

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Biología



TESIS DOCTORAL

Factores de crecimiento en concentrados de plaquetas

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Mónica Varela de Seijas Sapia

Directora

Nora Butta Coll

Madrid
Ed. electrónica 2019

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA



TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO EN CONCENTRADOS DE
PLAQUETAS**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR

MÓNICA VARELA DE SEIJAS SAPIA

Directora: Dra. Nora Butta Coll

MADRID 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**ESTUDIO DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO EN CONCENTRADOS DE
PLAQUETAS**

Tesis presentada por **MÓNICA VARELA DE SEIJAS SAPIA** para optar al grado de
Doctor por la Universidad Complutense de Madrid

Directora: Dra. Nora Butta Coll

Hospital Universitario La Paz – IdiPaz

Madrid, 2018



TRABAJO DE INVESTIGACIÓN PATROCINADO POR LA FUNDACIÓN BANCO
SANTANDER

La Dra. Nora Butta Coll, investigadora del Instituto para la Investigación Biomédica del Hospital Universitario La Paz (FIBHULP), Hospital Universitario La Paz - IdiPAZ,

Certifica que **Mónica Varela de Seijas Sapia** ha realizado bajo su dirección el trabajo "ESTUDIO DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO EN CONCENTRADOS DE PLAQUETAS".

Este trabajo reúne el interés y condiciones suficientes para considerarlo apto para su presentación como tesis doctoral en el Departamento de Biología de la Universidad Complutense de Madrid.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmamos el presente escrito en Madrid a 14 de Octubre de 2018.

Fdo Nora Butta Coll

Fdo Irene Gutierrez Cañas

A mi Mam.

Gracias por estar a mi lado.

Agradecimientos

A mi directora de tesis, Nora, que durante todo el proceso me acompañó, me ayudó y siempre estuvo a mi lado.

A Laura, por ser la chispa que encendió la mecha.

A Eduardo, Pablo y Carlota por su ayuda con los programas informáticos, sus ideas y su cariño.

A mis hermanas Rocío y Verónica por su interés, sus enseñanzas y sus comentarios, siempre dispuestas a echarme una mano. Y porque mis alegrías y mis logros son siempre los suyos.

Al Centro de estudios Neurológicos por ayudarme en mi trabajo durante todo este tiempo para que pudiera terminar la tesis.

A los pacientes que desde un primer momento se ofrecieron amablemente a participar en el estudio.

A Esther, Constanza, Elvira, Kiko, Mónica y a todos aquellos que, de una u otra manera, me han animado y han estado pendientes durante todo este tiempo.

ÍNDICE DE MATERIAS

Índice de Materias	13
Abreviaturas	21
Lista de figuras	29
Lista de tablas	33
Resumen	37
1. Introducción	54
1.1 Características de las Plaquetas	59
1.1.1 Maduración del megacariocito.....	61
1.1.2 Formación de proplaquetas	62
1.1.3 Estructura de las plaquetas.....	64
1.1.4 Mecanismo de activación y liberación de plaquetas.	69
1.1.5 Secreción de gránulos plaquetarios... ..	74
1.1.6 Papel de las plaquetas en la inflamación.. ..	77
1.1.7 Elementos proinflamatorios en las plaquetas.	77
1.2. Factores de crecimiento derivados de las plaquetas	82
1.2.1 PDGF	84
1.2.2 EGF.....	85

1.2.3 TGF- β	85
1.2.4 IGF	87
1.2.5 VEGF	88
1.3 Trombocitopenia inmune	88
1.4 Acción del plasma rico en plaquetas (PRP)	101
1.5 Sistemas de obtención del PRP	102
1.5.1 Obtención de PRP para su utilización clínica	103
1.1.6. Usos clínicos del PRP	107
2. Hipótesis	112
3. Objetivos	116
4. Materiales y métodos	120
4.1 Descripción de los pacientes incluidos en el estudio.	120
4.2 Preparación de las muestras	124
4.3. Análisis de las muestras	124
4.4. Determinación de los niveles de PDGF y TGF - β en plaquetas.....	124
4.5. Determinación de de funcionalidad y activación plaquetaria..	125
4.6. Análisis estadístico.....	127

5. Resultados	128
5.1 Características de los pacientes.....	130
5.2 Análisis del factor PDGF	132
5.2.1 Género.....	132
5.2.2 Edad	133
5.2.3 Género – edad.	134
5.2.4 Tabaco.....	135
5.2.5 Tabaco – Género.....	135
5.2.6 Alcohol	137
5.2.7 Alcohol – género.....	138
5.2.8 Deporte.....	139
5.2.9 Deporte – Género.	140
5.2.10. Antidepresivo.....	141
5.2.11. Antidepresivos – género.	142
5.2.12. Anticomiciales.	144
5.2.13. Anticomiciales – género	144
5.3 Análisis del factor TGF-β	146
5.3.1 Género	146
5.3.2 Edad.	146
5.3.3 Género – edad.....	147
5.3.4 Tabaco	147

5.3.5 Tabaco – Género	151
5.3.6. Alcohol.....	152
5.3.7 Alcohol – género.....	153
5.3.8 Deporte.	154
5.3.9 Deporte – Género.....	155
5.3.10 Antidepresivos..	157
5.3.12 Antidepresivos – edad.	158
5.3.13 Antidepresivos – género	159
5.3.14. Anticomiciales.	160
5.3.14. Anticomiciales – edad	161
5.3.15 Anticomiciales – género	162
5.4. Características de los pacientes con PTI	165
5.4.1 Estudio de la funcionalidad plaquetaria	166
5.4.2 Estudio de la capacidad de liberar gránulos de las plaquetas de los pacientes con PTI.	168
6. Discusión.....	170
6.1. Influencia de la edad y el género en los niveles de PDGF y TGF- β	175
6.2. Influencia del tabaco en los niveles de PDGF y TGF- β	177
6.3. Influencia del alcohol en los niveles de PDGF y TGF- β	179
6.4. Influencia de los antidepresivos en los niveles de PDGF y TGF- β	181
6.5. Influencia de los anticomiciales en los niveles de PDGF y TGF- β	181

6.6. Influencia del deporte en los niveles de PDGF y TGF- β	186
6.7 Influencia de la PT en los niveles de PDGF y TGF- β	189
7. Conclusiones.....	192
8. Referencias.....	196

ABREVIATURAS

Abreviaturas

mAbs: Anticuerpos monoclonales

ADP: Adenosín difosfato

APRIL: Ligando Inductor de la Proliferación del Linfocito B

ARN: Ácido ribonucleico

AR-TPO: Agonistas del Receptor de la Trombopoyetina

BAFF: Factor Activador de Linfocitos B

BAFF-R: Receptor para el BAFF

CD40L: CD40 ligando

CMF: Citometría de flujo

CPA: Célula Presentadora de Antígenos

eTPO: Trombopoyetina endógena

F: Factor

Fc: Fracción constante

Fg: Fibrinogeno

FT: Factor Tisular

FcγRs: Receptores para la fracción constante de las Ig

MKs: Megacariocitos

MPs: Micropartículas

OMS: Organización Mundial de la Salud

PBS: Tampón fosfato salino

PDGF: Factor de Crecimiento Derivado de las Plaquetas

PFP: Plasma libre de plaquetas

PLs: Fosfolípidos

PPP: Plasma pobre en plaquetas

PRP: Plasma rico en plaquetas

PS: Fosfatidilserina

PTI: Trombocitopenia Inmune

Pts: Plaquetas

R-TPO: receptor de la trombopoyetina

sCD40L: CD40 ligando soluble

SER: Sistema retículo-endotelial

TCR: Receptor de linfocitos T

Th: linfocitos T colaboradores

TNF α : Factor de necrosis tumoral α .

TPO: Trombopoyetina

TRAP: Péptido Activador del Receptor de la Trombina

Treg: Linfocito T regulador

TXA₂: Tromboxano A₂

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana

LISTA DE FIGURAS

Lista de Figuras

Figura 1. Elementos de la sangre	60
Figura 2. Formación de plaquetas	63
Figura 3. Morfología plaquetaria	65
Figura 4. Receptores de la membrana plaquetaria	66
Figura 5. Papel de las plaquetas en la hemostasia	71
Figura 6. Receptor del fibrinógeno..	72
Figura 7. Mecanismo de acción por el cual los gránulos se unen a la membrana plaquetaria para liberar su contenido.....	75
Figura 8. Estructura de PDGF –A y PDGF -.....	84
Figura 9. Estructura TGF – β 1	86
Figura 10. Principales acciones biológicas de TGF - β	87
Figura 11. Destrucción de plaquetas mediada por anticuerpos.....	91
Figura 12. Interacciones entre las células de la inmunidad innata y los linfocitos B.	93
Figura 13. Interacciones entre las células implicadas en la respuesta inmune en los pacientes con PTI.....	95
Figura 14. Características estructurales de la apoptosis en las plaquetas de pacientes con PTI.....	97
Figura 15. Mecanismo simplificado de señalización para los glucocorticoides.....	99

Figura 16. Proceso de regeneración o reparación tras la agresión a un tejido.	104
Figura 17. Diagrama esquemático del proceso de curación las heridas.....	108
Figura 18. Esquema de obtención del PRP.....	124
Figura 19. Análisis del factor PDGF respecto del género.....	131
Figura 20. Análisis del factor PDGF respecto de la edad.....	132
Figura 21. Análisis del factor PDGF respecto del género y la edad.....	133
Figura 22. Análisis del factor PDGF en individuos fumadores y no fumadores.....	134
Figura 23. Análisis del factor PDGF respecto del género en individuos fumadores y no fumadores.....	135
Figura 24. Análisis del factor PDGF en función del consumo de alcohol.....	136
Figura 25. Análisis del factor PDGF respecto del género y el consumo de alcohol.....	137
Figura 26. Análisis del factor PDGF respecto de la práctica de deporte.....	138
Figura 27. Análisis del factor PDGF respecto del género y la práctica de deporte.....	139
Figura 28. Análisis del factor PDGF respecto a la toma de antidepresivos.....	141
Figura 29. Análisis del factor PDGF respecto del género y la medicación con antidepresivos.....	142
Figura 30. Análisis del factor PDGF en relación a la medicación con anticomiciales.....	143

Figura 31. Análisis del factor PDGF y el género respecto a la medicación con anticomiciales.....	144
Figura 32. Análisis del factor TGF- β respecto del género.....	145
Figura 33. Análisis del factor TGF- β respecto de la edad.....	146
Figura 34. Análisis del factor TGF- β respecto del género y la edad....	147
Figura 35. Análisis del factor TGF- β en individuos fumadores y no fumadores.....	148
Figura 36. Análisis del factor TGF- β respecto del género y el hábito de fumar.....	150
Figura 37. Análisis del factor TGF- β respecto del consumo de alcohol.....	151
Figura 38. Análisis del factor TGF- β respecto del género y el consumo de alcohol.....	152
Figura 39. Análisis del factor TGF- β respecto de la práctica de deporte.....	154
Figura 40. Análisis del factor TGF- β respecto del género y la práctica de deporte.....	155
Figura 41 . Análisis del contenido de factor TGF- β en las plaquetas respecto a la medicación con antidepresivos	156
Figura 42. Análisis del contenido de factor TGF- β en las plaquetas respecto de la edad y la medicación con antidepresivos.....	157
Figura 43. . Análisis del contenido de factor TGF- β en las plaquetas respecto del género y la medicación con antidepresivos.....	159
Figura 44. Análisis del contenido de factor TGF- β en las plaquetas respecto y la medicación con anticomiciales.....	160
Figura 45.. Análisis del contenido de factor TGF- β en las plaquetas respecto de la edad y la	

medicación con anticomiciales.....	161
Figura 46. Análisis del contenido de factor TGF- β en las plaquetas respecto del género y la medicación con anticomiciales.....	163
Figura 47. Recuento de plaquetas	165
Figura 48.Unión de PAC1 a la superficie de las plaquetas.....	166
Figura 49. Expresión del receptor del fibrinógeno en la superficie de las plaquetas.....	167
Figura 50. Expresión de P-selectina y de CD63 en la superficie de las plaquetas.....	168
Figura 51. Contenido de PDGF α y de TGF- β de las plaquetas.	168

LISTA DE TABLAS

Lista de Tablas

Tabla 1. GPs de la membrana plaquetaria que participan en la adhesión y en el inicio de la agregación con sus ligandos correspondientes.....	67
Tabla 2. Sustancias con función inflamatoria e inmunológica que se hayan almacenadas en las plaquetas.....	79
Tabla 3. Micro RNAs plaquetarios.....	80
Tabla 4. Origen y acción de los principales factores de crecimiento.....	83
Tabla 5. Características de los pacientes del estudio	130
Tabla 6. Características de los pacientes con PTI	164

RESUMEN

ANTECEDENTES

Durante la coagulación se desencadenan reacciones en las que las células sanguíneas quedan atrapadas en una malla de fibrina. Entre estas células se encuentran las plaquetas, que no sólo tienen como función el taponamiento de los vasos sanguíneos, sino que también intervienen en la reparación y la regeneración tisular porque en su interior se almacenan proteínas que catalizan los procesos de cicatrización.

Entre los factores plaquetarios más estudiados están el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento similar a la insulina, el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), el factor de crecimiento vascular que interviene en la neovascularización, el factor de crecimiento epidérmico, el factor de crecimiento de los fibroblastos, etc. De todos estos, los que se encuentran en mayor concentración en las plaquetas son el PDGF y el (TGF- β). Los factores de crecimiento son sustancias que generan señales bioquímicas capaces de modificar las respuestas de las células del organismo. Están involucrados en el control del crecimiento y en la diferenciación celular. Dado que las plaquetas son fuente de factores de crecimiento, el PRP se usa para la regeneración ósea, la cicatrización de heridas cutáneas y en traumatología. También se utiliza en cirugía oftálmica, cardiopulmonar, maxilofacial y en odontología.

En particular nos centraremos en dos de ellos: el PDGF y el TGF- β

El PDGF participa en la glucogénesis, regula el crecimiento y la diferenciación celular en el sistema nervioso central durante el desarrollo, favorece la producción de la matriz extracelular y la quimiotaxis de fibroblastos, monocitos, células musculares y macrófagos, estimula la producción de la fibronectina utilizada durante la proliferación y

la migración celular en la cicatrización, e interviene en la reparación tisular al estimular la angiogénesis aumentando la mitosis endotelial.

Los miembros de la familia del TGF β regulan diferentes funciones celulares como la proliferación, la apoptosis, la diferenciación, la migración y tienen un papel clave en el desarrollo del organismo. El TGF- β está implicado en varias patologías humanas, incluyendo desórdenes autoinmunes y vasculares, así como enfermedades fibróticas y cáncer.

HIPÓTESIS

Las plaquetas son el mayor reservorio de estos factores de crecimiento, por lo tanto, factores que puedan modificar la función o la vida media de las plaquetas podrían tener influencia sobre los niveles de PDGF y TGF β

OBJETIVO

El objetivo general de este trabajo fue determinar si el género, la edad, los hábitos de vida y la medicación influían en los niveles de los factores de crecimiento PDGF y TGF β plaquetarios. También incluimos en el estudio un grupo de pacientes con trombocitopenia inmune (PTI) ya que en esta patología hay una producción disminuida y una destrucción periférica aumentada de las plaquetas.

MÉTODO

Se trata de un estudio prospectivo, observacional y transversal.

Se incluyeron;

A) 80 individuos entre 18 y 78 años que se estratificaron en los siguientes grupos:

- 1) menores de 35 años, entre 35- 55 años y mayores de 55 años
 - 2) 36 hombres, 44 mujeres.
 - 3) 15 fumadores, 65 no fumadores
 - 4) 25 consumen alcohol, 55 no.
 - 5) 38 no practican deporte, 24 de forma ocasional y 18 son deportistas.
 - 6) 5 individuos que toman antidepresivos, 6 individuos toman anticomiciales
- B) 30 pacientes con PTI y 25 individuos sanos.

Variables:

- 1) PDGF y TGF- β : se determinaron por ELISA en el lisado de las plaquetas.
- 2) **Receptores de adhesión en la superficie plaquetaria:** los receptores de fibrinógeno (GPIIb/IIIa) y del factor de vonWillebrand (GPIb/GPV/GPIX) presentes en la superficie de las plaquetas se evaluaron por citometría de flujo.
- 3) **Función plaquetaria.** La función de las plaquetas se evaluó activándolas con un agonista del receptor de trombina (el TRAP) y midiendo la activación del receptor de fibrinógeno y la exposición de P-selectina y CD63 en la superficie de las plaquetas por citometría de flujo.

RESULTADOS

Efecto de la EDAD Y el GÉNERO sobre el contenido plaquetario de PDGF y de TGF- β 1: Los niveles de TGF β 1 fueron superiores en las plaquetas de las mujeres ($P = 0,038$). El contenido de PDGF fue similar en las plaquetas de los hombres y en las de las mujeres-

Efecto del TABACO sobre el contenido plaquetario de PDGF y de TGF- β 1: No se observaron diferencias significativas entre individuos fumadores y no fumadores, sin embargo los niveles de TGF- β mostraban una tendencia a ser superiores en individuos no fumadores.

Efecto del consumo de ALCOHOL sobre el contenido plaquetario de PDGF y de TGF- β 1: Los individuos que consumían alcohol, ya sea de forma ocasional o habitual tendían a presentar niveles de TGF- β 1 superiores a las de los individuos que no consumían alcohol, independientemente del género y la edad ($P = 0,084$).

Efecto de los tratamientos con ANTIDEPRESIVOS sobre sobre el contenido plaquetario de PDGF y de TGF- β : En este estudio apreciamos que la medicación con antidepresivos no modificaba el contenido endógeno de PDGF y de TGF- β .

Efecto de los tratamientos con ANTICOMICIALES sobre el contenido plaquetario de PDGF y de TGF- β : Los niveles de PDGF no se ven afectados por el tratamiento con anticomiciales. Sin embargo, dado que la muestra de individuos sometidos a tratamiento es pequeña, sería interesante un estudio con mayor número de pacientes

Efecto de la práctica de DEPORTE sobre sobre el contenido plaquetario de PDGF y de TGF- β 1: Los niveles de PDGF no variaron con la frecuencia o el tipo de ejercicio realizado. Sin embargo observamos una tendencia al descenso en los niveles de TGF- β 1 a medida que aumenta la frecuencia con la que se practica el deporte.

Caracterización de las plaquetas de los pacientes con PTI

- 1- Número de plaquetas:** los pacientes con PTI tenían menos plaquetas que los controles sanos.
- 2- Capacidad de activación:** El receptor de fibrinógeno de las plaquetas de los pacientes con PTI era menos susceptible a la activación con TRAP que las del grupo control ($p < 0.05$ en ambos casos). La exposición en superficie de P-selectina y de CD63 en condiciones basales y tras activación con TRAP fue similar en las plaquetas de los pacientes con PTI y en las de los controles sanos.
- 3- Receptores de superficie:** la disminución de la capacidad de activación de las plaquetas a una disminución en la cantidad de los receptores de fibrinógeno en las plaquetas de los pacientes con PTI.
- 4- Contenido de los factores de crecimiento en las plaquetas de los pacientes con PTI:** No observamos diferencias en los niveles de TGF- β entre las plaquetas de los pacientes con PTI y las del grupo control. Por el contrario los niveles de PDGF en las plaquetas de los pacientes con PTI son mayores que las del grupo control.

CONCLUSIONES

El contenido de PDGF de las plaquetas no se vio influido ni por el género ni por la edad, sin embargo el TGF- β plaquetario es mayor en mujeres jóvenes que en hombres del mismo rango de edad. Tampoco se observaron diferencias en los niveles plaquetarios de

PDGF y de TGF- β entre individuos fumadores y no fumadores, ni en aquellos que consumen alcohol, ni en los práctica de deporte.

Noobsevamos diferencias entre los individuos medicados con antidepresivos o anticomiciales.

Los pacientes con PTI no presentaron variaciones en los niveles de de TGF- β pero si presentaron un aumento en los niveles de PDGF.

Si bien nuestros resultados no muestran que los niveles de expresión en plaquetas de PDGF y de TGF- β estén fuertemente regulados por hábitos y ciertas medicaciones, creemos recomendable realizar un estudio en una cohorte más numerosa, debido a la importancia de estos factores en medicina reparativa.

ABSTRACT

BACKGROUND

During coagulation reactions are triggered in which the blood cells are trapped in a fibrin mesh. Among these cells are the platelets, which not only have the function of plugging the blood vessels, but also intervene in tissue repair and regeneration because proteins that catalyze the healing processes are stored inside.

Platelet-derived growth factor, insulin-like growth factor, beta-transforming growth factor, vascular growth factor involved in neovascularization, epidermal growth factor, and other factors are the most studied platelet factors. growth factor of fibroblasts, etc. Of all these, those that are in greater concentration in the platelets are the transforming growth factors beta, the derivative of the platelets and the one of vascular growth.

Since platelets are a source of growth factors, PRP is used for bone regeneration, skin wound healing and in traumatology treatments. It is also used in ophthalmic, pulmonary cardio, maxillofacial and dental surgery.

Growth factors are substances that generate biochemical signals capable of modifying the responses of the body's cells. They are involved in the control of growth and cell differentiation. Most growth factors are found in the blood, especially stored in platelets. In particular, we will focus on two of them: PDGF and TGF β .

PDGF: Its actions include its participation in glycogenesis, growth regulation and cell differentiation in the central nervous system during development, it favors the production of the extracellular matrix and the chemotaxis of fibroblasts, monocytes, muscle cells and macrophages, stimulates the production of fibronectin used during proliferation and cell migration in cicatrization, and intervenes in tissue repair by stimulating angiogenesis by

increasing the endothelial mitosis.

TGF β : Members of this family regulate different cellular functions such as proliferation, apoptosis, differentiation, migration and have a key role in the development of the organism. TGF- β is implicated in several human pathologies, including autoimmune and vascular disorders, as well as fibrotic diseases and cancer.

HYPOTHESIS

Platelets are the major source of these growth factors, therefore, factors that may modify the function or half-life of platelets could have an influence on the levels of PDGF and TGF β .

OBJECTIVE

The objective of this study was to establish whether gender, age, lifestyle habits and medication influenced the levels of platelet PDGF and TGF - β growth factors. We also included in the study a group of patients with immune thrombocytopenia (ITP) since in this pathology there is a decreased production and an increased peripheral destruction of platelets.

METHOD

It is an observational and transversal study.

It was included 80 individuals between 18 and 78 years who were divided into the following groups:

- 1) under 35 years, between 35-55 years and over 55 years.
- 2) 36 men, 44 women.

- 3) 15 smokers, 65 non-smokers.
- 4) 25 consume alcohol, 55 no.
- 5) 38 do not practice sports, 24 occasionally and 18 are athletes.
- 6) 5 individuals taking antidepressants, 6 individuals take anticonvulsants.
- 7) 30 patients with ITP and 25 healthy individuals.

Variables:

- 1) PDGF and TGF- β : were determined by ELISA in platelet lysate.
- 2) **Platelet surface adhesion receptors:** the fibrinogen receptors (aIIb / bIII) and the vonWillebrand factor (GPIIb / GPV / GPIX) present on the surface of the platelets were evaluated by incubating the PRP with specific monoclonal antibodies (mAbs) against the subunits of these receptors, marked with fluorescein (FITC) or with phycoerythrin (PE) and analyzed by flow cytometry.
- 3) **Platelet function:** The function of the platelets was evaluated by activating them with an agonist thrombin receptor (the TRAP) and by measuring the activation of the fibrinogen receptor and the exposure of P-selectin and CD63 on the surface of the platelets . For this rich plasma was used in platelets (PRP) diluted with HEPES buffer that was incubated at room temperature and with buffer (basal condition) or with TRAP (stimulated condition). After incubation it was added PAC1, mAb that recognized only the active form of the fibrinogen receptor or anti-P-selectin or anti-CD63 mAbs, all them labeled with FITC. Subsequently, they were analyzed by flow cytometry.

RESULTS

Effect of AGE AND GENDER on the platelet content of PDGF and TGF- β : TGF- β 1 levels were higher in the platelets of women ($P = 0.038$). The content of PDGF was similar in platelets from men and women. In men there was an inverse relationship between age and PDGF content, while in women PDGF concentration increased with age to reach values similar to males at menopause ($p > 0.05$).

Effect of TOBACCO on the platelet content of PDGF and TGF β 1: No significant differences were observed between smokers and non-smokers, however the levels of TGF- β 1 showed a tendency to be higher in non-smokers. .

Effect of ALCOHOL consumption on the platelet content of PDGF and TGF- β 1: Individuals who consumed alcohol, either occasionally or habitually, had higher levels of TGF- β 1 than individuals who did not consume alcohol, regardless of gender and age ($P = 0.084$).

Effect of treatments with ANTIDEPRESSANTS on the platelet content of PDGF and TGF- β 1: In this study, we observed that medication with antidepressants did not modify the endogenous content of PDGF and TGF- β .

Effect of the treatments with ANTICOMICIALS on the platelet content of PDGF and TGF- β : PDGF levels are not affected by anticonvulsant treatment. However, given that the sample of individuals subjected to treatment is small, a study with a greater number of patients would be interesting.

Effect of the practice of SPORT on the platelet content of PDGF and TGF- β 1: The levels of PDGF did not vary with the frequency or type of exercise performed. However, we observe

a tendency to decrease levels of TGF - β 1 with the frequency in which the practiced of sports increases.

Characterization of platelets from patients with ITP

1. **platelet count:** Patients with ITP had fewer platelets than healthy controls
2. **Activation capacity:** Platelets from patients with ITP bound less PAC1 than those in the control group both at baseline conditions and after activation with TRAP ($p < 0.05$ in both cases) Surface exposure of P-selectin and CD63 under basal conditions and after activation with TRAP were similar in platelets from patients with ITP and from healthy controls.
3. **Surface receptors:** the decrease in PAC-1 binding was not due to a decrease in the amount of fibrinogen receptors in the platelets of patients with ITP.
4. **Content of growth factors in platelets from patients with ITP:** Platelet content of TGF- β was similar in platelets from patients with ITP and from healthy controls. In contrast, levels of PDGF in the platelets from patients with ITP were higher than those found in platelets from the control group

CONCLUSIONS

The PDGF content of the platelets was not influenced by gender or age, however the platelet TGF- β is higher in young women than in men of the same age range. No differences were observed in the platelet levels of PDGF and TGF- β between smokers and non-smokers, or those who consume alcohol, or in sports.

We do not see differences between medicated individuals with antidepressants or anticonvulsants.

Patients with ITP did not present variations in TGF- β levels but did show an increase in PDGF levels.

Although our results do not show that the platelet expression levels of PDGF and TGF- β are strongly regulated by habits and certain medications, we believe it is advisable to conduct a study in a larger cohort, due to the importance of these factors in reparative medicine.

1. INTRODUCCIÓN

De los elementos celulares que forman la sangre, la plaqueta fue el último en ser descubierto. Probablemente fue el inglés William Hewson (1739–1774) el primero en observar las plaquetas.

Durante el siglo XIX, numerosos observadores reportaron la presencia en la sangre de corpúsculos más pequeños que los glóbulos rojos y los glóbulos blancos a los que llamaron el “polvo de la sangre” [1, 2, 3, 4], pero se considera que el francés Alfred Donné (1801–1882) y el inglés George Gulliver (1804–1882) fueron los primeros en hacerlo.

En 1842 William Addison (1822–1881) describió a las plaquetas en su trabajo “sobre los corpúsculos pálidos.... en la sangre” [1, 3, 5, 6].

En 1845 Friederich Arnold (1803–1890) fue el primer anatomista en reconocer e ilustrar las plaquetas.

Gustav Zimmermann, en 1846, describió “billones de ciertos corpúsculos incoloros” que tendían a agruparse y los llamó “cuerpos elementales”. El mismo fenómeno fue observado por en 1862 por Max Schultze (1825–1874) quien los llamó “pequeños elementos” [1, 3, 5]. Riess en 1872 fue el primero en intentar contarlas y observó que éstas se encontraban disminuidas en la anemia perniciosa [1, 3, 5].

En 1873, Edme Felix Alfred Vulpian (1826–1887) describió la propiedad de estos cuerpos incoloros de la sangre de adherirse al vidrio y de formar agregados [5].

William Osler (1849–1919) en 1874 fue el primero en observar que las plaquetas se encontraban como unidades en la circulación y que se podían acumular [6]. En 1878, George Hayem (1841–1935), fue el primero en obtener recuentos de plaquetas muy similares a las aceptadas en la actualidad y en 1882 concluyó que los agregados de las plaquetas jugaban un papel importante para detener la salida de la sangre de los vasos y

que una disminución en su número o su ausencia provocaban una hemorragia.

Hayem empleó por primera vez el término “plaquette” en 1883 [7,8] y Giulio Biozzozero (1841–1901) aisló plaquetas de los trombos y observó que la hemostasia y la trombosis son procesos análogos [4,9].

En 1885 Schimmelbusch describió los cambios morfológicos que sufren las plaquetas cuando un vaso es dañado y se exponen superficies de composición diferente de las que se encuentran en el vaso sin lesión.

En 1886, Eberth observó que la estasis del flujo sanguíneo producía un depósito de plaquetas en la pared del vaso formando un “trombo rojo”, fenómeno al que denominó “metamorfosis viscosa” de las plaquetas [10,11].

En 1906, James Homer Wright (1869–1928) descubrió que los megacariocitos de la médula ósea daban lugar a las plaquetas una vez se ha producido la fragmentación de su citoplasma [12].

En 1994, un grupo de cirujanos en una reconstrucción mandibular utilizó un adhesivo de fibrina autógena al hueso esponjoso. Para ello separaron de una muestra de sangre sus componentes y emplearon la fracción plasmática como crioprecipitado, observando una consolidación ósea precoz, que se atribuyó al mayor número de células osteocompetentes que quedaban en la red de fibrina [13].

En 1997, Whitman presentó una alternativa autóloga al adhesivo de fibrina en cirugía oral y maxilofacial, el gel de plaquetas, utilizándolo no solo como adhesivo tisular sino también como procedimiento para la consolidación inicial de injertos cortico- esponjosos en los maxilares [14].

Más adelante Marx y cols. observaron que el PRP aumentaba la concentración de plaquetas en los injertos, observándose la presencia de al menos tres factores de crecimiento: PDGF y TGF- β 1 y 2, viendo además que las células esponjosas tenían

receptores para estos factores de crecimiento [15].

Existen varios trabajos que hablan de la utilidad del plasma en regeneración ósea [16], cicatrización de heridas cutáneas [17] y en traumatología. [18,19] También se utiliza en cirugía oftálmica [20,21], en cirugía cardiopulmonar [22], en cirugía maxilofacial y en odontología [23, 24, 25].

También se ha propuesto el uso del concentrado de plaquetas es como alimento de células madre, ya que aumenta la supervivencia de las colonias celulares [26].

También existen trabajos que vislumbran posibles efectos secundarios por el uso indiscriminado del plasma con plaquetas y que aportan un punto de vista diferente a la mayoría de los artículos publicados al respecto [27,28].

La agresión a los tejidos produce su alteración, a lo que el organismo responde poniendo en marcha una serie de mecanismos para recuperar el tejido afectado. Dicho proceso comienza siempre con la aparición de un coágulo sanguíneo en la zona en donde se ha producido el daño tisular que aporta las proteínas necesarias para generar un tejido fibroso que termina en cicatricial. Este proceso se conoce como reparación [29].

En otras ocasiones el proceso no lleva a una reparación sino a la creación de un tejido similar al original en arquitectura y función. En este caso se habla de regeneración [29].

Las proteínas involucradas en estos procesos son los factores de crecimiento que inducen señales en las diferentes células que intervienen en la reparación y el desarrollo de los tejidos, mediando la migración, la proliferación y la diferenciación de las mismas.

El coagulo sanguíneo que se forma en las heridas posee todos los componentes capaces de desencadenar cualquiera de estos procesos. Durante la coagulación se desencadenan reacciones en las que las células sanguíneas quedan atrapadas en una malla de fibrina. Entre estas células se encuentran las plaquetas, que no sólo tienen como función el taponamiento de los vasos sanguíneos, sino que también intervienen en la reparación y la regeneración tisular porque en su interior se almacenan proteínas que catalizan los procesos de cicatrización [30].

Entre los factores plaquetarios más estudiados están el PDGF, el factor de crecimiento similar a la insulina, el TGF- β , el factor de crecimiento vascular que interviene en la neovascularización, el factor de crecimiento epidérmico, el factor de crecimiento de los fibroblastos, etc. De todos estos, los que se encuentran en mayor concentración en las plaquetas son el TGF- β , el PDGF y el de crecimiento vascular.

Fue Robert Max [15] quien aportó a la bibliografía científica el término “plasma rico en plaquetas” (PRP), el cual se obtiene tras la extracción de sangre del paciente y su posterior centrifugación a una velocidad tal que las células sanguíneas con mayor peso, los hematíes, decantan en el fondo del recipiente, la serie blanca por encima de estos, e inmediatamente encima de la serie blanca las plaquetas.

Se han propuesto múltiples usos para el PRP, sin embargo su utilidad sigue generando controversias entre diferentes autores.

2.1. CARACTERÍSTICAS DE LAS PLAQUETAS

Las plaquetas son pequeños fragmentos celulares anucleados, con forma discoide y entre 1-3 μm de diámetro, más pequeños que el resto de las células sanguíneas (Fig 1). Se forman a partir del citoplasma del megacariocito de la médula ósea. En el proceso de formación de las plaquetas, el megacariocito, mediante un proceso de endomitosis, forma un núcleo poliploide y posteriormente, parte del citoplasma del megacariocito es empaquetado y la proplaqueta es liberada al exterior.

El proceso de formación de plaquetas puede dividirse en dos fases:

1° - **Maduración del megacariocito.** Esta fase que puede tardar días en completarse, requiere la presencia de factores de crecimiento específicos del megacariocito. En ella se produce una proliferación masiva de núcleos y un aumento del citoplasma simultáneamente con el incremento de las proteínas del citoesqueleto, de gránulos específicos de plaquetas y de la membrana necesaria para completar la formación de plaquetas [31, 32, 33, 34, 35].

2° - **Producción de plaquetas.** Es una fase relativamente rápida que dura horas. En ella se produce una remodelación del citoplasma formándose, en primer lugar, proplaquetas, luego preplaquetas y finalmente plaquetas [36, 37, 38].

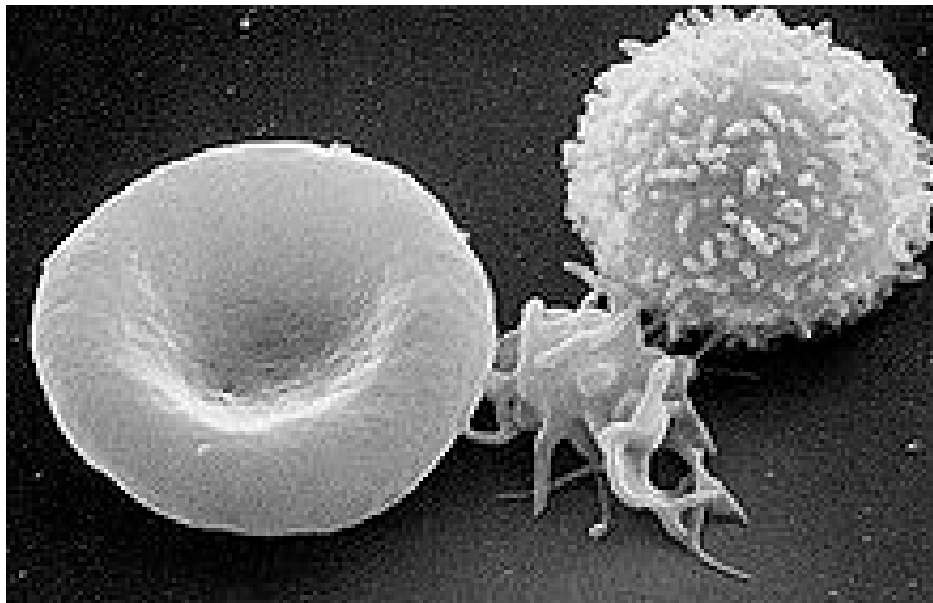


Fig 1- Elementos de la sangre. Se muestra un eritrocito a la derecha, plaqueta en el centro y leucocito a la izquierda. Microscopio electrónico de barrido. Linces clínicos: Junio 2015.

2.1.1. MADURACIÓN DEL MEGACARIOCITO

El megacariocito se desarrolla a partir del sistema celular hematopoyético presente principalmente en la médula ósea, pero también en el saco gestacional, en el hígado fetal, en el bazo durante las primeras etapas del desarrollo, y en el pulmón [39,40,41,42,43].

La trombopoyetina (TPO) interacciona con un receptor específico en el megacariocito, el c-Mpl, y regula directamente su maduración [44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51].

La endomitosis es el primero de los procesos dirigidos por la TPO. En él, el megacariocito se convierte en poliploide mediante varios ciclos de división del núcleo sin que se produzca división del citoplasma [52,53].

Uno de los propósitos de la endomitosis es la de sintetizar una gran cantidad de proteínas y lípidos, necesarios para crear una membrana altamente invaginada, formando un complejo de cisternas y túbulos distribuidos en el citoplasma del megacariocito y en conexión con la membrana plasmática. Esta membrana altamente invaginada es el origen de la superficie de las proplaquetas y plaquetas [54, 55, 56].

Los megacariocitos poliploides se localizan en los sinusoides de las células endoteliales de la médula ósea. Una vez formadas las proplaquetas, estas migran y se liberan al espacio intravascular.

La fibronectina y el fibrinógeno son también proteínas de la matriz extracelular implicadas en la diferenciación y la proliferación del megacariocito y su posterior maduración a proplaquetas [56].

2.1.2. FORMACIÓN DE PROPLAQUETAS

Numerosas evidencias sugieren que la maquinaria necesaria para la formación de plaquetas se encuentra en el citoesqueleto de los megacariocitos. La $\beta 1$ tubulina es la isoforma principal presente en el megacariocito y, junto con la dineína citoplasmática, promueven la formación y elongación de las proplaquetas [55,56].

Además los microtúbulos tienen una segunda función, la de transportar gránulos y organelas entre las proplaquetas [56].

En este proceso de formación de plaquetas, el microambiente de la médula ósea juega un papel determinante estimulando y favoreciendo la formación de las plaquetas y su posterior liberación [55,56]. Diferentes estudios muestran una interacción dinámica entre distintas proteínas de la matriz extracelular y los lugares específicos en donde se produce

la maduración. Una vez que el megacariocito se ha desarrollado migra a un nicho vascular donde comenzará el proceso de formación de proplaquetas [56] (Fig 2).

Una vez que las proplaquetas son liberadas al torrente sanguíneo entran en contacto con concentraciones elevadas de esfingosina 1-fosfato, la cual comienza la transformación a plaquetas [56]. Se ha descrito una fase previa a la formación de plaquetas, las preplaquetas, las que evolucionan a plaquetas mediante la escisión del citoplasma que las une [56] (Fig 2).

Como se ha explicado anteriormente, las plaquetas contribuyen a la hemostasia mediante la formación de un tapón de plaquetas y su afianzamiento posterior por la acción de la trombina que convierte el fibrinógeno en fibrina. Para realizar estas acciones las plaquetas tienen receptores de superficie que pueden unirse a glucoproteínas de adhesión. Entre estos receptores se encuentran el complejo GPIb/IX/V que media la adhesión de las plaquetas al factor de von Willebrand y el receptor GPIIb/IIIa que es específico de las plaquetas e interviene en la agregación plaquetaria al unirse al fibrinógeno y/o al factor de von Willebrand. En las plaquetas existen otros receptores para proteínas de adhesión como GPIa, GPVI y GP65 para el colágeno, Gpc/IIa para la fibronectina y GPIc/IIa para la laminina. Estos receptores también intervienen en la adhesión plaquetaria pero sus contribuciones exactas están menos definidas.

Una vez las plaquetas son activadas en su superficie muestran P-selectina, la cual interviene en las interacciones con los leucocitos. La actividad coagulante plaquetaria es el resultado de la exposición de los fosfolípidos cargados negativamente en la superficie de la plaquetas y de las micropartículas plaquetarias junto con la liberación y activación del factor V plaquetario [57, 58].

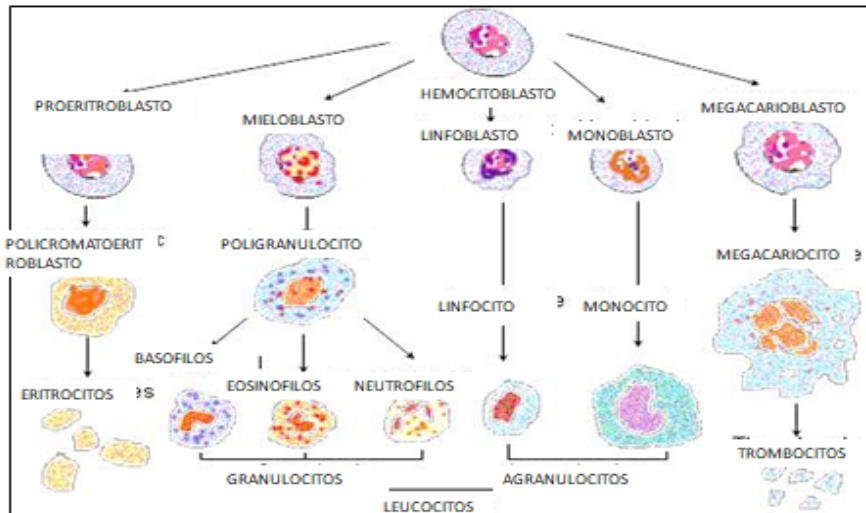


Fig 2 - Formación de plaquetas

2.1.3. ESTRUCTURA DE LAS PLAQUETAS

Mediante microscopía óptica y empleando las tinciones adecuadas, las plaquetas se ven como pequeños corpúsculos gris-azulados, ovalados o redondos. El diámetro medio varía en los diferentes individuos, oscilando entre 1,5 y 3 micras aproximadamente, es decir entre un tercio y un cuarto de los glóbulos rojos. También hay variabilidad en el tamaño de las plaquetas de un mismo individuo.

Por microscopía electrónica de barrido se observa que las plaquetas presentan una superficie borrosa que constituye el glicocalix, y una serie de invaginaciones de la membrana que corresponden a las aperturas del sistema canalicular.

Al microscopio electrónico de transmisión se observan numerosos gránulos en su interior, cuyo contenido se libera al exterior por los canalículos cuando se unen entre sí.

En su estructura podemos distinguir la membrana plasmática, el citoesqueleto compuesto

por microtúbulos y microfilamentos, y los orgánulos del citoplasma, fundamentalmente mitocondrias, peroxisomas, lisosomas, cuerpos densos y gránulos alfa.(Fig 3).

Durante la maduración del megacariocito se forman los gránulos alfa. La síntesis de sus elementos tiene lugar en la red del retículo endoplásmico y el aparato de Golgi del megacariocito. Son los gránulos más abundantes en las plaquetas, entre 50–80 por plaqueta. Contienen proteínas que intervienen en la activación y adhesión plaquetaria, en la coagulación y factores de crecimiento [59, 60, 61, 62,63].

Membrana plaquetaria

En la membrana plaquetaria podemos distinguir tres capas:

Capa exterior o glicocalix: Se encuentra en contacto con el plasma circulante y es la estructura con la que se adhieren las plaquetas. Con tiene ATP-ases.

Membrana celular: Formada por una bicapa de fosfolípidos (PLs) adoptando una estructura trilaminar. A esta estructura se anclan las GPs del glicocalix. Además posee proteína trombostetina que participan en la retracción de coagulo.

Área submembranos: Es la parte interna de la zona periférica. Formada por estructuras fibrilares de las GPs unidas a las fibras de actina y miosina del citoesqueleto. Mantiene la forma discoidal de la plaqueta.

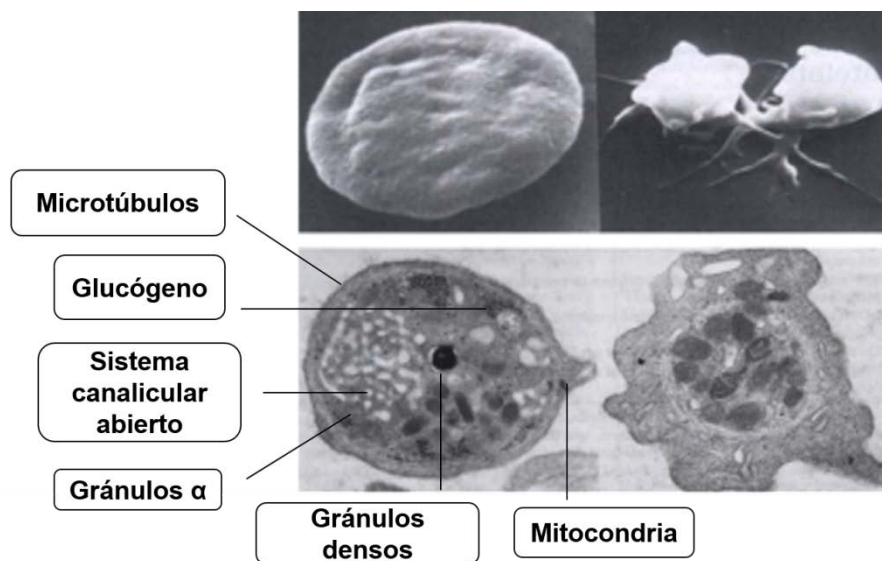


Figura 3. Morfología plaquetaria en reposo y activada. En la parte superior de la figura se muestran imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido. En la izquierda se muestra la forma discoidal de las plaquetas cuando estas se encuentran en reposo y en la derecha su forma esferoidal con pseudópodos cuando esta es activada. En la parte inferior se muestran las fotografías obtenidas con un microscopio electrónico de transmisión.—(Adaptado de George JN. Platelets. Lancet 2000; 355 (9214):1531-9).

En la superficie de las plaquetas podemos encontrar los siguientes receptores:

Receptores unidos a las proteínas G, sobre los cuales actúan los agonistas solubles como la trombina, el Adenosín difosfato (ADP), el tromboxano A₂ (TXA₂) y la epinefrina (EPI).

GPs, que en su mayoría pertenecen a la superfamilia de las integrinas, estas GPs interaccionan con proteínas adhesivas. Entre las que realizan una función más destacada son la GP Ib/IX/V (receptor del factor von Willebrand -FVW-), la GP IIb/IIIa (receptor del fibrinógeno y del FVW), la GPIa/IIa y la GPVI (receptores del colágeno), y la GPIV (receptor de la trombospondina y del colágeno) (Tabla 1).

Nomenclatura electroforesis	Nomenclatura actual	Ligando	Designación cluster
GPIa/IIa	Integrina $\alpha 2\beta 1$	Colágeno tipo I y IV	CD29, CD49b
GPIc/IIa	Integrina $\alpha 6\beta 4$	Laminina	CD29, CD49e
GPIc/IIa	Integrina $\alpha 5\beta 1$	Fibronectina	CD29, CD49f
GPIV	Receptor plaquetario mixto	Colágeno II y Trombospondina	CD36
GPVI	CAM del gen de la familia de las Ig	Colágeno	–
GPIb/IX/V	CAM ricas en leucina	FVW y Trombina	CD42a, CD42b CD42c y CD42d
GPIIb/IIIa	Integrina $\alpha IIb-\beta 3$	FVW y Fibrinógeno	CD41 y CD61

Tabla 1. GPs de la membrana plaquetaria que participan en la adhesión y en el inicio de la agregación con sus ligandos correspondientes.

Citoesqueleto y citoplasma.

El citoesqueleto contiene filamentos entrecruzados formado por proteínas, fundamentalmente por actina y miosina, conectados a GPs por proteínas enlazantes de actina, esto proporciona a la plaqueta un mecanismo contráctil que le permite cambiar de forma y la configuración de sus receptores de superficie cuando es activada.

En el citoplasma encontramos distintos orgánulos tales como los gránulos alfa, gránulos densos, mitocondrias, lisosomas, así como depósitos de glucógeno. Los gránulos α , los más numerosos, contienen, fibrinógeno, fibronectina, factor (F) V, Factor VIII, FVW,

FXIII, inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1), trombospondina, β -trombomodulina, P-selectina, agentes quimiotácticos y PDGF, IGF y TGF- β .

Los gránulos delta o gránulos densos son menos numerosos y contienen ADP, ATP, calcio, serotonina e histamina, los cuales participan en la activación de las plaquetas.

En el citoplasma encontramos una serie de estructuras comunes a otras células, tales como lisosomas, vesículas revestidas, mitocondrias, peroxisomas y en menor cantidad ribosomas que provienen del megacariocito.

Sistemas membranosos Los más importantes son el sistema canalicular abierto y el sistema tubular denso:

Sistema tubular denso. Se encuentra en la membrana y deriva del retículo endoplasmático liso del megacariocito. Se llama así por su opacidad en el microscopio electrónico. Éste es el principal reservorio tanto de calcio como de ácido araquidónico y es responsable de la síntesis del TXA₂, debido a que es donde se encuentra la enzima ciclooxigenasa. Este sistema tubular denso está conectado a la membrana plaquetaria para ayudar a la liberación del TXA₂.

Sistema canalicular abierto. Se trata de una red tubular que pone en contacto la superficie de la plaqueta con el sistema tubular denso. Recorren toda la plaqueta y facilitan tanto la captación como la liberación de diferentes sustancias.

2.1.4. MECANISMO DE ACTIVACIÓN Y LIBERACIÓN DE LAS PLAQUETAS. FORMACIÓN DE TROMBOS.

La hemostasia y la formación de trombos son procesos dinámicos que requieren la coordinación en el tiempo y en el espacio de una serie de eventos, que incluyen los receptores de membrana de las plaquetas, señales intracelulares y liberación de proteínas. El proceso está sometido a precisos mecanismos de control para que la respuesta no sea inadecuada, generando una respuesta hemorrágica o la producción de un trombo por un estímulo insignificante.

La señal de inicio para que se produzca el depósito y la activación plaquetaria es la exposición de las proteínas subyacentes de la pared del vaso sanguíneo. Otros parámetros que controlan la respuesta plaquetaria son la profundidad de la lesión, la velocidad del flujo sanguíneo y el tamaño del vaso.

Tras la lesión vascular se produce una vasoconstricción inducida por la liberación de tromboxano A₂ y serotonina por las plaquetas que facilita el depósito plaquetario por la disminución del flujo sanguíneo.

El flujo sanguíneo puede modificar la formación del trombo. En la circulación arterial, la rapidez del flujo dificulta la acumulación de factores de coagulación limitando la formación de la red de fibrina, mientras que las características de la circulación venosa favorecen la formación de trombos.

La formación inicial del trombo en respuesta a una herida requiere la interacción de las plaquetas con los componentes de la matriz extracelular expuestos a la sangre, especialmente el factor Von Willerand, colágeno, fibronectina, trombospodina y laminina. Las condiciones reológicas son importantes en este proceso de adhesión.

El colágeno I y III presente en las paredes de los vasos sanguíneos presentan afinidad por el factor de von Willebrand, de manera que estas dos moléculas se asocian en la matriz extracelular. El factor de von Willebrand soluble no es capaz de unirse a las plaquetas en condiciones normales y así previene una agregación que sería patológica. Sin embargo, cuando es retenido sobre las fibras de colágeno, impide la circulación de las plaquetas, desacelerando el flujo y permitiendo que las plaquetas establezcan uniones entre sus receptores y el factor Von Willerbrand.

El complejo de glucoproteínas GPIb/IX/V es el principal receptor de las plaquetas para el factor Von Willebrand. Este complejo también puede unir otras proteínas y factores de coagulación las cuales juegan un papel importante en el proceso de interacción con células endoteliales y leucocitos.

La unión de GPIb α al factor de von Willerband inmovilizado induce el aumento del Ca²⁺ intracelular, la síntesis de proteínas y tromboxanos, la liberación de ADP y finalmente la activación de la integrina GPIIb/IIIa. Tras esta activación se reclutan de plaquetas adicionales de la circulación y se produce la agregación.

El estrecho contacto producido así entre plaquetas adyacentes permite una acción paracrina que se traduce en una transferencia de información, lo que consolida la estabilidad del trombo recién formado y evita la disgregación o emboliación.

Las plaquetas además cambian de forma con la activación debido a modificaciones complejas en el citoesqueleto y en su membrana. Una vez se produce la activación se produce la liberación de los gránulos, cuerpos densos y del contenido de los lisosomas. El proceso de activación implica también a los receptores para agonistas como el ADP, la epinefrina, la trombina, el colágeno, el tromboxano A2 y el factor activador de plaquetas. Como consecuencia de la interacción de estos agonistas con sus receptores plaquetarios

se activan mecanismos de señalización en el que intervienen proteínas G, el metabolismo del fosfoinositol y la liberación y conversión del ácido araquidónico a tromboxano A₂. (Fig 5).

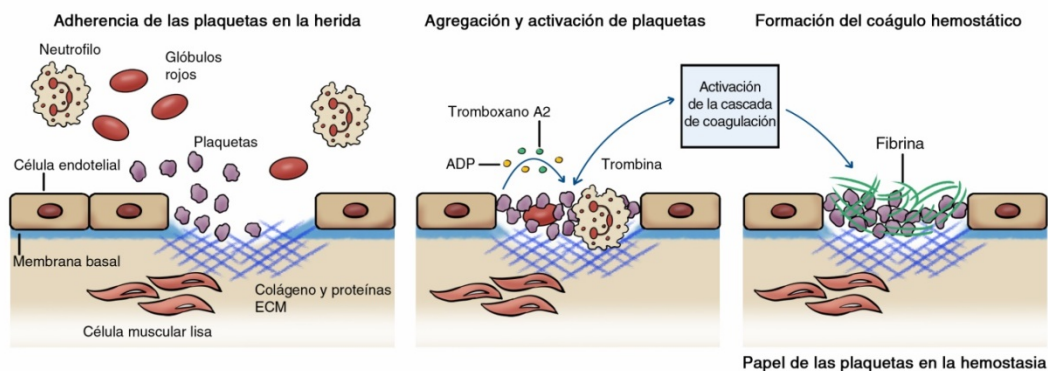


Fig 5. Papel de las plaquetas en la hemostasia

También como resultado de la activación plaquetaria se produce un aumento del calcio intracelular y un cambio en la conformación del receptor GPIIb/IIIa dando lugar a la unión de fibrinógeno con alta afinidad y a la agregación plaquetaria (Fig 6).

Cuando las plaquetas detectan cualquiera de los factores estimulantes antes mencionados, se produce su activación y, dependiendo del factor que actúe y en que concentración lo haga, primero se produce un cambio morfológico en la plaqueta y posteriormente una liberación de citoquinas o solamente una activación incompleta [63].

El fibrinógeno es una proteína dimérica que permite la formación de los puentes interplaquetarios responsables de la agregación. Es además el principal mediador de la

agregación plaquetaria por ser el ligando que se une con mayor afinidad a la integrina plaquetaria GP IIa/IIIb y por ser una de las proteínas más abundantes del plasma.

Como resultado de esta activación plaquetaria se producen señales de origen intracelular que se denominan “*inside-out*” que provocan un cambio en la estructura del receptor del fibrinógeno y un aumento de la afinidad por su ligando.

La unión del fibrinógeno a su receptor inicia un proceso de señalización “*outside-in*” que genera una cascada de sucesos tales como el agrupamiento de las integrinas y la formación de estructuras conocidas como contactos focales. Estos ensamblajes proteicos tienen un importante papel en la modulación de la adhesión celular, la secreción y en la inducción de los cambios morfológicos implicados en la extensión y locomoción celular (Fig 6).

Activación del Receptor de Fibrinógeno



6. Receptor del fibrinógeno. Los agonistas activan al receptor de fibrinógeno plaquetario (señal inside-out), se une Fg con alta afinidad y se generan señales hacia el interior de la célula (señal outside-in). Como consecuencia se activan numerosos procesos plaquetarios como la agregación, la secreción de sustancias proactivas y la extensión del cuerpo celular para la emisión de pseudópodos, y la adhesión plaquetaria.

2.1.4.1. SECRECIÓN DE LOS GRÁNULOS PLAQUETARIOS

Una vez las plaquetas son activadas, ya sea por adhesión a ligandos de la matriz subendotelial o por agonistas solubles, vacían su contenido a la circulación o lo traslocan a la superficie. El análisis del secretoma de las plaquetas reveló más de 300 sustancias tras la activación con trombina [62].

El origen de las sustancias bioactivas de los gránulos es la endocitosis y la biosíntesis, bien en el megacariocito o bien en las plaquetas puesto que ellas poseen mRNA y la maquinaria necesaria para hacerlo [62].

Estudios recientes demuestran que el contenido de los gránulos α no es homogéneo ni se libera simultáneamente tras la activación plaquetaria, lo que sugiere que la liberación de los gránulos está sujeta a un control funcional [62].

Varios factores inhibidores regulan la activación plaquetaria y previenen el depósito excesivo de plaquetas, entre ellos la prostaciclina y el óxido nítrico sintetizado por las células endoteliales [62].

El mecanismo contráctil de la actina y la miosina interviene en la secreción granular y en la retracción del coágulo. Los detalles de este mecanismo continúan siendo desconocidos [62]. Una vez se produce el cambio de la forma inicial de las plaquetas la actina se organiza centralmente en gruesas masas filamentosas donde probablemente se asocia con

filamentos de miosina. Parece que un aumento en los niveles de calcio-calmodulina inicia la respuesta contráctil, activando la quinasa de la cadena ligera de la miosina, la fosfatasa y la quinasa A dependiente de AMPc, los cuales modulan la respuesta.

La secreción se correlaciona con la centralización de los orgánulos en un anillo central. Sin embargo existe controversia sobre si las plaquetas secretan el contenido de sus gránulos por la fusión con el sistema canalicular abierto en su centro o por la fusión directa con la membrana plasmática [62].

Se ha sugerido un sistema de dos pasos para la secreción granular [63]. El primer paso es la aproximación de los gránulos a la cara interna de la membrana plasmática y el segundo la fusión de las bicapas lipídicas. El proceso de aproximación implica a pequeñas GTPasas como la R3 que se fosforila al activarse la plaqueta. Existe la hipótesis de que la R3 forma complejos con el factor soluble sensitivo n-etilamida (SNARE) presente en el gránulo y en la membrana plasmática e incluye a las sintaxinas 2 y 4, lo que da lugar al complejo de aproximación 7s. [63].

Actualmente también se ha propuesto la posibilidad de que la secreción de las plaquetas sea similar a la de las neuronas en relación a lo que se conoce como mecanismo SNARE. Este mecanismo se basa en la composición de t-SNARE, v-SNARE y el componente soluble SNAP/NSF. El uso de marcadores ha permitido demostrar que tanto el SNARE como la sintaxina 2 intervienen en la secreción de los gránulos plaquetarios. Ulteriormente también se ha visto que la sintaxina 4 intervine liberando el contenido, primero de los gránulos alfa y gránulos densos y posteriormente el contenido de los lisosomas. La fusión consta de tres etapas: acoplamiento, unión y fusión. El acoplamiento consiste en la superposición de los gránulos en la cara interna de la membrana plasmática, donde son reconocidos por receptores complementarios. Este proceso requiere energía y

es catalizado por la proteína sensible de fusión N- etilamida (NSF) con actividad ATPasa. También intervienen las proteínas solubles asociadas a NSF (SNAP) que caracterizan a los receptores de membrana denominados SNARE. Estos SNARE pueden ser el blanco de membrana (t-SNARE) o de las vesículas (v-SNARE). La fusión y la exocitosis del complejo de los gránulos se realiza con la ayuda de las proteínas asociadas a las vesículas (VAMP) [63], (Fig 5).

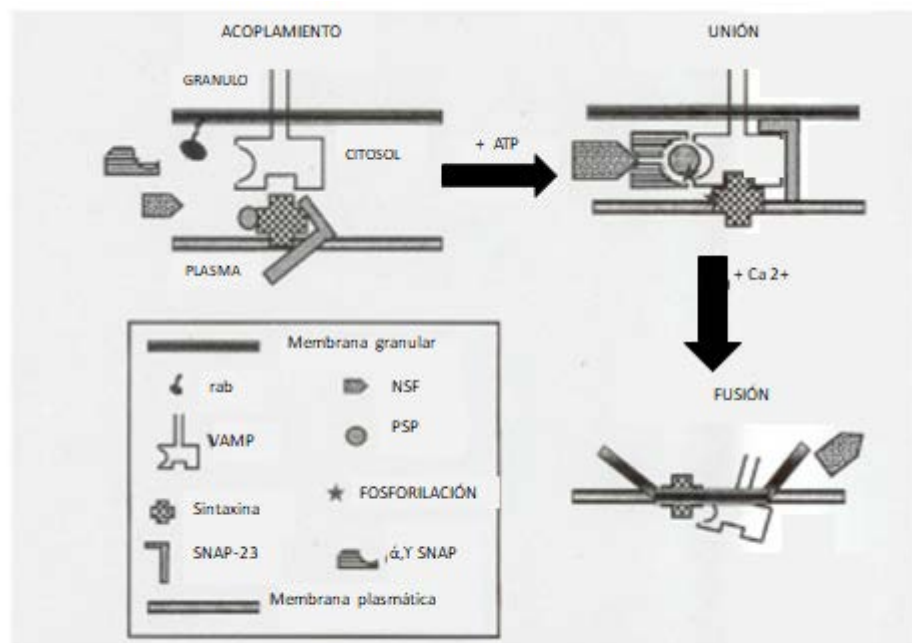


Fig 7. Mecanismo de acción por el cual los gránulos se unen a la membrana plaquetaria para liberar su contenido. Adaptado de Rendu y col. Platelets (2001)26.

2.1.5. PAPEL DE LAS PLAQUETAS EN LA INFLAMACIÓN

Existe una conexión entre la coagulación y los procesos inflamatorios ya que muchas de las sustancias proinflamatorias inducen un estado hipercoagulable por reducción de la actividad anticoagulante natural, por lo que las enfermedades inflamatorias conllevan el riesgo adicional de sufrir eventos trombóticos [64].

Una descompensación en el fino mecanismo de control de la función plaquetaria hace que estas se activen, liberen su contenido y ejerzan su efecto procoagulante y proinflamatorio en tejidos distantes (Tabla 2).

Para que estos procesos tengan lugar, las plaquetas deben interactuar con las células endoteliales y los leucocitos.

2.1.5.1. ELEMENTOS PROINFLAMATORIOS EN LAS PLAQUETAS

CD40Ls

Dentro de la familia de factor de necrosis tumoral encontramos el CD40 y el CD40L. El CD40L se encuentra en el interior de las plaquetas y tras la activación plaquetaria mediada por agonistas, se expresa en la superficie de las plaquetas donde sufre una escisión por las metaloproteasas 2 y 9 liberándose a la circulación la forma soluble (CD40Ls).

Se considera que el CD40Ls es uno de los mediadores más importantes en la inflamación ya que induce la producción de quimioquinas y la activación de las proteínas de adhesión

de las células endoteliales.

METALOPROTEINASAS

Son proteínas que poseen un papel fundamental en la remodelación tisular, desarrollo embrionario, cicatrización y migración celular. Además participan en el desarrollo de tumores, en la arteriosclerosis y en la desestabilización de la placa de ateroma.

Las plaquetas son una fuente importante de metaloproteinasas y de sus inhibidores.

ÁCIDO HIALURÓNICO

El ácido hialurónico es un polisacárido de la matriz extracelular que contribuye a la homeostasis local suprimiendo la proliferación celular, la migración, la angiogenesis, la inflamación y la inmunogenicidad.

Las plaquetas poseen hialuronidasa 2 (HIAL2) en su interior. Cuando las plaquetas circulantes y las células inmunes se unen al ácido hialurónico de las células endoteliales activadas la HIAL2 degrada el ácido hialurónico producido por la vasculatura inflamada.

Los fragmentos de ácido hialurónico producen una señalización en las células de su entorno que induce la liberación de citoquinas y quimioquinas por los leucocitos mononucleares locales y el reclutamiento de otros tipos celulares [64].

MICROPARTÍCULAS

Las plaquetas poseen la maquinaria celular necesaria para generar micropartículas. Este proceso se produce mediante dos mecanismos distintos: uno depende de la activación plaquetaria y otro de la activación de las caspasas y de las proteínas proapoptóticas Bak y Bax. Ambos mecanismos tienen como consecuencia un aumento en la exposición de fosfatidilserina en la membrana de las plaquetas. Tanto en la activación como en la apoptosis de las plaquetas se produce la liberación de micropartículas, las cuales poseen factor tisular, quimioquinas, receptores de superficie para ligandos de adhesión y brindan una superficie de fosfatidilserina para anclar los complejos de las proteínas de la coagulación que permiten la generación de trombina. Las micropartículas de origen plaquetario extienden el efecto de las plaquetas a lugares alejados de la propia célula activada [64].

PROTEÍNAS DEL COMPLEMENTO

La activación del sistema del complemento contribuye de manera importante a la inflamación vascular, puesto que dicha activación genera C3a y C5a, potentes mediadores inflamatorios que se comportan como citoquinas [64].

MOLÉCULA	LOCALIZACIÓN Y MECANISMO DE LIBERACIÓN	ESTADO	FUNCIÓN	CELULAS DIANA
HISTAMINA	Localización desconocida. Liberada durante la activación plaquetaria	Preformada	Promueve hipersensibilización de tipo alérgico	CE, plaquetas, PMN, Eosinófilos, Monocitos, NK, Células T, Células B
SEROTONINA (5-HT)	Gránulos densos Liberada durante la activación plaquetaria	Preformada	Actúa sobre el SNC, promueve la coagulación y la activación de células T	Plaquetas, Macrófagos, Monocitos
TROMBOXANO A2	Membrana plasmática	Sintetizada	Promueve la coagulación y la inflamación	Plaquetas, Macrófagos, Células T
PAF	Membrana plasmática		Promueve la inflamación	Plaquetas, PMN, Macrófagos, Monocitos
PDGF	α -gránulos. Liberado durante la activación plaquetaria	Preformada	Promueve la cicatrización	Macrófagos, Monocitos, Células T
TGF- β	α -gránulos. Liberado durante la activación plaquetaria	Preformada	Inhibe el crecimiento. Inmunosupresor	Macrófagos, Monocitos, Células T, células B, DC
CXCL7 (NAP2)	Desconocida	Producto de escisión de precursor preformado	Quimioquina	PMN
CXCL4 (PF4)	α -gránulos. Liberado durante la activación plaquetaria	Preformada	Quimioquina	PMN, Plaquetas
CXCL1 (GRO α)	α -gránulos. Liberado durante la activación plaquetaria	Preformada	Quimioquina	PMN
CXCL5 (ENA 78)	α -gránulos. Liberado durante la activación plaquetaria	Preformada	Quimioquina	PMN
CCL5(RANTES)	α -gránulos. Liberado durante la activación plaquetaria	Preformada	Quimioquina	Monocitos, Basófilos, Eosinófilos, NK, DC, Células T, Plaquetas
CCL3(MP1 α)	α -gránulos. Liberado durante la activación plaquetaria	Preformada	Quimioquina	Monocitos, Basófilos, Eosinófilos, NK, DC.
CCL7(MPC3)	Desconocida	Preformada	Quimioquina	Monocitos, Basófilos, NK, DC,
IL-1 β y la proteína precursora IL	Desconocida	Sintetizada	Activación de células T. Efectos múltiples	Macrófagos, Monocitos, DC, Células T
HMGB1	Desconocida	Preformada	Regulación de genes	Macrófagos, PMN, CE
CD40	Membrana plasmática	Preformada	Coestimulador. Interacciones con el endotelio	Células T
CD154	α -gránulos. Liberado durante la activación plaquetaria	Preformada	Coestimulador. Interacciones con el endotelio	Células B, PMN, DC, Macrófagos, Monocitos, CE

CC: Ligando CC quimioquina. CE: Células endoteliales. CXCL: Ligando CXC. DC: Células dendríticas. HMGB1: proteína del grupo de alta movilidad B1. IL-1 β : Interleukina 1 β . NK: Natural killer. PAF: Factor activador plaquetario. PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas. PMN: Leucocito polimorfonuclear. TGF- β : Factor de crecimiento transformante β .

Tabla 2. Sustancias con función inflamatoria e inmunológica que se hayan almacenadas en las plaquetas. Nora Butta, Victor Jimenez- Yuste, Ihosvany Fernández Bello, M^a Teresa Alvarez, Mónica Mattín Salces, Ana Rodríguez de la Rúa. Las plaquetas en las enfermedades inflamatorias. Curso de trombosis y hemostasia. Libro de ponencias. 10-18.

MICRO RNA

Los microRNA son moléculas de 19-25 nucleótidos de RNA no codificador que funcionan como reguladores de la expresión génica. A pesar de no tener núcleo, las plaquetas poseen varios pre-microRNA y microRNA maduros además de la maquinaria necesaria para su procesamiento. La tabla 3, muestra la función y los genes diana de algunos de los microRNA descritos en plaquetas. De todos ellos miR96a podría tener importancia en los procesos inflamatorios al ser VAMP8 su gen diana, proteína fundamental en la exocitosis de las sustancias almacenadas en los gránulos de las plaquetas [64] (Tabla 3).

microRNA	Gen diana	Función
miR-223	P2Y12	Activación plaquetaria
miR-200b	PRKAR2B	Hiperreactividad plaquetaria
miR-495	KLHL5	Hiperreactividad plaquetaria
miR-107	CLOCK	Hiperreactividad plaquetaria
miR-96a	VAMP8	Exocitosis de los gránulos de las plaquetas

Tabla 3.- Micro RNAs plaquetarios

En individuos sanos los valores normales de las plaquetas están comprendidos entre 150000/ml y 400000/ml. Estos valores no solo varían entre los diferentes individuos sino

que pueden variar en el propio individuo con el tiempo si el individuo sufre alguna enfermedad como un mieloma, insuficiencia renal, si su estado nutricional es deficiente o si se ha sometido a alguna intervención quirúrgica [65].

En el valor promedio de las plaquetas también influye el género debido a la actividad bioquímica y hormonal y la edad puesto que el metabolismo no es el mismo en una persona joven que en un anciano. Además llevar una vida saludable y la alimentación son factores que influyen en el número de plaquetas [66].

Estudios sobre la influencia de la edad y el género en el número de plaquetas reflejan diferencias importantes en función de la edad y el género.

Los individuos mayores de 80 años poseen menos plaquetas y la población entre 14 y 29 años posee más plaquetas. En cuanto al género las mujeres presentan valores superiores a los hombres pero su volumen plaquetario medio es inferior [66, 67].

2.2. FACTORES DE CRECIMIENTO DERIVADO DE LAS PLAQUETAS

Una vez explicado el mecanismo de activación y liberación de las plaquetas y su papel en la formación de trombos y en las enfermedades inflamatorias, describiré la función de los factores de crecimiento plaquetarios.

Los factores de crecimiento son elementos que originan señales bioquímicas capaces de modificar las respuestas de las células del organismo [68]. Se encuentran involucrados en el control del crecimiento y en la diferenciación celular. Los factores de crecimiento son péptidos, es decir, secuencias cortas de aminoácidos, que usualmente transmiten señales entre las células modulando su actividad, siendo responsables de distintos eventos biológicos tales como la mitosis, la quimiotaxis, la citodiferenciación y la síntesis de la

matriz extracelular. Todos estos mecanismos están involucrados en los procesos de reparación y regeneración.

Los factores de crecimiento podemos clasificarlos en función de su especificidad: amplia o reducida [65,67], (Tabla 4). Los de especificidad amplia actúan sobre muchas clases de células, tales como fibroblastos, fibras musculares lisas, células neurogliales y células epiteliales y no epiteliales. Dentro de este grupo se encuentra el PDGF y EGF. Los factores de crecimiento de especificidad reducida actúan solo sobre un tipo de células, como por ejemplo la eritropoyetina, que tan solo induce la proliferación de los precursores de los hematíes [65,67].

Los factores de crecimiento actúan de manera local. La estimulación celular se realiza bien de manera autocrina, es decir, las células producen y responden al mediador biológico producido, o bien mediante un mecanismo paracrino, en el que la célula que produce el factor se encuentra en las proximidades de las células a las que afecta.

De forma general podemos decir que los factores de crecimiento se sintetizan en forma de precursores, siendo necesario para la activación del factor un proceso de proteolítico [67].

El mecanismo de acción de los factores de crecimiento siempre comienza al unirse a receptores específicos de membrana. Para cada factor de crecimiento existe un receptor o conjunto de receptores específicos, de forma que las células responden a un factor de crecimiento solo si disponen de la proteína receptora adecuada. Tras la estimulación de los receptores se activan segundos mensajeros tales como proteínas G y tirosinaquinasas.

Entre los tipos celulares productores de factores de crecimiento están los fibroblastos, los osteoblastos, las células endoteliales y los leucocitos, especialmente monocitos y macrófagos. Además existen lugares de almacenamiento de estos factores tales como los

gránulos alfa de las plaquetas [65,67,68].

FACTOR	ORIGEN PRINCIPAL	ACTIVIDAD PRIMARIA
PDGF	Plaquetas, cél endoteliales, placenta	Promueve la proliferación de tejido conectivo, cél gliales y de la musculatura lisa.
EGF	Glándula submaxilar, Glándula de bruners	Promueve la proliferación de cél gliales, mesenquimatosas y epiteliales
TGF- α	Comun en cél transformadoras	Importante en la reparación de heridas
FGF	Amplio número de cél. La proteína esta asociada con la MEC	Promuev proliferación de muchas cél. Inhibe algunas cél madre. Induce formación de mesodermo en embriones.
NGF	Mastocitos, eosinofilos, cél del estroma de la médula ósea, queratinocitos	Promueve crecimiento de neuronas
ERITROPOYETINA	Riñones	Promueve proliferación y diferenciación de eritrocitos
TGF- β	Cél Th activadas, T helper, Natural killers	Antiinflamatorio. Promueve reparación de heridas. Inhibe proliferación de macrófagos y linfocitos
IGF-1	Higado	Promueve proliferación de muchos tipos celulares
IGF-2	Variedad de células	Promueve proloferación de cél de origen fetal.

Tabla 4. Origen y acción de los principales factores de crecimiento. 1996–2017 the medical biochemistry.

2.2.1. FACTOR DE CRECIMIENTO DERIVADO DE PLAQUETAS (PDGF):

Este factor de crecimiento se encuentra en las plaquetas almacenado en los gránulos alfa, por lo que toma este nombre. También es producido por los macrófagos, las células endoteliales, los monocitos y los fibroblastos.

Dependiendo las cadenas que formen la estructura del factor de crecimiento podemos encontrar tres formas: PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB (Fig 7).

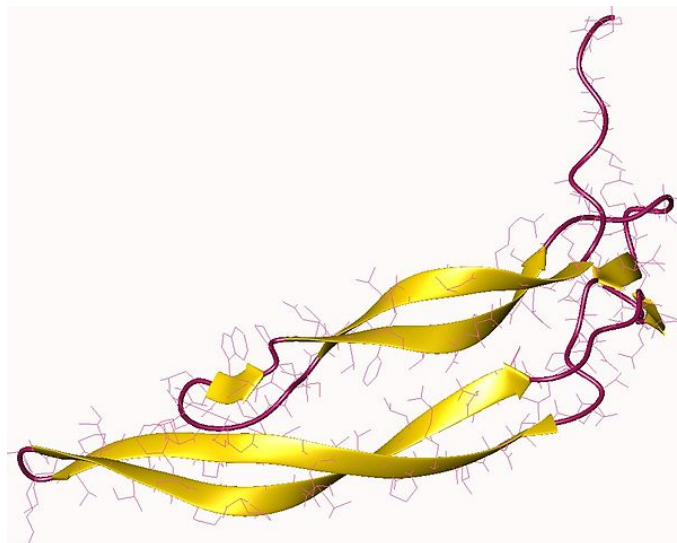


Fig 8. Yu JC, Li W, Wang LM, Uren A, Pierce JH, Heidaran MA (1995). «Differential requirement of a motif within the carboxyl-terminal domain of alpha-platelet-derived growth factor (alpha PDGF) receptor for PDGF focus forming activity chemotaxis, or growth». *J. Biol. Chem.* **270** (13).

Una vez se produce su liberación actúa como una cerradura de doble llave: no sólo es necesario que el factor se una al receptor para desencadenar su acción, sino que además es necesario que también se una a un sustrato de adhesión celular que posea un receptor simétrico para que intervenga el segundo mensajero, el fosfoinositol 3 quinasa que actuará sobre el ADN e inducirá la expresión de genes específicos. Estos genes desencadenarán procesos de adhesión intercelular, migración, proliferación y diferenciación, y estimularán la síntesis y la secreción de proteínas.

Para que esto ocurra, la tirosinaquinasa tiene que ser activada mediante un mecanismo de fosforilación en su receptor molecular [68]. El propósito de este proceso es el control de la actividad de la quinasa y la creación de uniones para la transducción de la señal molecular. Como consecuencia de este mecanismo, la acción de los factores en el lugar

de la lesión continúa aunque hayan desaparecido los mismos del medio, ya que se ha activado el sistema de segundos mensajeros.

2.2.2. FACTOR DE CRECIMIENTO EPITELIAL (EGF):

Es sintetizado como un precursor de 1217 aminoácidos. Entre sus acciones biológicas se pueden destacar los efectos mitogénicos y quimiotácticos en fibroblastos y células epiteliales. También induce la migración celular, sobre la que tiene un efecto dosis dependiente.

2.2.3. FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE (TGF- α) y (TGF- β):

El TGF- α posee muchos efectos comunes con EGF, entre ellos la proliferación y la migración de las células epiteliales, la liberación de iones calcio del hueso y la inhibición de la actividad de los osteoblastos. Además tiene efecto angiogénico e interviene en el desarrollo tumoral mediante dos mecanismos: uno, estimulando la proliferación celular mediante un mecanismo autocrino y dos, induciendo la angiogénesis tumoral mediante un mecanismo paracrino [68].

El TGF- β (Fig 9) es una familia de proteínas que incluye a las inhibinas, a las activinas, a la proteína morfogénica de hueso (BMP) y a las citoquinas y a la hormona antimulleriana. El TGF- β está implicado en varias patologías humanas, incluyendo desórdenes autoinmunes y vasculares, así como enfermedades fibróticas y cáncer [68].

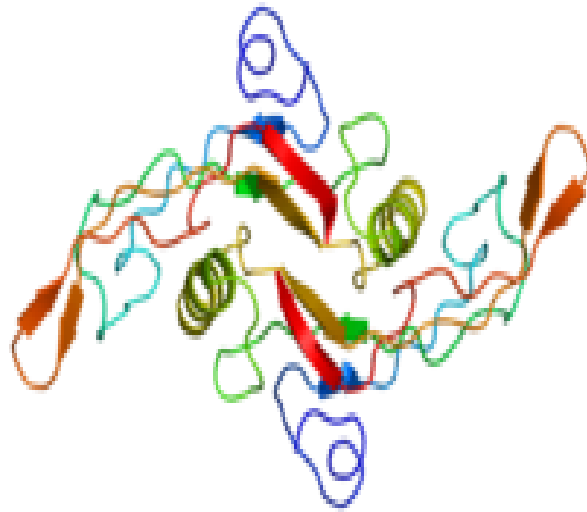


Fig 9. Estructura TGF – β 1. Derynck R, Jarrett J, Chen E, Eaton D, Bell J, Assoian R, Roberts A, Sporn M, Goeddel D (1985). «Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells». *Nature* **316** (6030): 701-5.

La activación del receptor de TGF- β propicia su fosforilación y la de proteínas efectoras intracelulares (Smad) que una vez activas se translocan al núcleo para inducir la transcripción de genes blanco, y así regular procesos y funciones celulares (Fig 10).

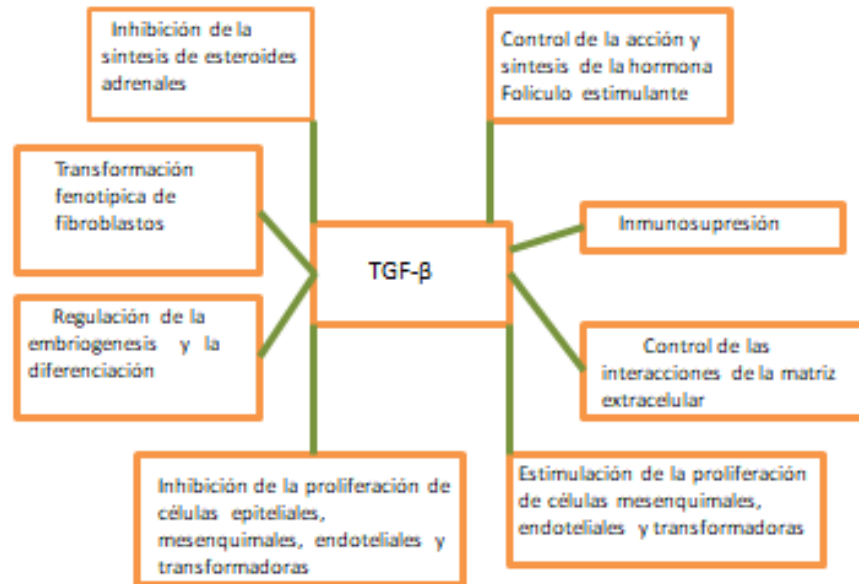


Fig 10.- Adaptado de Beca T, et al. Plasma rico en plaquetas, una revisión bibliográfica Principales acciones biológicas de TGF-β Avances en Periodoncia e Implantología Oral .

2.2.4. FACTOR DE CRECIMIENTO SIMILAR A LA INSULINA (IGF):

Se llama así por la semejanza de su estructura con la de la insulina. Existen dos tipos: Tipo I (70 aminoácidos) y tipo II (67 aminoácidos). Existen dos receptores celulares correspondientes a cada uno de ellos. Entre sus funciones se encuentran la de estimular la síntesis de la matriz ósea, diferenciando a los osteoblastos y replicando las células osteoprogenitoras, es mitogénica y quimiotáctica de células, estimula la producción de glucógeno hepático y presenta una acción sinérgica con el PDGF [68].

2.2.5. FACTOR DE CRECIMIENTO ENDOTELIAL VASCULAR (VEGF):

El VEGF es similar en un 24% al PDGF, aunque utiliza diferentes receptores celulares. Presenta acción mitogénica en células endoteliales e interviene en la cicatrización.

2.3. TROMBOCITOPENIA INMUNE (PTI)

La trombocitopenia se define como la disminución del recuento de plaquetas por debajo del límite inferior normal (10000/mL). Clínicamente, suele considerarse relevante cuando es inferior a 100/mL. En condiciones fisiológicas, el mantenimiento del número de plaquetas se debe a un correcto balance entre su producción y su destrucción [69].

Las trombocitopenias pueden ser hereditarias o adquiridas.

Las trombocitopenias hereditarias son un grupo heterogéneo difícil de clasificar, ya que diferentes mutaciones genéticas son responsables de una disminución de los megacariocitos, de una trombopoyesis ineficaz o de alteraciones estructurales de las plaquetas. Dentro de este grupo encontramos la Trombocitopenia Amegacariocítica, Congénita, Trombocitopenia Amegacariocítica con sinostosis radioulnar, Trombocitopenia con ausencia de radio, Síndrome de Wiskot Aldrich, Síndrome de May-Hegglin; Fechner, Sebastian y Epstein así como el Síndrome de DiGeorge.

Las trombocitopenias adquiridas, más frecuentes que las hereditarias, las podemos clasificar en cuanto a su origen: central, periférico o una combinación de ambas.

En este trabajo nos hemos centrado en la trombocitopenia inmune, considerada dentro de las trombocitopenias periféricas.

La trombocitopenia periférica se produce por consumo o por destrucción de las plaquetas y dentro de este grupo se ha incluido a la Trombocitopenia Inmune.

La Trombocitopenia Inmune (PTI), es una enfermedad autoinmune adquirida que se caracteriza por una trombocitopenia aislada (recuento de plaquetas $<100/\text{mL}$), con grandes variaciones en el número, en la actividad de las plaquetas y en sus manifestaciones clínicas y cuyo diagnóstico se realiza por exclusión [70].

Durante muchos años se asumió un único mecanismo etiopatogénico causante de la PTI, en el cual la destrucción periférica de las plaquetas era producida por anticuerpos contra las glicoproteínas plaquetarias. Sin embargo, la ausencia de autoanticuerpos detectables en un numeroso grupo de pacientes de PTI sugirió la existencia de otros mecanismos responsables de la enfermedad, como por ejemplo una disregulación de la megacariopoyesis [71].

Estudios de cinética plaquetaria con plaquetas autólogas marcadas con isótopos radioactivos en los años 80, mostraron que los pacientes con PTI presentaban una producción plaquetaria disminuida [72,73]. Los mecanismos implicados en esta disminución serían tanto la acción de esos autoanticuerpos sobre los megacariocitos de la médula ósea como los niveles alterados de TPO endógena [70,74].

La incidencia de la PTI varía según las series publicadas, pero en general se considera una enfermedad rara. Según el Registro del Reino Unido, se estima en 3,9 por cada 100.000 personas-año [75,76]. No hay diferencias entre ambos géneros, excepto en edades comprendidas entre 30 y 60 años, donde es más prevalente en mujeres [77,78].

Otra forma de clasificar la PTI es en función de la edad de aparición (niños y adultos), o por el tiempo transcurrido tras el diagnóstico (*de novo*, persistente o crónica) [79,80].

Se pueden observar grandes variaciones en la forma de presentación de la enfermedad, el curso clínico y la cifra de plaquetas.

Generalmente, cursa con sangrados cutáneo-mucosos leves (petequias, equimosis, epistaxis), aunque algunos pacientes pueden presentar sintomatología más grave como hemorragia intracraneal. Los pacientes con recuentos de plaquetas superiores a 500/mL suelen estar asintomáticos y no requieren tratamiento. Aún así la enfermedad conlleva un importante deterioro de la calidad de vida del paciente, debido a los propios síntomas físicos, así como a la menor actividad social y laboral [81,82].

El desencadenante de este proceso autoinmune es aún desconocido, sin embargo parece que es un proceso infeccioso o inflamatorio el que inicia la PTI. De manera que agentes infecciosos tales como el VIH, *H. pylori* o el virus de hepatitis C [83] están implicados en el desarrollo de la enfermedad. Estos agentes infecciosos iniciarían y perpetuarían la enfermedad mediante reactividad cruzada entre algún antígeno del agente etiológico de la infección y la membrana plaquetaria.

Se ha notado que en determinadas infecciones, al igual que en la administración de vacunas, las células que presentan antígenos (CPA) podrían exponer fragmentos de GPs de la membrana plaquetaria a las células T, que junto con el HLA-DR, estimularían el receptor de TCR (receptor de linfocitos T) de los linfocitos T helper. Cuando estos linfocitos T helper son activados sobreexpresan el CD40 ligando (CD40L) o CD154 el cual se une al CD40 localizado en la membrana de los linfocitos B. La interacción entre CD40/CD40L genera un conjunto de señales intracelulares que estimulan la secreción de

numerosos mediadores, la síntesis de proteínas de membrana que participan en la inmunidad humoral, celular y en la inflamación. Entre los efectos descritos y mejor conocidos del sistema CD40/CD40L son la proliferación, la diferenciación, el cambio de clase de inmunoglobulina del linfocito B, y la estimulación de las CPA y del linfocito T. Todo ello conduce a la activación, proliferación y diferenciación de LB y, por tanto a la síntesis de anticuerpos antiplaquetas [84] (Fig.11).

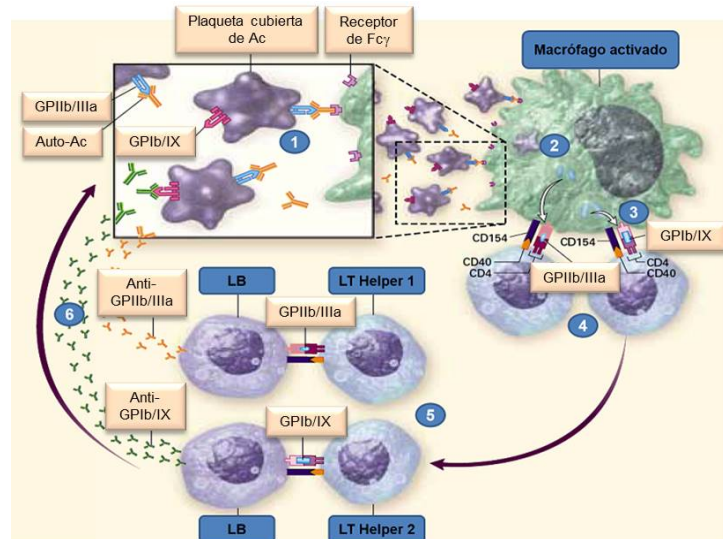


Fig 11. Destrucción de plaquetas mediada por anticuerpos. En la figura se representan las distintas fases de la producción de anticuerpos y la destrucción de las plaquetas opsonizadas. (Adaptado de Cines DB, Blanchette VS. N Engl J Med 2002; 346:995-1008)

En la etiopatogenia de la PTI también están implicadas citoquinas de la superfamilia del factor de necrosis tumoral como el BAFF, en inglés BLyS (factor activador de linfocitos B) y el APRIL (ligando inductor de linfocitos B). Estas citoquinas son producidas por células del sistema inmune como los macrófagos, las células dendríticas, linfocitos T activados, linfocitos B aberrantes y células estromales. Una disregulación en estas citoquinas se relacionaría con la aparición de la enfermedad.

La superficie de los linfocitos B presenta tres receptores a los que se une el BAFF: BAFF-R (receptor para BAFF), TACI (calcium modulator ligand interactor) y el BCMA (antígeno de maduración de células B). El APRIL se une al BCMA y al HSPG.

Cuando el BAFF interacciona con sus receptores se produce una sobreexpresión de diferentes miembros de la familia antiapoptótica bcl-2, lo cual promueve un aumento de la proliferación, maduración y supervivencia de los linfocitos B, de manera que la sobreexpresión de BAFF impide la apoptosis de los linfocitos B, favoreciéndose de esta manera la aparición de enfermedades autoinmunes [84].

En pacientes con enfermedades autoinmunes tales como la artritis reumatoide, el lupus eritematoso sistémico y el síndrome de Sjögren primario, tanto en suero como en órganos diana se han encontrado niveles elevados de BAFF y APRIL (Fig.12).

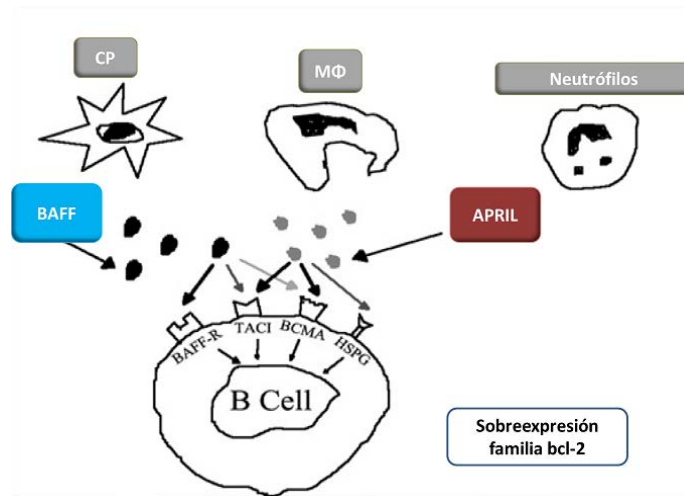


Figura 12. Interacciones entre las células de la inmunidad innata y los linfocitos B. La figura muestra cómo las células plasmáticas (CP), los macrófagos (MΦ) y los neutrófilos, producen diferentes citoquinas como el BAFF o el APRIL los cuales se unen a receptores de la membrana del linfocito B produciendo la proliferación y maduración del mismo. (Extraído de M^a TERESA ÁLVAREZ ROMÁN. Estudio de los factores involucrados en las manifestaciones hemorrágicas de la trombocitopenia inmune).

En la etiopatogenia de la PTI además de la producción de anticuerpos, pueden estar implicados otros mecanismos. Existen trabajos que han demostrado que en estos pacientes el número de linfocitos T cooperadores (CD4+) disminuye y los linfocitos T citotóxicos (CD8+) aumentan. Dichos linfocitos actúan sobre diferentes antígenos de la membrana plaquetaria, fundamentalmente la GPIIb/IIIa [84].

Además hay estudios que han demostrado que los pacientes con PTI crónica frecuentemente presentan un incremento en el ratio Th1/Th2 con expansión oligoclonal de células T [85].

Estas observaciones relativas a los linfocitos T citotóxicos y a los anticuerpos antiplaquetarios demuestran la pérdida de tolerancia del sistema inmune a los antígenos propios de las plaquetas.

Diferentes estudios han buscado una explicación que justifique la pérdida de tolerancia de los linfocitos T reguladores (Treg).

Los Treg es una población de linfocitos T CD4⁺ que se caracteriza por la elevada concentración de CD25 en su superficie y la presencia de otros marcadores como el factor de transcripción FOXP3, y los antígenos CD45RB y CTLA-4 (antígeno-4 de linfocitos T citotóxicos). La principal función de los Treg es mantener la tolerancia interaccionando con las CPA, los Th y los LB y por lo tanto previniendo la aparición de enfermedades autoinmunes como la PTI [86].

En los pacientes con PTI, Th y LB, sortean la vigilancia de los Treg favoreciendo que los Th induzcan la activación y proliferación de los LB y por tanto la producción de anticuerpos contra los antígenos GPIIb/IIIa y/o GPIbIX de la superficie plaquetaria.

A continuación, las plaquetas son opsonizadas por anticuerpos, son capturadas por los macrófagos esplénicos a través de los receptores para la fracción constante de las Ig (FcγRs) y son fagocitadas por los macrófagos del sistema retículo endotelial (SRE) tanto del bazo como del hígado. Además estos macrófagos esplénicos y hepáticos también pueden actuar como CPA, presentando péptidos o fragmentos de antígenos GPIIb/IIIa y/o GPIb/IX a las células Th. Una vez activados, las CPA y los Th producen una serie de citoquinas proinflamatorias tales como la interleucina 6 (IL6), interleucina (IL10), sobreexpresando el CD154 o CD40L y activando a los linfocitos B, los cuales producen

de nuevo anticuerpos contra los antígenos plaquetarios, opsonizando las plaquetas que son destruidas en el SRE, cerrando así el círculo [87].

Por tanto podría decirse que la PTI tiene lugar porque tanto las CPA, los macrófagos, los Th y los LB escapan al control inmune de los Treg, modificándose así tanto las funciones como el número de las células previamente citadas. Las interacciones que se producen entre estos tipos celulares son fundamentales en los mecanismos etiopatogénicos de la PTI. Dichas interacciones son mediadas y potenciadas por varias moléculas de superficie, como son el receptor de los linfocitos T para el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), el B7-CD28-citotóxico, el CTLA-4, el CD40-CD40L y el Fas-FasL [87].(Fig.13)

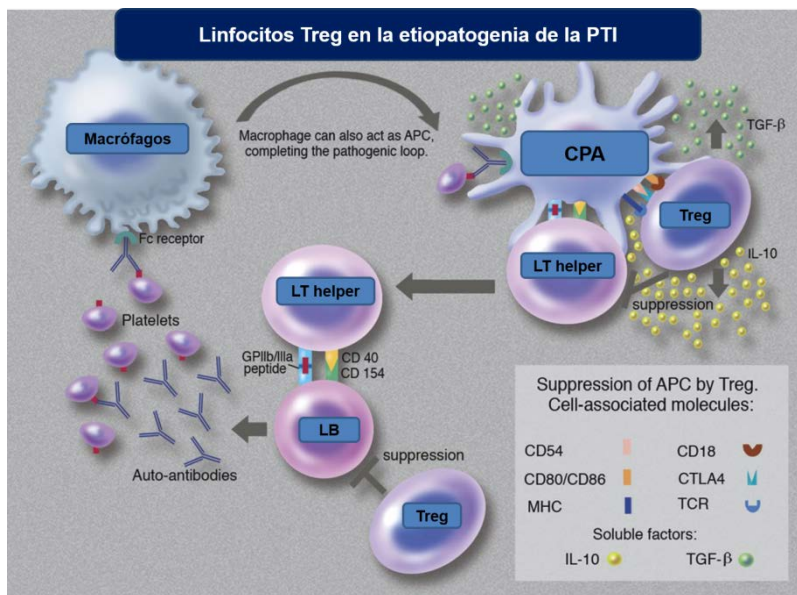


Figura 13. Interacciones entre las células implicadas en la respuesta inmune en los pacientes con PTI. En la figura se muestran las interacciones entre las células Treg con los linfocitos T helper, las CPA y los LB. En pacientes con PTI los linfocitos Treg permiten que los

Th induzcan la activación y proliferación de los LB y posteriormente la producción de autoanticuerpos contra los antígenos GPIIb/IIIa y/o GPIb/X de la superficie plaquetaria. (Adaptado de “ITP: Tregs come to the rescue” Blood 2010; 116:4388-4390).

El bazo es el principal órgano de producción de anticuerpos y de eliminación de plaquetas opsonizadas, previamente unidas a los macrófagos a través de los receptores para la Fc de las inmunoglobulinas. En el aclaramiento plaquetario en los pacientes con PTI los receptores para la Fc de las inmunoglobulinas implicados son los de baja afinidad, FcγRIIA y FcγRIIIA. Algunos autores han encontrado más frecuentemente ciertos polimorfismos como FcγRIIa-131H y FcγRIIIa-158V en pacientes con PTI [87,88].

Los pacientes con PTI además de presentar un aumento de la destrucción plaquetaria, presentan también una disminución en su producción. Dado que los antígenos GPIIb/IIIa y GPIb/IX se encuentran también en la superficie de los megacariocitos, los anticuerpos pueden unirse a los mismos alterando la megacariopoyesis [89]. Diferentes estudios han demostrado que dichos autoanticuerpos inhiben la proliferación y maduración de los megacariocitos, así como la liberación de plaquetas [91,92].

Mediante microscopia electrónica es posible observar las alteraciones que producen estos anticuerpos en los megacariocitos de médula ósea, el aumento del tamaño de las mitocondrias, la vacuolización del citoplasma, la distensión de membranas y la condensación de la cromatina nuclear [94,95] fig.14).

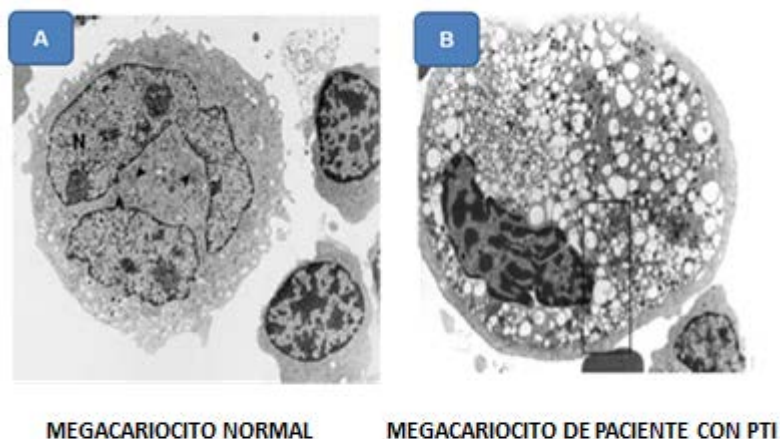


Figura 14. Características estructurales de la apoptosis en las plaquetas de pacientes con PTI. (A) muestra un megacarioblasto normal (megacariocito en fase I) con núcleo lobulado (N); en el citoplasma se puede observar un sistema característico de delimitación de la membrana (asteriscos) y mitocondrias normales (punta de las flechas). (B) Megacariocito maduro de un paciente con PTI que muestra características ultraestructurales de para-apoptosis. (Adaptada de Houwerzijl EJ, Blom NR, van der Want JJ, et al. Ultrastructural study shows morphologic features of apoptosis and para-apoptosis in megakaryocytes from patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 2004;103:500-506)

Las manifestaciones clínicas son muy variables y se caracterizan por sangrado mucocutáneo pudiéndose encontrar desde pacientes asintomáticos o con equimosis de pequeña cuantía, hasta pacientes con hemorragias de riesgo vital como, entre otras, hemorragias cerebrales o gastrointestinales.

Generamente la cifra de plaquetas se correlaciona con las manifestaciones hemorrágicas, pero no es el único factor que interviene. La edad del paciente, el estilo de vida u otros factores como la presencia de uremia, pueden contribuir igualmente al sangrado [77].

En adultos el comienzo suele ser molesto y generalmente tiene un curso crónico [95]. Sin embargo, en niños suele ser autolimitada y al menos dos tercios se recuperan espontáneamente en seis meses [93].

Diferentes estudios muestran tasas de mortalidad 1,3 a 2,2 veces mayor en los pacientes con PTI que en la población normal. Aunque la muerte por hemorragia es la mayor preocupación en estos pacientes, la mortalidad es baja [94]. Sin embargo, los pacientes mayores de 60 años y aquellos con hemorragias previas tienen mayor riesgo de sangrado [96]. Tanto el sangrado como la infección y los efectos secundarios del tratamiento, contribuyen por igual a la mortalidad [97].

Los tratamientos de la PTI están encaminados a restaurar el recuento de plaquetas. Podemos distinguir tres líneas de tratamiento.

Una **primera línea** que se centra en la inhibición de la producción de anticuerpos y la degradación de plaquetas. Los fármacos frecuentemente utilizados son glucocorticoides, junto con IVIg y antiD. Estos corticosteroides comparten un modo de acción común: son pequeñas moléculas que se une a un receptor citosólico específico que activa la transcripción. Los glucocorticoides pueden pasar a través de la membrana celular para entrar a la célula por difusión simple. Dentro de la célula, el glucocorticoide se une a su receptor. En el siguiente esquema (Fig.15) se muestra el mecanismo simplificado de señalización para los glucocorticoides:

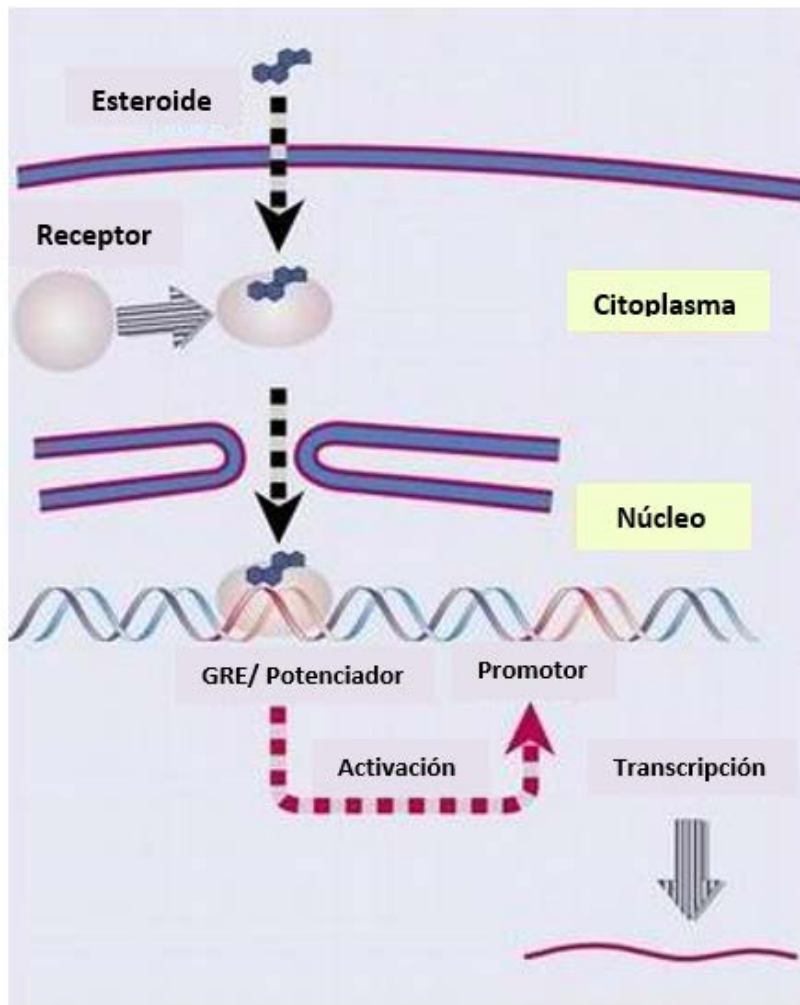


Figura 15. Mecanismo simplificado de señalización para los glucocorticoides. bio.uh.cu/sites/genmol/confs/conf7/p04_euc.htm.

El receptor activado reconoce una secuencia consenso específica que identifica al elemento respuesta al glucocorticoide (GRE).

Una **segunda línea** que incluye la esplenectomía y/o fármacos inmunosupresores y agonistas de l receptor de la TPO.

Una **tercera línea** que suelen ser inmunosupresores [98,99].

2.4. ACCIÓN DEL PLASMA RICO EN PLAQUETAS (PRP)

Una de las aplicaciones más importantes de los factores de crecimiento a nivel terapéutico es su utilización para mejorar el proceso de cicatrización de los tejidos blandos [100,101] y la regeneración ósea. Para esto se utilizan los factores de crecimiento contenidos en el plasma rico en plaquetas (PRP).

El plasma rico en plaquetas es una suspensión concentrada de plaquetas en plasma. Bioquímicamente, el PRP está compuesto de plasma, restos mínimos de leucocitos, plaquetas y factores de crecimiento.

Durante la primera fase del proceso de cicatrización se forma un entramado de fibrina que engloba plaquetas, neutrófilos y monocitos encargados de la quimiotaxis, de sintetizar la matriz extracelular y de estimular la división celular. Al aportar un mayor número de plaquetas y por tanto aumentar el estímulo, se acelera el proceso de cicatrización [100,101].

Varios estudios reportan que el calcio y la trombina activan la liberación de factores de crecimiento PDGF e IGF-1, reducen la concentración de HGF y no tienen efecto en la liberación de VEGF [100,101].

Algunos trabajos señalan que el PRP suprime la liberación de citoquinas, disminuye la inflamación, interacciona con macrófagos y acelera la curación del tejido y su regeneración [102,103].

La aplicación de PRP a cultivos de células óseas tiene un efecto dosis-dependiente. La exposición a corto plazo (24 horas) promueve funciones de proliferación y quimiotaxis en

dichas células, mientras que exposiciones mayores (11 días consecutivos) tiene como resultado un descenso tanto de la actividad de la fosfatasa alcalina (producto de la actividad celular) como de la formación de mineral [103].

Parece probable que tanto las plaquetas como las proteínas del plasma estimulen la expresión de genes que codifican el colágeno. Por su parte, el colágeno tipo I favorece la formación del coagulo de PRP estimulando la liberación de factores de crecimiento [104].

2.5. SISTEMAS DE OBTENCIÓN DE PRP

Dentro de los sistemas para la obtención de un concentrado de plaquetas se puede hacer una clasificación atendiendo a la cantidad de sangre necesaria para este fin [104].

Un primer grupo de métodos comprende aquellos que utilizan gran cantidad de sangre, aproximadamente 500 ml. Estos métodos son de uso hospitalario, se denominan sistemas de aféresis. El sistema consiste en colocar una vía venosa en el paciente a través de la cual se hace pasar la sangre a una centrífuga que por gradiente separa los elementos celulares; posteriormente se reinfunde al paciente el plasma y las células que no se van a utilizar, todo ello en un sistema cerrado y estéril para evitar la contaminación. Con este sistema se puede obtener un gran concentrado de plaquetas, que suele ir acompañada de la serie leucocitaria. La mayor parte de los trabajos consultados sobre este sistema intentan buscar una forma de prevenir la acumulación de citoquinas y leucocitos en el concentrado plaquetario [105,106].

Un requisito importante en estos sistemas para obtener el concentrado de plaquetas es mantener la integridad de las mismas sin que se activen. Para evitar que las plaquetas se activen y la sangre se coagule se utiliza citrato sódico como anticoagulante. Otra variable

que condiciona la integridad de las plaquetas es el tiempo de almacenamiento ya que según aumenta, se incrementa la posibilidad de fragmentación de las plaquetas y la liberación del contenido de sus gránulos alfa [105].

El segundo grupo de métodos de obtención de PRP utiliza menor cantidad de sangre y el sobrante no es reinfundido al paciente. Estos sistemas suelen manejar entre 50 – 200 ml de sangre, que se obtienen normalmente tras la venopunción de la flexura del codo. Como anticoagulante se utiliza citrato dextrosa o citrato sódico.

El tercer grupo de sistemas de obtención de PRP son aquellos que utilizan una cantidad inferior a 50 ml. Existen varios tipos en el mercado y en todos ellos, tras una venopunción en tubos estériles con citrato sódico se realiza una centrifugación (el tiempo y las revoluciones de la centrífuga dependen del sistema de centrífuga utilizado) [105,106].

2.5.1. OBTENCIÓN DE PRP PARA SU UTILIZACIÓN CLÍNICA

El PRP se obtiene por centrifugación diferencial de la sangre del donante [107].

Las muestras de plaquetas deben utilizarse rápidamente y no son válidas transcurridos unos días [108].

La obtención del PRP debe ser cuidadosa y el método muy estandarizado ya que el producto obtenido la mayoría de las veces no puede ser analizado antes de su utilización en el paciente.

La secuencia del proceso es básicamente la siguiente [108]:

- Punción venosa
- Extracción de la sangre

- Separación celular

El objetivo es la obtención de la máxima concentración de plaquetas por unidad de volumen sin la rotura de las mismas ya que cualquier alteración en el centrifugado puede producir daños estructurales en las células sanguíneas [108].

Actualmente hay varios aparatos para la obtención de PRP para su uso en la clínica dental como por ejemplo la Smart PRP (Harvest Technologies, Norwell, MA), el 13i Platelet Concentrate Collection System, el Plasma Seal (Plasma Seal, San Francisco, CA), y el Platelet Concentrator (Impl Innovations, West Palm Beach, FL) entre otros. Todos pueden procesar cantidades pequeñas de sangre total, de 45 a 60 ml, para obtener de 5 a 6 ml de PRP.

El Smart PRP y el 3i Platelet Concentrate Collection System son los únicos, aceptados por la FDA para la producción de PRP.

Una vez obtenido el PRP, se puede aplicar activándolo previamente o no, al sitio a tratar, mezclado con un material de injerto o solo. El PRP puede auto-activarse (tarda más de 30 min) o activarse mediante compuestos que aporten calcio (8 o 10 minutos) obteniéndose en ambos casos resultados variables. Para activar el PRP de forma segura se puede usar la trombina bovina pero en algunos países se evita su uso por el riesgo de transmisión de enfermedades. También se puede optar por activar el PRP con 1 ml de sangre autóloga y algo de hueso esponjoso autógeno, ya que ambos contienen trombina. Los últimos estudios experimentan con el empleo de un activador sintético, el TRAP [108]. Este péptido es un agonista del receptor de trombina del tipo PAR-1 que promueve la liberación de los factores de crecimiento contenidos en el PRP.

PROCESO DE REGENERACIÓN TISULAR

La comprensión de las fases en el modelo cicatricial y en concreto la regeneración tisular es esencial para entender los mecanismos de reparación ósea y de los beneficios que pueda tener el PRP en este proceso (Fig.16).

En todos los tejidos del organismo existen células madre “adultas” precursoras de distintos tipos celulares locales. Las últimas investigaciones en bioingeniería han referido que los factores de crecimiento descritos promueven la diferenciación y/o la proliferación de los preosteoblastos y de su estirpe, los osteoblastos [108].

Los factores de crecimiento liberados por los concentrados plaquetarios se distribuyen por difusión, debido a los gradientes de concentración de los mismos, que varían en función de la infiltración de fluido durante la respuesta reparativa inicial.

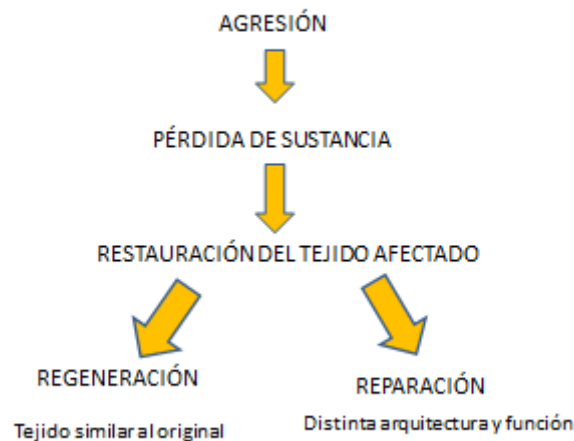


Fig 16- Proceso de regeneración o reparación tras la agresión.

En un primer momento se establece en el sitio de aplicación del PRP un coágulo de fibrina debido a la agregación plaquetaria, con lo que se favorece la aparición de un entorno de hipoxia, disminuyendo su pH hasta 4 o 6, mientras que el resto del organismo tiene un pH cercano a 7. Desde el principio todos estos estímulos provocan el inicio de la revascularización de la zona, la migración de las células pluripotenciales y la mitogénesis de células osteoprogenitoras y fibroblastos. En este ambiente, la cicatrización ósea comienza por la liberación de los factores de crecimiento en el injerto debido a la ruptura y la liberación del contenido de los gránulos plaquetarios [108]. Los factores liberados son, principalmente, PDGF, TGF- β e IGF.

La acción iniciada por los factores de crecimiento liberados por las plaquetas será continuada a partir del tercer o cuarto día por los factores de crecimiento liberados por los macrófagos, ya que la hipoxia en la que se encuentra el coágulo de fibrina crea un gradiente de oxígeno que induce la quimiotaxis de los macrófagos [108], que continúan liberando factores de crecimiento (PDGF, TGF- β , IGF-I, FGF).

El PDGF estimula la mitogénesis de las células desde el canal medular, y se inicia la angiogenesis en el interior del injerto inducida por la mitosis de las células endoteliales [108].

El TGF- β estimula la mitogénesis de preosteoblastos y osteoblastos aumentando el número de estas células a la vez que promueve su diferenciación a osteoblastos maduros.

La continua secreción de TGF- β favorece la formación de la matriz ósea y de colágeno.

El IGF actúa sobre los osteoblastos endo-óseos, limitando así las trabéculas del hueso esponjoso insertado.

Alrededor de los días 14 y 17 se puede ver la completa capilarización del injerto. Estos capilares responden al gradiente de oxígeno, por lo que después de la vascularización del

injerto, se establece un mecanismo inhibitor para prevenir una superangiogenesis [108].

Se origina entonces la coalescencia de las islas osteoides individuales a la superficie del hueso, produciéndose la consolidación clínica del injerto. Este momento se relaciona con la fase I de la regeneración ósea, es decir, la aparición de tejido óseo trabeculado desorganizado, sin sistemas harvesianos [108].

De la cuarta a la sexta semana el injerto está revascularizado y la regeneración ósea es casi completa, desaparecen los macrófagos y se inicia el proceso de reabsorción y reposición. En este punto se produce la liberación de proteína morfogenética del hueso (BMP) e IGF, proteínas ácido-insolubles que actúan en las células adyacentes del canal medular y en los preosteoblastos induciendo la proliferación y la diferenciación de éstas en osteoblastos funcionales que secretaran matriz ósea.

Este proceso definirá una arquitectura ósea madura con el sistema harvesiano característico del hueso de fase II, autosustentado. De esta forma, a través de un ciclo normal de reabsorción-remodelación y progresión del injerto se formará un hueso maduro y funcional.

POSIBLES RIESGOS

Entre los posibles riesgos por el uso de factores de crecimiento podemos destacar una posible contaminación del producto durante o después de su obtención y la posible transmisión de priones por el empleo de trombina bovina para la activación del mismo.

Además se ha relacionado la sobreexposición a los factores de crecimiento y sus receptores con la aparición de tejidos tumorales y displásicos, lo cual hace pensar en dos posibles riesgos: desarrollar carcinogénesis y la posibilidad de favorecer la metástasis

[109].

2.6. USOS CLINICOS DEL PLASMA RICO EN PLAQUETAS

En el campo de la **OFTALMOLOGÍA** existen diferentes trabajos en donde se utiliza el PRP. Ghering en 1999 utilizó el PRP para tratar los pacientes con máculas retinianas en estadio II a IV [110].

Hartwing probó el concentrado de plaquetas en la epitalización de defectos de la córnea: obtuvo el concentrado de plaquetas mediante plaquetoféresis y lo usó como colirio para acelerar la cicatrización de las úlceras corneales [111].

Un grupo español ha publicado la eficacia del tratamiento subconjuntival y tópico con un concentrado de plaquetas tras el autotrasplante y heterotrasplante compatible de células del limbo en el ojo con insuficiencia limbar total por quemaduras por ácido en los que había sido insuficiente un injerto previo. Se observó el acortamiento del tiempo de adaptación a los injertos, la estabilización corneal y la mejoría de la agudeza visual en el ojo tratado [112].

En **CIRUGÍA GENERAL** existen también aplicaciones del PRP con resultados alentadores. Kjaergard presentó un trabajo en el que realizaba resecciones pulmonares en cerdos y aplicaba el concentrado de plaquetas en forma de spray para evitar las fugas de aire en el post-operatorio, con magníficos resultados [113].

Schips aplicó el concentrado de plaquetas sobre el lecho de una nefrectomía parcial para mejorar la hemostasia durante la intervención obteniendo así una hemostasia más rápida [114].

Sidman lo aplicó en una amigdaladenoidectomía disminuyendo el sangrado y acelerando la cicatrización [115].

En **CIRUGÍA PLÁSTICA** el PRP se ha utilizado para mejorar la cicatrización con un adecuado nivel de factores de crecimiento, como describe Eppley [116].

En **DERMATOLOGÍA** el PRP se ha utilizado para la curación de úlceras de la piel, bien de origen vascular o diabético, traumatismos y quemaduras [117] (Fig17).

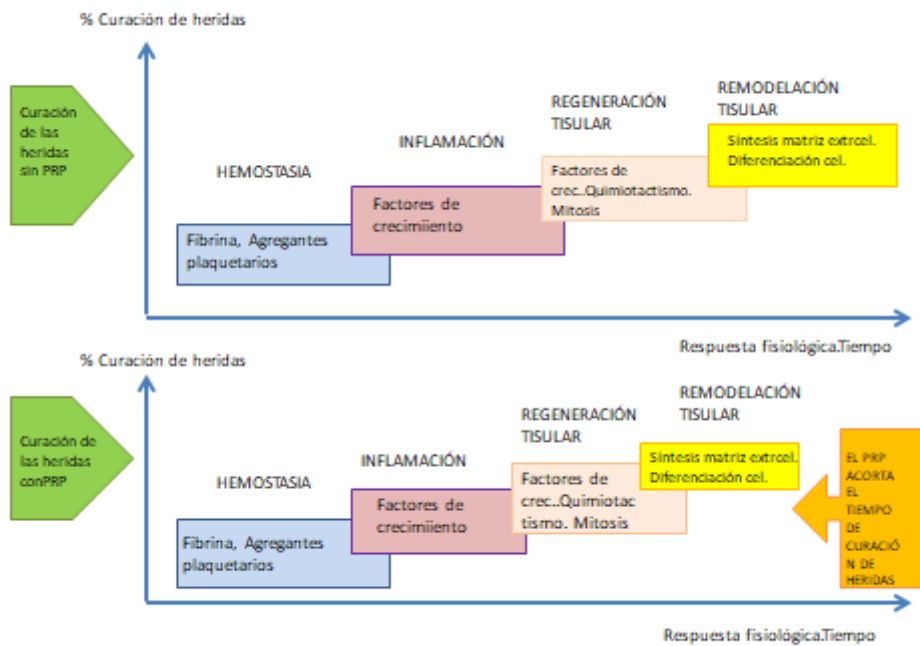


Fig 17. Diagrama esquemático del proceso de curación las heridas en condiciones normales y de su aceleración cuando se aplica el preparado de PRP. Adaptado de Rev Esp Cir Oral Maxilofac 2012;34:8-17 .

En el campo de la **TRAUMATOLOGÍA** el **PRP** ha sido más utilizado en plastias del ligamento cruzado anterior, [118], y para la rediferenciación de condrocitos en la reparación del cartílago en condroplastias articulares [119].

Uno de los primeros campos en los que se utilizó el **PRP** fue en **CIRUGÍA MAXILOFACIAL** [120,121]. Ya en 1997 Whitman habló de un gel de plaquetas como alternativa a la fibrina en la cirugía. Se utilizaba fundamentalmente en las cirugías de paladar hendido, en las reconstrucciones mandibulares y en comunicaciones oro-antrales o sinusales, observando una mejor hemostasia en las intervenciones en las que usaba el gel de plaquetas frente a aquellas en las que no lo usaba.

Robert Max en 1998 [121] observó la repercusión del uso de concentrado de plaquetas en cirugía maxilofacial estudiando la cicatrización y la maduración del hueso mediante el análisis radiológico valorado con histomorfometría, determinando la densidad ósea en los operados.

Uno de los procedimientos más utilizados en **ODONTOLOGÍA** y cirugía maxilofacial es la elevación del seno maxilar. Probablemente sea una de las cirugías de regeneración sobre la que existen un mayor número de trabajos realizados con diferentes técnicas de abordaje y en la que se utilizan diferentes materiales de relleno, desde hueso autólogo hasta materiales sintéticos [119, 120, 121].

Otro de los usos clínicos del **PRP** ha sido la **CIRUGÍA PERIODONTAL** [119]. Se ha probado en defectos infraóseos en los que el **PRP** se mezclaba con hueso desmineralizado para regenerar los mismos, observándose cantidades radiológicamente significativas de

hueso neoformado.

En la regeneración periodontal también se ha utilizado la mezcla de PRP y células madre mesenquimales aspiradas de la cresta ilíaca del paciente.

También existen numerosos estudios en el campo de la **IMPLANTOLOGÍA DENTAL** en donde se utiliza el PRP [119,122].

Gabory y cols. trataron de determinar los efectos de los factores de crecimiento liberados por el PRP en relación con el aumento de contacto entre el implante y el hueso. El estudio lo realizaron por primera vez en un hueso de clase I, es decir, formado principalmente por hueso cortical que posee un reconocido potencial de cicatrización mas bajo. Los resultados obtenidos fueron positivos, concluyendo que el PRP puede aumentar la anchura del hueso cortical alrededor del implante [122].

2. HIPÓTESIS

Actualmente, el uso de factores de crecimiento en medicina reparadora y regenerativa es cada vez más extendido, sin embargo, no siempre se obtienen buenos resultados.

Pensamos que factores externos, hábitos de vida propios de cada individuo y patologías que cursan con trombocitopenia podrían afectar la síntesis de los factores de crecimiento PDGF y TGF- β y su almacenamiento dentro de las plaquetas.

Conocer si estas situaciones pueden alterar los niveles de dichos factores de crecimiento en las plaquetas podría ayudar a predecir el potencial regenerativo del PRP.

3. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo fue estudiar si la edad, el género, hábitos y algunas medicaciones condicionan los niveles de los factores de crecimiento PDGF y TG- β . También se incluyó un grupo de individuos con trombocitopenia inmune, patología con una producción y vida media plaquetaria reducidas.

Este objetivo principal se subdividirá en:

- 1- Determinar las variaciones en los niveles de dichos factores en función del género, la edad, consumo de alcohol y tabaco, práctica de deporte y toma de medicación asociada a determinadas patologías como son los antidepresivos y los anticomiciales.
- 2- Establecer si existen variaciones en el contenido de los FC en las plaquetas de pacientes con trombocitopenia inmune (PTI).

4 . MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Descripción de los pacientes incluidos en el estudio

El estudio se llevó a cabo desde Julio de 2015 hasta octubre de 2015 en la Sección de Trombosis y Hemostasia del Hospital Universitario La Paz y en la UAX (Universidad Alfonso X el Sabio).

El protocolo de este estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de la UAX. Todos los individuos que se incluyeron fueron informados y firmaron el consentimiento de participación. Todos los procedimientos se realizaron siguiendo los principios de la Declaración de Helsinki. Se garantizó manejar la información respetando legislación española sobre códigos éticos de conducta (Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal; Real Decreto 1720/2007, de 21 de diciembre, por el que se aprueba el Reglamento de desarrollo de la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de protección de datos de carácter personal; y Ley 8/2001, del 13 de Julio, de Protección de datos de carácter personal en la Comunidad de Madrid).

Se trata de un estudio prospectivo, observacional y transversal.

A Se incluyeron 80 individuos entre 18 y 78 años que se dividieron en los siguientes grupos:

- 1) menores de 35 años, entre 35- 55 años y mayores de 55 años.
- 2) 35 hombres, 45 mujeres.
- 3) 15 fumadores, 65 no fumadores.
- 4) 25 consumen alcohol, 55 no.
- 5) 38 no practican deporte, 24 de forma ocasional y 18 son deportistas.
- 6) 5 individuos que toman antidepresivos, 6 individuos toman anticomiciales.

B) 30 pacientes con PTI crónica, definida por Rodeghiero como recuento de plaquetas inferior a 100/mL durante más de 12 meses con megacariocitos normales o aumentados en médula ósea, sin evidencia morfológica de displasia y sin otras patologías que puedan explicar trombocitopenia y 25 individuos sanos. Los pacientes con PTI (80% de mujeres) tenían una edad media de 60 ± 20 años, con un recuento plaquetario de 43000 ± 17000 /mL y los sujetos sanos (59% de mujeres, edad media 55 ± 23 años) tenían un recuento plaquetario de 186000 ± 48000 /mL.

En los pacientes con PTI los criterios de exclusión fueron hipertensión no controlada, enfermedad arterial periférica o coronaria, pruebas anormales de función hepática o renal, diagnóstico de trastorno hemorrágico o trombopatía, tratamiento con fármacos que pudieran afectar la hemostasia o antecedentes de episodios trombóticos.

Con objeto de evitar la influencia de los ciclos circadianos en las variables estudiadas, la hora de extracción de la sangre fue la misma para todos los sujetos del estudio (entre las 9 y las 10 horas de la mañana).

Se extrajeron 10 ml de sangre de una vía periférica que se recogieron en citrato sódico al 3,8% como anticoagulante. La aspiración de la muestra fue gradual para que se destruyeran menos células y se produjeran menos turbulencias para evitar la activación de las plaquetas.

El PRP se obtuvo por centrifugación de sangre total a 152 g, durante 10 minutos a 23°C y sin freno. Todas las muestras fueron analizadas o procesadas durante las 2 horas tras el muestreo. Los recuentos de plaquetas se determinaron con un contador de células Coulter Ac Tdiff (Beckman Coulter, Madrid, España).

Para aislar plaquetas 600 μ l del PRP se pasaron a un tubo eppendorf de 1,5 ml y al que se añadió 60 μ l de ACD (Citrato sódico, ácido cítrico y glucosa, proporción ACD 1:10)

A continuación se realizó una segunda centrifugación en microfuga a 5500 rpm durante 3 minutos, obteniéndose de esta manera un pellet de plaquetas. Las plaquetas se lavan 2 veces con tampón HEPES (HEPES 10 mM, NaCl 145 mM, KCl 5 mM y MgSO₄ 1 mM; pH 7,4) con ACD (1:10). Tras la última centrifugación el sedimento se congeló a -80°C. (Fig.18)

5.2 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Las plaquetas congeladas se resuspendieron en un medio hipotónico y posteriormente se sometieron a cinco ciclos de congelación con nieve carbónica/ descongelación a 37°C y agitando las muestras con un agitador Vortex entre cada ciclo. Esto permite romper las membranas evitando usar detergentes que puedan interferir en la posterior lectura de los ELISA empleados.

5.3 ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

5.3.1 Determinación de los niveles de PDGF y TGF – β en plaquetas.

Los niveles plaquetarios de PDGF y TGF - β se determinaron mediante la técnica de ELISA utilizando kits comerciales (PDGF Wuhao Science co. LTD. EIAab, Madrid,

España y TGF- β Cusabio. Madrid, España). Los resultados del ELISA (ng/ml) se corrigieron por el número de plaquetas.

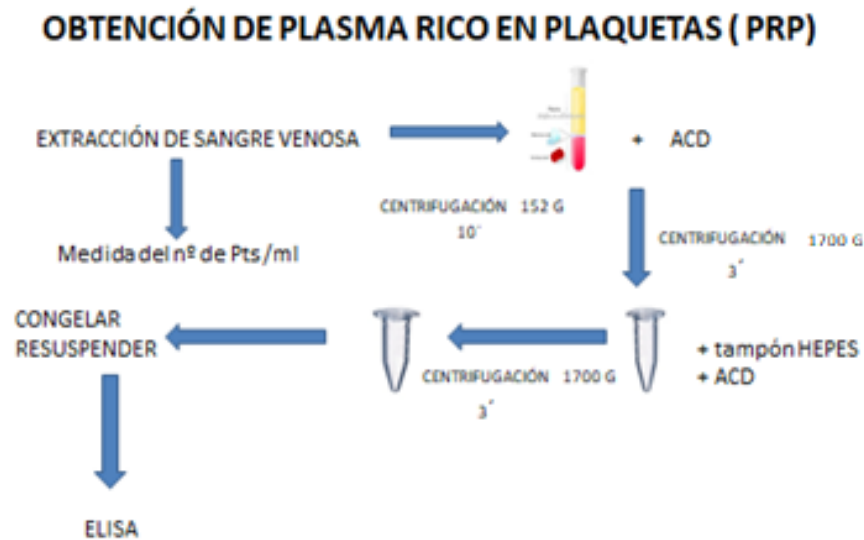


Figura 18. Esquema de obtención de PRP

5.4 DETERMINACIÓN DE FUNCIONALIDAD Y ACTIVACIÓN PLAQUETARIA.

La activación de las plaquetas se evaluó a través del análisis de la activación del receptor de fibrinógeno (Fg, marcador de activación plaquetaria) y por la exposición de P-selectina y CD63 (marcadores, respectivamente, de la liberación de los gránulos alfa y densos intraplaquetarios) en la superficie de las plaquetas, en estado basal y tras la activación con TRAP (Péptido Activador del Receptor de Trombina, Bachen, Bubendorf, Suiza). Para ello se utilizó PRP diluido 1:5 con tampón HEPES y se incubó con 100 μ M

de TRAP a temperatura ambiente y con buffer para la condición basal. Tras la incubación, se añadió PAC1 (Becton Dickinson, Madrid, España), un mAb que reconoce sólo la forma activa del receptor de fg, marcado con fluoresceína (FITC). Después de 15 minutos de incubación en oscuridad y a temperatura ambiente, las muestras se diluyeron en tampón HEPES para su análisis por citometría de flujo con un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson Biosciences). Se adquirieron 10.000 eventos en la región plaquetaria que fueron analizados con el software BD CellQuest Pro™ (Becton Dickinson Biosciences). Para determinar la expresión de P-selectina y de CD63 se evaluó la unión de mAb anti-P-selectina o anti-CD63 marcados con fluoresceína (FITC), ambos mAb de BD Pharmingen, San Diego, CA, USA en estado basal y tras la estimulación con TRAP 100µM y se analizaron por citometría de flujo.

Para cuantificar el receptor de Fg presente en la superficie plaquetaria, el PRP se diluyó 1:5 en buffer PBS y se incubó 20 minutos a temperatura ambiente con un mAb unido a ficoeritrina (PE) dirigido contra la subunidad α IIB (CD41, Biocytex, Marseille, France) o con un mAb unido a FITC dirigido contra la subunidad β 3 del receptor de Fg (BD Pharmingen). Tras la incubación el PRP se diluyó de nuevo con PBS (1:6) y las muestras se analizaron por citometría de flujo.

5.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se ha realizado con el programa SPSS statistics versión 20 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). El test de Shapiro-Wilk se usó para probar la distribución de la población. La comparación media o mediana de dos grupos se realizó, respectivamente, mediante el test de Student o de Mann-Whitney. El análisis de tres o más grupos se

realizó utilizando un método no paramétrico, el test de Kruskal-Wallis, y empleando el test post-hoc de Dunn. Los valores de $P < 0,05$ se consideraron significativos.

5. RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES.

En el presente estudio se analizó si la cantidad de los factores de crecimiento, PDGF y TGF β , en las plaquetas dependían de factores externos tales como el género, la edad, el hecho de fumar, ingerir alcohol, hacer deporte, o tomar medicación, tal y como antidepresivos o anticomiciales, medicación indicada para el tratamiento de los pacientes epilépticos y/o con dolores neuropáticos.

También se analizó si las plaquetas de pacientes con PTI presentaban diferencias en los niveles de dichos factores de crecimiento.

En la tabla 5 se muestran las características de los pacientes del estudio.

RESULTADOS

GÉNERO	EDAD	PATOLOG	MEDICAC	FUMADOF	ALCOHOL	DEPORTE	LEU	ERITR	Hb	LINFOC	VPN	PLAQUETAS
F		tumor riñ	no	no	no	si, frecuer	3.0	4.4	13.3			64
F	24		no	no	no	si, ocasior	6.1	4.76	14.2	2.5	6.0	254
M	28		veroidin	no	no	si, ocasior	6.2	4.68	13.6	2.4	7.1	235
M	29		no	15 dia	ocasional	no	7.9	4.9	13.5	2.2	7.7	150
F	22		no	no	ocasional	no	6.0	4.8	14.6	2.1	5.5	195
F	22		atcptvos	no	no	no	6.4	4.5	13.9	2.6	6.7	300
F	34		no	no	no	si, ocasior	6.4	4.40	12.7	2.9	6.7	226
F	23		no	no	ocasional	si, frecuer	5.4	4.79	14.0	2.6	7.8	165
M	23		omeopraz	no	ocasional	si, ocasior	3.7	4.72	14.3	1.6	7.4	204
M	20		no	no	no	no	9.2	4.78	13.0	4.1	6.3	272
M	34		no	no	no	no	8.2	4.06	12.7	2.4	7.5	225
F	23		no	no	no	si, ocasior	6.0	4.78	14.6	1.8	7.8	255
M	29	epilepsia	anticomic	5 dia	no	si, ocasior	2.5	3.6	10.5	0.6	8.3	52
F	27	no	anticonce	no	no	no	3.6	4.4	13.0	1.5	9.5	245
F	8	no	no	no	no	si, frecuer	9.6	4.4	12.5	3.3	11.3	258
F	25	no	antidepre	no	ocasional	si, ocasior	5.0	4.6	14.1	1.9	8.8	392
F	21	epilepsia	tegret/gal	2 dia	no	si, ocasior	5.4	3.7	11.1	2.2	8.4	192
M	24	epilepsia	anticomic	4 dia	ocasional	no	5.1	4.7	15.2	2.4	11.5	136
F	16	anorexia	no	no	no	si, frecuer	4.8	4.2	13.7	1.4	9.5	236
F	51		no	no	no	si, ocasior	6.8	4.24	12.4	2.4	7.1	209
M	44		no	no	no	si, ocasior	13.1	4.38	13.6	3.9	6.4	394
M	50		no	no	no	si, ocasior	4.8	4.33	11.6	1.4	8.4	164
M	36		no	no	no	si, ocasior	5.9	4.57	12.5	2.2	6.7	237
F	39		no	no	no	si, ocasior	5.5	5.00	14.3	2.3	5.9	277
M	40		no	no	ocasional	no	4.7	5.02	14.1	1.8	7.0	271
F	45		no	2 dia	ocasional	si, ocasior	8.7	4.7	14.9	3.1	6.5	281
M	44		no	no	ocasional	no	5.6	4.5	12.9	2.1	6.1	310
F	51		secalip	14	no	si, ocasior	6.5	4.2	13.1	2.5	6.8	339
F	37		antalgil	20 dia	ocasional	no	7.5	3.95	11.9	3.1	6.9	286
M	46		no	no	no	si, frecuer	4.2	4.93	13.5	1.7	5.8	150
M	37		no	no	ocasional	no	5.5	4.61	12.7	1.9	6.3	281
F	53		no	no	no	si, ocasior	6.8	3.95	11.6	2.6	7.2	311
F	46		evirox	no	no	no	8.0	4.08	12.0	2.0	6.3	306
F	54		no	no	no	no	8.1	5.11	15.2	3.6	7.1	328
M	46		no	no	no	no	6.7	4.98	14.2	2.6	6.1	298
F	49		no	no	no	si, ocasior	4.8	4.28	13.1	2.0	7.8	167
M	45		no	no	no	si, ocasior	5.2	5.02	13.2	1.8	6.1	248
F	55		no	no	no	si, ocasior	8.6	4.14	12.0	3.2	6.7	239
F	52	Hptiro/lu	estati/lca	20 dia	no	no	7.2	4.6	14.3	1.7	8.7	260
M	54	no	no	no	ocasional	no	5.6	5.2	14.8	2.0	8.4	233
M	54	no	no	si 40 dia	si 1 litro d	no	13.7	4.3	14.2	1.6	8.4	232
F	55	epilepsia	anticomic	no	no	si, frecuer	4.5	4.8	14.2	1.2	9.6	166
F	43	epilepsia	anticonvu	no	no	no	5.2	3.3	11.2	1.6	10.0	200
M	50	hepatitis	Hpoleste	no	ocasional	no	7.3	5.2	14.2	2.0	9.6	334
F	51	epilepsia	htirod/an	no	no	no	4.1	4.4	13.5	1.7	10.4	185
F	47	no	tepacean	no	no	si, frecuer	5.9	4.4	12.2	1.9	8.6	311
F	43	no	besitran	no	no	no	6.5	4.5	13.9	1.6	7.6	246
F	51	no	no	no	ocasional	si, frecuer	3.7	4.3	13.1	1.1	9.1	264
M	35	VIH	retroviral	no	no	si, ocasior	7.1	5.0	14.3	3.1	9.1	91
F	52	epil - ictu	atcoag-ate	no	no	no	4.4	4.2	12.2	1.3	9.9	245
F	39		no	no	no	si, ocasior	8.8	4.4	12.5	2.1	10.5	442
M	41	no	no	20 dia	1 dia	no	4.4	4.6	14.1	1.7	7.4	281
F	52	no	no	1 dia	no	no	4.1	4.4	13.6	1.6	8.7	243
F	51	no	no	no	no	no	9.7	4.6	13.9	2.1	9.2	403
M	64		no	no	no	si, ocasior	5.7	4.57	13.9	2.3	5.7	276
M	61		no	no	no	no	6.8	4.48	13.1	1.9	7.5	125
M	56		no	no	no	si, ocasior	6.4	5.10	15.8	2.3	5.8	168
F	61		no	no	no	no	5.2	5.56	13.8	2.1	6.6	204
F	56	colico ren	aremis/or	20 dia	ocasional	no	9.5	4.1	13.2	3.1	8.1	302
F	72	ca mama	hnas tiroi	no	no	si, frecuer	5.2	4.3	12.6	1.1	9.6	182
F	66	no	no	30 dia	ocasional	si, ocasior	9.0	4.7	14.5	2.9	8.4	179
F	59	no	anthpt/te	no	no	si, frecuer	5.4	4.6	13.8	1.2	9.5	169
M	74	no	AHT/diur/	no	1 dia	no	5.3	5.3	15.7	2.7	9.2	144
F	56	hepatitis	triptizol	no	no	si, frecuer	2.9	4.5	13.9	1.0	8.7	236
F	64	no	no	no	no	no	9.4	4.3	13.1	0.6	9.5	241
F	59	no	no	12 dia	ocasional	si, frecuer	6.4	4.5	15.1	2.7	9.0	216
M	56	ca prostat	no	no	no	no	7.3	5.2	14.9	1.1	9.2	291
M	74	ca laringe	tamak/cm	no	no	no	8.7	5.1	15.2	1.7	9.2	270
F	79	no	betalisina	no	no	no	7.8	4.0	12.0	2.2	9.1	201
M	69	no	sintr/aten	no	ocasional	no	5.9	4.9	14.6	1.3	8.7	245
M	70	no	orfi/depre	6 dia	ocasional	si, frecuer	8.3	5.1	16.0	2.0	9.3	154
M	78	no	anticomic	no	no	no	9.8	4.6	14.0	1.6	9.5	346
M	57	Artritis rei	carbamac	20 dia	ocasional	no	6.5	4.3	13.4	2.1	9.0	252
F	75	epilepsia	depakine	no	no	no	5.8	4.3	13.6			161
F	74	no	no	no	no	si, frecuer	8.1	4.5	12.9	1.9	8.6	296
M	57	epilepsia	atepilepti	no	no	no	3.7	4.4	13.9	1.4	8.6	145
M	70	ca prostat	Aht/diur/	no	1 dia	si, frecuer	5.5	4.9	14.5	1.3	9.7	102
F	35	no	no	no	no	no	8.3	4.9	16.00	1.9	9.5	250
M	43	no	no	no	no	no	6.5	5.1	14.5	2.0	8.6	216

M	69	no	sintr/aten	no	ocasional	no	5.9	4.9	14.6	1.3	8.7	245
M	70	no	orfi/depr	6 dia	ocasional	si, frecuer	8.3	5.1	16.0	2.0	9.3	154
M	78	no	anticomic	no	no	no	9.8	4.6	14.0	1.6	9.5	346
M	57	Artritis re	carbamac	20 dia	ocasional	no	6.5	4.3	13.4	2.1	9.0	252
F	75	epilepsia	depakine	no	no	no	5.8	4.3	13.6			161
F	74	no	no	no	no	si, frecuer	8.1	4.5	12.9	1.9	8.6	296
M	57	epilepsia	atepilepti	no	no	no	3.7	4.4	13.9	1.4	8.6	145
M	70	ca prostat	Aht/diur/	no	1 dia	si, frecuer	5.5	4.9	14.5	1.3	9.7	102
F	35	no	no	no	no	no	8.3	4.9	16.00	1.9	9.5	250
M	43	no	no	no	no	no	6.5	5.1	14.5	2.0	8.6	216

Tabla 5. Características de los pacientes del estudio.

5.2 ANÁLISIS DEL FACTOR PDGF

5.2.1 GÉNERO

Se realizó un análisis para ver si existe relación entre los niveles de factor PDGF y el género. El estudio se hizo sobre 80 pacientes, 44 mujeres y 36 hombres. (Fig 19).

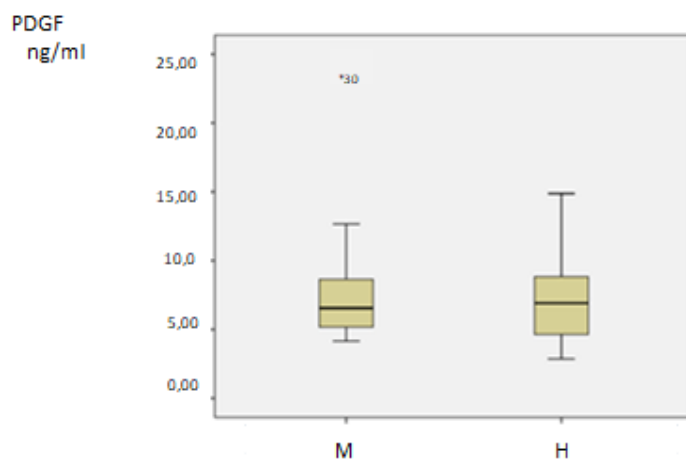


Fig 19. Análisis del contenido de factor PDGF en las plaquetas respecto del género

No hubo diferencias entre hombres y mujeres en el contenido de PDGF de las plaquetas.

5.2.2 EDAD

Para el estudio de la influencia de la edad en la cantidad de PDGF se dividió la población en tres grupos: 20 individuos menores de 35 años, 37 individuos entre 35 y 55 años y 23 individuos mayores de 55 años (Fig 20).

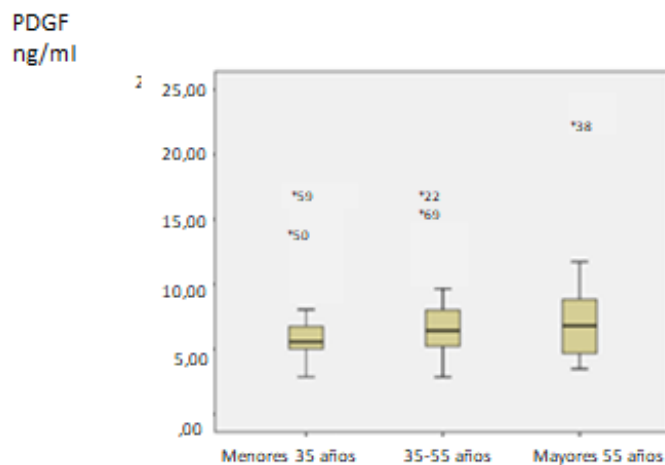


Fig 20. Análisis del factor PDGF en las plaquetas respecto de la edad.

No hubo diferencias en el contenido plaquetario del factor PDGF en plaquetas de individuos de distintas edades. Los valores que están fuera de la distribución de la población correspondían a los individuos 50 y 59, quienes, respectivamente, tomaban

antiepilépticos y antidepresivos, el 38 que está operada de cáncer de mama y toma hormonas tiroideas, y el 22 que está tratado con retrovirales para el VIH.

5.2.3 EDAD – GÉNERO

Para estudiar si existía una relación entre el género y la edad con el contenido plaquetario de PDGF, los tres grupos de población divididos según la edad se separó en hombres y mujeres, teniendo: menores de 35 años, 13 mujeres y 7 hombres, entre 35 y 55 años ,20 mujeres y 17 hombres y mayores de 55 años 11 mujeres y 12 hombres. (Fig 21).

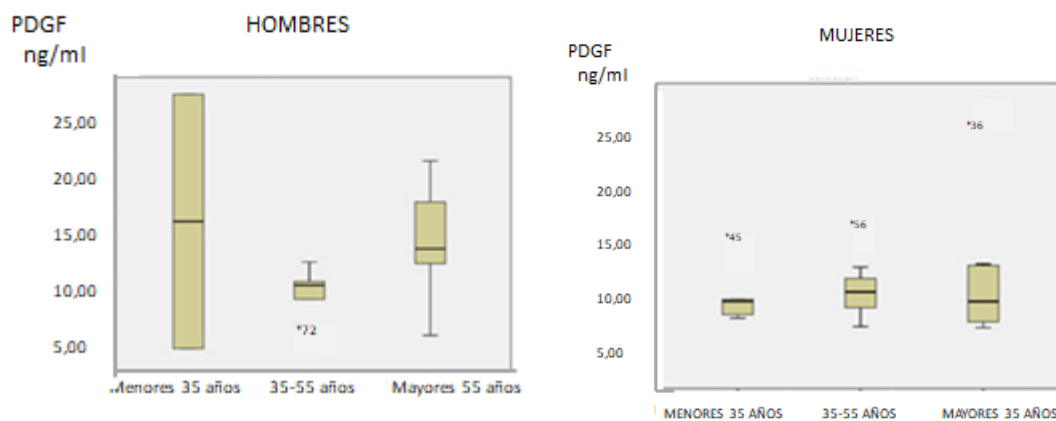


Fig 21 Análisis del contenido de factor PDGF en las plaquetas respecto del género y la edad.

La distribución del contenido de PDGF según la edad y el género fue similar en las plaquetas de los hombres y en las de las mujeres

5.2.4 TABACO

Se estudió si el tabaco afectaba al contenido plaquetario de PDGF. El análisis se hizo de un total de 80 individuos de los cuales 65 eran no fumadores y 15 fumadores. (Fig 22).

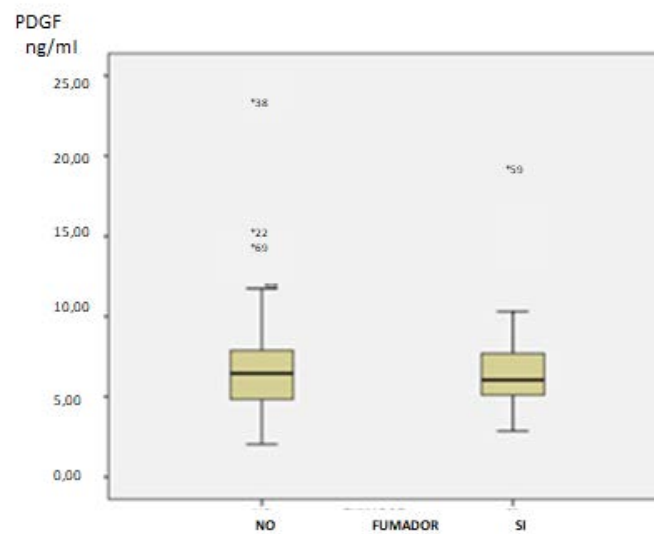


Fig 22. Análisis del contenido de factor PDGF en las plaquetas en individuos fumadores y no fumadores.

No hay diferencias en el contenido de PDGF entre individuos fumadores y no fumadores.

5.2.5 TABACO – GENERO

Se analizó la relación entre fumadores y género en una población de 44 mujeres, 8 fumadoras y 36 no fumadoras y 35 hombres 29 no fumadores y 7 fumadores (Fig 23).

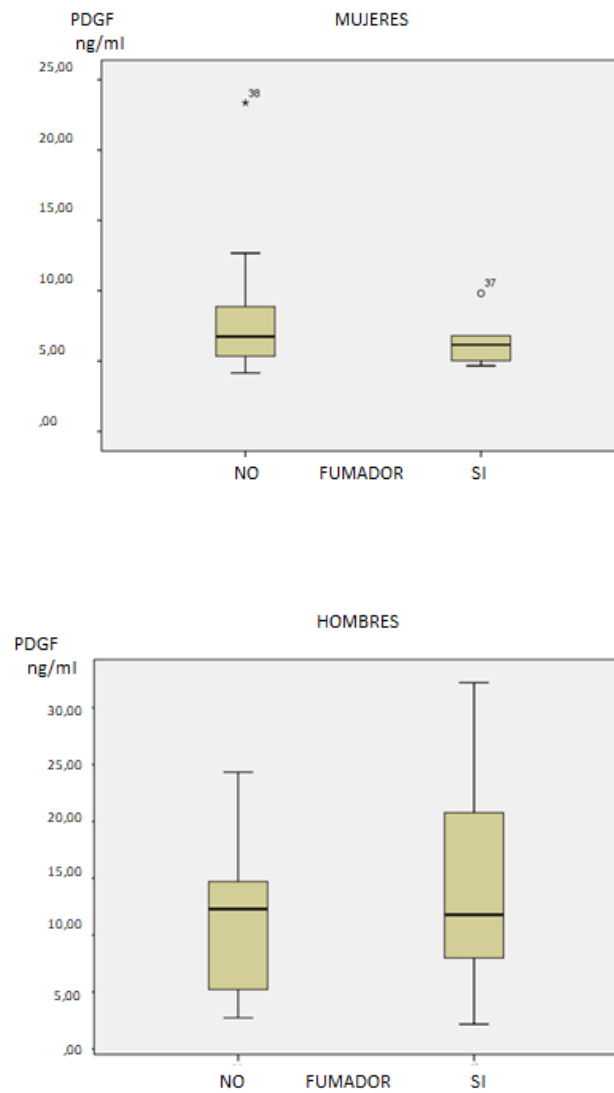


Fig 23. Análisis del contenido de factor PDGF en las plaquetas respecto del género en individuos fumadores y no fumadores.

Ambas gráficas muestran que el hábito de fumar no modifica el contenido plaquetario de factor PDGF en los hombres y en las mujeres ($P = 0,42$ en mujeres y $P = 0,547$ en hombres).

5.2.6 ALCOHOL

Se estudió si el consumo de alcohol tenía incidencia en el contenido de PDGF de las plaquetas, en una población de 80 individuos en la cual 55 individuos no bebían alcohol habitualmente y 25 sí. (Fig 24).

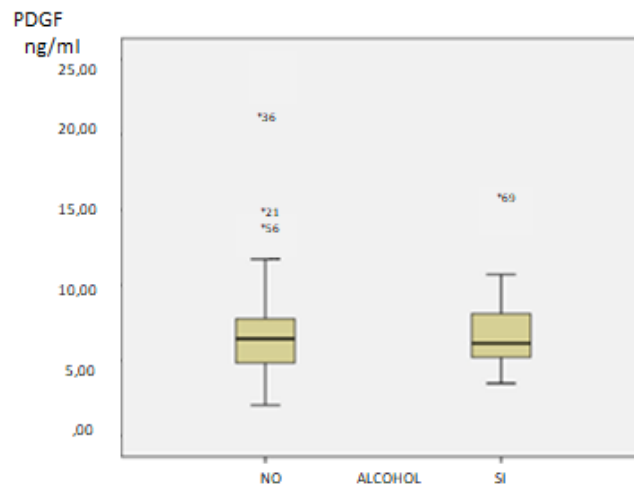


Fig 24. Análisis del contenido de factor PDGF en las plaquetas en función del consumo de alcohol.

En el gráfico podemos observar que no hay diferencias en el contenido de PDGF plaquetario entre aquellos individuos que consumen alcohol y los que no lo hacen ($P = 0,927$).

5.2.7 ALCOHOL – GÉNERO

Se analizó la relación entre ingesta habitual de alcohol y género en una población de 4 mujeres, de las cuales 10 ingerían alcohol y 34 no, y 36 hombres, 15 de ellos bebedores habituales y 21 no. (Fig 25).

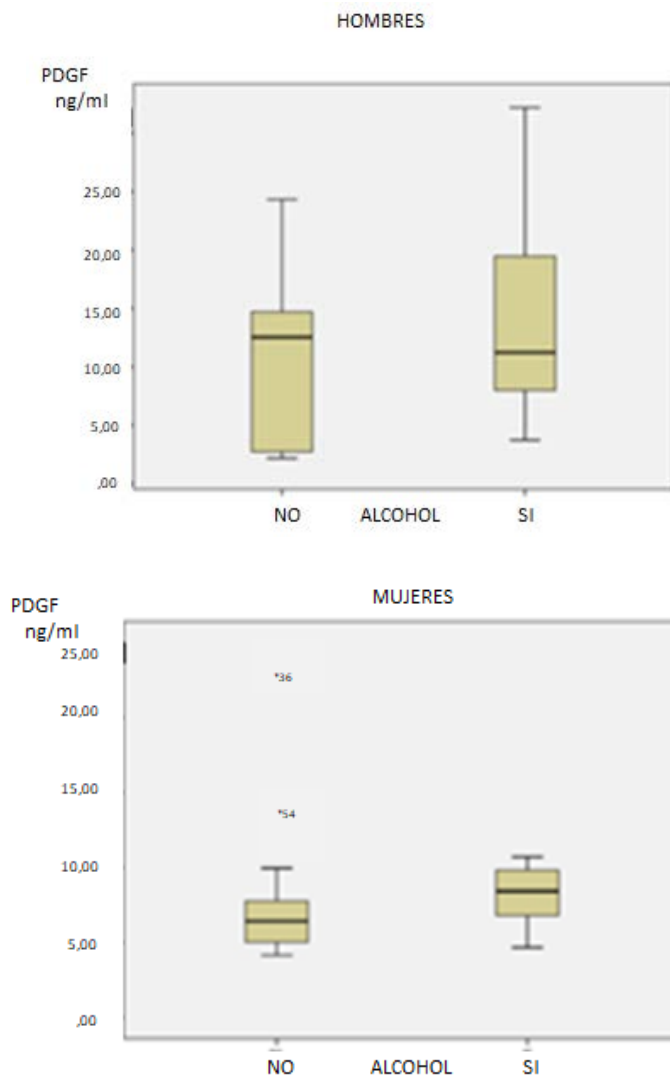


Fig 25. Análisis del contenido de factor PDGF en las plaquetas respecto del género y el consumo de alcohol.

Si bien no existían diferencias significativas en los grupos de estudio ($P = 0,753$ en

mujeres y el valor de $P = 0,647$ en hombres), en el gráfico se puede observar que el contenido endógeno de PDGF plaquetario es ligeramente superior en aquellas mujeres que consumen alcohol que en las que no lo hacen, mientras que en los hombres se observa una mayor dispersión en los valores de PDGF.

5.2.8 DEPORTE

Evaluamos si realizar deporte tenía incidencia en el contenido plaquetario de PDGF. El análisis se hizo de un total de 80 individuos de los cuales 38 no hacía deporte, 18 hacían deporte con frecuencia y 24 ocasionalmente. (Fig 26).

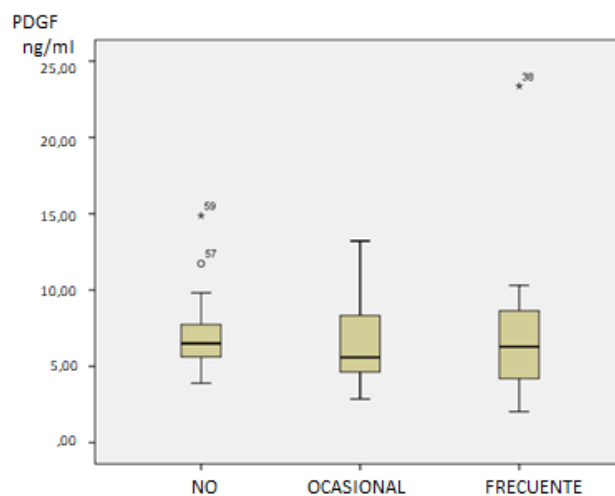


Fig 26. Análisis del contenido de factor PDGF en las plaquetas respecto de la práctica de deporte.

El análisis estadístico demostró que no había diferencias significativas entre aquellos individuos que no practicaban deporte y los que lo realizaban ocasional o frecuentemente.

5.2.9 DEPORTE- GÉNERO

Se analizó si el contenido de PDGF plaquetario estaba condicionado por el género y la realización de deporte. Se evaluó una población de 44 mujeres, de las cuales 16 no hacían deporte, 15 lo hacían habitualmente y 12 ocasionalmente y una población de 36 hombres de los cuales 21 no hacían deporte, 2 frecuentemente y 13 ocasionalmente. (Fig 27).

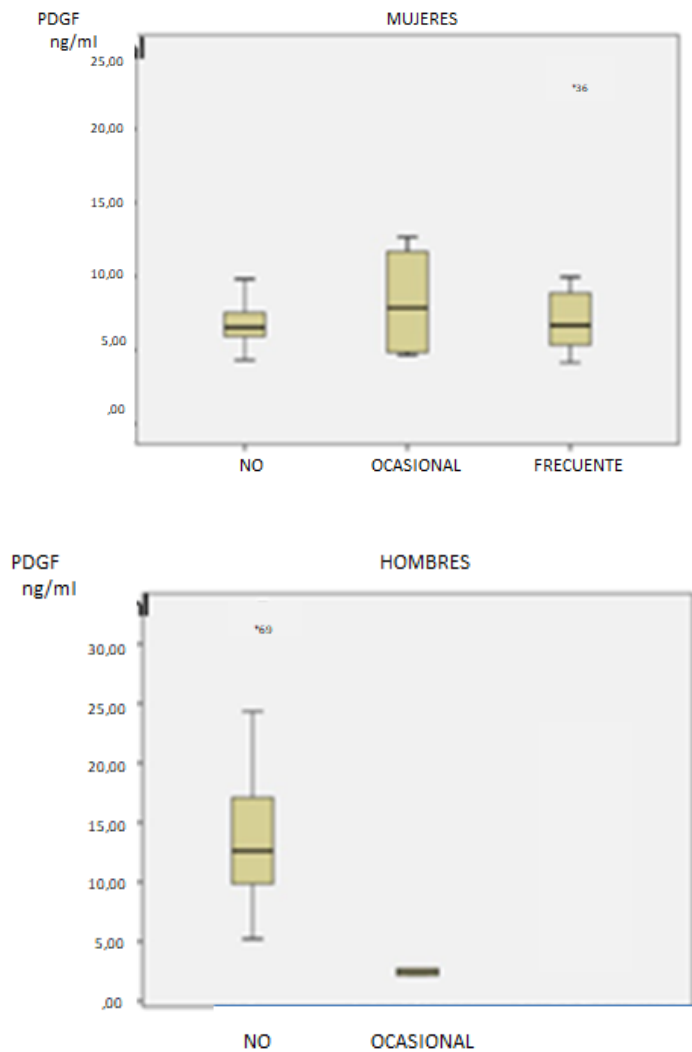


Fig 27. Análisis del contenido de factor PDGF en las plaquetas respecto del género y la práctica de deporte.

Tampoco en este caso vemos diferencias en el contenido endógeno de PDGF en las plaquetas entre la población femenina estratificada según la realización de deporte. El bajo número de hombres que practicaban deporte frecuentemente no permite incluir a esta población en el análisis estadístico. Las pruebas Post Hoc en la población masculina no fueron significativas en ninguno de los casos, siendo $P = 0,901$ en los que no hacen deporte y los que hacen ocasionalmente $P = 0,951$ en los que no hacen deporte y si lo hacen frecuentemente, $P = 0,807$ en los que practican deporte ocasionalmente y los que lo practican frecuentemente.

En el caso de las mujeres la prueba Las pruebas Post Hoc tampoco fueron significativas, siendo $P = 0,955$ en los que no hacen deporte y los que hacen ocasionalmente $P = 0,225$ en los que no hacen deporte y si lo hacen frecuentemente, $P = 0,391$ en los que practican deporte ocasionalmente y los que lo practican frecuentemente.

5.2.10 ANTIDEPRESIVOS

Se estudió si la toma de antidepresivos influía en el contenido de PDGF en las plaquetas. El análisis se hizo de un total de 80 individuos de los cuales 75 no tomaban antidepresivos y 5 sí. (Fig 28).

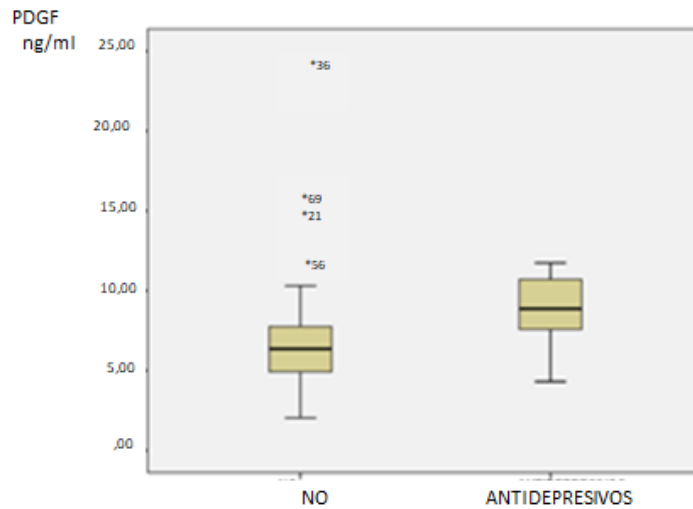


Fig 28. Análisis del contenido de factor PDGF en las plaquetas respecto a la toma de antidepresivos.

No hay diferencia los valores de PDGF plaquetario en los individuos estudiados ($P = 0,183$).

5.2.11 ANTIDEPRESIVOS – GÉNERO

Estudiamos si el consumo de antidepresivos afectaba de manera distinta el contenido endógeno de PDGF en las plaquetas de individuos de los distintos géneros. En nuestra cohorte, de las 44 mujeres, 3 tomaban antidepresivos y de los 36 hombres, sólo 2 tomaban esta medicación. La gráfica 29 se ha realizado con el objeto de mostrar la distribución de los niveles de PDGF en nuestra cohorte, pero el bajo número de individuos incluidos imposibilita realizar el análisis estadístico. (Fig.29)

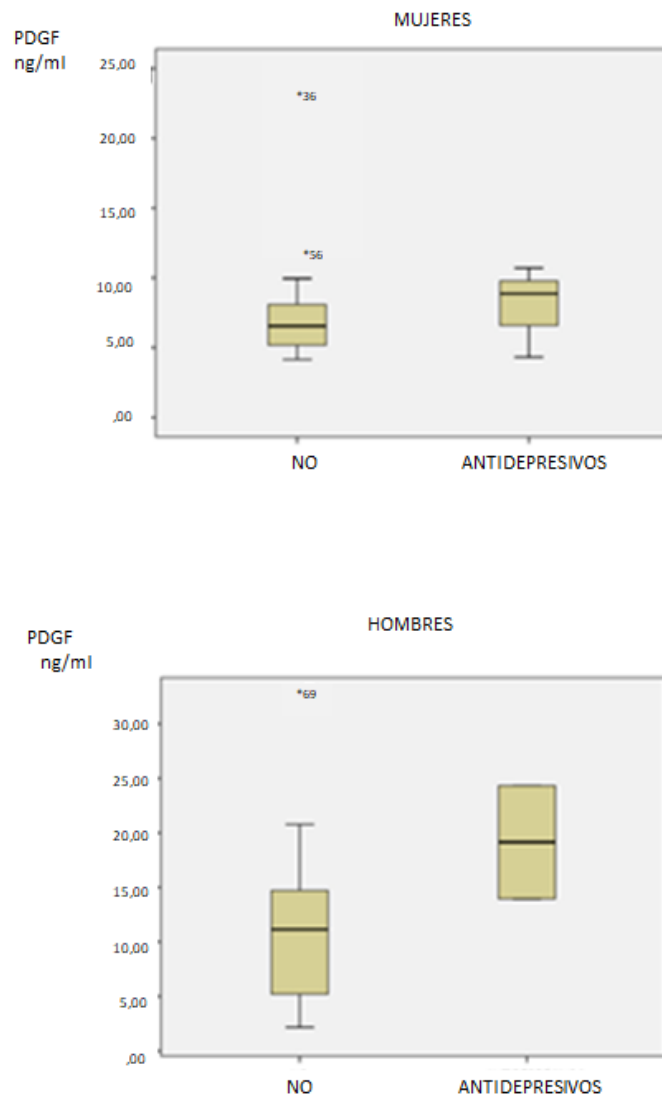


Fig 29. Análisis del contenido de factor PDGF en las plaquetas respecto del género y la medicación con antidepresivos.

5.2.12 ANTICOMICIALES

Estudiamos si el tratamiento con anticomiciales incidía en el contenido plaquetario de PDGF. El estudio se hizo en una población de 80 individuos, de los cuales 6 tomaban anticomiciales y 71 no. (Fig 30).

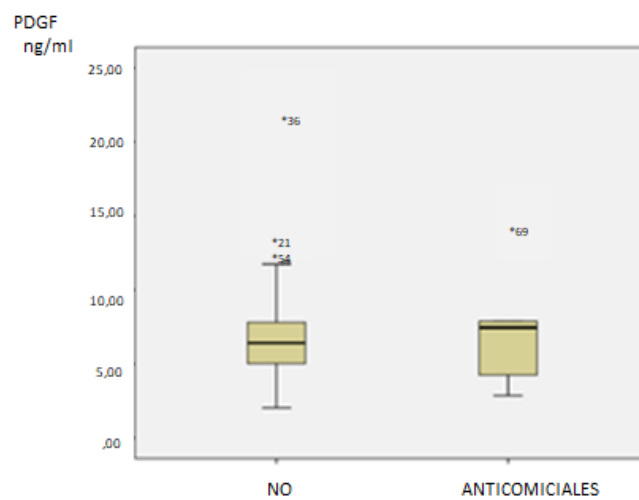


Fig 30. Análisis del contenido de factor PDGF en las plaquetas en relación a la medicación con anticomiciales

En la gráfica podemos observar que no existen diferencias entre los grupos ($P = 0,642$)

5.2.13 ANTICOMICIALES – GÉNERO

En nuestra cohorte, de las 44 mujeres, 4 tomaban anticomiciales y de los 36 hombres, sólo 2 tomaban esta medicación. . (Fig 31). Por este motivo, la gráfica 31 se ha realizado con el objeto de mostrar la distribución de los niveles de PDGF en nuestra cohorte, pero

el bajo número de individuos incluidos imposibilita realizar el análisis estadístico (Fig 31).



31. Análisis del contenido de factor PDGF en las plaquetas respecto género y la medicación con anticomiciales

ANÁLISIS DEL FACTOR TGF β

5.3.1 GÉNERO

Se estudio un total de 80 casos, de los cuales 44 fueron mujeres y 36 hombres. (Fig 32).

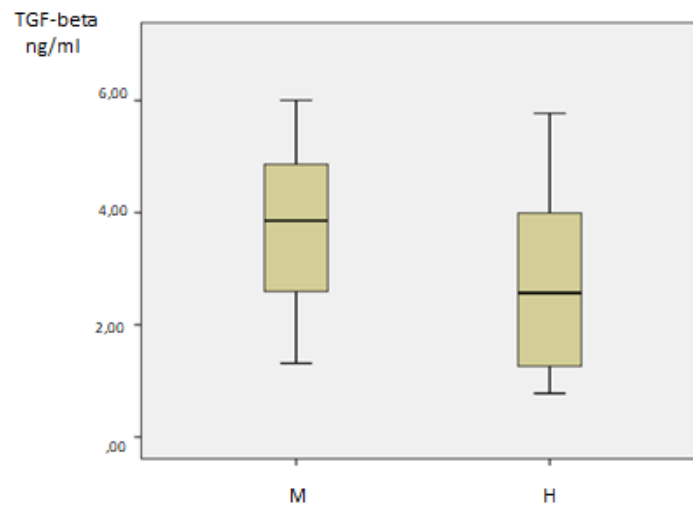


Fig 32. Análisis del contenido de factor TGF- β en las plaquetas respecto del género. ($P = 0,038$).

Las plaquetas de las mujeres contenían más TGF β que las de los hombres.

5.3.2 EDAD

Para estudiar la influencia de la edad en la cantidad de TGF β plaquetaria la población se dividió en tres grupos: menores de 35 años (20 individuos), entre 35 y 55 años (37 individuos) y mayores de 55 años (23 individuos). (Fig 33).

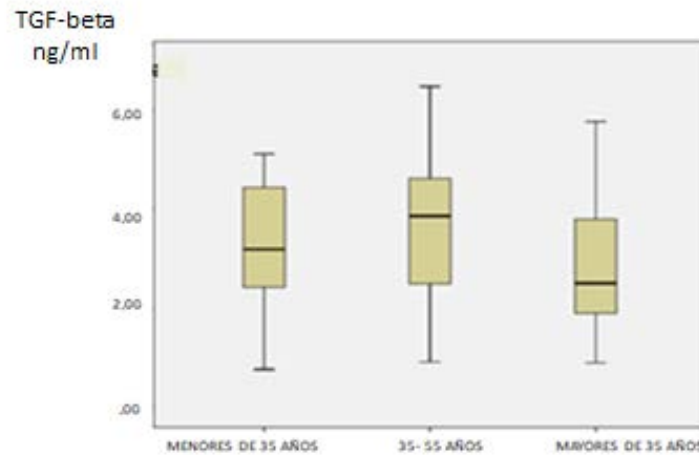
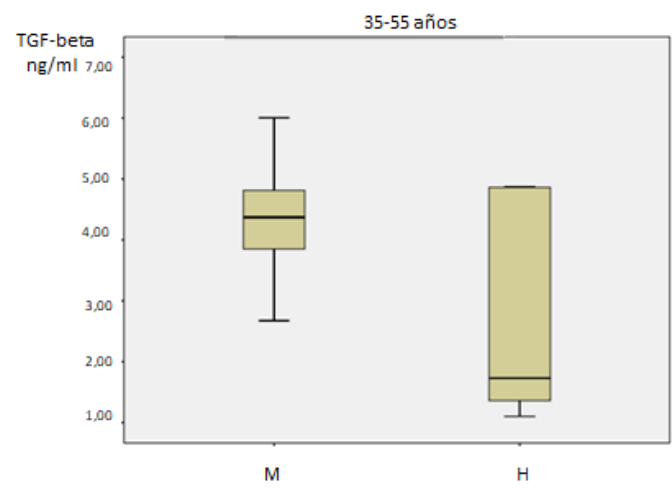
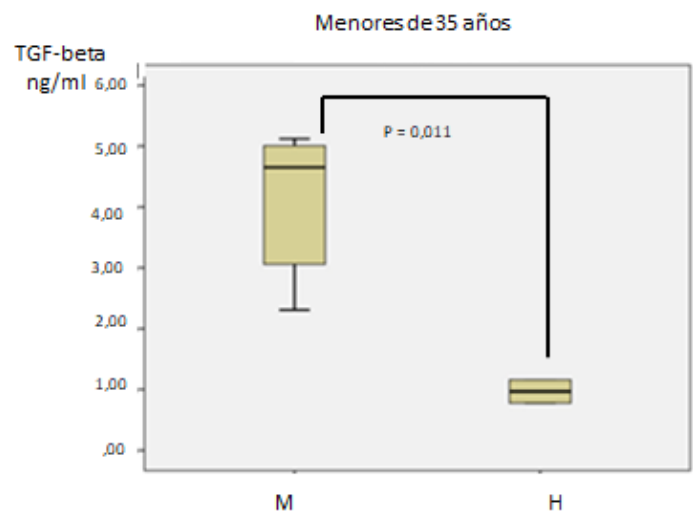


Fig 33. Análisis del contenido de factor TGF- β en las plaquetas respecto de la edad

La edad no modifica el contenido de TGF β de las plaquetas. ($P > 0.05$)

5.3.3 GÉNERO - EDAD

Para estudiar si existía relación entre el género y la edad con el contenido plaquetario de TGF β , los tres grupos de población divididos según la edad se separó en hombres y mujeres, teniendo: menores de 35 años, 13 mujeres y 7 hombres, entre 35 y 55 años, 20 mujeres y 17 hombres y mayores de 55 años 11 mujeres y 12 hombres. (Fig 34).



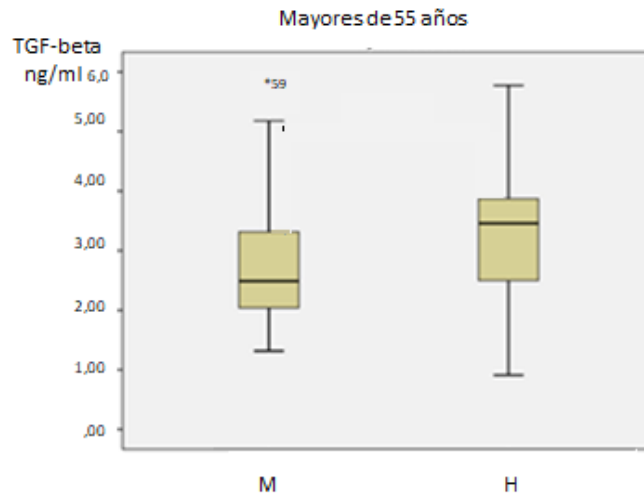


Fig 34. Análisis del contenido de factor TGF- β en las plaquetas respecto del género y la edad.

Las plaquetas de las mujeres menores de 35 años contenían más TGF- β que las de los hombres del mismo rango de edad ($P = 0,011$). Esta tendencia se mantenía en el grupo entre 35–55 años, aunque no fue significativa ($P = 0,052$). En el grupo de mayores de 55 años el contenido de TGF- β en las plaquetas fue similar en hombres y mujeres ($P = 0,725$).

5.3.4 TABACO

Se estudiaron 80 individuos de los cuales 65 eran no fumadores y 15 fumadores. (Fig 35).

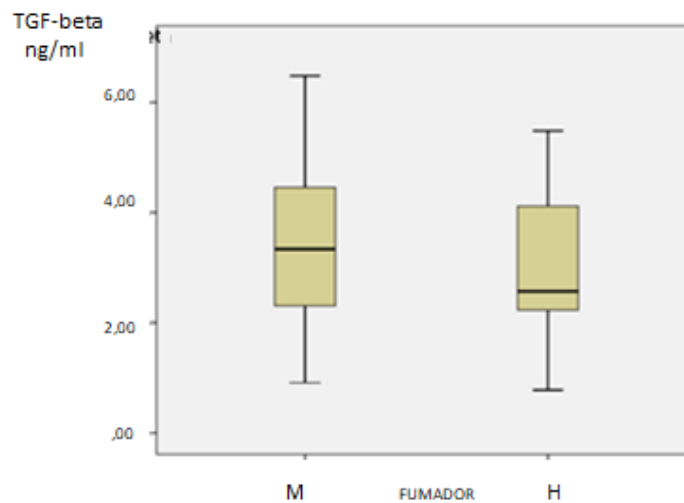


Fig 35. Análisis del contenido de factor TGF- β en las plaquetas de individuos fumadores y no fumadores

No existen diferencias en el contenido de TGF- β 1 en las plaquetas de individuos fumadores y no fumadores.

5.3.5 TABACO – GÉNERO

Se analizó si la costumbre de fumar condicionaba el contenido plaquetario de TGF β en las poblaciones femeninas y masculinas. Se analizaron los datos de 44 mujeres (8 fumadoras y 36 no fumadoras) y de 36 hombres (29 no fumadores y 7 fumadores). (Fig 36).

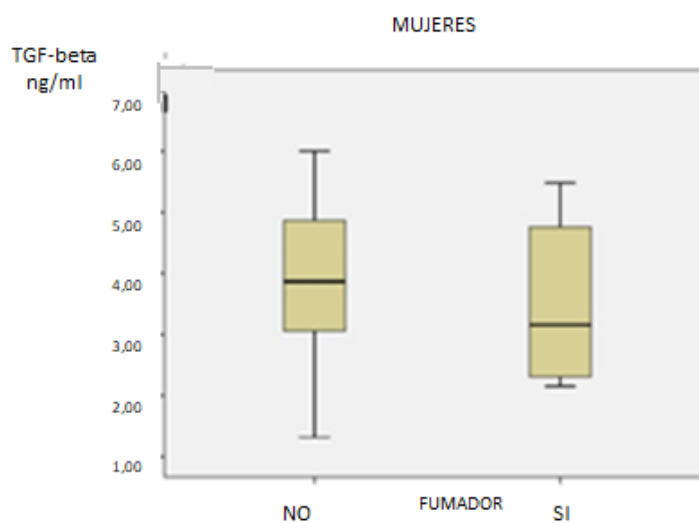
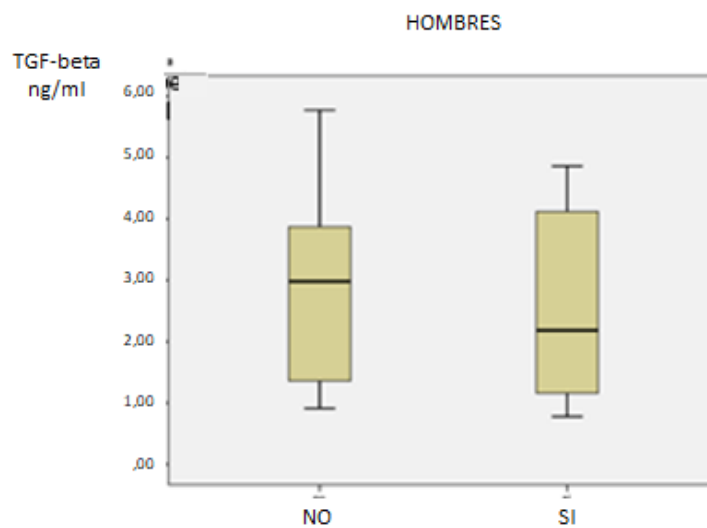


Fig 36. Análisis del contenido de factor TGF- β en las plaquetas respecto del género y el hábito de fumar.

No hubo diferencias en los niveles plaquetarios de TGF β entre fumadores y no fumadores en la población de mujeres ($P = 0,734$) y en la de hombres ($P = 0,785$).

5.3.6 ALCOHOL

Se estudió si el consumo de alcohol tenía incidencia en el contenido de TGF β en las plaquetas. Para esto se analizaron los resultados de una población en la cual 55 individuos no bebían alcohol y 25 si lo hacían. (Fig 37).

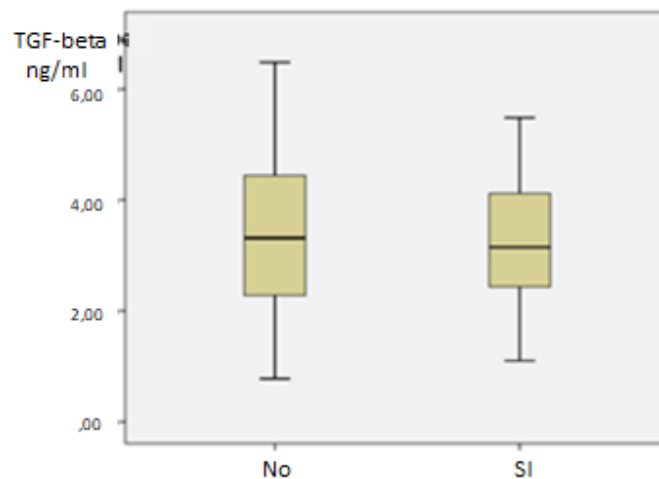
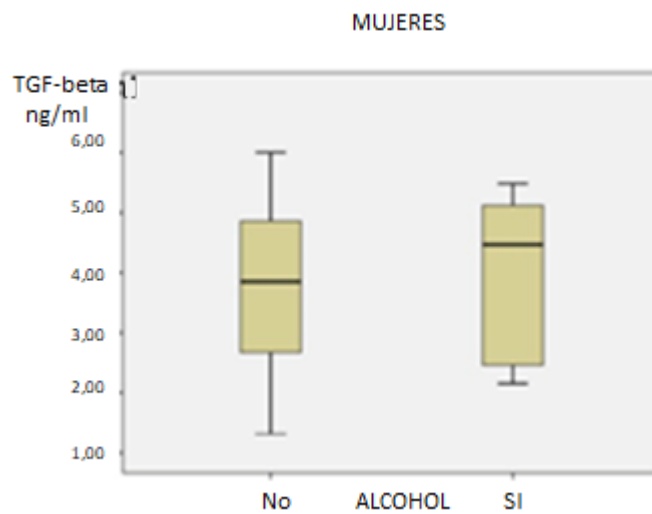


Fig 37. Análisis del contenido de factor TGF- β en las plaquetas respecto del consumo de alcohol.

No se observaron diferencias en el contenido de TGF β en las plaquetas de los individuos que no toman y toman alcohol habitualmente ($P = 0,932$).

5.3.7 ALCOHOL – GÉNERO

Se estudió si el consumo de alcohol modificaba de manera diferente el contenido plaquetario de TGF β en mujeres y en varones. Se analizaron los datos de una población de 44 mujeres de las cuales 10 ingerían alcohol y 34 no, y 36 hombres de los cuales 16 eran bebedores habituales y 20 no (Fig 38).



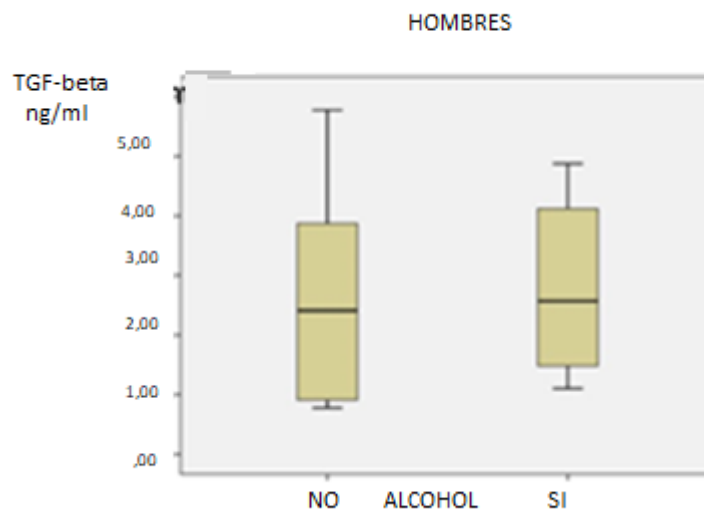


Fig 38. Análisis del contenido de factor TGF- β en las plaquetas respecto del género y el consumo de alcohol.

El consumo de alcohol no modifica el contenido de TGF β en mujeres ($P = 0,723$) y en hombres ($P = 0,884$). Otra vez más el gráfico nos muestra que la cantidad de TGF β es mayor en las plaquetas de las mujeres que en las de los hombres, consuman o no alcohol.

5.3.8 DEPORTE

Se analizaron 80 individuos de los cuales 38 no hacían deporte, 18 lo hacían con frecuencia y 24 ocasionalmente. (Fig 39).

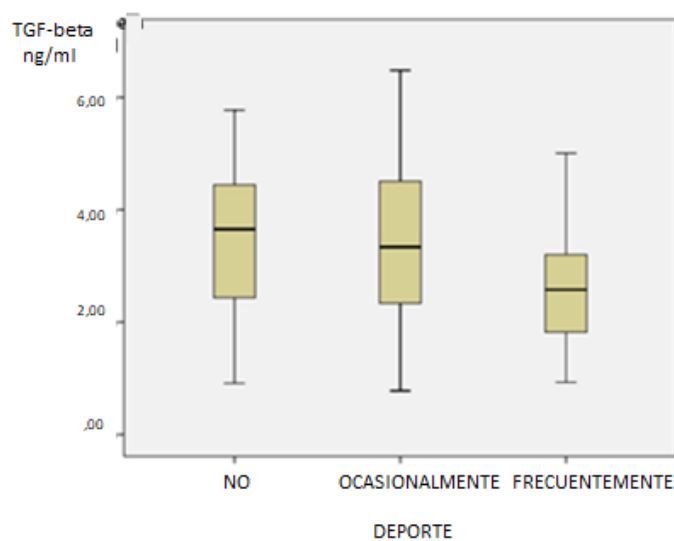


Fig 39. Análisis del contenido de factor TGF- β en las plaquetas respecto de la práctica de deporte

No hubo diferencias en el contenido plaquetario de TGF β entre aquellos individuos que realizan deporte y los que no lo hacían.

5.3.9 DEPORTE- GÉNERO

Se analizó si la realización de deporte modificaba de forma distinta el contenido de TGF- β plaquetario en la población femenina y en la masculina. Se estudió una población de 44

mujeres, de las cuales 16 no hacían deporte, 15 lo hacían habitualmente y 12 ocasionalmente, y una población de 36 hombres de los cuales 21 no hacían deporte, 2 practicaban deporte frecuentemente y 13 ocasionalmente. (Fig 40).

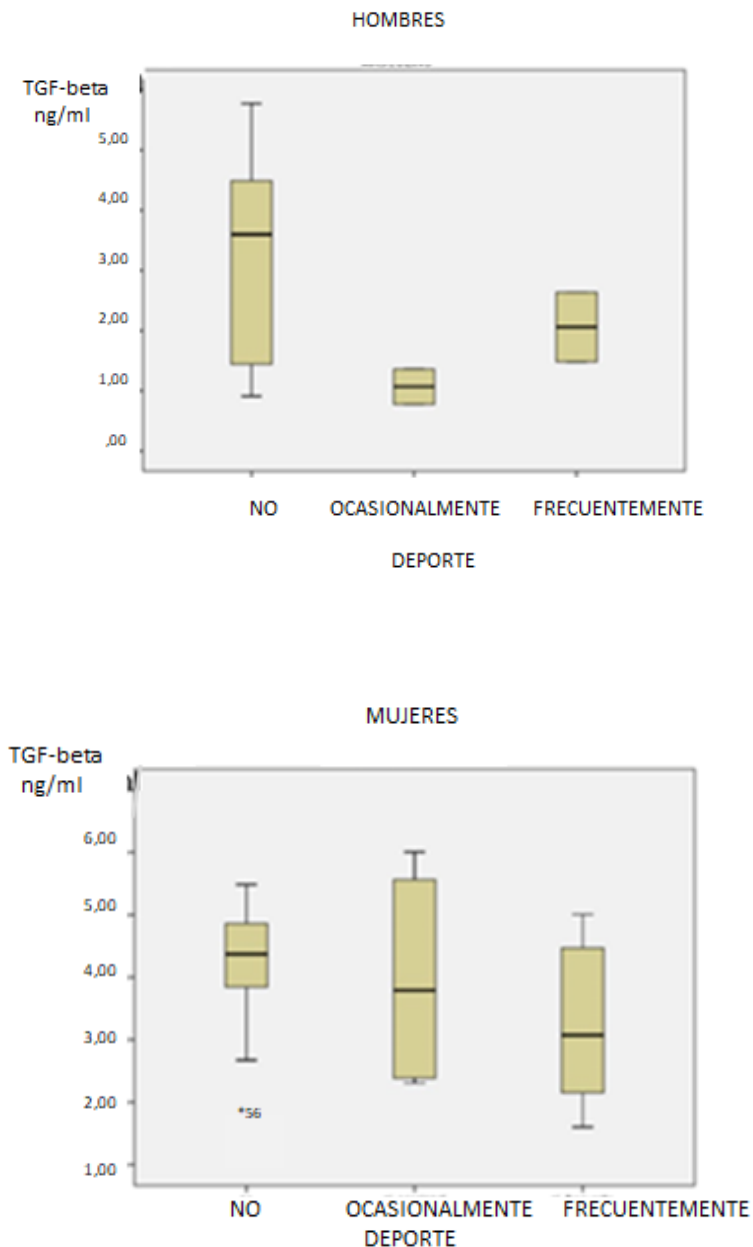


Fig 40. Análisis del contenido de factor TGF- β en las plaquetas respecto del género y la práctica de deporte.

Si bien la realización de deportes no modificaba de forma significativa el contenido plaquetario de TGF- β en hombres y en mujeres, el bajo número de hombres que practicaban deporte frecuentemente no permite incluir a esta población en el análisis estadístico.

5.3.10 ANTIDEPRESIVOS

Se analizó si el consumo de antidepresivos modificaba el contenido plaquetario de TGF- β . Se analizaron los datos de 80 individuos de los cuales 75 no tomaban antidepresivos y 5 sí los toman. (Fig 41).

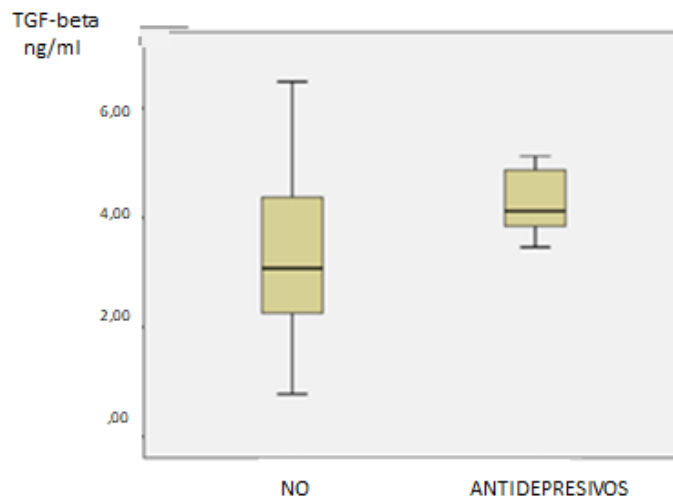
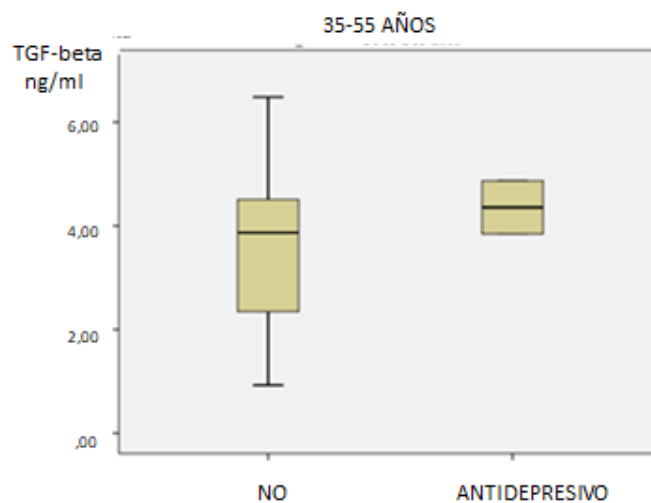


Fig 41. Análisis del contenido de factor TGF- β en las plaquetas respecto a la medicación con antidepresivos

Si bien el consumo de antidepresivos no modificaba de forma significativa el contenido plaquetario de TGF β , se observó una tendencia al aumento del contenido del factor (P= 0,094) en los pacientes medicados.

5.3.11 ANTIDEPRESIVOS - EDAD

Se analizó si la edad y la toma de antidepresivos influía en el contenido de TGF- β en una población de 80 personas. Del grupo de menores de 35 años, 1 persona tomaba antidepresivos y 19 no. En el grupo de 35 a 55 años, 34 personas no toman esta medicación y 2 si lo hacían y en el grupo de mayores de 55 años, 21 no toman medicación y 2 si la toman. La gráfica 42 se ha realizado con el objeto de mostrar la distribución de los niveles de PDGF en nuestra cohorte, pero el bajo número de individuos incluidos imposibilita realizar el análisis estadístico.



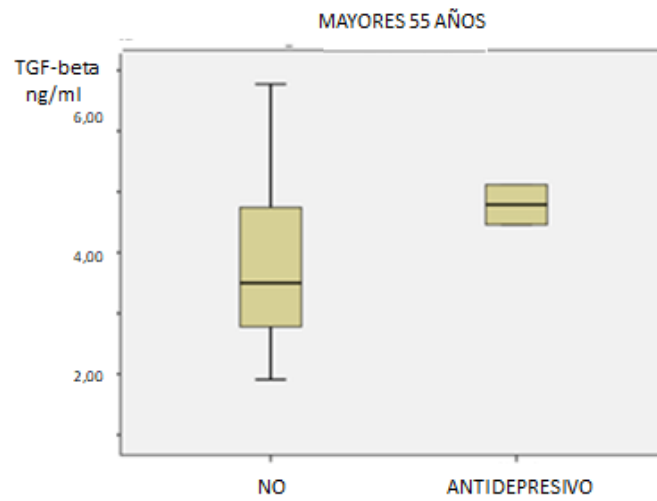
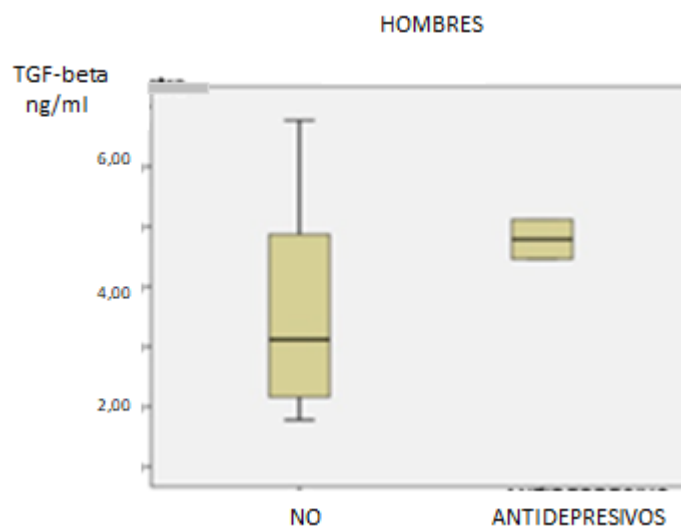


Fig 42. Análisis del contenido de factor TGF- β en las plaquetas respecto de la edad y la medicación con antidepresivos

5.3.12 ANTIDEPRESIVOS – GÉNERO

Se analizaron 80 casos, 44 de ellos mujeres, de las cuales 3 tomaban antidepresivos y 36 hombres, de los cuales 2 tomaban esta medicación. (Fig 43).



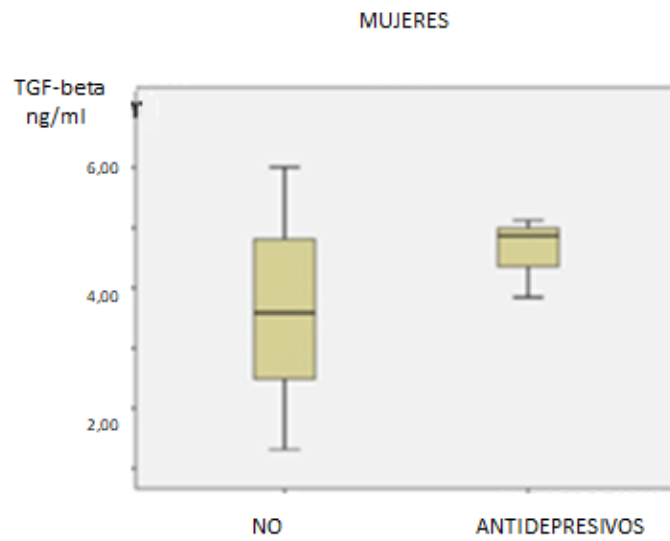


Fig 43. Análisis del contenido de factor TGF- β en las plaquetas respecto del género y la medicación con antidepresivos.

Una vez más, los gráficos se han realizado con el objeto de describir la distribución de las poblaciones pero el bajo número de individuos incluidos imposibilita realizar el análisis estadístico.

5.3.13 ANTICOMICIALES

El estudio se hizo en una población de 80 individuos, de los cuales 6 tomaban anticomiciales y 74 no. (Fig 44).

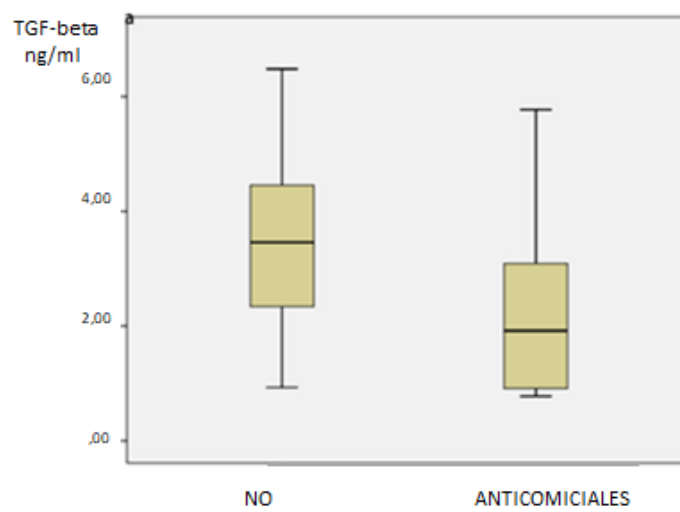
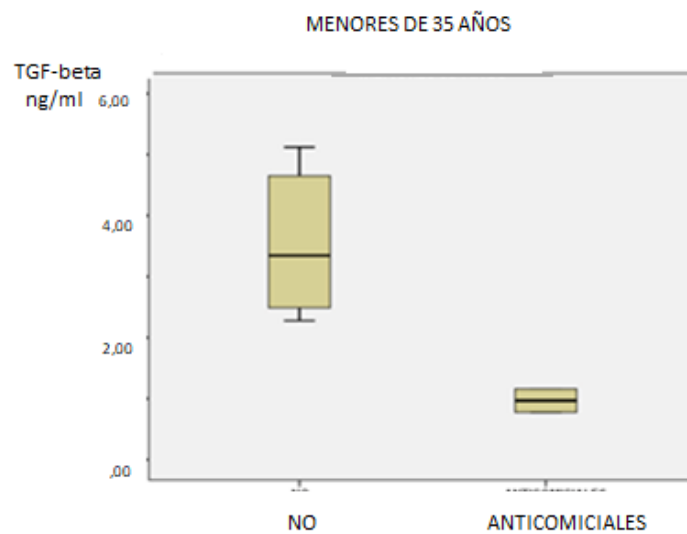


Fig 44. Análisis del contenido de factor TGF- β en las plaquetas respecto y la medicación con anticomiciales.

El consumo de anticomiciales tiende a disminuir el contenido de TGF β de las plaquetas (P = 0,086)

5.3.14 ANTICOMICIALES – EDAD

Se estudió si el consumo de anticomiciales modificaba el contenido plaquetario de TGF β de forma distinta según la edad del individuo. De nuevo se hicieron tres grupos: 20 menores de 35 años de los cuales 19 no toman anticomiciales, 37 individuos entre 35 y 55 años de los cuales 34 no toman anticomiciales y 23 individuos mayores de 55 años de los cuales 21 no toman anticomiciales. La Fig 45 se ha realizado con el objeto de describir la distribución de las poblaciones pero el bajo número de individuos incluidos imposibilita realizar el análisis estadístico



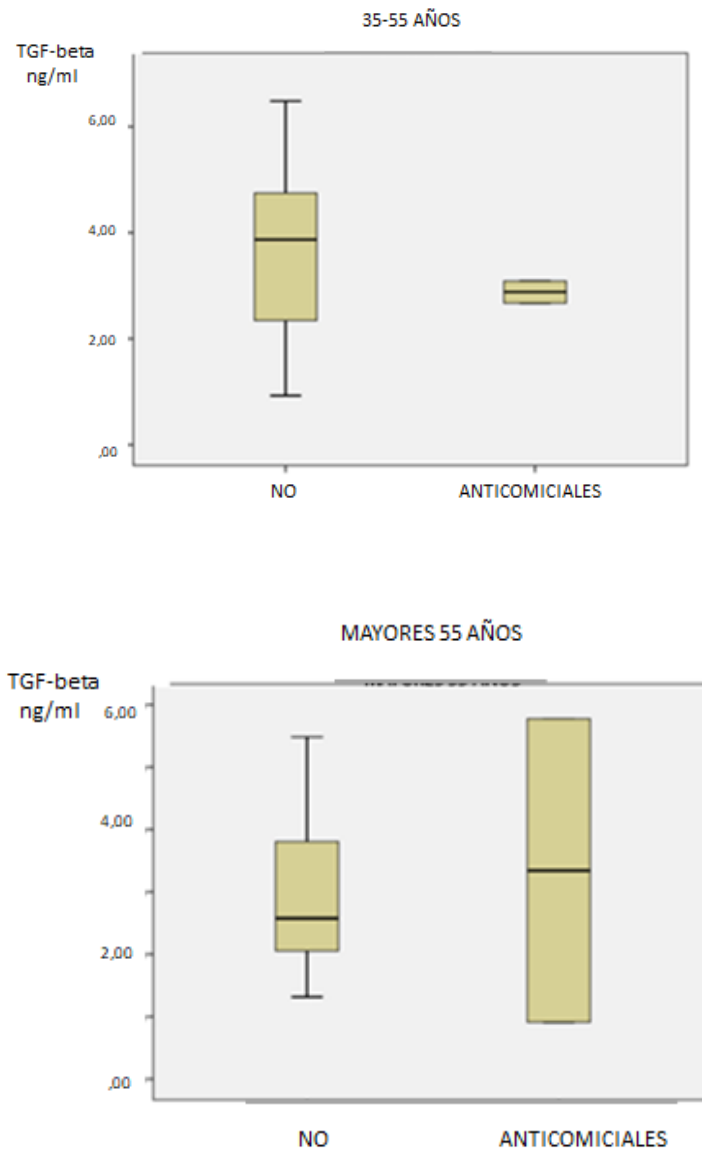


Fig 45. Análisis del contenido de factor TGF- β en las plaquetas respecto de la edad y la medicación con anticomiciales.

5.3.15 ANTICOMICIALES - GÉNERO

Se analizaron 80 casos, 44 de ellos mujeres, de las cuales 4 tomaban anticomiciales y 36 hombres, de los cuales 2 tomaban esta medicación. (Fig 46)

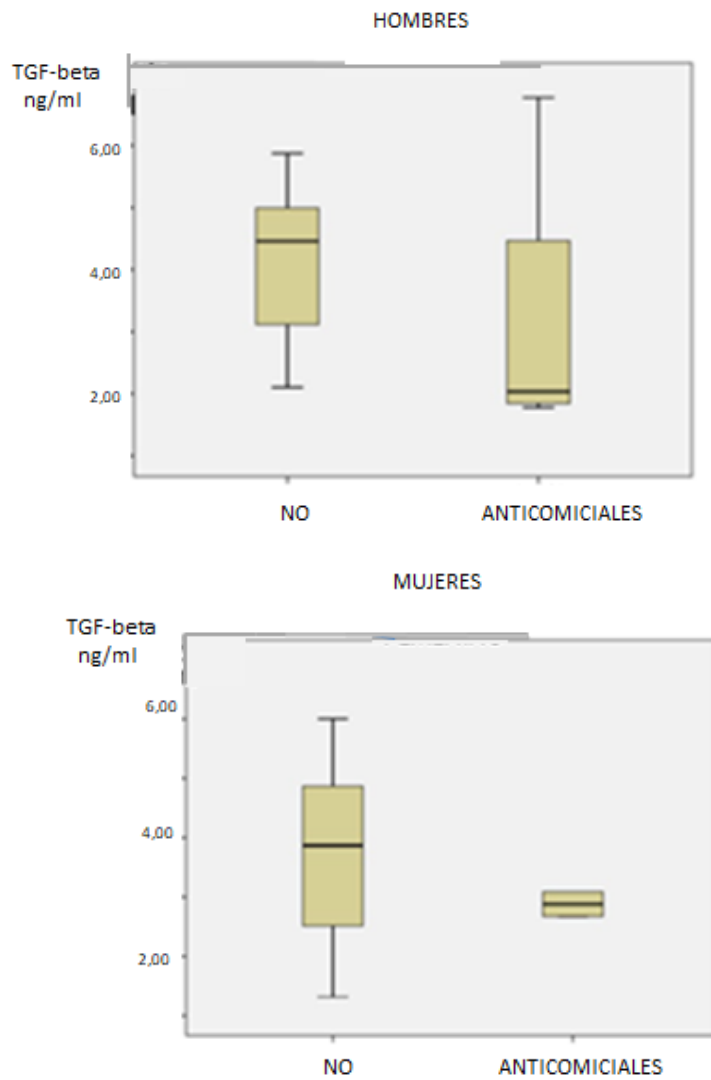


Fig 46. Análisis del contenido de factor TGF- β en las plaquetas respecto del género y la medicación con anticomiciales.

El tratamiento con anticomiciales no modificó el contenido de TGF β en las plaquetas de hombres y mujeres.

5.4 CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES DEL ESTUDIO PTI

Las características demográficas de los pacientes se muestran en la Tabla 6.

Nº	EDAD (años)	Género	Tiempo desde el diagnóstico (años)	Tratamientos	Tratamientos concomitantes
1	24	F	7.3	Cortic,Ig	Tardyferon
2	92	F	3.0	Cortic,Ig	Plavix, Minitran, Dilutol, Coropres
3	53	F	16.1	Cortic,Ig	no
4	70	F	6.4	Cortic,Ig	Adalat, capoten, ameride, adiro, omeprazol, metformina, diamicron
5	51	F	11.4	Cortic,Ig	alprazolam
6	74	M	11.6	No	motilium, omeprazol, rivotril, astonim, adalterel
7	52	F	14.3	Cortic,Ig	no
8	82	F	4.2	Cortic,Ig	lexatin, nexium, omeprazol, simvastatina
9	77	M	3.5	Cortic,Ig	AntiHTA/tromalyt
10	54	F	6.6	Cortic,Ig	Cortic,Igno
11	77	F	11.9	Cortic,Ig	Indapamida,Perodril, Teva
12	79	F	10.5	Cortic,Ig	tamoxifeno
13	46	F	14.7	Cortic,Ig	no
14	39	F	8.1	Cortic,Ig	no
15	80	M	12.5	Revolade 25 mg/día	Arimidex, Enalapril
16	39	F	11.1	Revolade 50 mg/día	NO
17	80	F	1.9	Romiplostin 3mcg/kg	ameride, cipralex, gelocatil, ixia, omeprazol, tramadol, triptyzol, plusvent, fibraguar
18	73	F	7.0	Romiplostin 8mcg/kg	NO
19	38	M	22.0	Revolade 25 mg/día	NO
20	41	M	4.1	Revolade 50 mg/día	NO

21	29	F	4.2	Revolade 50 mg/día	NO
22	82	F	36.0	Romiplostim 8 mcg/kg	candesartan, omeprazol, atorvastatina
23	29	F	4.2	Revolade 50 mg/día	NO
24	60	F	23.0	Revolade 50 mg/día	NO
25	74	F	2.7	Romiplostim 2mcg/ kg	simvastatina, alopurinol, omeprazol, metformina

Tabla.6 Características clínicas y demográficas de los pacientes con PTI

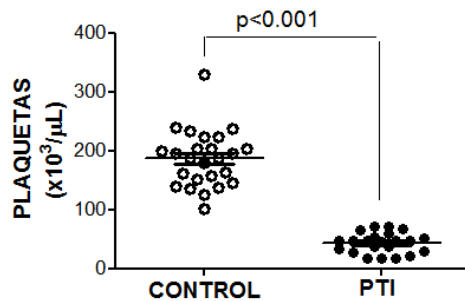


Figura 47. Recuento de plaquetas. Las plaquetas de los individuos de los distintos grupos se determinó con un contador de células Coulter Ac Tdiff . Cada símbolo representa a un sujeto. Comparación entre grupos realizada por el test de Mann-Whitney.

Estudio de la funcionalidad plaquetaria.

La capacidad de activación de plaquetas por agonistas se determinó evaluando la habilidad del receptor de fibrinógeno de unir PAC1 (mAb que reconoce la conformación

activa del receptor de fibrinógeno) y la exposición de P-selectina y de CD63 en la superficie de las plaquetas tras la activación con TRAP. Las plaquetas de pacientes con PTI unieron menos PAC1 (Figura48), indicando una menor capacidad de activación del receptor de fibrinógeno.

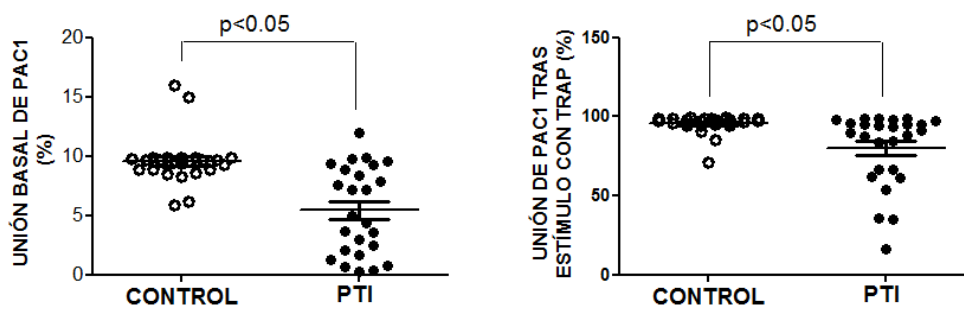


Figura 48. Unión de PAC1 a la superficie de las plaquetas. Se determinó la unión de PAC1 a las plaquetas en condiciones basales (panel de la izquierda) o tras la estimulación con 100 μ M TRAP (panel de la derecha) por citometría de flujo. Cada símbolo representa a un sujeto. Comparación entre grupos realizada por el test de Mann-Whitney.

Una de las causas que podrían explicar la menor unión de PAC1 es que las plaquetas de pacientes con PTI presentaran menos receptores para el Fg. Por este motivo evaluamos la presencia de las subunidades alfa IIb y beta3 que forman el receptor de Fg y observamos que la expresión de ambas subunidades en las plaquetas de los pacientes con PTI no difería de la del grupo control (Figura 49).

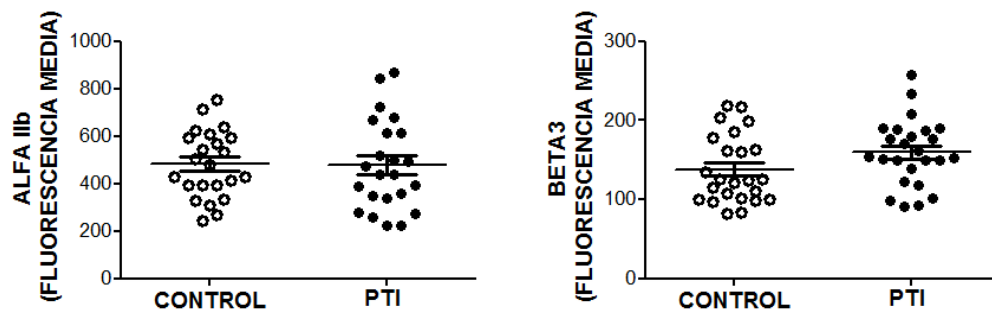
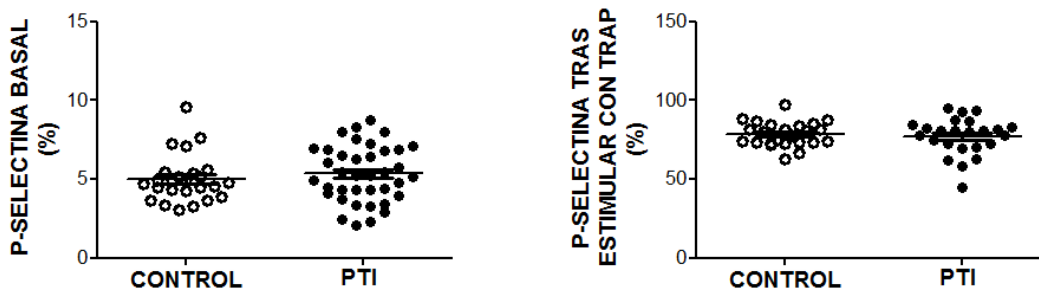


Figura 49. Expresión del receptor del fibrinógeno en la superficie de las plaquetas. Las plaquetas de los individuos de los distintos grupos en estudio se incubaron con mAb específicos contra la subunidad alfa IIb (panel de la izquierda) o beta3 (panel de la derecha). La unión de los anticuerpos se determinó por citometría de flujo. Cada símbolo representa a un sujeto. Comparación entre grupos realizada por el test de Mann-Whitney.

Estudio de la capacidad de liberar gránulos de las plaquetas de los pacientes con PTI

A pesar de la menor capacidad de activación de las plaquetas de los pacientes con PTI, estas expusieron los mismos niveles de P-selectina y de CD63 que los controles tras la activación con TRAP (Figura 50).



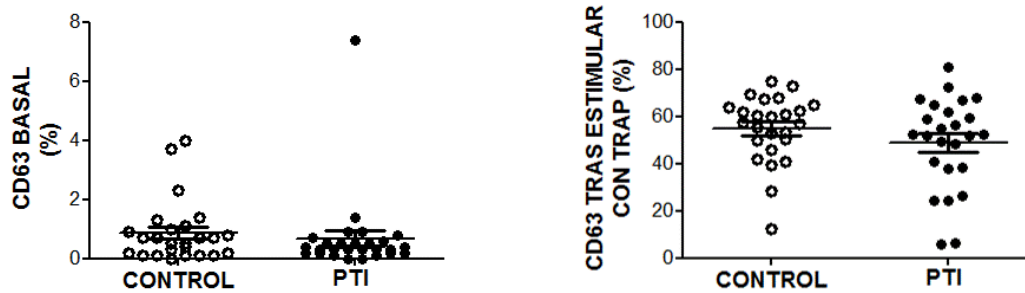


Figura 50. Expresión de P-selectina y de CD63 en la superficie de las plaquetas. Se determinó la expresión de ambas en condiciones basales (paneles de la izquierda) o tras la estimulación con 100 μ M TRAP (paneles de la derecha) por citometría de flujo. Cada símbolo representa a un sujeto. Comparación entre grupos realizada por el test de Mann-Whitney.

En correspondencia con esta observación, las plaquetas de los pacientes con PTI contenían igual cantidad de TGF- β y más PDGF- α que las plaquetas del grupo control.

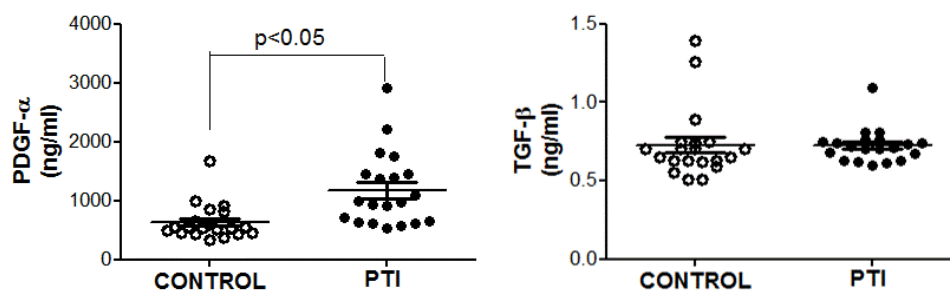


Figura 51. Contenido de PDGF y de TGF- β de las plaquetas. Se determinó el contenido endógeno de estas dos sustancias en las plaquetas de individuos controles y de pacientes con PTI. Cada símbolo representa a un sujeto. Comparación entre grupos realizada por el test de Mann-Whitney

e Mann-Whitney.

6. DISCUSIÓN

DISCUSIÓN.

El objetivo principal de este trabajo fue estudiar si ciertas situaciones fisiológicas (edad, género), farmacológicas (consumo de antidepresivos y anticomiciales), hábitos (consumo de alcohol, práctica de deportes) y una patología que cursa con trombocitopenia (PTI), modificaban los niveles plaquetarios de los factores de crecimiento PDGF y TGF- β .

La importancia de determinar qué condiciones modifican el contenido de los factores de crecimiento en el contenido de los gránulos plaquetarios radica en el hecho de que son sustancias con una alta actividad metabólica que pueden condicionar el estado fisiopatológico de un individuo [123] y la eficacia de su uso en la cicatrización y la regeneración tisular [124].

Estudios previos han demostrado una gran variabilidad en el contenido de los factores de crecimiento en los gránulos plaquetarios de los individuos lo cual podría deberse a los hábitos, dieta y consumo de fármacos [125,126].

Teóricamente, los niveles de factores de crecimiento derivados de las plaquetas deberían depender del recuento de plaquetas, sin embargo, no existen estadísticamente diferencias significativas que relacionen el número de plaquetas y la cantidad de factores de crecimiento.

Por ejemplo, existe una asociación significativa entre el número de plaquetas y la concentración de TGF- β , pero esta asociación no es significativa para el PDGF, por lo que el número de plaquetas no puede utilizarse para predecir la cantidad de factores de crecimiento que serán producidos [127].

La falta de correlación entre el recuento de plaquetas y los niveles de factores de crecimiento, puede ser explicado por una variación individual en cuanto a la producción y almacenamiento de citoquinas, lo que significa que diferentes individuos necesitarán diferente número de plaquetas para conseguir un mismo efecto biológico [128, 129, 130].

No obstante, en este trabajo hemos evitado que este hecho pudiese alterar las conclusiones del análisis realizado ya que hemos expresado el contenido de los factores de crecimiento por plaqueta.

Los concentrados plaquetarios humanos constituyen una fuente abundante y económica de factores de crecimiento. En nuestro trabajo hemos aplicado ciclos de congelación/descongelación para obtener estos factores, tal y como recomiendan algunos autores [131, 132, 133, 134, 135, 136].

Sin embargo existen grandes diferencias en cuanto a las técnicas de obtención del concentrado de plaquetas. La sangre es sometida a centrifugaciones sucesivas y en este proceso existen una serie de variables, no bien definidas en la actualidad, que pueden influir en la calidad del proceso y modificar la concentración de factores y el grado de activación de las plaquetas [137]. Una activación prematura de las plaquetas conlleva una pérdida de factores de crecimiento que se eliminan o se degradan antes de alcanzar el lugar donde deben actuar [137].

Así mismo tampoco se observan criterios homogéneos en la definición de la dosis terapéutica de las plaquetas [138].

Dado que el potencial regenerativo del PRP radica precisamente en los factores de crecimiento que contiene, el conocimiento de los niveles de estos factores en las

muestras de PRP que se utilizan en la clínica aseguraría un resultado fiable en los tratamientos.

Influencia de la Edad y el género en los niveles de PDGF y TGF- β .

Aun cuando pueden darse diferencias en el número de plaquetas entre hombres y mujeres, no se han encontrado diferencias significativas en los niveles de factores de crecimiento en función del género o de la edad [139].

Algunos trabajos describen diferencias de género en la capacidad de activación de las plaquetas [139] sin embargo no hemos encontrado referencias al contenido de factores de crecimiento de los gránulos.

Otros estudios muestran diferencias que dependen de la edad en la respuesta celular frente a los factores de crecimiento. Estas diferencias radican en la expresión de los receptores de los factores de crecimiento, entre ellos los receptores para el PDGF y para el TGF β . En animales jóvenes y adolescentes no hay diferencias significativas en la expresión de RNA-m para los receptores de estos factores de crecimiento, pero a medida que aumenta la edad, la expresión de dichos genes va disminuyendo y, por tanto, el número de receptores [140,141].

Leung et al [141], reportaron diferencias en los niveles circulantes de PDGF, siendo estos bastante superiores en mujeres en edades cercanas a la menopausia que en hombres de mediana edad. Los mismos autores reportaron que en animales sometidos a una ovariectomía también se observaba dicho aumento en los niveles de secreción de PDGF, efecto que era revertido al suministrar un tratamiento estrogénico, sugiriendo una posible

regulación por testosterona. Sin embargo, nuestros resultados no mostraron diferencias en el contenido de PDGF en las plaquetas de hombres y mujeres independientemente de su edad. Leung et al, midieron los niveles de este factor en el suero, mientras que nosotros lo hicimos en lisado de plaquetas.

Otros autores han comprobado que los niveles de PDGF en mujeres con menopausia y en hombres de similar edad son comparables [142]. Esta observación coincide con nuestros resultados.

Este aumento observado en PDGF no es observado por Kawasumi et al. en el caso de TGF- β [142], aunque existen referencias que indican que la dihidrotestosterona eleva los niveles de TGF- β , y el óxido nítrico los contrarresta [142]. En oposición a estos resultados, el presente trabajo mostró que las plaquetas de las mujeres contenían más TGF- β que las de los hombres.

También es posible observar diferencias en función del género y la edad respecto a TGF- β . En los hombres a medida que la edad aumenta, se observa un aumento de factor TGF- β , mientras que en mujeres observamos el efecto contrario, una disminución del factor TGF- β a medida que la edad aumenta.

Estudios radiográficos realizados en pacientes tratados con PRP para la regeneración del hueso alveolar tras una cirugía del tercer molar mostraron que los hombres presentaban una mayor formación de hueso que las mujeres lo cual se atribuía a PDGF y TGF- β [143].

Influencia del Tabaco en los Niveles de PDGF y TGF- β .

En nuestro estudio no observamos variaciones significativas en los niveles de PDGF ni de TGF- β en individuos fumadores. Es importante tener presente que ninguno de estos individuos son enfermos crónicos ni presentan patologías cardiovasculares o cerebrovasculares ni son pacientes con EPOC.

El tabaquismo es uno de los factores de riesgo más importantes para el desarrollo de la enfermedad cardiovascular. La mortalidad atribuible al tabaquismo se produce principalmente por cáncer, enfermedades respiratorias crónicas y enfermedades vasculares. Este riesgo es proporcional al número de cigarrillos diarios consumidos y al tiempo de duración de la adicción o exposición (en el caso de los pasivos).

Tanto el monóxido de carbono como la nicotina, son los dos componentes responsables de la aparición de complicaciones circulatorias.

Los componentes del tabaco y del humo del tabaco actúan a distintos niveles del organismo, dando lugar a alteraciones fisiopatológicas que explican la aceleración del proceso aterosclerótico, las alteraciones vasculares y alteraciones endoteliales observadas en el fumador [144], entre ellas la elevación de la presión arterial, las alteraciones hemorreológicas y del sistema de coagulación y diversas alteraciones endócrinas y hemodinámicas. Todas ellas implicadas en el desencadenamiento de la enfermedad coronaria y cerebrovascular.

Cuando las plaquetas se adhieren alrededor de la lesión endotelial se libera el factor de crecimiento derivado de las plaquetas PDGF que actúan reparando el daño causado [144,145]. Si el hábito de fumar hubiese modificado los niveles de PDGF de las plaquetas podríamos inferir que la reparación no se podría efectuar de forma adecuada,

sin embargo nosotros no observamos diferencias en los niveles de dicho factor de crecimiento entre individuos fumadores y no fumadores.

El factor TGF- β , que actúa regulando la respuesta inflamatoria, está también relacionado con estos hechos ya que soporta importantes implicaciones en la génesis de la fibrosis que acompaña a la inflamación vascular y de otros órganos del proceso patológico cardiovascular, ya que la nicotina estimula la producción y secreción de dicho factor [146].

Si bien TGF- β es la citoquina profibrotica más importante [146] se ha demostrado que PDGF -B también tiene el mismo efecto ya que induce la producción de TGF- β [147].

Pero también hay que tener en cuenta que otros factores de crecimiento secretados por células activadas están implicados, como el factor de crecimiento de los fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), o el PDGF antes mencionado, con acciones también sobre la proliferación de las células musculares lisas [148].

Diversas células del sistema inmune producen TGF- β , linfocitos, macrófagos y células dendríticas, ejerciendo un papel muy importante en la modulación de la expresión de moléculas de adhesión y en la quimiotaxis de células que participan en el proceso inflamatorio. Los estudios sobre TGF- β en pacientes con EPOC (Enfermedad pulmonar obstructiva crónica) son contradictorios ya que se han descrito valores altos de esta citoquina en el epitelio bronquial y también niveles de producción disminuidos en cultivos de macrófagos alveolares [148].

Chuanirum y Wesson [149] refirieron que los fumadores presentan niveles aumentados de TGF- β y de productos de glicosilación avanzada.

Influencia del alcohol en los niveles de PDGF y TGF- β .

En nuestro estudio se observó que en aquellas personas que toman alcohol, ya sea de forma ocasional o de forma habitual los niveles del factor TGF- β fueron similares a la de los individuos que no lo consumían. Además se da la circunstancia de que en este trabajo, la mayor parte de los individuos que consumían alcohol eran también fumadores. Para poder hacer el análisis individual de cada uno de estos factores se deberían incluir más pacientes en el estudio.

El consumo de alcohol, que afecta a gran número de los tejidos del organismo, es una de las mayores causas de morbilidad prevenible. La Organización Mundial de la Salud considera que el alcohol y su consumo es el segundo factor de riesgo de mortalidad en los países desarrollados.

El estudio del efecto de la ingesta de alcohol en el contenido de los factores plaquetarios TGF- β y PDGF se basó en el hecho de que estos dos factores participan en la degeneración del tejido hepático [150] y en que las plaquetas son la fuente más abundante de los mismos.

El abuso del alcohol es una de las principales razones del desarrollo de la fibrosis hepática, la cual se caracteriza por una acumulación excesiva de proteínas de matriz extracelular [151].

Por lo general, los efectos del alcohol en los tejidos dependen de la cantidad y la duración a lo largo del tiempo de su consumo. Incluso una ingestión de alcohol en unos días puede producir esteatosis, hígado graso, y pueden encontrarse en el órgano hepatocitos con macrovesículas de triglicéridos [152]. La esteatosis incide en el individuo que bebe periódicamente predisponiéndole a la fibrosis hepática y cirrosis. Una ingesta de 30 o más gramos de alcohol al día incrementa el grado de cirrosis [153, 154, 155, 156].

Factores que inciden sobre el riesgo alcohólico son la edad, el género y el tabaquismo son factores de riesgo en la Hipertensión arterial (HTA) adicionales al inducido por el consumo de alcohol [156].

Al tiempo que hay desarrollo de daño hepático crónico, los hepatocitos y las células del epitelio biliar entran en un proceso de muerte por apoptosis. Existe una asociación directa entre la apoptosis de hepatocitos y la fibrogénesis hepática. Diversos estudios han sugerido la asociación de esta respuesta hipertrófica con la activación y aumento en los niveles plasmáticos de TGF- β [157]. El TGF- β actúa sobre las células renales causando su hipertrofia y produciendo un exceso de matriz extracelular en las células glomerulares, tubulares y en los fibroblastos intersticiales [157].

El TGF- β se ha relacionado con el desarrollo de diversos procesos patológicos en los cuales existe una fibrosis aumentada, como en el caso de la cirrosis hepática y la glomerulonefritis crónica [157].

Numerosas referencias indican un aumento de PDGF y el TGF- β en personas que consumen bebidas alcohólicas, pero dichos factores provendrían fundamentalmente de las

células de Kupffer y de las células estrelladas hepáticas y no de las plaquetas [151, 152, 154].

INFLUENCIA DE LOS ANTIDEPRESIVOS EN LOS NIVELES DE PDGF Y TGF- β .

En nuestro trabajo se estudió el efecto de los antidepresivos en los niveles de TGF- β , y PDGF. Se compararon los niveles de dichos factores de crecimiento en individuos que no tomaban antidepresivos y en aquellos que si lo hacían. También se evaluó si hay la edad o el género influían en dichos niveles.

En este estudio apreciamos que la medicación con antidepresivos no modificaba el contenido endógeno de PDGF y de TGF- β . No obstante, una debilidad de este trabajo es no haber podido incluir más pacientes en el grupo de medicados con antidepresivos. El diseño adecuado de este estudio hubiera sido contar con una población de pacientes con depresión a los que les tome una muestra de sangre antes de comenzar el tratamiento con los antidepresivos y después de alcanzar una respuesta satisfactoria a los mismos.

No se encontraron referencias sobre el efecto de los antidepresivos y los niveles de PDGF.

La depresión mayor es uno de los desórdenes del ánimo más comunes, y aunque no se conoce la etiología de la depresión, se ha establecido que la depresión podría producirse como consecuencia de la interacción de los genes y el ambiente. Además se ha visto que pacientes con episodios depresivos presentan una deficiencia de la neurotransmisión serotoninérgica y/o noradrenérgica en el sistema nervioso central [158].

En base a esto, los tratamientos farmacológicos para esta patología actúan aumentando la

biodisponibilidad de serotonina (5-HT) o noradrenalina (NA) bloqueando la recaptación de dichos neurotransmisores por los terminales nerviosos en distintas estructuras, (fármacos inhibidores de la recaptación de serotonina. IRSR) o inhibiendo la recaptación de monoaminas (antidepresivos tricíclicos).

Las plaquetas acumulan cerca del 99% del total de serotonina en sangre [159]. El sistema de transporte de la serotonina hacia los lugares de almacenamiento, ya sean las plaquetas o los terminales nerviosos es muy similar, aunque se ha reportado en la depresión una disminución en la unión al transportador plaquetario [160]. Si el paciente está medicado, dicho transportador es el principal lugar de acción de los inhibidores de la recaptación de serotonina [161]. Además, la serotonina participa de la agregación plaquetaria al liberarse a la sangre y activarse los receptores 5-HT_{2A}, localizados en la membrana de las plaquetas, mejorándose así el proceso de agregación [162].

Por estos motivos, desde hace muchos años, las plaquetas se han utilizado como modelo para el estudio de los antidepresivos y la disfunción serotoninérgica en pacientes con depresión.

Por otra parte, los eventos estresantes a lo largo de la vida inician una serie de respuestas fisiológicas que subsecuentemente pueden transformarse en patológicas, lo cual sugiere la participación de mecanismos de respuesta al estrés en los desórdenes depresivos. Los mecanismos de respuesta al estrés se encuentran bajo el control del eje Hipotálamo-Hipófisis-Suprarrenal (HHS), el cual regula la secreción de Glucocorticoides (GCs). Alrededor del 50% de los pacientes depresivos poseen niveles elevados de GCs, ya que diversas estructuras cerebrales modulan la actividad del eje Hipotálamo-Hipófisis-Suprarrenal.

El estrés disminuye los niveles del ARNm de TGF- β en todas las subáreas hipocampales, efecto que es completamente prevenido por el tratamiento con antidepresivos tricíclicos. Estos datos sugieren que dentro de las acciones de los antidepresivos se podría incluir la inducción de TGF- β para promover cambios que favorezcan la resiliencia celular, o para mejorar la neurotransmisión de NA en el hipocampo [162].

Sin embargo, existe muy poca evidencia que indique la participación de TGF- β en la depresión.

En un estudio postmortem de pacientes con depresión bipolar, se encontró una reducción del ARNm de TGF- β en muestras de la corteza prefrontal [163]. Este antecedente nuevamente sugiere que el TGF- β es una proteína inmunomoduladora importante presente en el hipocampo [163]. Esta citoquina ha sido encontrada en altas concentraciones en biopsias de pacientes con enfermedad de Parkinson [164], enfermedad de Alzheimer [165] e infarto cerebral [166]. También, la expresión de TGF- β se induce en el hipocampo después hipoxia, isquemia y también tras traumas cerebrales e infecciones, todas condiciones relacionadas con muerte celular [167]. Estas observaciones han llevado a postular que la expresión aumentada de TGF- β en respuesta a daño en el SNC es una característica común con los factores neurotróficos clásicos. En acuerdo con esto, se ha demostrado in vivo que TGF- β previene la degeneración neuronal.

Estudios recientes muestran que los pacientes depresivos tienen niveles séricos de TGF- β más bajos que los individuos sanos. Estos niveles reducidos de TGF- β se recuperan luego de 8 semanas de tratamiento con distintos antidepresivos [167].

INFLUENCIA DE LOS ANTICOMICIALES EN LOS NIVELES DE PDGF Y TGF- β .

En este trabajo se estudió si la toma de anticomiciales incidía en los niveles del factor de crecimiento PDGF en las plaquetas.

Los niveles de PDGF no se ven afectados por el tratamiento con anticomiciales. Sin embargo, dado que la muestra de individuos sometidos a tratamiento es pequeña, sería interesante un estudio con mayor número de pacientes.

Los fármacos anticomiciales son fármacos desarrollados para el tratamiento del dolor neuropático, de ahí que se propusiera denominarlos junto a los antidepresivos fármacos neuromoduladores. En su clasificación diferenciamos antiepilépticos clásicos o de primera generación (carbamazepina, difenilhidantoína, ácido valproico, clonazepam) y los de segunda generación, la mayoría de los cuales se han desarrollado específicamente para el tratamiento del dolor neuropático [168].

Los antiepilépticos también llamados anticonvulsivos o F.A.E., acrónimo de "fármaco anti-epiléptico" hacen referencia a un fármaco u otra sustancia destinada a combatir, prevenir o interrumpir las convulsiones o los ataques epilépticos.

Dentro de los fármacos antiepilépticos uno de los más utilizados es el valproato o ácido valproico. El uso de valproato generalmente está asociado con alteraciones hematológicas entre las que podemos incluir la supresión medular, alteración de la cascada de la coagulación, disminución del factor VIII y del factor Von Willebrand, y alteración del número y función de las plaquetas, que en el contexto del paciente llevado a cirugía mayor representa un aumento del riesgo de sangrado perioperatorio y mayor requerimiento de transfusión en el postoperatorio [168]. La trombocitopenia ha sido

reportada entre el 6% y el 33% de pacientes adultos con epilepsia con antecedentes de consumo de valproato [169].

Aunque la mayoría de los fármacos anticomiciales llevan años en el mercado y su desarrollo ha sido sometido a estrictas medidas de seguridad y eficacia, aún falta mucho por saber sobre su mecanismo de acción. Esto es debido a que algunos fármacos anticomiciales se han descubierto de forma fortuita o bien a través de modelos animales, modelos experimentales que posteriormente son difíciles de reproducir en humanos. El desarrollo de fármacos anticomiciales diseñados en base a un “diana” predeterminada ha sido hasta el momento infructuoso. Por este motivo muchos de los fármacos anticomiciales actuales no tienen un mecanismo de acción bien definido y si varios, sobre los cuales puede destacar o ser más evidente uno de ellos [170].

La eficacia de los distintos fármacos anticomiciales actuales reside en la capacidad de modular la hiperexcitabilidad neuronal patológica que caracteriza a la epilepsia. Esta hiperexcitabilidad neuronal es modificada en base a cuatro mecanismos principales sobre los que la mayoría de los fármacos anticomiciales actúan: 1) aumentando de la inhibición neuronal mediada por el sistema gabaérgico. 2) bloqueando los canales de sodio voltaje-dependientes. 3) reduciendo las corrientes de calcio involucradas en los circuitos talámico-corticales 4) aunque no tan establecido como los anteriores, se especula que hay fármacos anticomiciales cuya propiedad antiepiléptica podría estar en relación con la capacidad de disminuir la excitabilidad neuronal sináptica dependiente de glutamato.

Por otro lado, el mecanismo de acción de los fármacos anticomiciales no es selectivo, puesto que actúan sobre redes o grupos neuronales “normales”, motivo por el cual la mayoría de los fármacos anticomiciales actuales despliegan toxicidad neuronal como efecto secundario común [170].

No se encontraron estudios que relacionen la toma de fármacos anticomiciales con los factores de crecimiento.

INFLUENCIA DEL DEPORTE EN LOS NIVELES DE PDGF Y TGF- β .

Analizamos si la realización de deporte tenía incidencia en los niveles plaquetarios de factor PDGF. Los niveles de ambos factores en las plaquetas no se modificaban en aquellos individuos que practicaban deporte. Aparecen tres individuos que no entran en las cajas y con niveles más altos de PDGF, probablemente debido a la medicación, anticomiciales en dos de los casos y hormonas tiroideas en el tercero. La realización de deporte tampoco modificaba de forma selectiva los niveles del factor PDGF en hombres o en mujeres.

Los efectos que el ejercicio físico tiene sobre la hemostasia dependen de las características del sujeto (edad, sexo, patología de base, estado de entrenamiento,...) y del tipo de ejercicio físico (calidad, intensidad, duración,...).

Cuando comparamos sujetos sedentarios con individuos que realizan deporte habitualmente, observamos una disminución de los cambios relacionados con la edad, tales como deterioro de músculos, huesos, articulaciones, pérdida de masa muscular, pérdida de la elasticidad de las arterias y de la función endotelial. La reducción del estrés oxidativo puede estar relacionado con estos hallazgos.

La intensidad del ejercicio y estos cambios no está tan clara, aunque parece que a una intensidad del 80% del consumo máximo de oxígeno (VO₂ max) se producen aumentos

de la reactividad plaquetaria, del recuento celular sanguíneo y del hematocrito, mientras que a intensidades por debajo del 60% del VO₂ max, no se observan cambios, lo cual significaría que el ejercicio de alta intensidad puede provocar un estado de hiperreactividad plaquetaria e hipercoagulabilidad que podría incrementar los eventos cardiovasculares [171]. Parece que cuando el ejercicio es extenuante la liberación de los depósitos de la médula ósea, bazo y pulmón serían responsables de este aumento del recuento plaquetario, aunque dependiendo del trabajo que analicemos, la magnitud de este cambio oscila entre el 18% y el 80% [172]. No existe consenso sobre la influencia del ejercicio en el recuento plaquetario y su activación [172], pero sí parece aceptado que el número de plaquetas se eleva inmediatamente después del ejercicio (o al menos, de algunos tipos de ejercicio) y se mantiene así los 30 minutos posteriores [173]. Además se observa un aumento de la agregación plaquetaria un pequeño incremento en el tamaño de las mismas [173].

Un metabolismo anaeróbico y un aumento en la producción de catecolaminas durante el ejercicio serían responsables de la activación plaquetaria y su agregación, además de factores mecánicos y microlesiones endoteliales con exposición de colágeno [174].

Además Durante el ejercicio se producen una serie de respuestas y adaptaciones hematológicas y en general podría decirse que los deportistas que realizan una actividad física intensa y de larga duración (ciclistas, nadadores, corredores etc.) presentan aumentos del volumen plasmático, aumento del hematocrito y del recuento eritrocitario y concentraciones bajas de hemoglobina, hierro y ferritina.

Estudios experimentales indican un efecto antiinflamatorio derivado de una actividad física regular [175]. Sujetos que realizan una media de 2,5 h semanales de ejercicio físico

presentan un incremento de citocinas antiinflamatorias, como la interleucina (IL) 4, la IL-10 y el TGF- β cuando la pared de la célula muscular es dañada por la tensión, así como un descenso de la proteína C reactiva (PCR) y de algunas citocinas proinflamatorias, como la IL-6 y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α). Además se ha demostrado un aumento de factores de crecimiento VEGFC; bCFC y BDNF [175].

Actualmente el plasma rico en factores de crecimiento es una técnica innovadora para tratar lesiones deportivas bien como complemento del tratamiento quirúrgico o como aplicación independiente. En los últimos tiempos se ha ido ampliando el conocimiento de que el tratamiento local con plaquetas tiene la capacidad de acelerar la cicatrización de los tejidos dañados [176].

No se encontraron referencias bibliográficas reportando variaciones en los niveles de PDGF o TGF β plaquetario debido a la práctica deportiva. Sin embargo existe numerosa bibliografía que habla de un aumento de ambos factores de crecimiento en los procesos de regeneración muscular y/o ósea tras una lesión [176].

INFLUENCIA DE LA PTI EN LOS NIVELES DE PDGF Y TGF- β .

Distintos trabajos refieren que pacientes con PTI crónica en remisión presentan niveles plasmáticos significativamente más altos de TGF- β que los pacientes con la enfermedad activa y que los controles sanos [177,178]. Los últimos adelantos en el conocimiento de la patogénesis de la trombocitopenia inmune parecen indicar una desregulación de la respuesta inmunitaria en las células T, la cual jugaría un papel primario en la trombocitopenia inmune primaria y posiblemente en otras enfermedades inflamatorias y

autoinmunes [179]. El o los eventos que inician el descontrol inmunitario sigue sin ser aclarado y es posible que participen factores genéticos en combinación con factores adquiridos.

Las células Tregs son un pequeño subgrupo de células T CD4+ con un papel principal estableciendo y manteniendo la autotolerancia. Se piensa que el desarrollo aberrante o disfunción de estas células es el principal defecto subyacente en la mayor parte de las enfermedades autoinmunes órgano-específicas y se sabe que esos defectos ocurren en los pacientes con trombocitopenia inmunitaria primaria.

El factor TGF- β activa las células Tregs y además tiene la capacidad potencial de suprimir la proliferación de las células B y la producción de anticuerpos. Se ha visto que existe una asociación entre la concentración aumentada de TGF- β con la remisión de la trombocitopenia inmunitaria primaria. Esto sugiere que la activación y la cantidad de las células Tregs son moduladas por la existencia del TGF- β [180]. El hecho de que nosotros no hayamos observado diferencias en los niveles de TGF- β puede deberse a que su origen no sea plaquetario.

Se sabe que los polimorfismos del gen de TGF- β pueden alterar las concentraciones plasmáticas de TGF- β ; entre estos polimorfismos se encuentran el codón 509 (C \rightarrow T), codón 25 (Arg \rightarrow Pro), y el codón 10 (Leu \rightarrow Pro) [181].

Nuestro trabajo mostró que los niveles de PDGF plaquetarios en los pacientes con PTI eran mayores que los del grupo control.

En este trabajo hemos estudiado de forma aislada cómo factores tales como el género, medicación y determinados hábitos pueden modificar los niveles de PDGF y TGF- β . Sin

embargo, generalmente encontramos que dos o más de estos factores se presentan juntos y los niveles de factores de crecimiento que hemos evaluado son fruto del balance entre ellos.

Aunque se sabe poco acerca de cómo hábitos y medicación afectan al contenido de los factores de crecimiento, dicho contenido puede resultar de potencial relevancia a la hora de aplicar tratamientos médicos personalizados ya que los factores de crecimiento provenientes de plaquetas son utilizados de forma extendida en medicina regenerativa y sus niveles plaquetarios podrían condicionar los resultados de dichas terapias. Si bien el bajo número de pacientes de nuestro estudio no permite asegurar que los niveles de expresión en plaquetas de PDGF y de TGF- β estén regulados por hábitos y ciertas medicaciones, creemos recomendable estudios con una población más amplia además de evaluar el contenido de estos factores antes de su uso en terapia regenerativa.

7. CONCLUSIONES

- 7.1- La edad y el género no influyen en el contenido plaquetario de PDGF.
- 7.2- El TGF- β plaquetario era mayor en mujeres jóvenes que en hombres del mismo rango de edad. Según aumenta la edad en las mujeres estos valores tienden a disminuir.
- 7.3- No se observaron diferencias en los niveles plaquetarios de PDGF y de TGF- β entre individuos fumadores y no fumadores.
- 7.4- El consumo de alcohol de hombres y de mujeres, ya fuese de forma habitual u ocasional, no modificó el contenido plaquetario de TGF- β y de PDGF
- 7.5- La práctica de deporte no modificó los niveles de TGF- β plaquetarios y PDGF.
- 7.6-El tratamiento con antidepresivos no modificó los niveles de TGF- β y de PDGF. Para poder estratificar la población según género y edad, deberían incluirse más pacientes en el estudio.
- 7.7- Los anticomiciales no modificaron los niveles plaquetarios de PDGF ni de TGF- β en los individuos que toman dicha medicación.
- 7.8- Los pacientes con PTI no presentaron variaciones en los niveles de de TGF- β pero si presentaron un aumento en los niveles de PDGF.
- 7.9 Si bien nuestros resultados no muestran que los niveles de expresión en plaquetas de PDGF y de TGF- β estén fuertemente regulados por hábitos y ciertas medicaciones, creemos recomendable realizar un estudio en una cohorte más numerosa, debido a la importancia de estos factores en medicina regenerativa y de reparación.

8. REFERENCIAS

BIBLIOGRAFÍA POR ORDEN DE REFERENCIA

- 1.- Robb-Smith A. Why the platelets were discovered. *Br J Haematol* 1967; 13:618-637.
- 2.- Spaet T. Platelets: the blood dust. En Wintrobe M, ed. *Blood, Pure and Eloquent*. New York: Mc Graw Hill, 1980:549-571.
- 3.- Quick A. The historical development of the concepts of Hemostasis. En: Quick A, ed. *Hemorrhagic Diseases and Thrombosis*. Philadelphia. Lea & Fabiger, 1966:15-33.
- 4.- MacFarlane RG, Biggs R. Fibrinolysis. Its mechanism and significance. *Blood* 1948; 3:1167-1187.
- 5.- Tocantis L. Historical notes on blood platelets. *Blood* 1948; 3:1073-1082.
- 6.- Addison W. On the colourless corpuscles and on the molecules and cytoblasts in the blood. *Lond Med Gaz* 1841/42; 30:144-146.
- 7.- Dreyfus C. Georges Hayem. *J Lab Clin Med* 1942; 27:855-865.
- 8.- Hayem G. *L'hématoblaste, Troisième Élément du Sang*. París: Press Universitaires de France, 1923.
- 9.- Bizzozero J. Ueber einen neuen Formbestandtheil des Blutes und dessen Rolle bei der Thrombose und der Blutgerinnung. *Virchows Arch Pathol Anat Physiol* 1882; 90:261-332.
- 10.- Schimmelbusch C. Die Blutplättchen und die Blutgerinnung. *Arch Path Anat Physiol* 1885; 101:201.
- 11.- Eberth J, Schimmelbusch C. Experimentelle Untersuchungen über Thrombose. *Arch Path Anat Physiol* 1886; 103:39.
- 12.- Wright JH. The origin and nature of the blood plates. *Boston Med Surg J* 1906; 154:643-645.
- 13.- Whitman DH, Berry RL, Green DM. Platelet gel: An autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg.* 1997 11; 55(11).
- 14.- Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998 06; 85(6): 638-46.
- 15.- Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: Evidence to support its use. *J. Oral maxillofac. Surg.* 2004. 62: 489-496.

- 16- Anitua EA. Enhancement of osseointegration by generating a dynamic implant surface. *J Oral Implantol.* 2006; 32(2): 72-6.
- 17.- Mateo de Acosta Andino, Porres Aguilar,M, Vazquez Saldaña.Actualización bibliográfica sobre el uso de preparaciones ricas en plaquetas en la cicatrización de heridas. *Cir. plást. iberolatinoam.* 2010. vol.36 no.3.
- 18.- Ning Zhang, Yong-Ping Wu, Sheng-jun Quian, Chong Teng. Research progress in the mechanism of effect of PRP in bone deficiency healing.. *The scientific world journal.* Vol 2013.
- 19.- Mario Reyes, Sandra Romero, Julio Cifuentes, Emilio Zarzar. Actualización de la técnica de obtención y uso del plasma rico en factores de crecimiento.. *Revista dental de Chile.* 2002; 93(2): 25-28.
- 20.- Hartwig D, Harloff S, Liu L, Schlenke P, Wedel T, Geerling G. Epitheliotropic capacity of a growth factor preparation produced from platelet concentrates on corneal epithelial cells: A potential agent for the treatment of ocular surface defects? *Transfusion.* 2004 12; 44(12): 1724-31.
- 21.- Márquez de Aracena del Cid,R., Montero de Espinosa Escoriaza,I., Muñoz Saez M, Pereira Gutiérrez G, Martín Leal F. Tratamiento con concentrado plaquetario plasmático subconjuntival y tópico en el trasplante de limbo. *Mapfre Medicina.* 2006; 17(4): 280-5.
- 22.- Kjaergard HK, Pedersen JH, Krasnik M, Weis-Fogh US, Fleron H, Griffin HE. Prevention of air leakage by spraying vivostat fibrin sealant after lung resection in pigs. *Chest.* 2000 04; 1.
- 23.- Peñarrocha Diago M, Sanchís Bielsa JM, Martínez González JM. Factores de crecimiento y proteínas que influyen en el crecimiento óseo: Aplicaciones en implantología oral. *Periodoncia: Revista Oficial de la Sociedad Española de Periodoncia.* 2001; 11(3): 205-16.
- 24.- Anitua EA. Enhancement of osseointegration by generating a dynamic implant surface. *J Oral Implantol.* 2006; 32(2): 72-6.
- 25 .- Ballester JF, Alvarez A, López I, Molinos JR, Arnás M, Vera JM. Protocolo para la obtención de PDGF a partir de PRF. *Revista española odontoestomatológica de implantes.*2004, vol 12, 14-29.
- 26.- Yamada Y, Ueda M, Hibi H, Baba S. A novel approach to periodontal tissue regeneration with mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma using tissue engineering technology: A clinical case report. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2006 08; 26(4): 363-9.

- 27.- Martínez González JM, Cano Sánchez J, Gonzalo Lafuente JC, Campo Trapero J, Esparza Gómez GC, Seoane Lestón M. ¿Existen riesgos al utilizar los concentrados de plasma rico en plaquetas (PRP) de uso ambulatorio? *Medicina Oral*. 2002; 7(5): 375-90.
- 28.- Landesberg R, Moses M, Karpatkin M. Risks of using platelet rich plasma gel. *J Oral Maxillofac Surg*. 1998 09; 56(9): 1116-7
- 29.- Dagobert Tutsch, Norbert Boss, Gunter Wangerin, editor. *Diccionario Médico Roche*; 1993.
- 30.- Okada H, Murakami S. Cytokine expression in periodontal health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1998; 9(3): 248-66.
- 31.- Odell, T.T., Jr., and C.W. Jackson. Polyploidy and maturation of rat megakaryocytes. *Blood*. 1968. 32:102–110.
- 32.- Odell, T.T., Jr., C.W. Jackson, and T.J. Friday. Megakaryocytopoiesis in rats with special reference to polyploidy. *Blood*. 1970. 35:775–782.
- 33.- Long, M.W., N. Williams, and S. Ebbe. Immature megakaryocytes in the mouse: physical characteristics, cell cycle status, and in vitro responsiveness to thrombopoietic stimulatory factor. *Blood*. 1982. 59:569–575.
- 34.- Bartley, T.D., J. Bogenberger, P. Hunt, Y.S. Li, H.S. Lu, F. Martin, M.S.Chang, B. Samal, J.L. Nichol, S. Swift. Identification and cloning of a megakaryocyte growth and development factor that is a ligand for the cytokine receptor Mpl. *Cell*. 1994. 77:1117–1124.
- 35.- Ebbe, S. 1976. Biology of megakaryocytes. *Prog. Hemost. Thromb*. 3:211–229.
- 36.- Sabri, S., A. Foudi, S. Boukour, B. Franc, S. Charrier, M. Jandrot-Perrus, R.W. Farndale, A. Jalil, M.P. Blundell, E.M. Cramer. Deficiency in the Wiskott-Aldrich protein induces premature proplatelet formation and platelet production in the bone marrow compartment. *Blood*. 2006. 108:134–140.
- 37.- Kaushansky, K. Historical review: megakaryopoiesis and thrombopoiesis. *Blood*. 2008. 111:981–986.
- 38.- Kaushansky, K., S. Lok, R.D. Holly, V.C. Broudy, N. Lin, M.C. Bailey, J.W. Forstrom, M.M. Buddle, P.J. Oort, F.S. Hagen. Promotion of megakaryocyte progenitor expansion and differentiation by the c-Mpl ligand thrombopoietin. *Nature*. 1994. 369:568–571.
- 39.- Kuter, D.J., D.L. Beeler, and R.D. Rosenberg. The purification of megapoietin: a physiological regulator of megakaryocyte growth and platelet production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994. 91:11104–11108.

- 40.-Lok, S., K. Kaushansky, R.D. Holly, J.L. Kuijper, C.E. Lofton-Day, P.J. Oort, F.J. Grant, M.D. Heipel, S.K. Burkhead, J.M. Kramer.. Cloning and expression of murine thrombopoietin cDNA and stimulation of platelet production in vivo. *Nature*. 1994. 369:565–568.
- 41.- Sohma, Y., H. Akahori, N. Seki, T. Hori, K. Ogami, T. Kato, Y. Shimada, K. Kawamura, and H. Miyazaki. Molecular cloning and chromosomal localization of the human thrombopoietin gene. *FEBS Lett* 1994. 353:57–61.
- 42.- Wendling, F., E. Maraskovsky, N. Debili, C. Florindo, M. Teepe, M. Titeux, N. Methia, J. Breton-Gorius, D. Cosman, and W. Vainchenker. cMpl ligand is a humoral regulator of megakaryocytopoiesis. *Nature*. 1994. 369:571–574.
- 43.- Juan Antonio Barcat. Megacariocitos, plaquetas y una nueva función pulmonar *Medicina (B. Aires)* 2017 vol.77 no.4.
- 44.- Gurney, A.L., K. Carv Moore, F.J. de Sauvage, and M.W. Moore. Thrombocytopenia in c-mpl-deficient mice. *Science*. 1994. 265:1445–1447.
- 45.- Yamada, E. The fine structure of the megakaryocyte in the mouse spleen. *Acta Anat. (Basel)*. 1957. 29:267–290.
- 46.- Radley, J.M., and C.J. Haller. The demarcation membrane system of the megakaryocyte: a misnomer? *Blood*. 1982. 60:213–219.
- 47.- Schulze, H., M. Korpál, J. Hurov, S.W. Kim, J. Zhang, L.C. Cantley, T. Graf, and R.A. Shivdasani. Characterization of the megakaryocyte demarcation membrane system and its role in thrombopoiesis. *Blood*. 2006. 107:3868–3875.
- 48.- Patel-Hett, S., H. Wang, A.J. Begonja, J.N. Thon, E.C. Alden, N.J. Wandersee, X. An, N. Mohandas, J.H. Hartwig, and J.E. Italiano Jr. The spectrin-based membrane skeleton stabilizes mouse megakaryocyte membrane systems and is essential for proplatelet and platelet formation. *Blood*. 2011. 118:1641–1652.
- 49.- Tablin, F., M. Castro, and R.M. Leven. Blood platelet formation in vitro. The role of the cytoskeleton in megakaryocyte fragmentation. *J. Cell Sci.* 1990. 97:59–70.
- 50.- Hartwig, J.H., and J.E. Italiano Jr. Cytoskeletal mechanisms for platelet production. *Blood Cells Mol. Dis.* 2006. 6:99–103.

- 51.- Thon, J.N., A. Montalvo, S. Patel-Hett, M.T. Devine, J.L. Richardson, A. Ehrlicher, M.K. Larson, K. Hoffmeister, J.H. Hartwig, and J.E. Italiano Jr. Cytoskeletal mechanics of proplatelet maturation and platelet release. *J. Cell Biol.* 2010. 191:861–874.
- 52.- Blair, P., and R. Flaumenhaft. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev.* 2009. 23:177–189.
- 53.- Reddi, A.H., R. Gay, S. Gay, and E.J. Miller. Transitions in collagen types during matrix-induced cartilage, bone, and bone marrow formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1977. 74:5589–5592.
- 54.- Leonardo Rivadeneyra, Paola Carla Ivani, Mirta Schattner, Roberto Gabriel Pozner. The birth of a platelet: A trip from bone marrow megakaryocytes to circulating platelets. *Acta bioquímica clínica latinoamericana.* 2016 vol.50 no.2.
- 55.- Serrano Amarilla, Natalia. Biología de los megacariocitos embrionarios: vías de diferenciación y su papel en el establecimiento de los compartimentos celulares del hígado fetal. UAM. 2010. Tesis Doctoral.
- 56.- Bermejo E. Fisiología de la hemostasia normal. *Hematología* 2017. Vol. 21 N° Extraordinario: 10-18
- 57.- Dina Pabón Realpe. Papel Del Complejo GPIb-IX en la activación plaquetaria dependiente de trombina y en la diferenciación megacariocítica. UAM. 2008. Tesis Doctoral.
- 58.- Sabri, S., M. Jandrot-Perrus, J. Bertoglio, R.W. Farndale, V.M. Mas, N. Debili, and W. Vainchenker. Differential regulation of actin stress fiber assembly and proplatelet formation by alpha2beta1 integrin and GPVI in human megakaryocytes. *Blood.* 2004. 104:3117–3125.
- 59.- Zou, Z., A.A. Schmaier, L. Cheng, P. Mericko, S.K. Dickeson, T.P. Stricker, S.A. Santoro, and M.L. Kahn. Negative regulation of activated alpha-2 integrins during thrombopoiesis. *Blood.* 2009. 113:6428–6439.
- 60.- Zhang, L., M. Orban, M. Lorenz, V. Barocke, D. Braun, N. Urtz, C. Schulz, M.L. von Brühl, A. Tirniceriu, F. Gaertner. A novel role of sphingosine 1-phosphate receptor S1pr1 in mouse thrombopoiesis. *J. Exp. Med.* 2012. 209:2165–2181.
- 61.- Kellie R. Machlus, Joseph E. Italiano. The incredible journey From megakaryocyte development to platelet formation. *J. Cell Biol.* Vol 201, N° 6. 785-796.

- 62.- Rendu F, Brohard-Bohn B. The platelet release reaction: Granules' constituents, secretion and functions. *Platelets*. 2001 08; 12(5): 261-73.
- 63.- Rivera J, lozano ML, Navarro-Nuñez L, Vicente V. Platelet receptors and signaling in the dynamics of thromb formation. *Haematologica* 2009,94:700711.
- 64.- Nora Butta, Victor Jimenez- Yuste, Ihosvany Fernández Bello, M^a Teresa Alvarez, Mónica Mattín Salces, Ana Rodriguez de la Rúa. Las plaquetas en las enfermedades inflamatorias. Curso de trombosis y hemostasia. Libro de ponencias. 10-18.
- 65.- Antonio Lorente Perez Sierra. Estudio de microscopia electrónica y cuantificación de los factores de crecimiento mediante un nuevo procedimiento de obtención de plasma rico en plaquetas. Memoria para optar al grado de doctor. 2010.
- 66.- AM. Agustino, R. Piqueras, M. Pérez, P. García de Rojas, J. Jaqueti, F. Navarro. Recuento de plaquetas y volumen plaquetario medio en una población sana. *Rev Diagn Biol* 2002 vol.51 no.2.
- 67.- Beca T. Plasma rico en plaquetas, una revisión bibliográfica. *Av implantol* 2007;19, 1:39-52.
- 68.- Johana Andrae. Role of platelet derived growth factors in physiology and medicine. *Genes and development* 22.1276-1312.
- 69.- Graham SS, Traub B, Mink IB. Automated platelet-sizing parameters on a normal population. *Am J Clin Pathol* 1987; 365-369.
- 70.- Kosugi, S. Circulating thrombopoietin level in chronic immune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol*, 1996. 93(3): p. 704-6.
- 71.- Stasi, R., Immune thrombocytopenia: pathophysiologic and clinical update. *Semin Thromb Hemost*, 2012. 38(5): p. 454-62.
- 72.- Stoll, D., et al., Platelet kinetics in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura and moderate thrombocytopenia. *Blood*, 1985. 65(3): p. 584-8.
- 73.- Heyns Adu, P., et al., Platelet turnover and kinetics in immune thrombocytopenic purpura: results with autologous ¹¹¹In-labeled platelets and homologous ⁵¹Cr-labeled platelets differ. *Blood*, 1986. 67(1): p. 86-92.
- 74.- Nichol, J.L., Endogenous TPO (eTPO) levels in health and disease: possible clues for therapeutic intervention. *Stem Cells*, 1998. 16 Suppl 2: p. 165-75.

- 75.- Abrahamson, P.E. The incidence of idiopathic thrombocytopenic purpura among adults: a population-based study and literature review. *Eur J Haematol*, 2009. 83(2): p. 83-9.
- 76.- Schoonen, W.M. Epidemiology of immune thrombocytopenic purpura in the General Practice Research Database. *Br J Haematol*, 2009. 145(2): p. 235-44.
- 77.- Abrahamson, P.E. The incidence of idiopathic thrombocytopenic purpura among adults: a population-based study and literature review. *Eur J Haematol*, 2009. 83(2): p. 83-9.
- 78.- Segal, J.B. and N.R. Powe, Prevalence of immune thrombocytopenia: analyses of administrative data. *J Thromb Haemost*, 2006. 4(11): p. 2377-83.
- 79.- Rodeghiero, F. Standardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children: report from an international working group. *Blood*, 2009. 113(11): p. 2386-93.
- 80.- Provan, D. International consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia. *Blood*, 2010. 115(2): p. 168-86.
- 81.- George, J.N. Improved quality of life for romiplostim-treated patients with chronic immune thrombocytopenic purpura: results from two randomized, placebo-controlled trials. *Br J Haematol*, 2009. 144(3): p. 409-15.
- 82.- Snyder, C.F. Health-related quality of life of immune thrombocytopenic purpura patients: results from a web-based survey. *Curr Med Res Opin*, 2008. 24(10): p. 2767-76.
- 83.- Olsson, B. T-cell-mediated cytotoxicity toward platelets in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Nat Med*, 2003. 9(9): p. 1123-4.
- 84.- Fogarty, P.F. T cell receptor VB repertoire diversity in patients with immune thrombocytopenia following splenectomy. *Clin Exp Immunol*, 2003. 133(3): p. 461-6.
- 85.- Andre, S. Surveillance of antigen-presenting cells by CD4+ CD25+ regulatory T cells in autoimmunity: immunopathogenesis and therapeutic implications. *Am J Pathol*, 2009. 174(5): p. 1575-87.
- 86.- Sebastian Lacroix- Desmazes, Ana Maria Navarrete, Sebastien André, Jagadeesh Bayry, Srinivas V. Kaveri, Suryasarathi Dasgupta. Dynamics of factor VIII determine its immunological fate in hemophilia A. *Blood* 2008 112: 240-249.
- 87.- Carcao, M.D., et al., Fcγ receptor IIa and IIIa polymorphisms in childhood immune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol*, 2003. 120(1): p. 135-41.
- 88.- Crow, A.R. and A.H. Lazarus, Role of Fcγ receptors in the pathogenesis and treatment of idiopathic thrombocytopenic purpura. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2003. 25 Suppl 1: p. S14-8.

- 89.- Chang, M. Immune thrombocytopenic purpura (ITP) plasma and purified ITP monoclonal autoantibodies inhibit megakaryocytopoiesis in vitro. *Blood*, 2003. 102(3): p. 887-95.
- 90.- Emilia, G. *Helicobacter pylori* eradication can induce platelet recovery in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood*, 2001. 97(3): p. 812-4.
- 91.- McMillan, R.. Suppression of in vitro megakaryocyte production by antiplatelet autoantibodies from adult patients with chronic ITP. *Blood*, 2004. 103(4): p. 1364-9.
- 92.- Stahl, C.P., D. Zucker-Franklin, and T.P. McDonald, Incomplete antigenic cross-reactivity between platelets and megakaryocytes: relevance to ITP. *Blood*, 1986. 67(2): p. 421-8.
- 93.- Houwerzijl, E.J. Ultrastructural study shows morphologic features of apoptosis and para-apoptosis in megakaryocytes from patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood*, 2004. 103(2): p. 500-6.
- 94.- Cohen, Y.C. The bleeding risk and natural history of idiopathic thrombocytopenic purpura in patients with persistent low platelet counts. *Arch Intern Med*, 2000. 160(11): p. 1630-8.
- 95.- Stasi, R. Pathophysiology and therapeutic options in primary immune thrombocytopenia. *Blood Transfus*, 2011. 9(3): p. 262-73.
- 96.- Cortelazzo, S., et al., High risk of severe bleeding in aged patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood*, 1991. 77(1): p. 31-3.
- 97.- Portielje, J.E. Morbidity and mortality in adults with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood*, 2001. 97(9): p. 2549-54.
- 98.- AnneZufferey,Rick Kapur, John W Semple. Pathogenesisand therapeutic mechanism in inmune thrombocitopenia (PTI). *J.Clin.med.*2017,6,16.
- 99.-Michele P. Lambert, TherryB. Gersheimer. Clinical update sin adult inmune thrombocitopenia. *Blood* 2017. Vol 129, number 21.
- 100.- Klongnoi B, Rupprecht S, Kessler P, Thorwarth M, Wiltfang J, Schlegel KA. Influence of platelet-rich plasma on a bioglass and autogenous bone in sinus augmentation. An explorative study. *Clin Oral Implants Res.* 2006 06; 17(3): 312-20.
- 101.- Ohya M, Yamada Y, Ozawa R, Ito K, Takahashi M, Ueda M. 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. *Clin Oral Implants Res.* 2005 10; 16(5): 622-9.

- 102.- De Obarrio JJ, Araúz-Dutari JJ, Chamberlain TM, Croston A. The use of autologous growth factors in periodontal surgical therapy: Platelet gel biotechnology-case reports. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2000 10; 20(5): 486-97.
- 103.- Camargo PM, Lekovic V, Weinlaender M, Vasilic N, Madzarevic M, Kenney EB. Platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral combined with guided tissue regeneration in the treatment of intrabony defects in humans. *J Periodontal Res.* 2002 08; 37(4): 300-6.
- 104.- Camargo PM, Lecovik V, Weinlaender M, Divnic-Resnik T, Pavlovic M, Kenney EB. A surgical reentry study on the influence of platelet-rich plasma in enhancing the regenerative effects of bovine porous bone mineral and guided tissue regeneration in the treatment of intrabony defects in humans. *J. Periodontology.* 2009 06; 80(6): 915- 23.
- 105.- Lekovic V, Camargo PM, Weinlaender M, Vasilic N, Kenney EB. Comparison of platelet-rich plasma, bovine porous bone mineral, and guided tissue regeneration versus platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral in the treatment of intrabony defects: A reentry study. *J Periodontol.* 2002 02; 73(2): 198-205.
- 106.- Lekovic V, Camargo PM, Weinlaender M, Vasilic N, Aleksic Z, Kenney EB. Effectiveness of a combination of platelet-rich plasma, bovine porous bone mineral and guided tissue regeneration in the treatment of mandibular grade II molar furcations in humans. *J Clin Periodontol.* 2003 08; 30(8): 746-51.
- 107.- Weibrich G, Hansen T, Kleis W, Buch R, Hitzler WE. Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone.* 2004 04; 34(4): 665- 71.
- 108.- Zimmermann R, Jakubietz R, Jakubietz M, Strasser E, Schlegel A, Wiltfang. Different preparation methods to obtain platelet components as a source of growth factors for local application. *Transfusion.* 2001 10; 41(10): 1217-24.
- 109.- Keles GC, Cetinkaya BO, Albayrak D, Koprulu H, Acikgoz G. Comparison of platelet pellet and bioactive glass in periodontal regenerative therapy. *Acta Odontol Scand.* 2006 11; 64(6): 327-33.
- 110.- Gehrig A et al. Assessment of RS1 in X-linked juvenile retinoschisis and sporadic senile retinoschisis. *Clin Genet* 1999, 55:461-5.
- 111.- Hartwig D, Herminghaus P, Wedel T, Liu L, Schlenke P, Dibbelt L. Topical treatment of ocular surface defects: comparison of epitheliotropic capacity of fresh

frozen plasma and serum on corneal epithelial cells in an in vitro cell culture model.

Tranfus Med 2005. 15: 107-113.

112.- Márquez-de-Aracena R., Montero-de-Espinosa I., Muñoz M., Pereira G. Aplicación subconjuntival de concentrado de plaquetas plasmáticas en el tratamiento de quemaduras oculares. Resultados preliminares. Arch Soc Esp Oftalmol. 2007. vol.82. nº 8.

113 .- Petrungraro P. The use of platelet rich plasma with growth factor (autologous platelet gel) to enhance hard and soft tissue healing and maturation in surgical implant dentistry. Clinical Update. 2000. 1(8).

114 .- Inkinen K, Wolff H, Lindroos P, Ahonen J. Connective tissue growth factor and its correlation to other growth factors in experimental granulation tissue. Connect Tissue Res. 2003. 44(1): 19-29.

115.- Keceli HG, Sengun D, Berberoğlu A, Karabulut E. Use of platelet gel with connective tissue grafts for root coverage: A randomized-controlled trial. J Clin Periodontol. 2008. 03/05; 35(3): 255-62.

116.- Shanaman R, Filstein MR, Danesh-Meyer MJ. Localized ridge augmentation using GBR and platelet-rich plasma: Case reports. Int J Periodontics Restorative Dent. 2001. 08; 21(4): 345-55

117.- Robiony M, Polini F, Costa F, Politi M. Osteogenesis distraction and platelet-rich plasma for bone restoration of the severely atrophic mandible: Preliminary results. J Oral Maxillofac Surg. 2002. 06; 60(6): 630-5.

118.- M. Sánchez, J. Azofra, B. Aizpurúa, R. Elorriaga, E. Anitua, I. Andía. Aplicación de plasma autólogo rico en factores de crecimiento en cirugía artroscópica. Asociación Española de artroscopia. 2003. vol. 10 • fasc. 1 • núm. 19.

119.- Miranda SR, Nary Filho H, Padovan LEM, Ribeiro DA, Nicolielo D, Matsumoto MA. Use of platelet-rich plasma under autogenous onlay bone grafts. Clin Oral Implants Res. 2006.12; 17(6): 694-9.

120.- Petrungraro P. Platelet-rich plasma for dental implants and soft-tissue grafting. interview by arun K. garg. Dent Implantol Update. 2001. 06; 12(6): 41-6.

121.- Garg AK. The use of platelet-rich plasma to enhance the success of bone grafts

around dental implants. *Dent Implantol Update*. 2000. 03; 11(3): 17-21.

122.- Kim S, Kim W, Park J, Kim H. A comparative study of osseointegration of avana implants in a demineralized freeze-dried bone alone or with platelet-rich plasma. *J Oral Maxillofac Surg*. 2002. 09; 60(9): 1018-25.

123.- Heldin CH, Lennartsson J, Westermarck B. Involvement of platelet-derived growth factor ligands and receptors in tumorigenesis. *J Intern Med*. 2017. Sep 22.

124.- Kawase T. Platelet-rich plasma and its derivatives as promising bioactive materials for regenerative medicine: basic principles and concepts underlying recent advances. *Odontology*. 2015. 103(2):126-35.

125.- Araki J, Jona M, Eto H, Aoi N, Kato H, Suga H, et al. Optimized preparation method of platelet-concentrated plasma and noncoagulating platelet-derived factor concentrates: maximization of platelet concentration and removal of fibrinogen. *Tissue Eng Part C Methods*. 2012. 18:176–185.

126.- Bernardi M, Albiero E, Alghisi A, Chierigato K, Lievore C, Madeo D. Production of human platelet lysate by use of ultrasound for ex vivo expansion of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*. 2013. 15:920–929.

127.- Gremmel T, Kopp CW, Eichelberger B, Koppensteiner R, Panzer S. Sex differences of leukocyte-platelet interactions and on-treatment platelet reactivity in patients with atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2014. 237(2):692–5.)

128.- Ballester Ferrandis, JF, Sanchez Siles, M. Pia Pascual,P, Camacho Alonso,F. Influencia de la edad y el sexo de los pacientes en la determinación de la dosis administrada de plaquetas en la terapéutica de plasma rico en factores de crecimiento. *Labor dental clínica*. Vol15. Nº1 01-03/2014

129.- Rodríguez Flores, J; Palomar Gallego, MA; Torres García-Denche, J. Plasma rico en plaquetas: fundamentos biológicos y aplicaciones en cirugía maxilofacial y estética facial. *Rev. Esp. Cirug Oral y Maxilofac* 2012, vol. 34 no.1.

130.- Beca, T., Hernández G., Morante S. y Bascones, A. Plasma rico en plaquetas. Una revisión bibliográfica *Rev. Avances en Periodoncia e Implantología Oral*. 2007, Vol. 19 no 1.

131.- Hemeda H, Giebel B, Wagner W. Evaluation of human platelet lysate versus fetal bovine serum for culture of mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*. 2014. 16:170–180.

132. - Capelli C, Pedrini O, Valgardsdottir R, Da RF, Golay J, Introna M. Clinical grade expansion of MSCs. *Immunol Lett*. 2015. 168:222–227.

- 133.- Doucet C, Ernou I, Zhang Y, Llense JR, Begot L, Holy X, et al. Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: a safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. *J Cell Physiol.* 2005; 205:228–236
- 134.- Schallmoser K, Strunk D. Generation of a pool of human platelet lysate and efficient use in cell culture. *Methods Mol Biol.* 2013, 946:349–362.
- 135.-Schallmoser K, Strunk D. Preparation of pooled human platelet lysate (pHPL) as an efficient supplement for animal serum-free human stem cell cultures. *J Vis Exp.* 2009; 32:e1523.
- 136.- Strandberg G, Sellberg F, Sommar P, Ronaghi M, Lubenow N, Knutson F, Berglund D. Standardizing the freeze-thaw preparation of growth factors from platelet lysate. *Transfusion.* 2017, 57(4):1058-1065.
- 137.- Sáez-Torres Barroso, C., Calvo Benito, J. y Gayá Puig, A. Calidad del plasma rico en plaquetas: estudio de la activación plaquetaria. *Rev. Esp. Cirug. Orañ y Maxilofac* 2007, vol 29 no 4.
- 138.- Becker DM, Segal J, Vaidya D, Yanek LR, Herrera-Galeano JE, Bray PF, Moy TF, Becker LC, Faraday N. Sex differences in platelet reactivity and response to low-dose aspirin therapy. *J Am Med Assoc.* 2006. 295(12):1420–7. 12.
- 139.- Gernot Weibrich et al. Grow factors levels in platelets rich in plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count. *journal of cranio- maxillofacial surgery.* 2002. 30, 97-102.
- 140.- Kim S, Kim W, Park J, Kim H. A comparative study of osseointegration of avana implants in a demineralized freeze-dried bone alone or with platelet-rich plasma. *J Oral Maxillofac Surg.* 2002 09; 60(9): 1018-25
- 141.- Leung. Pilot study of sex diferences in chemokine/citokine markers of atherosclerosis in humans. *Gender medicine.* 2008, Vol 5. N 1.
- 142.- Kawasumi M, Kitoh H, Siwicka KA, Ishiguro N. The effect of the platelet concentration in platelet-rich plasma gel on the regeneration of bone. *J Bone Joint Surg Br.* 2008 07; 90(7): 966-72.
- 143.- Ronaldo Celio Mariano, William Morais de Melo, Cassia Carneiro- Avelino. Comparative radiographic evaluation of alveolar bone healing associated with autologous platelet rich plasma after impacted mandibular third molar surgery. *J oral maxillofac surg* 2012, 70:19-24.
- 144.- Rajavashisth TB. Xu XP. Jovinge S. Meisel S. Xu XO. Chai NN. Fishbein MC. Kaul S. Cercek B. Sharifi B. Shah PK. Membrane type I matrix metalloproteinase

expression in human atherosclerotic plaques: evidence for activation by pro-inflammatory mediators. *Circulation* 1999; 99(24): 3103-3109.

145.- Chuanrun T, Wesson DE. Cigarette smoking predicts faster progression of type 2 established diabetic nephropathy despite ACE inhibition. *Am J Kidney Dis* 2002, 39:376-82.

146.- Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Roles of TGF-beta in hepatic. *Biosci.* 7, d 793-807.

147.-Thieringer F, Maass T, Czochra P, Klopčič B, Conrad I, Friebe D, et al. Spontaneous hepatic fibrosis in transgenic mice overexpressing PDGF-A. *Gene.* 2008; 423(1):23-28.

148.- Margarita de Montserrat Castiñeira Alvariño. Papel etiopatogénico del tabaco y el alcohol en los procesos de fibrogénesis pancreática asociado a pancreatitis crónica: estudio sobre cultivo de células estrelladas pancreáticas. Universidad de Santiago de Compostela. 2014. Tesis Doctoral.

149.- M.José Medrano, Elena Cerrato, Raquel Boix, Miguel Delgado Rodriguez. Factor e riesgo cardiovascular en la población española: Mtaanálisis de estudios transversales. *Médecina clínica.* 2005. Vol.124 (16); 606-612.

150.- Seki E, Schwabe RF. Hepatic inflammation and fibrosis: functional links and key pathways. *Hepatology.* 2015. 61 (3):1066-79.

151.- Lazarte Cuba, R., Pávez Azurmendi, C. y Poniachik Teller, J. Hepatitis alcohólica.. *Hepatología,* 2015. págs. 89-105

152.- Altamirano J, Bataller R. Alcoholic liver disease: pathogenesis and new targets for therapy. *Nature reviews. Gastroenterol Hepatol* 2011. 8:491-501.

153.- M. Vera y N. Nieto. Células estrelladas hepáticas y hepatopatía alcohólica. *Rev. esp. enferm. cavar.* 2006, vol.98 no.9.

154.- Lazarte R, Pavez C, Poniachik J. Enfermedad hepática por alcohol. *Avances en Hepatología* 2012. p. 142-62.

155.- OMS. Informe Mundial de Situación sobre Alcohol y Salud 2014.

156.- P.M. Kearney, M. Whelton, K. Reynolds, P. Muntner, P.K. Whelton, J. He Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet,* 2005. 365 pp. 217-223.

157.- Magen, A. Feldman, Z. Cohen, D. Ben-Alon, E. Minz, A. Chernyavsky Circulating endothelial Progenitor cells, Th1/Th2/Th17-related cytokines, and endothelial dysfunction in resistant hypertension *Am J Med Sci,* 2010. 339, pp. 117-122.

- 158.- Javier Andrés Bravo Vivallo. Efecto del antidepresivo desipramina sobre marcadores hipocampales asociados a la resiliencia celular. Universidad de Chile. 2007. Tesis Doctoral.
- 159.- Demian Halperin, Guido Reber, Influencia de los antidepresivos en la hemostasia. *Diálogos Clin Neurosci* . 2007 Mar; 9 (1): 47-59
- 160.- Baldessarini, R., y cols., 2001, Warsh, J., y cols. Significado de la Dosis Neuroléptica y el Nivel Plasmático en el Tratamiento Farmacológico de las Psicosis. *Arch Gen Psiquiatría*. 1988; 45 (1): 79 - 91.
161. Resumen objetivo elaborado por el Comité de Redacción Científica de SIIC. **Effects of Selective Serotonin Reuptake Inhibitors on Platelet Function: Mechanisms, Clinical Outcomes and Implications for Use in Elderly Patients.** *Drugs & Aging* 2011. 28(5):345-367.
- 162.- Castren, E., Brain-Derived Neurotrophic Factor and Antidepressant Drugs Have Different But Coordinated Effects on Neuronal Turnover, Proliferation, and Survival in the Adult Dentate Gyrus. *J. Neurosci*. 2005 2. 25 (5): 1089-94.
- 163.- Jorge Mario Rodríguez Fernández, Mary García Acero. El papel del receptor de glucocorticoide en el estrés temprano. *Univ. Méd. Bogotá (Colombia)*, 2010. 51 (4): 385-391.
- 164.- Mogi, M.. La interleuquina-1 β , la interleucina-6, el factor de crecimiento epidérmico y el factor de crecimiento transformante α están elevados en el cerebro de los pacientes parkinsonianos. *Letras de neurociencia*.1994. Vol 180. Número 2. 147-150.
- 165.- Flanders, K.C. Altered expression of transforming growth factor-beta in Alzheimer's disease. *Neurology* August 1995 vol. 45 no. 8 1561-1569.
- 166.- Henrich-Noack, P. Lehrmann, E. Nichols, N.R. . *Pharmacol* 2012, 3:120.
- 167.- Myint, A.M.. Interacción citoquina-serotonina a través deIDO: una hipótesis de neurodegeneración de la depresión. *Hipótesis médicas*. 2003, Vol 61.519-525.
- 168.- A. Angarita. Epilepsia y sus implicaciones en el campo odontológico: artículo de revisión. Andrea Morales, Yijen Hallal, Francis Quintero, Indira Rondón. *Acta bioclinica Suplemento* 2014.
- 169.- Zhu, Y. Multi-dysfunctional pathophysiology in ITP. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2005. 54(2): p. 107-16.
- 170.- 182.- Hollman M. Edmons D. *The treatment of epilepsy*. Chap 3. 1994.

- 171.- María Yera Cobo¹ José Naranjo Orellana². Efectos del ejercicio físico sobre la hemostasia: una revisión del problema. Archivos de medicina del deporte. 2011. Vol 23, 45-55.
- 172.- Sandra M.M. Matsudo. Revista clínica Las Condes. 2012. Vol.23, Issue 3, 209-217.
- 173.- Mendelson B, Wong CH. Changes in the facial skeleton with aging: implications and clinical applications in facial rejuvenation. Aesthetic Plast Surg. 2012. (4):753-60.
- 174.- Bruce Hamilton, Johannes L. Tol, Wade Knez, Hakim Chalabi. Exercise and the platelet activator calcium chloride both influence the growth factor content of PRP: overlooked biochemical factors that could influence PRP treatment. Sports med published. 2013.
- 175.- Alejandro Abarca. Ejercicio como tratamiento anti-inflamatorio. Med. leg. Costa Rica. 2016. vol.33 n.1.
- 176.- José De La Mata. Plasma rico en plaquetas: ¿un nuevo tratamiento para el reumatólogo? Reumatol Clin 2013; 9:166-71 Vol. 9 Núm.3.
- 177.- Andersson, PO. Stockelberg, D. Jacobsson, S. y Wadenvik, H. La supresión inmune mediada por el factor de crecimiento transformante-beta1 podrían estar asociada con la remisión de la púrpura trombocitopénica idiopática crónica. Anales de Hematología, 2000. 79, 507 -513.
178. Diferencias clínicas de la trombocitopenia inmunitaria entre los niños y los adultos: posible explicación patogénica. Carlos S Ron-Guerrero. Rev Hematol Mex 2014; 15:142-147.
- 179-. Atabay, Bern, Oren, Hale, Irken, Gülersu, Kzldağ, Sefa PhD¹¹; Tunal, Sunay I; Türker, Meral ; Ylmaz, Şebnem . Papel de factor de crecimiento transformante-1 polimorfismos genéticos en la Infancia Púrpura Trombocitopénica Idiopática. Revista de Hematología / Oncología Pediátrica. 2003 – Vol. 25 (11) 885-889.
- 180.- Yasunari Kageyama, Tomoaki, Rie matsushima-Nishiwaki, Yuko Iida, Shigeru akamatsu, Akira kondo, Gen kuroyanagi², Naohiro Yamamoto, Jun Mizutani, Takanobu Otsuka, Haruhiko Tokuda, HirokiIiida, Osamu Kozawa and Shinji Ogura. Involvement of Rac in thromboxane A2-induced human platelet activation: Regulation of sCD40 ligand release and PDGF-AB secretion .Molecular medicine reports 2014. 0: 107-112.

