibrin glue after laparoscopic excision of large ovarian endometriomas. *Journal of the American Association of Gynecologic Laparoscopists* **3**: 575-579.

Tashjian A.H. Jr. & Levine, L. (1979) Epidermal growth factor stimulates prostaglandin production and bone resorption in cultured mouse calvaria. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **85**: 966-975.

Tayapongsak, P., O'Brien, D.A., Monteiro, C.B. & Arceo-Diaz, L.Y. (1994) Autologous fibrin adhesive in mandibular reconstruction with particulate cancellous bone and marrow. *Journal of Oral & Maxillofacial Surgery* **52**: 161-165.

Terranova, V.P. & Wikesjo, U.M. (1987) Extracellular matrices and polypeptide growth factors as mediators of functions of cells of the periodontium. A review. *Journal of Periodontology* **58**: 371-380.

Terranova, V.P., Odziemiec, C., Tweden, K.S. & Spadone, D.P. (1989) Repopulation of dentin surfaces by periodontal ligament cells and endothelial cells. Effect of basic fibroblast growth factor. *Journal of Periodontology* **60**: 293-301.

Thesleff, I. & Tummers, M. (2003) Stem cells and tissue engineering: Prospects for regenerating tissues in dental practice. *Medical Principles and Practice* **12**: 43-50.

Thomas, R.A. (1987) Fibroblast growth factors. *FASEB Journal* **1**: 434-440.

Thor, A. (2002) Reconstruction of the anterior maxilla with platelet gel, autogenous bone, and titanium mesh: a case report. *Clinical Implant Dentistry & Related Research* **4**: 150-155.

Thorn, J.J., Sorensen, H., Weis-Fogh, U. & Andersen, M. (2004) Autologous fibrin glue with growth factors in reconstructive maxillofacial surgery. *International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery* **33**: 95-100.

Thorwarth, M., Wehrhan, F., Schultze-Mosgau, S., Wiltfang, J. & Schlegel, K.A. (2006) PRP modulates expression of bone matrix proteins in vivo without long-term effects on bone formation. *Bone* **38**: 30-40.

Tocantins, L.M. (1948) Historical notes on blood platelets. *Blood* **3**: 1073.

Tsay, R.C., Vo, J., Burke, A., Eisig, S.B., Lu, H.H. & Landesberg, R. (2005) Differential growth factor retention by platelet-rich plasma composites. *Journal of Oral & Maxillofacial Surgery* **63**: 521-528.

Ueda, M., Yamada, Y., Ozawa, R. & Okazaki, Y. (2005) Clinical case reports of injectable tissue-engineered bone for alveolar augmentation with simultaneous implant placement. *International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry* **25**: 129-137.

Vikjaer, D., Blom, S., Hjorting-Hansen, E. & Pinholt, E.M. (1997) Effect of platelet-derived growth factor-BB on bone formation in calvarial defects: an experimental study in rabbits. *European Journal of Oral Sciences* **105**: 59-66.

Vilcek, J. (2003) The cytokines: An overview. In: The cytokine handbook. Vol. 1 Eds.: Thomson, A.W. & Lotze, M.T. Academic Press, 4^a Edición. Avon, pp. 3-18.

Wagner, C.L., Mascelli, M.A., Neblock, D.S., Weisman, H.F., Coller, B.S. & Jordan, R.E. (1996) Analysis of GPIIb/IIIa receptor number by quantification of 7E3 binding to human platelets. *Blood* **88**: 907-914.

Wahl, S.M., Hunt, D.A., Wakefield, L.M., McCartney-Francis, N., Wahl, L.M., Roberts, A.B. & Sporn, M.B. (1987) Transforming growth factor type beta induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**: 5788-5792.

Wang, H.L., Pappert, T.D., Castelli, W.A., Chiego, D.J. Jr., Shyr, Y. & Smith, B.A. (1994) The effect of platelet-derived growth factor on the cellular response of the periodontium: an autoradiographic study on dogs. *Journal of Periodontology* **65**: 429-436.

Wartiovaara, U., Salven, P., Mikkola, H., Lassila, R., Kaukonen, J., Joukov, V., Orpana, A., Ristimaki, A., Heikinheimo, M., Joensuu, H., Alitalo, K. & Palotie, A. (1998) Peripheral blood platelets express VEGF-C and VEGF which are released during platelet activation. *Thrombosis & Haemostasis* **80**: 171-175.

Weibrich, G., Kleis, W.K., Kunz-Kostomanolakis, M., Loos, A.H. & Wagner, W. (2001) Correlation of platelet concentration in platelet-rich plasma to the extraction method, age, sex, and platelet count of the donor. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **16**: 693-699.

Weibrich, G., Kleis, W.K., Hafner, G. & Hitzler, W.E. (2002a) Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count. *Journal of Craniomaxillofacial Surgery* **30**: 97-102.

Weibrich, G., Buch, R.S., Kleis, W.K., Hafner, G., Hitzler, W.E. & Wagner, W. (2002b) Quantification of thrombocyte growth factors in platelet concentrates produced by discontinuous cell separation. *Growth Factors* **20**: 93-97.

Weibrich, G., Kleis, W.K., Hafner, G., Hitzler, W.E. & Wagner, W. (2003a) Comparison of platelet, leukocyte, and growth factor levels in point-of-care platelet-enriched plasma, prepared using a modified Curasan kit, with preparations received from a local blood bank. *Clinical Oral Implants Research* **14**: 357-362.

Weibrich, G., Kleis, W.K., Buch, R., Hitzler, W.E. & Hafner, G. (2003b) The Harvest Smart PRePTM system versus the Friadent-Schutze platelet-rich plasma kit. *Clinical Oral Implants Research* **14**: 233-239.

Weibrich, G., Hansen, T., Kleis, W., Buch, R. & Hitzler, W.E. (2004) Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone* **34**: 665-671.

Weibrich, G., Kleis, W.K., Hitzler, W.E. & Hafner, G. (2005) Comparison of the platelet concentrate collection system with the plasma-rich-in-growth-factors kit to produce platelet-rich plasma: a technical report. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **20**: 118-123.

Weisel, J.W. (2004) The mechanical properties of fibrin for basic scientists and clinicians. *Biophysical Chemistry* **112**: 267-276.

White, J.G. (1969) The dense bodies of human platelets: inherent electron opacity of the serotonin storage particles. *Blood* **33**: 598-606.

Whitman, D.H., Berry, R.L. & Green, D.M. (1997) Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *Journal of Oral & Maxillofacial Surgery* **55**: 1294-1299.

Wiltfang, J., Schlegel, K.A., Schultze-Mosgau, S., Nkenke, E., Zimmermann, R. & Kessler P. (2003) Sinus floor augmentation with beta-tricalciumphosphate (beta-TCP): does platelet-rich plasma promote its osseous integration and degradation? *Clinical Oral Implants Research* **14**: 213-218.

Wiltfang, J., Kloss, F.R., Kessler, P., Nkenke, E., Schultze-Mosgau, S., Zimmermann, R. & Schlegel, K.A. (2004) Effects of platelet-rich plasma on bone healing in combination with autogenous bone and bone substitutes in critical-size defects. An animal experiment. *Clinical Oral Implants Research* **15**: 187-193.

Wintrobe, M.M. et al. (1979a) Plaquetas y Megacariocitos: Fisiología de la hemostasis primaria. En *Hematología Clínica*, Tomo I. Eds.: Wintrobe, M.M. et al. Editorial Intermedica. 4ª Edición, Buenos Aires, pp. 376-413.

Wintrobe, M.M. et al. (1979b) Variaciones cuantitativas de las plaquetas en la enfermedad: Trombocitopenia y trombocitosis. En Hematología Clínica, Tomo II. Eds.: Wintrobe, M.M. et al. Editorial Intermedica. 4ª Edición, Buenos Aires, pp. 30-75.

World Medical Association Declaration of Helsinki, 2000. www.wma.net

Wright, J.H. (1910) The histogenesis of the blood platelets. *Journal of Morphology* **21**: 263.

Yamada, Y., Boo, J.S., Ozawa, R., Nagasaka, T., Okazaki, Y., Hata, K. & Ueda, M. (2003) Bone regeneration following injection of mesenchymal stem cells and fibrin glue with a biodegradable scaffold. *Journal of Craniomaxillofacial Surgery* **31**: 27-33.

Yamada Y, Ueda M, Naiki T, Takahashi M, Hata K, Nagasaka T. (2004) Autogenous injectable bone for regeneration with mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma: tissue-engineered bone regeneration. *Tissue Engineering* **10**: 955-964.

Yarden, Y., Escobedo, J.A., Kuang, W.J., Yang-Feng, T.L., Daniel, T.O., Tremble, P.M., Chen, E.Y., Ando, M.E., Harkins, R.N., Francke, U., Friend, V. A., Ullrich, A. & Williams, L. T. (1986) Structure of the receptor for platelet-derived growth factor helps define a family of closely related growth factor receptors. *Nature* **323**: 226-232.

Yazawa, M., Ogata, H., Nakajima, T., Mori, T., Watanabe, N. & Handa, M. (2003) Basic studies on the clinical applications of platelet-rich plasma. *Cell Transplantation* **12**: 509-518.

Yazawa, M., Ogata, H., Kimura, A., Nakajima, T., Mori, T. & Watanabe, N. (2004) Basic studies on the bone formation ability by platelet rich plasma in rabbits. *Journal of Craniofacial Surgery* **15**: 439-446.

Young, J.Z. & Medawar, P.B. (1940) Fibrin suture of peripheral nerves. *Lancet* **275**: 126.

Youssefian, T. & Cramer, E.M. (2000) Megakaryocyte dense granule components are sorted in multivesicular bodies. *Blood* **95**: 4004-4007.

Zhang, L., Leeman, E., Carnes, D.C. & Graves, D.T. (1991) Human osteoblasts synthesize and respond to platelet-derived growth factor. *American Journal of Physiology* **261(2 Pt 1)**: C348-C354.

Zhu, S.J., Choi, B.H., Huh, J.Y., Jung, J.H., Kim, B.Y. & Lee, S.H. (2006) A comparative qualitative histological analysis of tissue-engineered bone using bone marrow mesenchymal stem cells, alveolar bone cells, and periosteal cells. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology & Endodontics* **101**: 164-169.

Zimmermann, R., Jakubietz, R., Jakubietz, M., Strasser, E., Schlegel, A., Wiltfang, J. & Eckstein, R. (2001) Different preparation methods to obtain platelet components as a source of growth factors for local application. *Transfusion* **41**: 1217-1224.

Zola, H. (2001) Human leukocyte differentiation antigens as therapeutic targets: the CD molecules and CD antibodies. *Expert Opinion on Biological Therapy* **1**: 375-83.

Zola, H. & Swart, B. (2005) The human leucocyte differentiation antigens (HLDA) workshops: the evolving role of antibodies in research, diagnosis and therapy. *Cell Research* **15**: 691-694.

Zucker-Franklin, D. & Kaushansky, K. (1996) Effect of thrombopoietin on the development of megakaryocytes and platelets: an ultrastructural analysis. *Blood* **88**: 1632-1638.

Zwaal, R.F., Comfurius, P. & Bevers, E.M. (1992) Platelet procoagulant activity and microvesicle formation. Its putative role in hemostasis and thrombosis. *Biochimica et biophysica acta* **1180**: 1-8.
