



Trabajo Final del Máster Universitario de Ciencias Odontológicas.

Facultad de Odontología. Universidad Complutense de Madrid.

Concentrados plaquetarios y cinética de liberación de factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y serotonina.

Eficacia de Protocolos Quirúrgicos y Regenerativos en Implantología.



Laura Baca González.

Tutor: Prof. Dr. Jesús Torres García-Denche.



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID. Facultad de Odontología

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER
VISTO BUENO DEL TUTOR
MASTER OFICIAL EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

El profesor/a tutor

Nombre y apellidos:	Prof. Dr. Jesús TORRES GARCÍA-DENCHE.
---------------------	---------------------------------------

del alumno/a

Nombre y apellidos	Laura BACA GONZÁLEZ.
--------------------	----------------------

encuadrado en la línea de investigación

Eficacia de protocolos quirúrgicos y regenerativos en Implantología.
--

DA EL VISTO BUENO


para que el Trabajo de Fin de Máster titulado

Concentrados plaquetarios y cinética de liberación de factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y serotonina.
--

sea admitido para su defensa ante Tribunal.

En Madrid , a 3 de septiembre de 2018 .

Fdo: el profesor/a

 Prof. Dr. Jesús TORRES GARCÍA-DENCHE

El presente Visto Bueno se debe acompañar del Trabajo de Investigación en formato electrónico y tres copias en papel



MÁSTER EN: CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

COMPROMISO DEONTOLÓGICO PARA LA ELABORACIÓN, REDACCIÓN Y POSIBLE PUBLICACIÓN DEL TRABAJO DE FIN DE MÁSTER (TFM)

CENTRO: Facultad de Odontología.

ESTUDIANTE DE MÁSTER: Laura BACA GONZÁLEZ.

TUTOR/ES DEL TFM: Prof. Dr. Jesús TORRES GARCÍA-DENCHE.

TÍTULO DEL TFM: *“Concentrados plaquetarios y cinética de liberación de factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y serotonina.”*

FECHA DE PRIMERA MATRÍCULA: cinco de septiembre de dos mil diecisiete.

FECHA DE SEGUNDA MATRÍCULA (en caso de producirse):

1. Objeto

El presente documento constituye un compromiso entre el estudiante matriculado en el Máster en Ciencias Odontológicas y su Tutor/es y en el que se fijan las funciones de supervisión del citado trabajo de fin de máster (TFM), los derechos y obligaciones del estudiante y de su/s profesor/es tutor/es del TFM y en donde se especifican el procedimiento de resolución de potenciales conflictos, así como los aspectos relativos a los derechos de propiedad intelectual o industrial que se puedan generar durante el desarrollo de su TFM.

2. Colaboración mutua

El/los tutor/es del TFM y el autor del mismo, en el ámbito de las funciones que a cada uno corresponden, se comprometen a establecer unas condiciones de colaboración que permitan la realización de este trabajo y, finalmente, su defensa de acuerdo con los procedimientos y los plazos que estén establecidos al respecto en la normativa vigente.

3. Normativa

Los firmantes del presente compromiso declaran conocer la normativa vigente reguladora para la realización y defensa de los TFM y aceptan las disposiciones contenidas en la misma.

4. Obligaciones del estudiante de Máster

- Elaborar, consensuado con el/los Tutor/es del TFM un cronograma detallado de trabajo que abarque el tiempo total de realización del mismo hasta su lectura.
- Informar regularmente al Tutor/es del TFM de la evolución de su trabajo, los problemas que se le planteen durante su desarrollo y los resultados obtenidos.
- Seguir las indicaciones que, sobre la realización y seguimiento de las actividades formativas y la labor de investigación, le hagan su tutor/es del TFM.
- Velar por el correcto uso de las instalaciones y materiales que se le faciliten por parte de la Universidad Complutense con el objeto de llevar a cabo su actividad de trabajo, estudio e investigación.

5. Obligaciones del tutor/es del TFM

- Supervisar las actividades formativas que desarrolle el estudiante; así como desempeñar todas las funciones que le sean propias, desde el momento de la aceptación de la tutorización hasta su defensa pública.
- Facilitar al estudiante la orientación y el asesoramiento que necesite.

6. Buenas prácticas

El estudiante y el tutor/es del TFM se comprometen a seguir, en todo momento, prácticas de trabajo seguras, conforme a la legislación actual, incluida la adopción de medidas necesarias en materia de salud, seguridad y prevención de riesgos laborales.

También se comprometen a evitar la copia total o parcial no autorizada de una obra ajena presentándola como propia tanto en el TFM como en las obras o los documentos literarios, científicos o artísticos que se generen como resultado del mismo. Para tal, el estudiante firmará la Declaración de No Plagio del ANEXO I, que será incluido como primera página de su TFM.

7. Procedimiento de resolución de conflictos académicos

En el caso de producirse algún conflicto derivado del incumplimiento de alguno de los extremos a los que se extiende el presente compromiso a lo largo del desarrollo de su TFM, incluyéndose la posibilidad de modificación del nombramiento del

tutor/es, la coordinación del máster buscará una solución consensuada que pueda ser aceptada por las partes en conflicto. En ningún caso el estudiante podrá cambiar de Tutor directamente sin informar a su antiguo Tutor y sin solicitarlo oficialmente a la Coordinación del Máster.

En el caso de que el conflicto persista se gestionará según lo previsto en el SGIC de la memoria verificada.

8. Confidencialidad

El estudiante que desarrolla un TFM dentro de un Grupo de Investigación de la Universidad Complutense, o en una investigación propia del Tutor, que tenga ya una trayectoria demostrada, o utilizando datos de una empresa/organismo o entidad ajenos a la Universidad Complutense de Madrid, se compromete a mantener en secreto todos los datos e informaciones de carácter confidencial que el Tutor/es del TFM o de cualquier otro miembro del equipo investigador en que esté integrado le proporcionen así como a emplear la información obtenida, exclusivamente, en la realización de su TFM.

Asimismo, el estudiante no revelará ni transferirá a terceros, ni siquiera en los casos de cambio en la tutela del TFM, información del trabajo, ni materiales producto de la investigación, propia o del grupo, en que haya participado sin haber obtenido, de forma expresa y por escrito, la autorización correspondiente del anterior Tutor del TFM.

9. Propiedad intelectual e industrial

Cuando la aportación pueda ser considerada original o sustancial el estudiante que ha elaborado el TFM será reconocido como cotitular de los derechos de propiedad intelectual o industrial que le pudieran corresponder de acuerdo con la legislación vigente.

10. Periodo de Vigencia

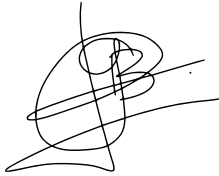

Este compromiso entrará en vigor en el momento de su firma y finalizará por alguno de los siguientes supuestos:

- Cuando el estudiante haya defendido su TFM.
- Cuando el estudiante sea dado de baja en el Máster en el que fue admitido.
- Cuando el estudiante haya presentado renuncia escrita a continuar su TFM.
- En caso de incumplimiento de alguna de las cláusulas previstas en el presente documento o en la normativa reguladora de los Estudios de Posgrado de la Universidad Complutense.

La superación académica por parte del estudiante no supone la pérdida de los derechos y obligaciones intelectuales que marque la Ley de Propiedad Intelectual para ambas partes, por lo que mantendrá los derechos de propiedad intelectual sobre

su trabajo, pero seguirá obligado por el compromiso de confidencialidad respecto a los proyectos e información inédita del tutor.

Firmado en Madrid, a 3 de septiembre de 2018.

<p>El estudiante de Máster</p>  <p>Fdo.: Sta. Laura BACA GONZÁLEZ</p>	<p>El Tutor/es</p>  <p>Fdo.: Prof. Dr. Jesús TORRES GARCÍA-DENCHE</p>
---	--

SR. COORDINADOR DEL MÁSTER EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

ANEXO I: DECLARACIÓN DE NO PLAGIO

D./Dña. Laura BACA GONZÁLEZ con NIF 05469948-L, estudiante de Máster en la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid en el curso 2017-2018, como autor/a del trabajo de fin de máster titulado “Concentrados plaquetarios y cinética de liberación de factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y serotonina.” y presentado para la obtención del título correspondiente, cuyo/s tutor/ es/son:

Prof. Dr. Jesús TORRES GARCÍA-DENCHE

DECLARO QUE:

El trabajo de fin de máster que presento está elaborado por mí y es original. No copio, ni utilizo ideas, formulaciones, citas integrales e ilustraciones de cualquier obra, artículo, memoria, o documento (en versión impresa o electrónica), sin mencionar de forma clara y estricta su origen, tanto en el cuerpo del texto como en la bibliografía. Así mismo declaro que los datos son veraces y que no he hecho uso de información no autorizada de cualquier fuente escrita de otra persona o de cualquier otra fuente. De igual manera, soy plenamente consciente de que el hecho de no respetar estos extremos es objeto de sanciones universitarias y/o de otro orden.

En Madrid, a 3 de septiembre de 2018.



Fdo.: Laura BACA GONZÁLEZ

Esta DECLARACIÓN debe ser insertada en primera página de todos los trabajos fin de máster conducentes a la obtención del Título.

Introducción.....	3
1. Los concentrados plaquetarios. Definición y evolución histórica.....	3
2. Actualidad del tema.....	5
3. Factores de crecimiento.....	6
4. La serotonina, un agente doble.....	11
4.1. Serotonina del sistema nervioso central (SNC).....	13
4.2. Serotonina periférica.....	14
4.3. Serotonina y remodelación ósea.....	15
4.4. Serotonina y plaquetas.....	18
5. Plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) y plasma rico en fibrina (L-PRF).....	20
5.1. PRGF. Protocolo de Anitua y cols.	20
5.2. L-PRF. Protocolo de Choukroun y cols.....	21
6. Interés y justificación del estudio.....	22
Objetivos	24
Hipótesis.....	25
1. Hipótesis de trabajo.....	25
2. Hipótesis alternativa (H_1)	25
3. Hipótesis nula (H_0).....	25
Material y método	26
1. Población y muestra	26
2. Diseño del estudio.....	26
2.1. Variables.....	27
2.2. Extracción de sangre.....	28
2.3. Procesado de la sangre. PRGF.....	28
2.3. Procesado de la sangre. L-PRF.....	29
2.5. Cambios de medio.....	29
2.6. Análisis por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).....	30
3. Análisis de datos	32
3.1. Serotonina	32
3.2. VEGF.....	33
Resultados	35
1. Serotonina.....	35
2. VEGF	36
Discusión	37
1. VEGF	37
2. Serotonina.....	42
Conclusiones.....	50
Agradecimientos	51
Anexos.....	52
1. Consentimiento informado para venopunción.....	52
2. Consentimiento informado para participación en el estudio.....	55
Bibliografía	59

Introducción

1. Los concentrados plaquetarios. Definición y evolución histórica.

Los concentrados plaquetarios (CP) son preparados sanguíneos donde la proporción de plaquetas es superior a la de la sangre periférica.

Su uso tiene origen en las técnicas de transfusión utilizadas en Medicina para la prevención y tratamiento de hemorragias secundarias a trombocitopenias severas. Por otro lado, en los años 70 comenzaron a emplearse como terapias coadyuvantes a la cicatrización de las heridas, los conocidos pegamentos de fibrina, que consistían en un concentrado de fibrinógeno humano que se activaba mediante trombina y calcio. Uno de los principales inconvenientes era su origen heterólogo lo que provocó la limitación de su uso en algunos países.

Para solucionar este problema, comenzaron a utilizarse a mediados de los años 90 concentrados plaquetarios autólogos. La técnica requería que los pacientes acudiesen unos días antes al hospital para una extracción de sangre que se sometía procesos de plasmaféresis con objeto de aislar el fibrinógeno. Estos nuevos concentrados recibieron el nombre de fibrina adhesiva autóloga) y gel de plaquetas. (Tayapongsak y cols., 1994; Whitman y cols., 1997) Estos procedimientos son el origen de lo que hoy conocemos como CP, pero no tuvieron mucho éxito por la complejidad de la técnica. Por un lado se necesitaban grandes volúmenes de sangre y por otro la aparatología que se usaba era costosa. (Dohan Ehrenfest y cols., 2008)

Un hito importante en la simplificación del método se produjo al reducir el volumen de sangre necesario para el procedimiento, y con la aparición de centrifugas para su uso en el propio gabinete. Marx bautizó a este derivado sanguíneo como plasma rico en plaquetas (PRP). (Marx, 1998) Para obtener el PRP se necesitan pequeños volúmenes de sangre que se extraían en el mismo momento de la cirugía para someterse a un doble proceso de centrifugado del que se obtenía un plasma enriquecido en plaquetas. Este plasma se activaba

mediante trombina bovina. Se comenzó a hablar por primera vez de un concentrado plaquetario capaz de aportar factores de crecimiento. El plasma rico en plaquetas se utilizaba al principio para favorecer la regeneración de las grandes cavidades óseas que quedaban tras la extirpación de quistes maxilares y mandibulares, obteniendo resultados muy positivos. Estos defectos cicatrizaban en menor tiempo y se conseguía mayor densidad ósea del hueso regenerado que cuando se comparaba con controles.

Evolución histórica de los concentrados plaquetarios.



Un año más tarde, Anitua desarrolló otro protocolo conocido como plasma rico en factores de crecimiento (PRGF). Una de las ventajas de este CP era la simplificación de la técnica, en la que utilizaba pequeños volúmenes de sangre y un solo centrifugado, invirtiendo mucho menos tiempo en el procedimiento. Además, en lugar de activarse con trombina bovina, se emplea cloruro cálcico. (Anitua, 1999) Tanto el PRP como el PRGF constituyen la primera generación de CP.

Recientemente ha surgido una segunda generación de CP que constituyen una nueva simplificación de la técnica. Es el denominado plasma rico en fibrina (PRF), donde no es necesario activar el preparado, puesto que de la centrifugación sale ya en forma de coágulo enriquecido. (Dohan y cols., 2006)

2. Actualidad del tema



Documento de la Secretaría de estado de Educación, Formación Profesional y Universidades de 7 de febrero de 2018, donde se confirma la venopunción como competencia de los profesionales sanitarios de Odontología.

En las gráficas de este apartado puede apreciarse como el número de publicaciones de los CP en general, así como particularmente en el ámbito Odontológico, sigue un patrón creciente. Son dos los hechos recientes que pueden influir positivamente en el uso clínico dental en un futuro próximo: por un lado la regularización del uso de este tipo de productos por parte de la Agencia Española del Medicamento en 2013. (Anitua y cols., 2015a) Por otro lado, está la confirmación en febrero de 2018 por parte de los organismos competentes de la posibilidad de que los profesionales de la Odontología practiquen la venopunción, paso necesario en la preparación de los CP.

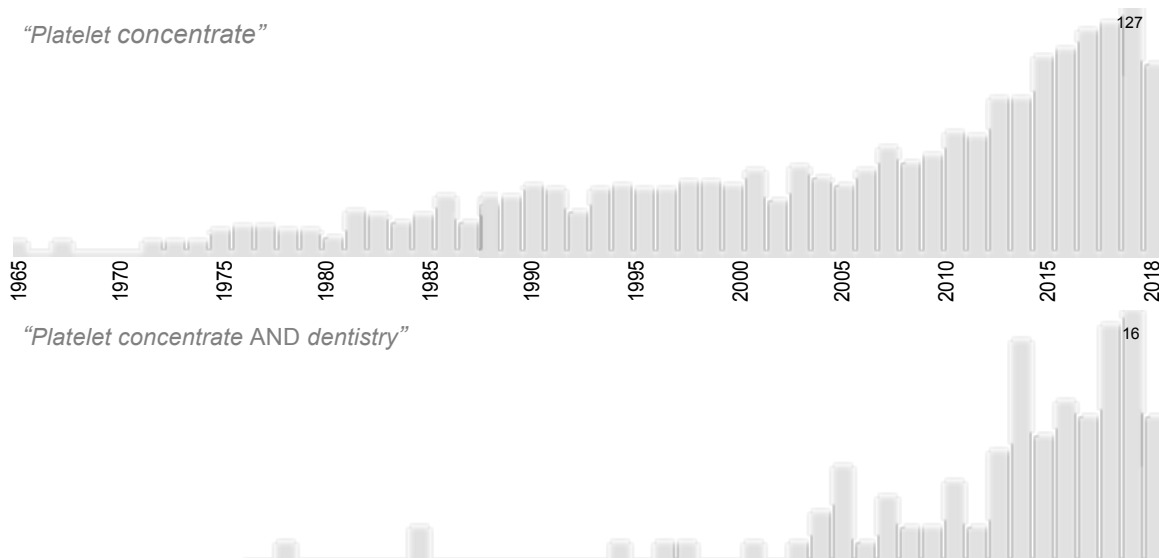


Gráfico histórico de resultados en PubMed para los términos indicados en cada figura.

3. Factores de crecimiento.

Todos los CP aportan principalmente dos elementos: una concentración de plaquetas superior a la de los niveles basales y una matriz de fibrina. Cuando se activan, las plaquetas liberan el contenido de sus gránulos alfa, ricos en factores de crecimiento (FC) Estos FC están implicados en los procesos de cicatrización de las heridas. Las funciones específicas de cada uno se detallan a continuación.

- Eje de los *factores de crecimiento análogos de la insulina* (IGFs) Los IGF I y II son reguladores positivos de la proliferación y diferenciación de la mayor parte de tipos celulares, incluyendo células tumorales, que se valen del sistema IGF para aumentar su potencial de supervivencia. Aunque estas citoquinas son mediadores de la multiplicación celular, su principal papel es, en realidad, regular la apoptosis al inducir señales de supervivencia que protegen las células de muchos estímulos apoptóticos matriciales. Además, aunque las IGF se liberan durante la desgranulación plaquetaria, se encuentran en gran proporción en la sangre circulante. Desde el punto de vista del hueso, IGF-1 influye en la proliferación y la secreción de matriz

por parte de los osteoblastos y su descenso con la edad corresponde con una disminución en la densidad mineral ósea.

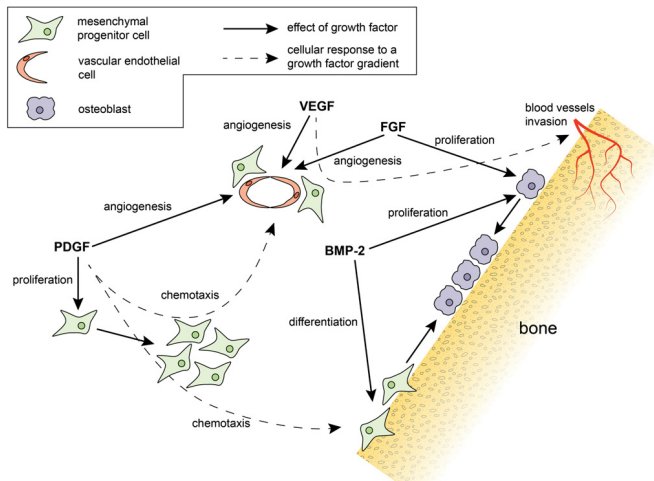
- *Factor de crecimiento epidérmico (EGF)* Es citoprotector y tiene efectos mitogénicos y quimiotácticos en fibroblastos y células epiteliales, induce la migración celular y estimula la formación de tejido de granulación. En la cicatrización de heridas acelera la reepitelización e incrementa la resistencia tensional.
- *Factor de crecimiento fibroblástico (FGF)* Su importancia está en la estimulación y coordinación de la mitogénesis de las células mesenquimales, como los fibroblastos, los osteoblastos, condrocitos, células musculares lisas y mioblastos esqueléticos. También inhibe los osteoclastos e induce la secreción de fibronectina por parte de los fibroblastos. Desarrollan una función proangiogénica por acción quimiotáctica sobre las células endoteliales.
- *Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)* Participa en la cicatrización promoviendo la angiogénesis: induce la quimiotaxis, proliferación y diferenciación de las células endoteliales, aunque sus efectos no se limitan exclusivamente a estas células, sino que también regula otras, como los fibroblastos. Además, provoca una hiperpermeabilidad de los vasos sanguíneos y es mitógeno, proapoptótico.
- *Factor de crecimiento transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)* TGF es una vasta superfamilia de más de 30 miembros que incluye también a los *factores morfogénicos óseos*. TGF- $\beta 1$ es la isoforma más frecuente, no sólo en los gránulos α de las plaquetas, sino durante todo el diálogo general intercelular. Los efectos *in vitro* dependen de la cantidad. Por ejemplo, en función de este parámetro puede favorecer o inhibir la proliferación de osteoblastos, con la consiguiente trascendencia en el proceso de reparación ósea. Es el agente más potente inductor de la cicatrización fibrosa, promoviendo la síntesis masiva de colágeno I y fibronectina por parte de osteoblastos y

fibroblastos. Además promueven la formación de inhibidores de proteasa, que frenan la lisis del colágeno I.

- *Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)* Actúan como quimiotácticos para macrófagos y fibroblastos y son reguladores esenciales de la migración, proliferación y supervivencia de los linajes de células mesenquimales involucrados en el desarrollo y remodelación ósea. Su papel como inhibidor o inductor depende de la distribución de sus receptores específicos. Promueve indirectamente la angiogénesis a través de los macrófagos y se comporta como activador de tales. Facilita, además y al igual que en el caso anterior, la formación de colágeno tipo I. Las isoformas más relevantes de las que se han descrito son AA, AB y BB.

En definitiva, PDGF, TGF- β e IGF, actúan conjuntamente en la quimiotaxis y mitogénesis de las células madre y osteoblastos, en la angiogénesis de nuevos capilares, en la formación de la matriz ósea y en la síntesis de colágeno. PDGF y TGF también participan en la mineralización ósea. (Davis y cols., 2014; Dohan y cols., 2006a; Rodríguez Flores y cols., 2012)

Se ha propuesto también el abordaje terapéutico, que aboga por la utilización de FC recombinantes, sin embargo se asocia a dosis suprafisiológicas para el paciente y a un alto coste económico. (Kobayashi y cols., 2016) Son diversos los métodos que se han probado con el fin de favorecer de manera efectiva la disponibilidad de este tipo de FC en su lugar de acción sin que pierdan efectividad, de modo que su concentración sea suficiente durante un período razonable como para permitir su acción. Cabe mencionar entre otros, los particulados, matrices, hidrogeles, sus compuestos así como la terapia génica. (Chen y cols., 2010) La mayoría de estos formatos aun se encuentran en fases experimentales. (Chen y cols., 2006) Para entender las distintas formulaciones primero es necesario explicar que los FC pueden aplicarse de forma aislada o conjunta.



Tal y como se ilustra en la imagen, cada factor de crecimiento cumple múltiples funciones en el proceso de angiogénesis y formación ósea. La combinación de varios factores de crecimiento en su administración con fines terapéuticos puede resultar en efectos sinérgicos o, por el contrario, inhibitorios y perjudiciales para la formación de tejido. (Bayer y cols., 2015)

En la compleja relación entre los FC y los principales tipos celulares también juega un papel protagonista el tiempo, pues no todos los FC liberados durante la cicatrización ósea *in vivo* suceden simultáneamente, sino que se corresponden con las distintas etapas de la regeneración.

Los distintos materiales diseñados para la administración de FC son matrices que buscan liberar dichos factores de forma mantenida y con una secuencia similar a la fisiológica. En su elaboración se tienen que tener en cuenta, no solo la cinética de liberación de FC, sino también factores como la velocidad de degradación, condiciones de procesado, dispersión de proteínas en la matriz, porosidad inicial y carga de proteínas. (Bayer y cols., 2015)

Dentro del grupo de los polímeros se incluyen poliésteres, ácido poliglicólico, ácido L-poliláctico o ácido poliláctico-co-glicólico, materiales adecuados por su biocompatibilidad, biodegradación controlada, capacidad de ser absorbidos, no toxicidad de los productos de degradación y la facilidad de administración. (Bayer y cols., 2015; Chen y cols., 2006) En ocasiones, propiedades tan importantes como la osteoconductividad y la integridad pueden verse comprometidas al emplear exclusivamente polímeros, por lo que se incorporan materiales naturalmente osteoconductores como el fosfato de calcio para crear matrices compuestas. A continuación se mencionan las distintas conformaciones estructurales que pueden adoptar estos polímeros:

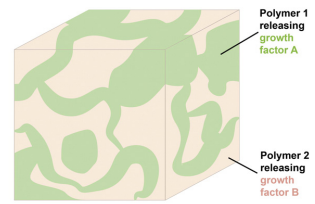
Matriz de polímeros cápsula:

- a) Matriz polimérica dual.
- b) Matriz enriquecida con microesferas.

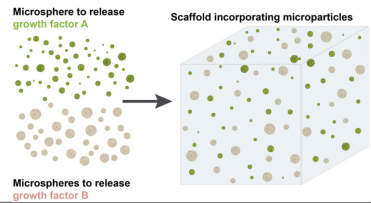
(Bayer y cols., 2015)

Polymer Encapsulating Scaffolding

a. Dual polymer scaffold

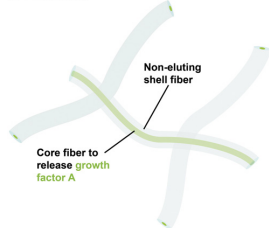


b. Microsphere Enhanced Scaffold

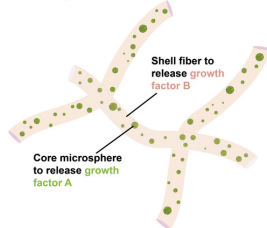


Core-shell Scaffolding

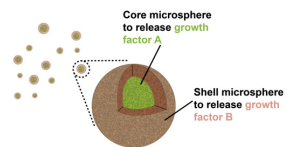
a. Fiber core



b. Microsphere core



c. Microsphere core-shell



Matriz carcasa-núcleo:

- a) Núcleo fibroso.
- b) Núcleo de microesferas.
- c) Microesferas.

(Bayer y cols., 2015)

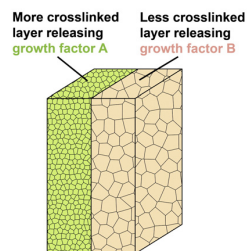
Matriz por capas:

- a) Capas yuxtapuestas.
- b) Capas cubrientes.

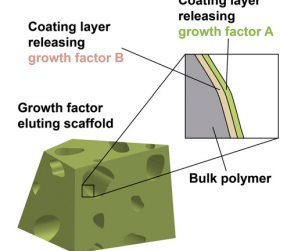
(Bayer y cols., 2015)

Layer-by-Layer Scaffolding

a. Juxtaposed layers



b. Coating layers



Existen opciones biológicas, que ofrecen la ventaja de no utilizar solventes orgánicos en la preparación y se limita la posibilidad de descenso de pH en el interior de la matriz durante la degradación. (Chen y cols., 2006) Entre ellas destacan:

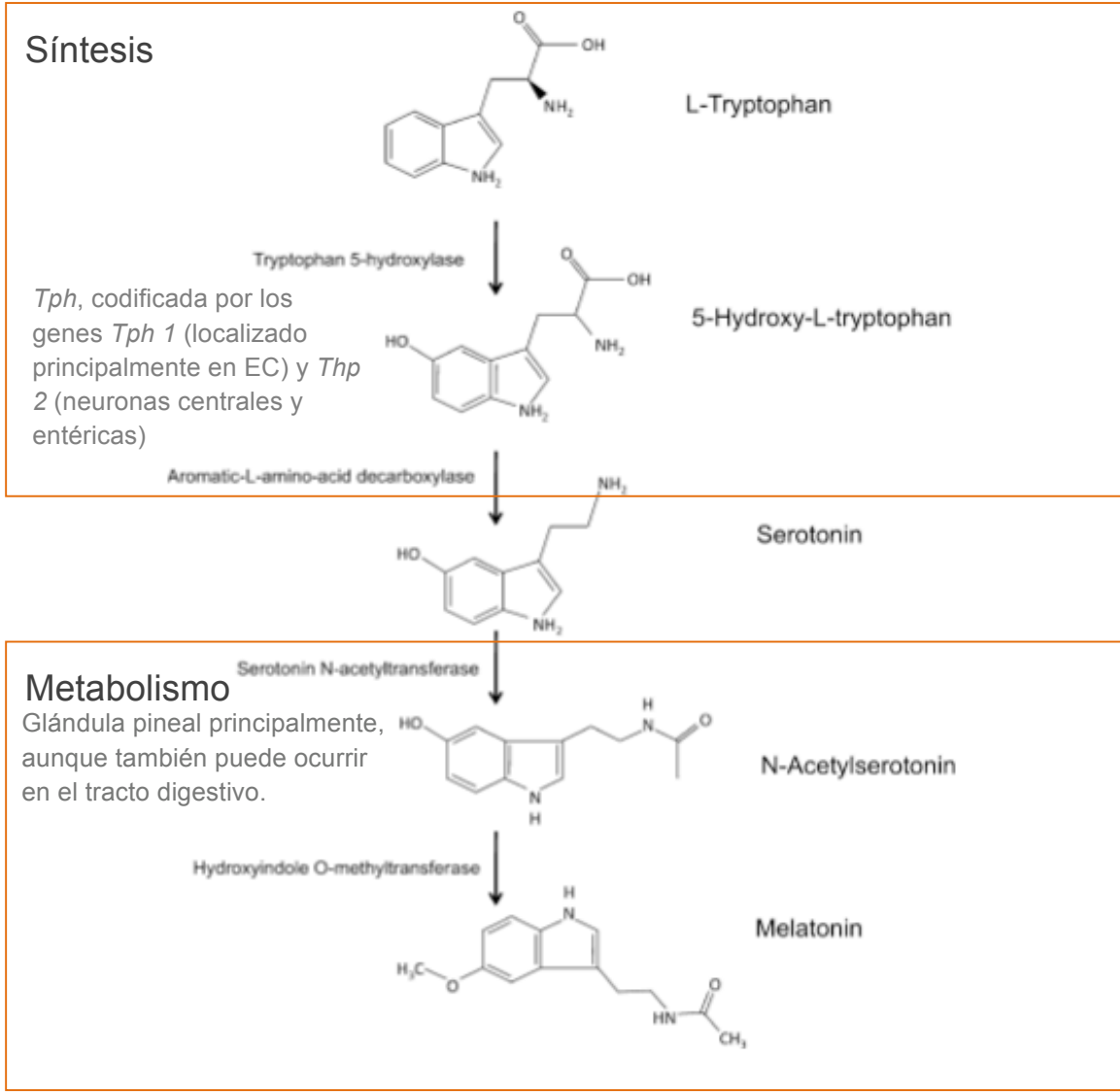
- Distribución por genes: insertando plásmidos mediante adenovirus, con técnicas de terapia génica. Este tratamiento podría combinarse con los métodos de distribución de FC ya descritos.
- Pequeñas moléculas: lo suficiente como para carecer de capacidad inmunogénica. En esta línea se ha investigado con simvastatina y rosuvastatina. El principal inconveniente es su inespecificidad. (Bayer y cols., 2015) Otro ejemplo son las microesferas de dextrano-co-gelatina para la liberación controlada de IGF-I. (Chen y cols., 2006)

Los CP constituyen otra opción biológica para la liberación de FC de origen autólogo en altas concentraciones. Pueden, además, mezclarse con otros biomateriales. (Chen y cols., 2010; Kobayashi y cols., 2016)

Así, la matriz de fibrina actuará a modo de carretera para la vehiculización de los FC y favorece su liberación progresiva durante el período de cinco a nueve días de vida plaquetaria. (Davis y cols., 2014) La eficacia de estos CP en las primeras fases de la cicatrización ha sido ampliamente demostrada. (Davis y cols., 2014; Badran y cols., 2017; Temmerman y cols., 2016)

4. La serotonina, un agente doble.

La serotonina o 5-hidroxitriptamina (5-HT) es un neurotransmisor monoamina. (Fidalgo y cols., 2013) Fue identificada por Rapport en 1948, como sustancia vasoconstrictora procedente de suero vacuno. El origen del término se debe a este hecho pero puede ser confuso, pues hoy se conoce que su presencia y funciones en el organismo son mucho más amplias. En los años 60 se comenzó a hacer distinción entre la serotonina central y periférica (Mercado y Kilic, 2010; Ducey y Karsenty, 2010)



Adaptado de Fidalgo y cols., 2013.

En la síntesis de la 5-HT el L-triptófano, procedente de la dieta, se convierte en 5 hidroxil-L-triptófano en un proceso mediado por la enzima 5-hidroxilasa (*Tph*), de la que existen dos isoformas y cada una es sintetizada por distintos tipos de células, tal y como se desarrolla en el esquema. La gran importancia de este hecho se explicará más adelante. La *Tph 1* se encuentra en las células enterocromafines (EC) del intestino, mientras que *Tph 2* se encuentra fundamentalmente en el cerebro. Por otro lado, la degradación de 5-HT se produce por acetilación, mediada por N-acetiltransferasa y resulta en N-acetilserotonina, que es un metabolito precursor de la melatonina. (Fidalgo y cols.,

2013) La gran diversidad de funciones de la 5-HT se atribuye a la capacidad de señalar hasta 14 receptores diferentes. (Ducy y Karsenty, 2010)

La recaptación de 5-HT se da mediante el *transportador de recaptación de serotonina* (SERT), Na^+/Cl^- dependiente. (Fidalgo y cols., 2013; Mercado Kilic, 2010) El mecanismo de regulación exacto del SERT por los gradientes transmembrana no es del todo conocido. (Mercado y Kilic, 2010) En el caso de las neuronas y células gliales, la expresión de receptores SERT en la membrana depende de la concentración extracelular de 5-HT. El aumento de la misma implica menos receptores, con la consiguiente limitación de su disponibilidad sináptica. (Mercado y Kilic, 2010)

El metabolismo sucede principalmente en la glándula pineal, aunque también puede darse en el tracto digestivo. Los SERT constituyen una diana terapéutica interesante como reguladores no específicos de la 5-HT en multitud de trastornos psiquiátricos: al bloquear estos receptores se incrementa la disponibilidad de serotonina extracelular. Con este fin se emplean los *inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina* (SSRIs).

4.1. Serotonina del sistema nervioso central (SNC)

Está asociada con la regulación de la temperatura, los ritmos circadianos, vómitos, agresividad. Así mismo, regula la ingesta de alimentos, el metabolismo energético y las respuestas al estrés en el cerebro modulando el sistema nervioso autónomo (SNA) y vías neuroendocrinas, como el eje hipotalámico-hipofisario-adrenal o el sistema insulina/IGF-1 y BDNF (*brain derived neurotrophic factor*, de la familia de las neurofinas asociadas al factor de crecimiento nervioso) La IL-1 y el TNF interaccionan con el sistema de la serotonina, entre otros sistemas neuroquímicos, para regular los ciclos de sueño y vigilia. (Fidalgo y cols., 2013)

Cada comportamiento está controlado por múltiples receptores de 5-HT. A su vez, cada receptor se expresa en varias regiones cerebrales y, probablemente, contribuya a modular distintos procesos comportamentales.

Esto explica por qué los fármacos dirigidos a un receptor 5-HT específico repercuten sobre muchos comportamientos. (Berger y cols., 2009)

La mayor parte de las neuronas serotoninérgicas se encuentran en los núcleos del rafe dorsal y medio del mesencéfalo caudal y sus axones se proyectan hacia otras zonas del cerebro: región frontal, tálamo, hipotálamo, región estriada, región cortical, médula, puente, cerebro medio, cerebelo y médula espinal. de modo que, virtualmente, toda célula del mismo se encuentra cercana a una fibra serotoninérgica. (Fidalgo y cols., 2013)

4. 2. Serotonina periférica

Implicada en la agregación plaquetaria, tono vascular, hipertensión, motilidad intestinal y regulación de la masa ósea. (Fidalgo y cols., 2013) Tiene efecto vasoconstrictor o vasodilatador en función de los receptores particulares expresados en el endotelio vascular y el músculo liso circundante. (Berger y cols., 2009)

Aproximadamente el 95% de la 5-HT del cuerpo se produce en las células enterocromafines (EC) del tracto digestivo. Cuando es liberada puede: a) ser captada por las plaquetas o b) ser recaptada y metabolizada por su transportador en el intestino moléculas SERT expresadas, en este caso, por los enterocitos del epitelio gastrointestinal y por las células entéricas.

El sistema nervioso entérico (SNE) inerva las dos capas de la *muscularis externa* y puede actuar independientemente del SNC en el control de funciones gastrointestinales como la motilidad y la secreción. La 5-HT presente en neuronas serotoninérgicas del SNE es sintetizada por las EC y es liberada en respuesta a estímulos mecánicos y químicos como el cambio de pH, cambios en la presión luminal o de péptidos y glucosa, entre otros.

La 5-HT tiene escasa penetración de la barrera hematoencefálica, aunque la implicación de la 5-HT en el equilibrio energético y de alimentación indica la posible relación entre ambos sistemas. La 5-HT periférica, tal vez afecte de manera indirecta al SNC. (Ducy y Karsenty, 2010)

4. 3. Serotonina y remodelación ósea

El papel de la 5-HT en la fisiología ósea fue documentado por primera vez en 2001 a raíz del descubrimiento de receptores de 5-HT, neurotransmisores y transportadores en osteoblastos y osteoclastos. (Wadhwa y cols., 2017) La clínica inicialmente silente de la osteoporosis enmascaró los efectos de la *Tph 1* sobre la remodelación ósea en los estudios previos con ratones. A partir de este descubrimiento, fue posible observar los efectos de la 5-HT central y periférica de manera independiente porque los genes que codifican para la *Tph*, enzima que interviene en su metabolismo, son específicos para cada una de ellas. (Ducy y Karsenty, 2010)

En ratones sin *Tph 2* se observa la ausencia de 5-HT detectable en el cerebro, mientras que los niveles séricos son normales. Sin embargo, estos ratones experimentan una severa pérdida de masa ósea. (Fidalgo y cols., 2013)



La *leptina* es una hormona derivada de los adipocitos que se une a los receptores (ObRb) de las neuronas serotoninérgicas del tronco cerebral e inhibe la síntesis de 5-HT central. Al igual que en caso anterior, los niveles reducidos de serotonina central se traducen en un tono simpático aumentado, que conduce a la reducción del número de osteoblastos e incrementa la resorción ósea, con la consiguiente pérdida de masa ósea. (Fidalgo y cols., 2013)

La 5-HT central actúa como neurotransmisor sobre los receptores Htr2c de las neuronas del núcleo ventromedial del hipotálamo y provocan la disminución del tono simpático. (Wadhwa y cols., 2017) La adrenalina sobre los receptores β -adrenérgicos de la membrana de los osteoblastos activa la síntesis de RANK-L, que estimula la función y diferenciación de los osteoclastos. Por otro lado, promueve un reloj molecular génico y la cascada de la ciclina D1 que limita la proliferación de los osteoblastos. Por tanto, la inhibición del tono simpático favorece la osteogénesis y disminuye la resorción. (Ducy y Karsenty, 2010)

Por otro lado, los ratones con *Tph 1* inactivo presentaban un incremento en la masa ósea. El efecto contrario se produce cuando aumentan los niveles de serotonina periférica, por ejemplo en pacientes tratados con fármacos SSRIs, que, aunque se emplean en trastornos neuropsiquiátricos, no son específicos para la serotonina central. Por lo tanto, se puede inferir que existe una relación inversamente proporcional entre los niveles de serotonina sérica y la densidad ósea. (Fidalgo y cols., 2013)

El mecanismo por el que la 5-HT periférica reduce la masa ósea es su acción como hormona, uniéndose a los receptores Htr1b de la membrana de los osteoblastos. Así se inhibe la fosforilación de la proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc (CREB) por medio de la fosfoquinasa A (PKA). Esto significa una limitación en la expresión de los genes de ciclina y por ende, la aminoración de la proliferación de osteoblastos y pérdida ósea. (Wadhwa y cols., 2017; Ducey y Karsenty, 2010)

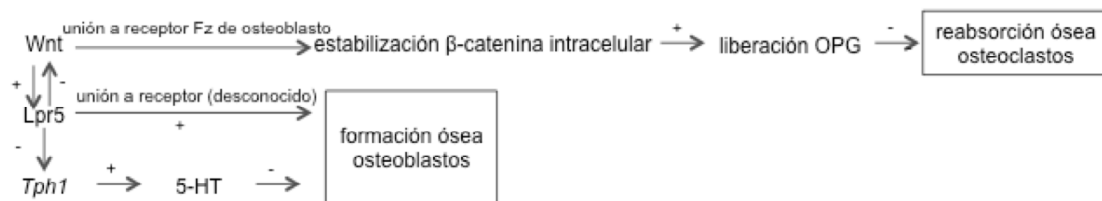
Cuando ambas enzimas, *Tph 1* y *Tph 2*, están ausentes en ratones, se observa menor masa ósea, osteogénesis y mayor resorción. Así, a pesar de que la proporción de serotonina sérica en el organismo es mayoritaria, es la 5-HT central la que predomina e influye más significativamente sobre el remodelado óseo.

La 5-HT central disminuye el tono simpático y favorece el aumento de la densidad ósea, mientras que la 5-HT periférica lo inhibe al reducir la proliferación de los osteoblastos. (Fidalgo y cols., 2013; Wadhwa y cols., 2013) El papel de la 5-HT central en relación al remodelado óseo es dominante. (Fidalgo y cols., 2013)

La influencia recíproca de los microRNAs (miRNAs) sobre la 5-HT y la expresión de sus receptores es un nuevo área de investigación. La actividad de osteoblastos y osteoclastos también está modulada por miRNAs, la vía del Wnt, p53 y algunos SSRI como la fluoxetina. (Fidalgo y cols., 2013; Wadhwa y cols., 2017)

La Wnt es una glicoproteína que inhibe la *Tph 1* de las EC al actuar negativamente sobre *Lrp5*. (Wadhwa y cols., 2017) *Lrp5* es un miembro atípico la familia de lipoproteínas receptoras de baja densidad, dentro del grupo de las

proteínas de la membrana. Fue precisamente la identificación por *serendipia* en dos estudios genéticos de Lpr5, como un importante regulador posnatal de la formación ósea en humanos, lo promovió la búsqueda del papel de la 5-HT en la fisiología ósea. Lpr5 por sí misma también estimula a los osteoblastos, aunque el mecanismo no es del todo conocido. Además, la unión de Wnt a determinados receptores en la membrana de estas células produce la estabilización de la β -catenina intracelular, que, junto con otros factores, activa la transcripción de osteoprotegerina (OPG). De este modo, la vía canónica de Wnt actúa sobre los osteoclastos e inhibe la reabsorción ósea, mientras que Lpr5 promueve la formación ósea de los osteoblastos. (Ducy y Karsenty, 2010)



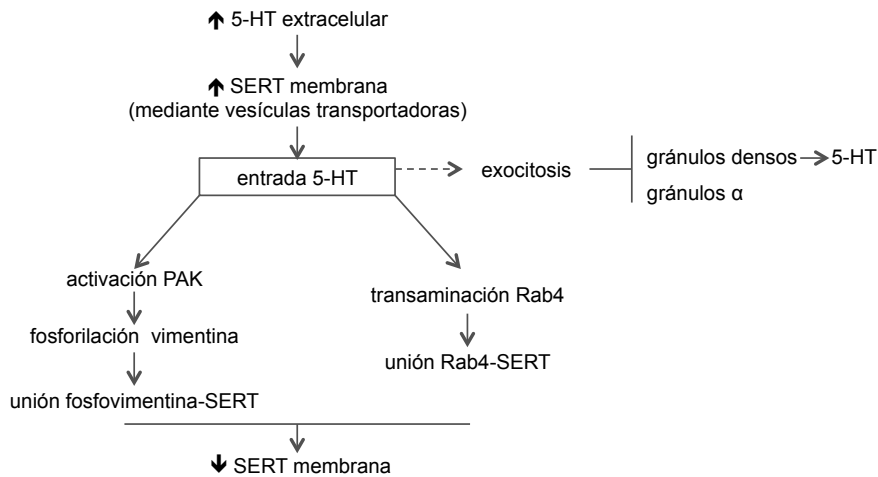
En el caso de los SSRI, existe controversia sobre su posible relación con una disminución en la masa ósea. Son muchos los posibles factores de confusión: la depresión como una causa de pérdida de masa ósea *per se*, el consumo de alcohol o tabaco, la edad, el género o la alimentación entre otros. Independientemente de estos, Ortuño y colaboradores señalan un posible mecanismo de activación de los canales Ca^{2+} dependientes de la calmodulina de los osteoclastos. Como consecuencia se activaría la cascada c-Fos-Nfact1 y disminuiría la resorción ósea en un período inicial. Sin embargo, también tiene un efecto en la recaptación de 5-HT central, lo que, a la larga, resultaría en la desensibilización de los receptores neuronales Htr2c y aumento del tono simpático, y, en consecuencia se produciría resorción y pérdida de densidad ósea. Por ello, un tratamiento corto determinaría la predominancia de un efecto protector sobre el hueso, mientras en períodos superiores a un año implicaría mayor riesgo de resorción. (Wadhwa y cols., 2017; Ortuño y cols., 2010)

4. 4. Serotonina y plaquetas

Las plaquetas contienen cerca del 95% de la 5-HT (periférica) presente en la circulación general. (Ducy y Karsenty, 2010) Las plaquetas constituyen los principales reguladores de la concentración de 5-HT en plasma. (Mercado y cols., 2010)

La 5-HT puede mediar cambios en la mecánica, fragilidad, proliferación migración y agregación de las plaquetas. (Fidalgo y cols., 2013) Las plaquetas tienen un número significativo de vesículas que almacenan 5-HT, pero no la sintetizan. (Berger y cols., 2009) Al igual que en las neuronas o las EC, la captación de 5-HT desde el plasma sanguíneo sucede a través de SERT. En interior de las plaquetas puede ser degradada por la monoaminooxidasa A (MOA) o transportada por VMAT y almacenada en gránulos densos (Fidalgo y cols., 2013; Mercado y cols., 2010)

El SERT es un sistema saturable. (Mercado y cols., 2010) En las plaquetas existe una relación bifásica entre el SERT y la serotonina. A bajas concentraciones extracelulares de 5-HT, la capacidad de captación de serotonina de las plaquetas es proporcional al número o expresión de las moléculas SERT en la membrana de las células. Sin embargo, cuando las concentraciones extracelulares son elevadas, la expresión de SERT disminuye, aunque las plaquetas continúan almacenando 5-HT a un ritmo ralentizado que se mantiene, presumiblemente, mientras la concentración extracelular de 5-HT sea elevada. (Mercado y cols., 2010; Fidalgo y cols., 2013) Mediante el mecanismo de retroalimentación, la concentración de 5-HT en el plasma sanguíneo se autorregula modulando la expresión de SERT en la membrana de las plaquetas. (Brenner y cols., 2007)



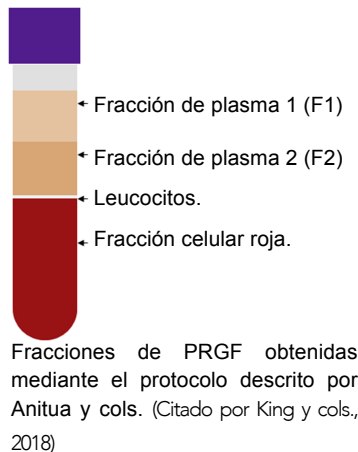
Al aumentar la concentración de 5-HT extracelular, también lo hace inicialmente la expresión de receptores SERT en la membrana plasmática de las plaquetas, que son transportadas desde el interior de la célula mediante vesículas transportadoras. Como consecuencia, aumenta la concentración intracelular de 5-HT. Cuando se satura la capacidad de las VMAT se activan dos vías de bloqueo de transporte de receptores SERT a la membrana plasmática (Rab4 y vimentina) y se reduce su expresión, de manera que se limita la entrada de 5-HT. El aumento de la concentración intracelular de 5-HT produce también la desgranulación y liberación de 5-HT al medio extracelular. (Mercado y cols., 2010)

Las plaquetas son la mayor fuente de 5-HT para las células del sistema inmune innato y adaptativo: células dendríticas, linfocitos B y T, células natural killer y mastocitos. Las citoquinas proinflamatorias también pueden interrumpir la síntesis de 5-HT al alterar el metabolismo del triptófano.

La 5-HT se ha demostrado como mediador proinflamatorio en el intestino. Sin embargo, los ratones *Tph 1* negativos no son inmunocomprometidos, lo que sugiere que la 5-HT no es esencial para las respuestas inmune innata o adaptativa, aunque sí que tiene un papel modulador en las infecciones víricas y en reacciones alérgicas. (Fidalgo y cols., 2013) Además, en el tejido localmente inflamado la liberación de 5-HT sensibiliza las fibras nerviosas periféricas que portan la información nociceptiva al SNC. También en el SNC la 5-HT tiene un papel modulador del dolor. (Berger y cols., 2009)

5. Plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) y plasma rico en fibrina (L-PRF)

5. 1. PRGF. Protocolo de Anitua y cols.



En líneas generales, se realiza una extracción de sangre del paciente, utilizando tubos con citrato sódico, con el fin de que no se coagule la sangre durante el proceso de centrifugación. El citrato sódico funciona como un interruptor: en dicho proceso de coagulación participa el ion calcio, pero el citrato sódico es un agente quelante capaz de atraparlo, de modo que impide que se desarrollen las cascadas enzimáticas correspondientes.

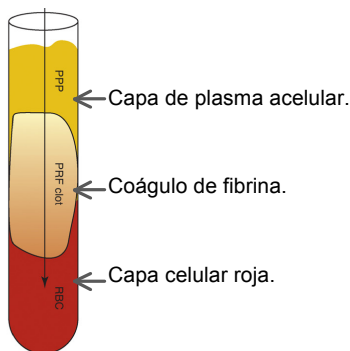
La muestra se somete a un proceso de centrifugado único del que se obtienen dos fracciones visibles: la fracción celular roja, en el fondo del tubo, donde se depositan los elementos de mayor peso molecular, como las células. Debe su color a la presencia de eritrocitos. Por encima se observa un líquido translúcido amarillento que constituye el plasma y es la fase donde se encuentran las plaquetas. Las plaquetas son, recordemos, fragmentos sin núcleo que provienen de una célula precursora, el megacariocito, y su tamaño relativo es menor al de otras células sanguíneas. El plasma a su vez está dividido en dos fracciones, una fracción 1 (F1) alejada de la serie roja y una fracción 2 (F2) cercana a la serie roja. La F1 es más pobre en plaquetas, su concentración es similar a la de la sangre periférica. La F2 contiene una proporción de plaquetas aproximadamente dos veces superior a la de la sangre. Las propiedades físicas de ambas porciones una vez activadas también son diferentes, de lo que se derivan distintos usos clínicos para cada una de ellas una vez activadas.

Entre la fracción F2 del plasma y la fracción roja existe una fina línea blanca denominada capa leucocitaria. Esta capa no se aspira en este protocolo, pues los autores de esta técnica postulan que se obtiene un producto más homogéneo con depleción leucocitaria. De este modo se omite la

respuesta de los neutrófilos, que expresan enzimas degradantes de la matriz, como las metaloproteinasas-8 (MMP-8) y MMP-9, y liberan especies de oxígeno reactivo que destruyen las células adyacentes, independientemente de que estén dañadas o sanas. (Anitua y cols., 2006)

El proceso de activación se realiza mediante cloruro cálcico una vez se ha realizado el fraccionamiento. El cloruro cálcico devuelve a la muestra los iones calcio necesarios para la coagulación que se bloquearon en el tubo citratado. Es un proceso dependiente de temperatura, por lo que el sistema incorpora una estufa. El recipiente para la activación se escogerá en función de la forma final deseada.

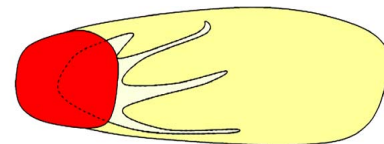
5. 2. L-PRF. Protocolo de Choukroun y cols.



Fracciones de PRF obtenidas mediante el protocolo descrito por Choukroun y cols. (Citado por Dohan Ehrenfest y cols., 2008)

Para este procedimiento la sangre se extrae en tubos sin agentes anticoagulantes o gelificantes. La activación plaquetaria y la formación del coágulo de fibrina sucede inmediatamente y después del centrifugado se obtienen dos fracciones claramente diferenciadas. A diferencia del PRGF en este protocolo la fracción plasmática (amarilla) no hay que activarla ya que se obtiene directamente un coágulo tras la centrifugación.

Los coágulos se conforman mediante presión con instrumentos específicamente diseñados para este efecto. En este caso se mantiene la capa leucocitaria. Los autores lo justifican por su efecto antiinfeccioso, por su papel en la regulación de la respuesta inmune y por su capacidad de producción de agentes proangiogénicos como el VEGF. (Dohan Ehrenfest y cols., 2008)



- Trombo rojo: corpúsculos rojos y plaquetas embebidas en una matriz de fibrina densa.
- Coágulo de fibrina.

Fracciones de PRF una vez separado del tubo de extracción (Dohan Ehrenfest y cols., 2006b)

6. Interés y justificación del estudio

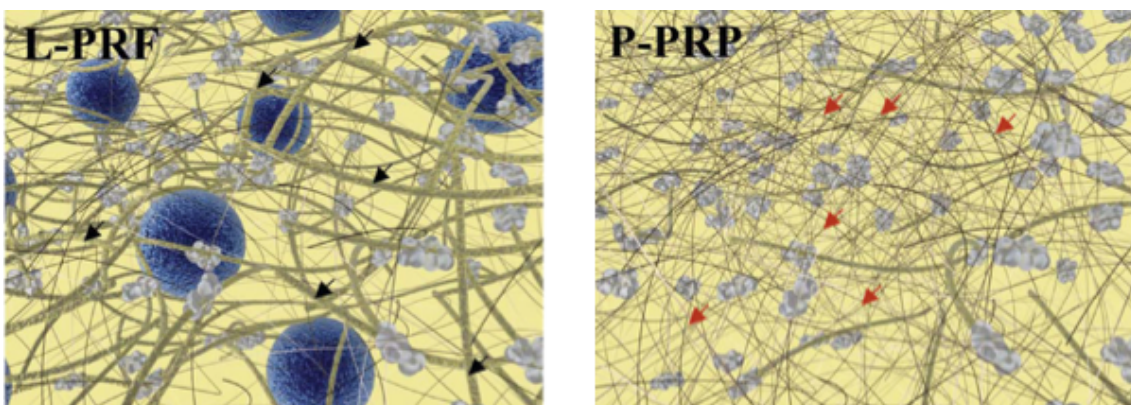
Los CP han demostrado tener un efecto beneficioso sobre la cicatrización en procedimientos clínicos que afectan a los tejidos blandos, como tendones o ligamentos. Su mecanismo de acción es, como se explicó anteriormente, la liberación de FC por parte de las plaquetas activadas. Estos GF están presentes en los gránulos α .

Todos ellos son esenciales en los mecanismos que se ponen en marcha en la regeneración ósea. Sin embargo, los estudios preclínicos y clínicos muestran resultados contradictorios e incluso negativos de éstos sobre el hueso. Ello podría deberse al potencial efecto inhibitorio de las moléculas presentes en los gránulos densos. La 5-HT es el producto más rápidamente liberado por las plaquetas activadas en cualquiera de los posibles métodos de activación.

In vitro se ha demostrado el efecto del ATP sobre la diferenciación y viabilidad de los osteoblastos. A bajas concentraciones influye positivamente sobre la mineralización, mientras que sucede lo contrario cuando son altas, inhibiendo los osteoblastos y estimulando los osteoclastos.

Aunque el mecanismo de acción del Ca^{2+} aun no está totalmente dilucidado, se cree que la regulación a nivel celular local es independiente de sus efectos sistémicos y produce apoptosis de los osteoclastos y disminución de su función.

Este último mecanismo frenaría el remodelado óseo, especialmente importante cuando se utilizan injertos.



Representación esquemática de la matriz y arquitectura celular del PRGF y del L-PRP. El contenido de leucocitos (azul) y la densidad de la matriz de fibrina (fibras amarillo-grisáceas) son los dos parámetros clave que definen cada tipo de CP. Los agregados plaquetarios (gris) siempre aparecen unidas a las fibras de fibrina. La forma de polimerización de la fibrina influye en el comportamiento y disolución del material. (Dohan Ehrenfest y cols., 2008)

Por otro lado, el método de obtención y activación de los CP podría modificar significativamente el patrón de liberación de los GF y ser de gran relevancia en el equilibrio que aquí se expone. (Badran y cols., 2017) De este modo se puede concluir que:

1) Aunque existe consenso en la literatura acerca de la liberación de FC, las concentraciones y el modo en que lo hacen a lo largo del tiempo no es tan claro.

2) Son escasos los estudios que comparen de forma objetiva ambos métodos, la mayor parte de las investigaciones son financiadas por las empresas que desarrollan cada uno de ellos.

3) En la búsqueda bibliográfica previa al presente trabajo no hemos encontrado artículos publicados en relación a la cinética de liberación de la 5-HT de los CP.

Objetivos

El objetivo principal es determinar la cinética de liberación de VEGF y 5-HT en el PRGF y el L-PRF respectivamente. Los objetivos específicos son:

- Estudiar si existen diferencias entre ambos grupos en el modo de liberación de VEGF.
- Comparar los patrones de liberación de 5-HT entre ambos CP.

Hipótesis

1. Hipótesis de trabajo

No existen diferencias en la cinética de liberación de VEGF y de serotonina entre PRGF y L-PRF.

2. Hipótesis alternativa (H_1)

Existen diferencias en la cinética de liberación de VEGF y serotonina entre PRGF y L-PRF.

3. Hipótesis nula (H_0)

En este estudio coincide con la hipótesis de trabajo: “no existen diferencias en la cinética de liberación de VEGF y de serotonina entre PRGF y L-PRF.”

Material y método

1. Población y muestra

Para la realización de este trabajo se reclutarán voluntarios sanos, alumnos del *Título Propio Máster de Cirugía Bucal e Implantología* de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid.

- Voluntarios sanos, sin restricción en función del sexo.
- Edad comprendida entre 18 y 25 años.
- Aceptación de los documentos de consentimiento informado (*Anexos*)

Se excluyeron aquellos participantes con:

- Patología sistémica o particularidades anatómicas que dificultasen o contraindicasen la técnica de venopunción.

La *muestra* consistió en cuatro voluntarios consecutivos que cumplían los requisitos descritos.

2. Diseño del estudio

Se realizó un estudio piloto *in vitro*. Las muestras de PRGF y L-PRF se incubaron en un medio de cultivo que se cambió a diferentes tiempos para cuantificar la cinética de liberación. Los tiempos elegidos para observar esta liberación fueron a los 30 y 90 minutos, 24, 48 horas, 6 y 10 días. En cada cambio de medio se retiraban 5mL del medio de incubación del coágulo, se sustituía por medio nuevo y se incubaba de nuevo hasta el siguiente cambio. El medio recogido en cada cambio, donde se encontrarían las proteínas liberadas en el intervalo de tiempo correspondiente, se almacenó congelado. Una vez recopiladas las muestras de cada tiempo, se caracterizaron mediante ELISA

para detectar 5-HT y VEGF. De este modo, las concentraciones corresponden a la liberación en cada intervalo de tiempo y no al total.

Secuencia de actuación

Tiempo	Procedimiento	Lugar	Recursos humanos
Previo	Búsqueda bibliográfica		LBG
	Extracción de sangre	Máster de Cirugía e Implantes. F. Odontología.	Dos operadores entrenados (HML, JTGD) Cuatro voluntarios
Simultáneo	Obtención PRGF / L-PRF	Máster de Cirugía e Implantes. Máster de Periodoncia. F. Odontología.	Dos operadores (JCF, LBG)
30', 90', 24h, 48h, 6d, 10d	Cambios medio	Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. F. Medicina.	LBG, EVA
4 d	ELISAs	Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. F. Medicina.	LBG, LR
	Análisis e interpretación resultados		LBG
	Redacción		LBG

2.1. Variables

- Tipo de concentrado plaquetario: PRGF o L-PRGF. Variable independiente cualitativa dicotómica.
- Tiempo: variable independiente cuantitativa discreta.
- VEGF: medido en pg/mL. Variable dependiente cuantitativa continua.
- 5-HT: medido en ng/mL. Variable dependiente cuantitativa continua.

2.2. Extracción de sangre

En primer lugar, se les explicó a los voluntarios en qué consistía el procedimiento y el estudio y se firmaron los consentimientos informados. Posteriormente, con el paciente sentado, se eligió el brazo de la extracción en función de la accesibilidad a las venas medianas basilíca o cefálica a su paso por la fosa cubital. Se realizó con el sistema Vacuette® (Greiner Bio-One; GmbH, Kremsmunster, Austria)

Se colocó el compresor (también conocido como “*smarch*”) y se desinfectó la zona cuidadosamente y sin frotar con digluconato de clorhexidina 10mg/mL (Cristalmina®. Laboratorios Salvat. Esplugues de Llobregat. Barcelona. España) . La colocación de la aguja se realizó en sentido de la vena, con una inclinación aproximada de 30°. De cada voluntario se obtuvieron:

- Dos tubos de 9mL cada uno, con citrato trisódico al 3.8% como anticoagulante para el protocolo de PRGF. Se caracterizan por el tapón de color azul. (Vacutainer®. BD. EEUU)
- Dos tubos de 9mL sin citratar seco siliconado para evitar la adhesión de hematíes a las paredes y favorecer la coagulación la preparación de L-PRF. Se distinguen por el tapón rojo. (Vacutainer® BD. EEUU)

Tras la extracción, los tubos se llevaron rápidamente a la centrifuga para la realización del protocolo de centrifugado y se instruyó a los pacientes para que realizasen compresión en la zona de extracción durante unos minutos.



Rotor de la centrifuga System V. La jeringa señala la posición cruzada y simétrica de los tubos necesario par su correcto funcionamiento. La jeringa de insulina de la imagen es la que se empleó para la dosificación del cloruro cálcico.

2.3. Procesado de la sangre. PRGF. (Anitua y cols., 2015b)

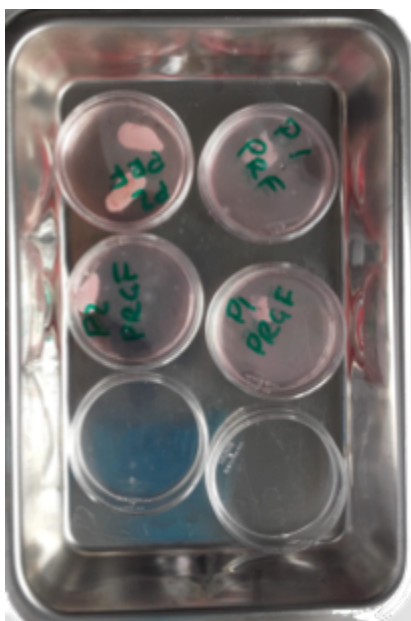
La sangre extraída se centrifugó a 1400rpm durante 8 minutos a temperatura ambiente (Centrífuga System V. BTI Biotechnology Institute S. L. Vitoria, España) Tal y como se desarrolló en la introducción, tras el proceso de centrifugación se observan

dos fracciones claramente diferenciadas, una fracción roja (constituida por eritrocitos principalmente) y una fracción amarilla (constituida por plasma y plaquetas). Para la obtención de PRGF se dividió la fracción amarilla en dos fracciones F1 y F2. La F2 se obtuvo de pipetear aproximadamente unos 2 mL por encima de una línea blanquecina junto a la fracción roja. La fracción 1 (F1), de volumen variable, se obtuvo pipeteando la fracción por encima de la F2. En primer lugar se pipetearon los 2mL de F2 en un tubo de fraccionamiento sin aditivos, con cuidado de respetar 0,5mL de margen de seguridad sobre la serie roja para evitar aspirar la capa leucocitaria. La F1 se descartó. La activación se realizó añadiendo cloruro cálcico (50 μ L por cada 1000 μ L de PRGF) (solución inyectable 10mg/mL. Braun. Alemania)

2.3. Procesado de la sangre. L-PRF. (Choukroun y cols., 2006)

La sangre se centrifugó a 3000 rpm (sobre 280g) durante 11 minutos (IntraSpinTM. Intra-Lock® Iberia S. L. Madrid. España) Después de la centrifugación en el tubo de extracción se observa una fracción amarilla ya coagulada y una fracción roja. Para su utilización, el coágulo amarillo de fibrina se separó de la fracción roja con un instrumento de corte.

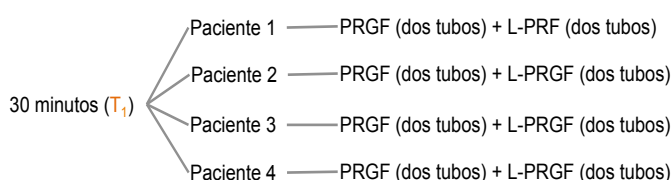
2.5. Cambios de medio



Los tiempos para el cambio de medio fueron 30 minutos, 90 minutos, 24 horas, 48 horas, 6 días y 10 días. En cada punto se renovaron 5mL de medio con medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 tamponado con ácido N-(2-hidroxietil) piperazina-N'-etanosulfónico (HEPES) y pH 7,4. El medio extraído se etiquetó y congeló a -80°C hasta el momento del análisis. Las muestras con medio renovado se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ entre cada cambio para permitir la liberación de factores de crecimiento.

Batea con placas de Petri para incubar las muestras.

Con este método se pretendía cuantificar la liberación de VEGF y 5-HT para cada momento.



Mismo esquema para los tiempos T_2 - T_4

Muestras etiquetadas y congeladas.

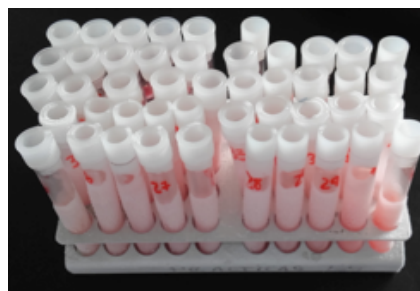


Diagrama de la preparación de muestras.

2.6. Análisis por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

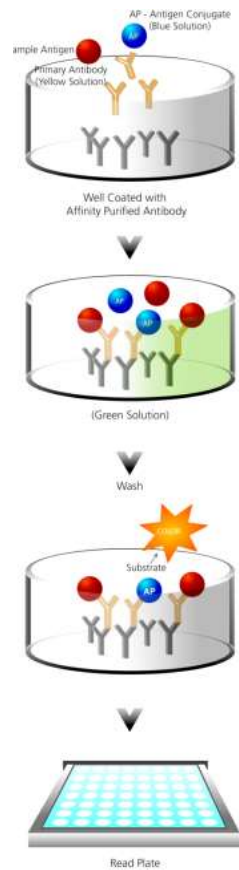
La prueba de ELISA es una técnica para la detección de moléculas añadiendo anticuerpos específicos para el antígeno problema marcados con una enzima capaz de producir un cambio de color o generar algún producto detectable. El mecanismo puede ser directo o indirecto.

Para la detección de VEGF se empleó un sistema directo (Human VEGF-A ELISA Kit. RayBiotech. Norcross. EEUU) que consta de 96 pocillos recubiertos con un anticuerpo específico para VEGF humano. El VEGF presente en la muestra se une al anticuerpo del pocillo. El excedente se lava y se añade un anticuerpo biotinilizado que se une al VEGF de la muestra que ya está fijo en el pocillo. Tras lavar de nuevo, se añade un marcador afín a la biotina. El excedente se lava de nuevo y por último se añade un sustrato que cambia de color por un proceso enzimático en proporción a la cantidad de marcador. Pasado un tiempo de incubación se para la reacción y el viraje de color se mide con un espectrofotómetro específico en términos de absorbancia. (Enzo, 2017)

Para la medición de 5-HT se eligió un sistema indirecto (Serotonin ELISA Kit. Enzo. Farmingdale. EEUU.) Al igual que en el caso anterior los pocillos están recubiertos con un anticuerpo primario (“Y” gris en la imagen) A los pocillos se añade la muestra (cuya 5-HT se representa como esferas rojas),

una solución de 5-HT conjugada con fosfatasa alcalina (esferas azules) y una solución de anticuerpo secundario para serotonina (“Y” amarilla). (Enzo, 2017)

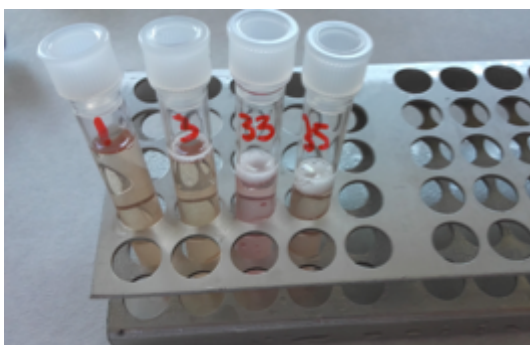
Durante la incubación, el anticuerpo secundario se une de manera competitiva a 5-HT conjugada y a la de la muestra. A su vez el anticuerpo secundario se une al anticuerpo del pocillo. De este modo, la serotonina conjugada “ocupa los huecos” que deja la 5-HT de la muestra. La placa se lava y se añade un sustrato que cambia de color cuando es catalizada por la fosfatasa alcalina. Al frenar la reacción enzimática, lo que se obtiene ahora es una relación inversa, pues el cambio de color es en realidad proporcional a la cantidad de fosfatasa que se unió a los anticuerpos del pocillo que quedaron libres tras lavar la muestra.



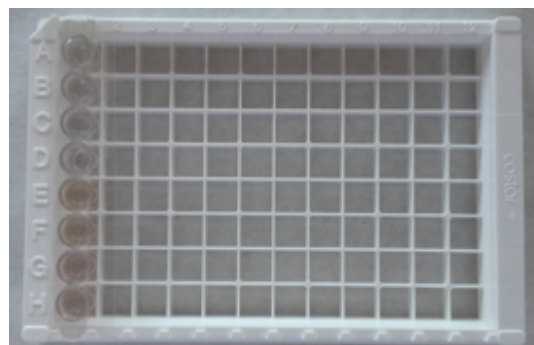
(Enzo, 2017)

Los resultados de absorbancia obtenidos de la lectura con el espectrofotómetro pueden interpretarse comparando los valores de la muestra con los de una curva estándar, obtenida a partir de diluciones de valor conocido a partir de un concentrado que incluye el kit. De esta curva se toman varios puntos que permiten calcular una regresión lineal con su fórmula correspondiente y, a partir de esta fórmula se pueden traducir los valores de la absorbancia a concentraciones. En este caso el procedimiento se realizó con el programa Microsoft® Excel® 2011 para Mac v.14.5.8.

Los rangos de detección de los kits empleados fueron y la sensibilidad 0,49-500ng/mL y 0,293ng/mL respectivamente en el kit para 5-HT y de 10-6000pg/mL y 10pg/mL en el de VEGF.



Muestras empleadas en la prueba previa.



Pocillos empleados en la prueba previa.

En el presente trabajo fue necesario realizar una prueba con algunas muestras (dos valores supuestamente extremos) previa a los ELISAs para determinar si los valores de la muestra se encontraban dentro del rango de detección y se ajustaban a la curva estándar. Así se determinó a necesidad de diluir a la mitad la muestras donde se presuponía mayor concentración de 5-HT.

Para VEGF se realizó duplicado técnico de las muestras, es decir, de cada alícuota se preparaban dos pocillos. En la prueba de 5-HT el duplicado se realizó con alícuotas de cada uno de los tubos, pues, recordemos, se extrajeron y prepararon dos tubos de cada concentrado plaquetario por paciente.

3. Análisis de datos

En este estudio no se realizó un cálculo del tamaño muestral por la escasez en la literatura de trabajos previos, por lo que el diseño corresponde a un estudio piloto que servirá como base, también en este aspecto, para futuras investigaciones. El análisis de datos se realizó con el programa SPSS v. 25 para Mac (IBM Corp., Armonk, NY, USA)

3.1. Serotonina

En primer lugar se realizó un test de bondad de ajuste a la distribución normal.

Concentrado plaquetario	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk			
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.	
Concentración de serotonina (ng/mL)	PRGF	,158	35	,027	,844	35	,000
	LPRF	,132	33	,155	,959	33	,235

a. Lilliefors Significance Correction

Las pruebas de normalidad funcionan contrastando los resultados de la muestra con una distribución normal teórica, de modo que la hipótesis nula (H_0) es que “no existen diferencias entre la distribución normal y la distribución que se está estudiando.” La H_0 , al igual que en cualquier contraste de hipótesis, se acepta cuando el resultado no es estadísticamente significativo. Por otro lado,

el test de Kolmogorov-Smirnov indica una distribución normal cuando el resultado se aproxima a 0 y el de Shapiro-Wilk cuando lo hace a 1. (Calatayud y Martín, 2003) La segunda prueba está más indicada en muestras pequeñas. De este modo, asumiendo un índice de confianza del 95%, tenemos que en el estudio:

	Kolmogorov-Smirnov		Shapiro-Wilk	
	Estadístico	Significación	Estadístico	Significación
PRGF	≈ 0	Sí	≈ 1	Sí
Normalidad	No		No	
LPRF	≈ 0	No	≈ 1	No
Normalidad	Sí		Sí	

Como una de las variables no se ajusta a la normalidad, se optó por aplicar el test de Kruskal-Wallis, que es la variante no paramétrica del test de ANOVA y se caracteriza porque permite conocer si existen diferencias estadísticamente significativas entre más de dos muestras, pero requiere de pruebas posteriores para saber específicamente entre qué grupos se encuentran dichas diferencias. Los test utilizados después fueron la U de Mann-Whitney, indicado en el estudio de dos muestras no paramétricas independientes, para comparar por pares cada punto de tiempo. Por ejemplo, PRGF T₁ (30 minutos) comparado con L-PRF en T₁; PRGF en T₂ (90 minutos), con L-PRF en T₂ y así sucesivamente. Esto se hizo aplicando la herramienta de filtro del programa SPSS.

3.2. VEGF

A diferencia de en el caso de 5-HT, entre los resultados para la concentración de VEGF, cuyos valores se especifican en la tabla adjunta en el apartado de *Resultados*, se obtuvieron varios valores negativos. Este hecho indica que las concentraciones se encontrarían por debajo del rango de detección de la prueba. Por ello, el análisis estadístico se vio limitado

exclusivamente a aquellos que fueron positivos, siguiendo el mismo procedimiento que en el análisis de 5-HT.

Tests of Normality

		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Concentración de VEGF (pg/mL)	PRGF	,253	4	.	,921	4	,544
	LPRF	,282	4	.	,879	4	,334

a. Lilliefors Significance Correction

Se aplicó el test de bondad de ajuste a la normalidad a los valores correspondientes a T₆, el único punto donde se podrían establecer comparaciones. Como la muestra es pequeña, se empleó la prueba Shapiro-Wilk con un nivel de confianza del 95%. Al resultar no estadísticamente significativa, se pudo asumir su distribución normal, y por ello se aplicó el test de la T de Student para muestras independientes.

Resultados

1. Serotonina

Serotonina (ng/mL)	30 minutos	90 minutos	24 horas	48 horas	6 días	10 días
LPRF	212,63±8,78	126,95±9,72	137,43±21,55	178,55±4,81	109,20±13,53	116,40±19,71
PRGF	189,98±4,59	138,35±15,08	145,97±16,95	156,02±8,35	104,68±5,23	203,43±40,87

Tabla de datos obtenidos a partir de la conversión de las absorbancias a concentraciones según se explica en el apartado “2.6. *Análisis por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)*” de *Material y método*. Como ya se ha mencionado, para momento y CP se emplearon varias alícuotas.

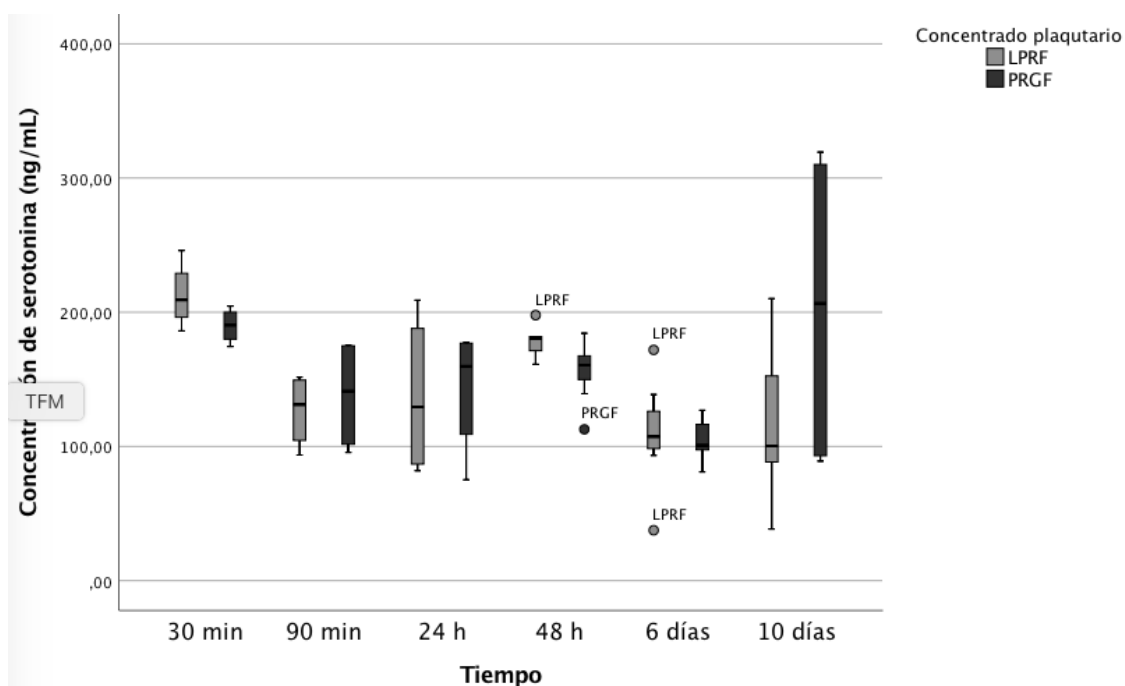


Diagrama de *caja y bigotes* descriptivo de la concentración de 5-HT en el medio para cada momento (no acumulado), agrupado por CP.

Si se asume un nivel de confianza del 95%, el resultado del test de Kruskal-Wallis se cumple que el valor de $p \leq 0,05$ y por tanto existen diferencias estadísticamente significativas entre al menos uno de los grupos que se están comparando.

Serotonina. Test U de Mann-Whitney	30 minutos	90 minutos	24 horas	48 horas	6 días	10 días
U de Mann-Whitney	2,000	6,000	8,000	6,000	26,000	20,000
Asymp. Sig. (2-tailed)	,083	,564	1,000	,061	,529	,208

Sin embargo, al realizar el test, ninguno de los valores de $p \leq 0,05$, aunque cabe destacar que el valor para 48h es muy próximo. En cualquier caso, no se puede rechazar la H_0 : "no existirán diferencias en la cinética de liberación de entre PRGF y L-PRF en el modo liberación de 5-HT."

2. VEGF

VEGF (pg/mL)	30 minutos	90 minutos	24 horas	48 horas	6 días	10 días
LPRF	1,27±16,95	-37,1±8,37	24,42±20,63	-0,37±14,25	-6,97±21,51	108,39±47,50
PRGF	-24,33±13,20	-21,09±18,24	-32,08±7,51	-25,41±15,61	-48,95±11,26	31,88±27,20

Tabla de datos relativos a las concentraciones.

Al igual que en las pruebas de bondad de ajuste a las normalidad, la de Levene para igualdad de varianzas asume la igualdad de varianzas cuando los resultados no son estadísticamente significativos, de nuevo con un nivel de confianza del 95%. De este modo no se puede rechazar la H_0 (es decir, se acepta) "no existen diferencias entre las varianzas," tal y como sucede aquí.

El test a dos colas resultó no significativo, por lo que no se puede asumir que existan diferencias estadísticas entre las concentraciones de VEGF de PRGF y PRF a los 10 días.

Discusión

1. VEGF

El éxito de la formación ósea y de la cicatrización de las fracturas se asocia a la osteogénesis, pero también a la angiogénesis. (Aryal y cols., 2014) Los vasos sanguíneos constituyen la matriz o plantilla estructural alrededor de la que tiene lugar el desarrollo óseo. (Grosso y cols., 2017) Este tejido está muy vascularizado y depende de la íntima relación entre dichos vasos y las células óseas para mantener su integridad. (Aryal y cols., 2014) Su salud depende del control vascular, que es clave en la homeostasis ósea. (Grosso y cols., 2014)

Por lo tanto, la angiogénesis es crucial en el desarrollo y reparación ósea y, por extensión, también lo es el factor de crecimiento que actúa como su más potente estímulo. Observado desde este prisma, el VEGF es parte del sistema que restaura el aporte de oxígeno a los tejidos cuando la circulación sanguínea es inadecuada. (Bissel y cols., 2015) En un enfoque más práctico, una de las principales dificultades en la regeneración ósea con sustitutos óseos es la dificultad de mantener la viabilidad de las células en el seno del injerto, que depende de forma crítica de la pronta invasión vascular desde el lecho receptor. Una perfusión sanguínea pobre resulta en la muerte celular por falta de oxígeno, nutrientes y acumulación de detritos. (Grosso y cols., 2017)

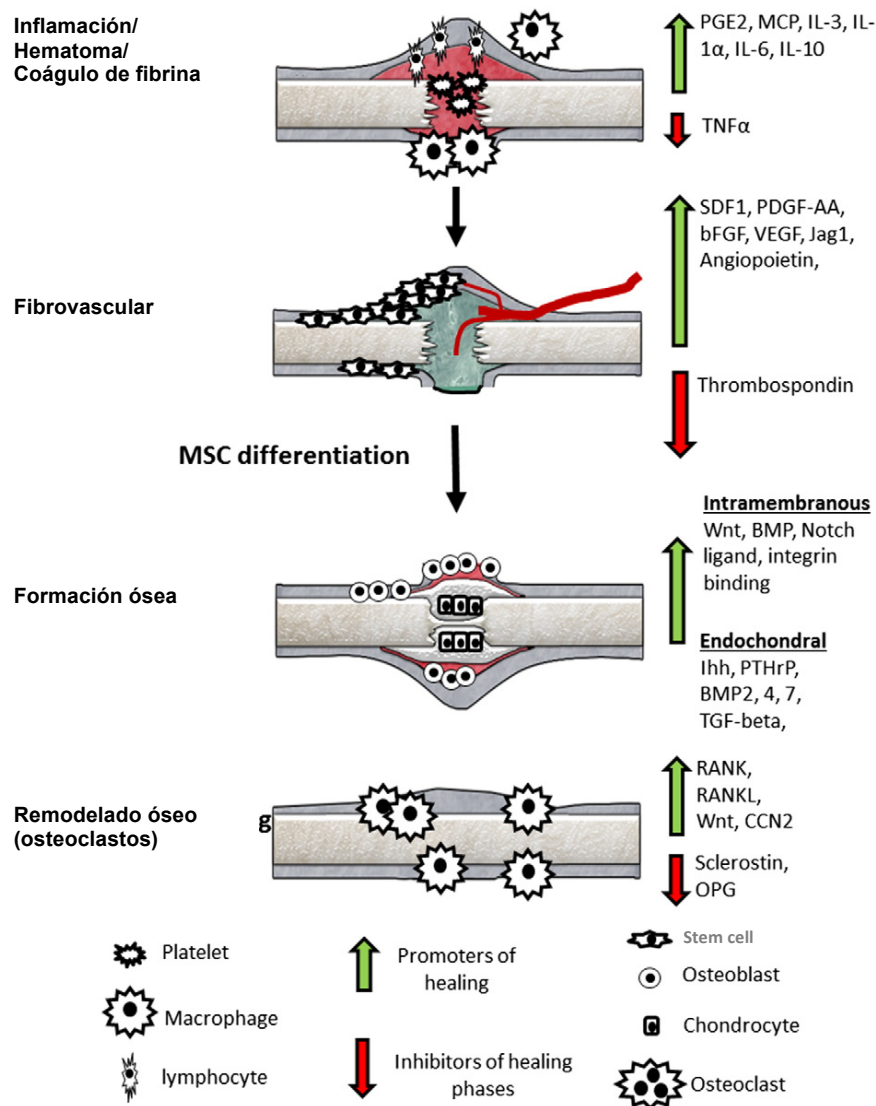
La familia del VEGF incluye al menos 6 miembros, clasificados desde VEGF-A a VEGF-E. Normalmente cuando no se especifica, el término “VEGF” se refiere a “VEGF-A”, que es el primero que se describió. Existen numerosas isoformas de VEGF-A. La expresión de VEGF se da en muchos tipos celulares de los propios vasos sanguíneos y circundantes a los mismos y, aunque la diana principal sean las células endoteliales, generalmente éstas no secretan VEGF en abundancia. Las células osteogénicas, incluyendo osteoprogenitoras, preosteoblastos y osteoblastos maduros sí son fuente considerable de VEGF. (Grosso y cols., 2017)

La señalización del VEGF se produce por la unión a los dominios extracelulares de dos receptores tirosina quinasa, VEGFR1 y VEGFR2, ambos reguladores positivos del desarrollo esquelético. Además de los efectos indirectos en la formación ósea por la estimulación de las células vasculares, el VEGF también puede influir directamente sobre la diferenciación y función de los osteoblastos que, como ya se ha mencionado, expresan receptores para este FC a pesar de no ser células endoteliales. (Hu y Olsen, 2017) Las células madre mesenquimales, las osteoprogenitoras y osteoclastos, también expresan receptores para VEGF y la presencia de esta molécula se traduce en un mayor reclutamiento, diferenciación y actividad de dichas células. A parte del mecanismo autocrino, VEGF también actúa de forma intracrina: la presencia de VEGF intracelular podría controlar la regulación transcripcional y la supervivencia celular de los osteoblastos, aunque el mecanismo exacto no se comprende totalmente. (Grosso y cols., 2017)

El conocimiento de cada una de las funciones del VEGF en las etapas de la cicatrización ósea se debe, en gran medida, a su estudio en ratones en los que se han suprimido los genes que codifican para la liberación de VEGF en sus diferentes isoformas o la expresión de los distintos receptores en las células. (Hu y Olsen, 2017) En los procesos de desarrollo y regeneración del hueso el VEGF cumple una doble función. Por un lado actúa sobre las células endoteliales, promoviendo su migración y proliferación y, por otro, estimula la osteogénesis por la regulación de otros FC osteogénicos. (Grosso y cols., 2017)

Cuando se produce un traumatismo en el hueso, bien accidental o bien como efecto de un acto quirúrgico, se producen en respuesta una serie de procesos que tienen como objeto la restitución del tejido dañado. Estas fases, que en la realidad suceden de manera continua y solapada, pueden dividirse con objeto de facilitar su comprensión en: inflamación no infecciosa, formación del callo blando, reposición por cartílago (reemplazo por callo óseo) y remodelación ósea. (Hu y Olsen, 2017) La fase posterior a la inflamación constituye, en realidad, una etapa de cicatrización fibrovascular que se caracteriza por la formación de vasos sanguíneos y el reclutamiento células madre y progenitoras mesenquimales hacia el callo provisional, que posteriormente se diferenciarán en osteoblastos y condrocitos. Esas células son las responsables de la

formación ósea tanto por la *vía endocondral* como por la *intramembranosa*. Ambas vías pueden converger en mecanismos duales. (Hankenson y cols., 2015) En el caso del desarrollo de los huesos craneofaciales, el mecanismo de osificación es intramembranoso. (Grosso y cols., 2017)



Mecanismos de señalización intercelulares durante el proceso de cicatrización ósea. (Hankenson y cols., 2015)

El precursor de la primera fase inflamatoria, común a ambos procesos, es la activación de los mecanismos de hemostasia del organismo de forma inmediata tras la lesión y la formación un coágulo. Como consecuencia de la ruptura de vasos sanguíneos se establece un hematoma en el hueso, donde se produce un reclutamiento de neutrófilos. Posteriormente confluyen macrófagos, cuya función es eliminar los neutrófilos muertos, promover respuestas

angiogénicas e iniciar la cascada de reparación. Con la formación de vasos sanguíneos se produce la migración de células osteocondroprogenitoras, capaces de diferenciarse en osteoblastos o condrocitos dependiendo de la estabilidad de los fragmentos óseos (puede tratarse de una fractura, pero también de un injerto) y de la disponibilidad de vasos sanguíneos. Finalmente el hueso inmaduro se remodela a hueso maduro. (Hu y Olsen, 2017)

Las funciones del VEGF en cada una de las fases de este proceso de cicatrización se explican a continuación.

- **Fase inflamatoria:** la expresión de VEGF por parte de las células óseas que rodean la lesión, así como las inflamatorias, está inducida en gran medida por la hipoxia que tiene lugar en el hematoma inicial. Como consecuencia de dicha expresión se produce la quimiotaxis de neutrófilos y se favorece la permeabilidad de las células endoteliales. Además, la formación de nuevos vasos permite la llegada de las células inflamatorias y osteoprogenitoras implicadas en el proceso.
- **Reposición por cartílago (osificación endocondral):** este tipo de reparación se remonta a los estadios del desarrollo homónimos, que son 1) formación de cartílago, 2) invasión vascular y de osteoclastos, 3) reabsorción del cartílago y 4) sustitución por hueso. Este proceso sucede durante la formación del callo óseo y es consecuencia de la reacción del periostio al daño. El VEGF promueve la invasión vascular y la llegada de condrocitos al cartílago hipertrófico. Además, estimula la diferenciación de las células progenitoras a osteoblastos. (Hu y Olsen, 2017; Grosso y cols., 2017)
- **Osificación intramembranosa:** a diferencia del caso anterior, las células progenitoras mesenquimales procedentes del endostio y la médula ósea se diferencian directamente en osteoblastos, sin existir un cartílago intermedio. Estas células producen el callo en el espacio intramedular. VEGF es también fundamental en esta modalidad de la osificación, pues las células llegan a través de los vasos sanguíneos neoformados al lugar de la lesión y también los nutrientes, oxígeno y minerales necesarios para la consolidación del hueso. Además, las

células de los vasos sanguíneos, incluyendo células musculares lisas, endoteliales y pericitos, liberan factores osteogénicos como el factor de necrosis tumoral β (TGF- β) y proteínas morfogénicas óseas 2 y 4 (BMP-2 y BMP-4), que estimulan la diferenciación de osteoblastos y la mineralización ósea. Las BMPs son una de las principales clases de moléculas reguladas por VEGF tanto en osteoblastos como en células endoteliales. Los osteoblastos en su proceso de maduración también generan, a su vez, factores angiogénicos, como PDGF-BB, entre los que también se incluye VEGF, que induce la angiogénesis mediante un mecanismo de retroalimentación positiva. No obstante, el VEGF también puede actuar como inhibidor de la diferenciación celular y competir con PDGF-BB en su unión a los receptores específicos de este último e impedir de esta forma la función de los pericitos, con la consiguiente formación de vasos sanguíneos inmaduros y la interrupción de la angiogénesis y osteogénesis. Además, puede producir resorción ósea por la llegada de un exceso de osteoclastos. (Grosso y cols., 2017)

Entendiendo la relevancia de la angiogénesis *per se* en el proceso de regeneración ósea, que se complementa con el mecanismo de actuación directo de VEGF sobre los distintos tipos celulares y la función moduladora que este FC tiene sobre otros FC, se comprende cuán imprescindible es VEGF en la osteogénesis. Por este motivo fue el FC seleccionado para el estudio de su cinética de liberación en PRGF y L-PRF.

Son numerosas las publicaciones que analizan este aspecto, aunque existe gran variabilidad en la literatura en el reportaje de los resultados. Muchos autores miden la liberación en un momento único, mientras que otros establecen varios puntos temporales, aunque la selección de dichos momentos es también heterogénea. Los datos pueden a su vez expresarse en términos de liberación acumulada, si para cada punto se suma a la liberación total previa, o bien simplemente como la concentración registrada en cada cambio de medio. En algunos estudios los resultados se expresan parcial o totalmente mediante gráficas, por lo que la interpretación en términos numéricos en las tablas que se adjuntan en este apartado es aproximada en dichos casos.

Estudio	Centro	Objetivo	Diseño	Muestra	Grupos	Pacientes	Nº tubos	Tiempo	FC	PRGF	L-PRF	Conclusiones
Dohan Ehrenfest y cols., 2006b	Niza, Paris (Francia), Göteborg (Suecia), California (EEUU)	Cuantificar mediadores celulares en exudado y coágulo PRF, PRP, suero, y cPRP.	<i>In vitro</i>	Varones no fumadores 20-28 años	PRF, PPP	15	NM	10'	PDGF-BB	-	1, 419 ng/mL (exudado) 6.634 ng/mL (exudado) 209,68 ng/mL (exudado)	Las citoquinas podrían liberarse y estimular reacciones de defensa.
Anitua y cols., 2013a	Vitoria (España)	Conocer el potencial regenerativo de PRGF en ligamento periodontal.	<i>In vitro</i>	Voluntarios sanos 18-27 años	Paciente 1, 2, 3	3	3	1h	VEGF TSP-1 HGF PDGF-AB IGF-1 TGFβ-1	168,33±189,36 pg/mL 32,33±3,51 ng/mL 983,33±156,31 pg/mL 26246±6280 pg/mL 91,67±14,98 pg/mL 48333,33±5186,60 pg/mL	PRGF estimula la proliferación, migración, adhesión y secreción de algunas biomoléculas principales de las células del ligamento periodontal.	
Passaretti y cols., 2014	Nápoles, Salerno, Turin (Italia)	Comparar el efecto de dos procedimientos distintos en la liberación de citoquinas y FC y en la capacidad de inducción del crecimiento en fibroblastos y células endoteliales.	<i>In vitro</i>	Voluntarios sanos no fumadores 24-40 años	L-PRF, mPRF, PRP	14	28	24h	GM-CSF IFN-γ MIP-1α MIP-1β RANTES TNF-α bFGF PDGF VEGF TGFβ-1	539,74±89 pg/mL 641,21±70 pg/mL 595,16±58 pg/mL 1837,97±190 pg/mL 85,54±7,90 pg/mL 7,66±0,6 5 pg/mL 2189,09±225 pg/mL 1376,3±129 pg/mL 265667,50±39851,60 pg/mL 13±8,5pg/mL	La liberación de PDGF y otros factores involucrados en la proliferación de fibroblastos fue mayor en PRP que en PRF (desgranulación). La de VEGF y factores proangiogénicos (posible relación con leucocitos) fue superior en PRF y facilita el crecimiento endotelial.	
Anitua y cols., 2015d	Vitoria (España)	Evaluar si la adición de leucocitos modifica las propiedades morfológicas, biomecánicas y biológicas de los CP en condiciones de normalidad e inflamatorias.	<i>In vitro</i>	Pacientes	PRGF, L-PRP	6	NM	72h	TNF-α IL-6 IL-8 Angiopoey1 VEGF PDGF-AB	≈ No detectable ≈ No detectable 129±139pg/mL ≈ 2500±400pg/mL 88±82pg/mL ≈ 6200±500pg/mL	La inclusión de leucocitos induce condiciones proinflamatorias significativamente mayores.	
Kobayashi y cols., 2015	Niigata (Japón)	Comparar angiogénesis de PRP y PRF y liberación de FC, PRF.	<i>In vitro</i>	Pacientes sanos no fumadores 28, 30, 54 años	PRP, PPP, PRF	3	5	-	PDGF-BB DLL1	- -	500 pg/mL 1200 pg/mL 15 ng/mL	PDGF y VEGF solo difunden en PRF. Potencial angiogénico similar. PRF más sencillo.
Anitua y cols., 2016	Vitoria (España)	Describir un nuevo protocolo de PRGF y compararlo con el actual mediante test de caracterización.	<i>In vitro</i>	Voluntarios sanos	PRGF 0,6m (A) L y 0,4mL (B)	3	NM	1h	TGFβ-1 IGF-1 VEGF PDGF-AB	A: ≈33; B: ≈44 ng/mL A: ≈110; B: ≈120 ng/mL A: ≈210; B: ≈280 pg/mL A: ≈10; B: ≈15 ng/mL	En PRGF-B menos activación plaquetaria y tiempo de coagulación y más concentración FC y recuperación plaquetas.	
Masaki y cols., 2016	Niigata (Japón)	Comparar la concentración de FC y citoquinas en A-PRF y CGF con PRP y PRGF	<i>In vitro</i>	Varones sanos no fumadores 37-68 años	A-PRF, CGF, PRP, PRGF	7	20	-	TGFβ-1 PDGF-BB VEGF IL-1β IL-16	0-430 ng/mL 0-2 ng/mL 0-40 ng/mL 0 pg/mL 0-9 pg/mL	A-PRF y CGF podrían funcionar como matriz y reservorio de FC y ser más angiogénicas que PRP.	
Arora y cols., 2017	Nueva Delhi (India)	Estandarizar PRP mediante la cuantificación de FC.	<i>In vitro</i>	Voluntarios sin medicación	PRF, PRP, sangre	16	16	Noche	PDGF-AB TGFβ-1 VEGF	- -	19,8±7,5 ng/mL 34,1±16,3 ng/mL 2,7±2,1 ng/mL	Más FC en PRP activado que PRF. Los FC de ambos, superiores sangre periférica.
Quihao y cols., 2017	Pekín (China)	Evaluar el contenido de FC de CGF y compararlo con PRP y PRF.	<i>In vitro</i>	Voluntarios sanos 41,3 años	CGF, PRP, PRF	20	NM	-	PDGF-BB TGFβ-1 IGF-1 VEGF bFGF	146,36±57,67±52,3 ng/mL 560,81±265,91 ng/mL 82,58±54,82 ng/mL 259,39±172,79 pg/mL 126,86±58,08 pg/mL	Hay concentración de FC en GFC. Más bFGF en CGF y PRF que PRP.	
Cabaro y cols., 2018	Nápoles (Italia)	Ganar perspectiva sobre la subpoblación de leucocitos de I-PRF y A-PRF e investigar citoquinas y FC liberados por los CP.	<i>In vitro</i>	Voluntarios sanos 26,4±1,6a años	L-PRF, A-PRF, PRGF	9	36	-	PDGF bFGF VEGF CCL5 IL-2 IL-4 IL-6 IL-8 IL-10 IL-17 Eotaxina IFN-γ MIP-1α MIP-1β TNF-α	27,34±10,58 pg/mL No detectable NM NM 322,83±48,71 pg/mL No detectable 1,16±0,26 pg/mL No detectable 1320,91±477,00 pg/mL No detectable 6562,96±931,91pg/mL No detectable 9,17±5,05 pg/mL 4,24±1,49 pg/mL 1,1±0,13 pg/mL No detectable 30,05±14,75 pg/mL 36,84±7,27 pg/mL 97,73±21,57 pg/mL 15,33±3,63 pg/mL	Distintos procedimientos y contenido en leucocitos afecta la liberación de citoquinas, quimiocinas y FC de los CP, que pueden ser útiles en distintos escenarios clínicos.	

Estudios que analizan la liberación en un momento único, ordenados por año de publicación. Se excluyen los valores para los CP distintos de PRGF y L-PRF. Se observan ligeras variaciones en algunos protocolos de L-PRF. NM: no menciona

Por las características estructurales propias de la matriz de fibrina que ya se adelantaron en el apartado de introducción, la liberación de FC será presumiblemente distinta entre los diferentes concentrados plaquetarios, lo que está en consonancia con los resultados de Dohan Ehrenfest y cols. (2012), en cuya comparativa incluyen PRGF y L-PRF. Anitua y cols., (2013b), Schär y cols. (2015), Kobayashi y cols. (2016), El Bagdadi y cols. (2017) y Dohan Ehrenfest y cols., (2018) también encuentran diferencias en la cinética entre uno de los dos CP y otros protocolos. En términos bioquímicos, se explica porque la matriz de fibrina contiene dominios de unión de heparán sulfato que pueden secuestrar y después liberar FCs, incluyendo PDGF, FGF, HGF y VEGF, además de existir lugares favorables para la adhesión celular que podrían condicionar su supervivencia. (Anitua y cols., 2015c)

De los estudios analizados, puede extraerse la liberación de FC de forma aislada por cada intervalo de tiempo en los trabajos de Dohan Ehrenfest y cols. (2012) y Gamal y cols. (2018) En el primero se observó que las cantidades de VEGF liberadas por L-PRF después de 6 días fueron más de 6 veces superiores al contenido inicial, lo que los autores atribuyen a la posibilidad de que los leucocitos continúen sintetizando FCs durante todo el período. Passaretti y cols. (2014) también observaron mayor liberación de VEGF y factores proangiogénicos en PRF frente a PRP, y explicaron las diferencias por la presencia de leucocitos. La presencia de estos FCs se correlacionó, además, con un mayor crecimiento endotelial. Esto contrasta con los resultados de Anitua y cols. (2013b) cuando comparan PRGF con L-PRP, protocolo que difiere de L-PRF en el uso de anticoagulante. En las conclusiones defienden que la inclusión de leucocitos no promueve la liberación de FC, pero sí de IL-1. Para Dohan Ehrenfest y cols. (2006) este componente inmune podría ser beneficioso como potencial estímulo de reacciones de defensa. Cabaro y cols. (2018) también señalan que los distintos procedimientos y el contenido de leucocitos afecta a la liberación de citoquinas, quimiocinas y FCs, y conocerlo permite al profesional elegir la mejor opción en función de las necesidades clínicas particulares. Dohan Ehrenfest y cols. (2012), destacan también que tras 20 minutos, la liberación de FC de L-PRF fue superior a la de PRGF de manera estadísticamente significativa y la diferencia se mantuvo a lo largo de los 7 días

del experimento. Además, al 5º día las membranas de PRGF se habían disuelto completamente. Si bien este hecho no se observó en nuestras muestras, los autores lo explican por la arquitectura de la matriz de fibrina. La liberación de VEGF por parte de L-PRF fue mayor en las primeras 24 horas y se mantuvo de manera lenta y continua durante todo el experimento. Por el contrario, las membranas de PRGF liberaron FCs, entre ellos el VEGF, principalmente en las primeras 4h, aunque también se mantuvo cierta actividad hasta la dilución completa de las membranas, pero de magnitud inferior a la de L-PRF.

En cuanto a las proteínas medidas en PRGF, en la publicación refieren gran amplitud de las desviaciones estándar y lo asocian a la variabilidad que el operador puede introducir en un protocolo que incluye varios procedimientos manuales y es susceptible de subjetividad en los pipeteados.

Gamal y cols. (2018) evalúan la presencia de FCs en fluido crevicular tras combinar PRGF y L-PRF con xenoinjertos en el tratamiento quirúrgico de defectos periodontales intraóseos. La concentración de PRGF que documentan a las 24 horas es $14435 \pm 159,9$ pg/mL, que destaca por ser la segunda mayor concentración de VEGF liberado por PRGF registrada en nuestra tabla. Sin embargo, debe tenerse en cuenta la amplia desviación estándar que representa el dato. Para este grupo, la liberación de VEGF en ambos CPs fue significativamente mayor durante el postoperatorio inmediato, considerando como tal la primera semana, que en los días restantes. No se observaron diferencias entre ambos CPs. En las conclusiones subrayan además, la ausencia de correlación con efectos clínicos en ambos grupos y no se observan concentraciones suprafisiológicas de FCs mantenidas en el defecto óseo. Postulan que el fenómeno puede deberse a las características particulares de un campo contaminado y continuamente colonizado por bacterias.

El estudio que mayor concentración de VEGF detecta para PRGF es el de Masuki y cols. (2016), con un valor de 40 ng/mL. En lo relativo a los valores de liberación mínima, el mismo estudio refiere 0, aunque debe leerse con cautela, pues es un resultado a un solo tiempo que, además, no especifican. Tal vez el tiempo del experimento fuese insuficiente para permitir la liberación.

En L-PRGF la mayor concentración mencionada fue 6602 ± 704 pg/mL como producto total acumulado tras 7 días de incubación del coágulo. (Dohan Ehrenfest y cols., 2018) En un período 10 días, los valores oscilan entre 80 y 240 pg/mL y 40 a 48 pg/mL para alguno de los intervalos. (Kobayashi y cols., 2016; Fujioka-Kobayashi y cols., 2017 respectivamente)

En los datos obtenidos en el presente trabajo sólo se lograron resultados detectables para L-PRF a los 30 minutos 24 horas y 10 días ($1,27 \pm 16,95$; $24,42 \pm 20,63$ y $108,39 \pm 47,50$ pg/mL), a pesar de haber utilizado un kit con un rango de detección suficientemente amplio que se seleccionó en base a la literatura. La tendencia creciente de estas cifras es contraria a la observada por Gamal y cols. (2018) a las 24 horas, 3 días y 7 días ($1243,5 \pm 24,8$; $866,8 \pm 8,7$; $772 \pm 14,8$; $306,5 \pm 3,1$). La liberación para Dohan y cols. (2012) fue más lineal, con valores de 881 ± 83 ; 857 ± 65 ; 865 ± 73 ; 821 ± 169 ; 1235 ± 254 ; 888 ± 199 ; 815 ± 153 pg a los 20 minutos, 1, 4 y 24 horas, 3, 5 y 7 días.

En cuanto a PRGF, se determinaron $31,88 \pm 27,20$ pg/mL a los 10 días, comparable con los 75 ± 30 pg que Dohan y cols. (2012) obtuvieron a los 7 días. Gamal y cols. (2018) recuperaron $807,6 \pm 73,3$ y $403,8 \pm 18,8$ pg/mL a los 10 y 14 días.

Entre las limitaciones del presente estudio en la detección de VEGF se encuentran el reducido tamaño muestral. También es susceptible la introducción de errores en el procesado de las muestras, especialmente sensible en la preparación de PRGF, pues, como ya se ha puntualizado, el proceso depende en gran medida del operador y de factores ambientales como la temperatura de la sala. Otro aspecto importante es la preservación de las muestras y la curva de aprendizaje de la propia prueba de ELISA. Pudiera existir también un sesgo de publicación en relación a los resultados no detectables, es decir, una tendencia de los editores y las revistas a rechazar aquellas investigaciones cuyos resultados son negativos o no demuestran diferencias significativas.

De cara a futuras investigaciones, resulta de gran interés, conocer la correlación entre los FCs liberados y la migración celular, estímulo de células madre mesenquimales o fibroblastos *in vitro*. Son necesarios, además, nuevos

estudios que analicen los cambios potenciales en los parámetros clínicos *in vivo*. La tendencia actual es a la creación de nuevos protocolos que mejoren la sencillez, eficiencia y la combinación con otras técnicas de regeneración ósea como los injertos.

2. Serotonina

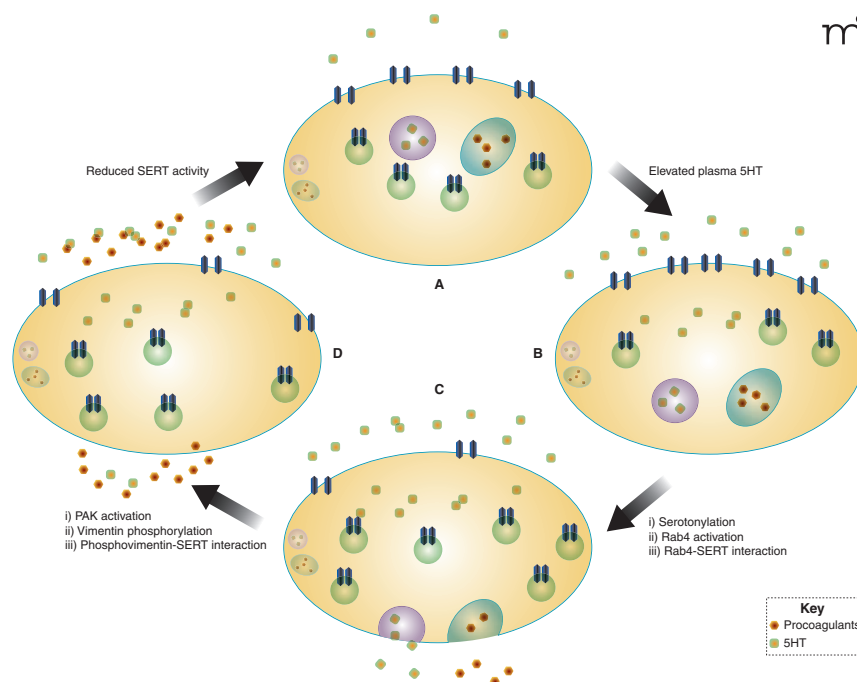
Aunque para la mayoría de autores el efecto beneficioso de los CPs en la cicatrización de los tejidos blandos es indiscutible, no lo es tanto en el caso del tejido óseo, donde los efectos documentados pueden llegar a ser nulos e, incluso, deletéreos para la regeneración ósea. Este fenómeno es aparentemente paradójico a la luz de los conocimientos actuales sobre los FCs y su comportamiento inductor sobre las células osteoprogenitoras y osteoblastos. La explicación puede encontrarse en la liberación de otros factores en el proceso de activación y desgranulación plaquetaria. Son pocos los estudios focalizados en el contenido de gránulos densos y su efecto en los tejidos. (Badran y cols., 2017)

Entre los compuestos contenidos en los gránulos densos se encuentra la serotonina, cuyo efecto local sobre el tejido óseo se expuso ampliamente en la introducción. Es por ello por lo que su estudio cobra magno interés. Los resultados presentados en este estudio piloto son pioneros, pues no se han encontrado publicaciones previas al respecto.

No se han obtenido diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en relación a la 5-HT liberada, aunque el valor de la concentración encontrado a las 48 horas es muy próximo a esta condición. El pico máximo para L-PRF corresponde a los 30 minutos, y el mínimo a los 6 días, mientras que en PRGF el máximo fue a los 10 días y el mínimo a los 6 días.

Los resultados no permiten trazar una gráfica clara de cinética de liberación. Lo esperado en base a bibliografía sobre FCs, era una liberación temprana de gran concentración en PRGF en contraposición a una liberación en menor cantidad pero más sostenida durante el periodo experimental para L-PRF. La justificación se halla en que la matriz de fibrina de PRGF es menos densa e

intrincada y tiende a disolverse antes. (Dohan Ehrenfest y cols., 2008; Dohan Ehrenfest y cols., 2018; Anitua y cols., 2015d) La discrepancia entre esta hipótesis y la realidad puede deberse a la presencia de variables confusoras. Por ejemplo, desconocemos el papel que los leucocitos pueden desempeñar en este ámbito. Por su parte, las plaquetas no tienen capacidad de síntesis de 5-HT por sí mismas pero sí cumplen una función de reguladoras a través de la expresión o no de receptores SERT en su membrana. (Berger y cols., 2009; Mercado y cols., 2010)



Una elevación de la 5-HT en el plasma sanguíneo implica un aumento de la recaptación de 5-HT mediado por la sobreexpresión de SERT en la membrana. Como consecuencia es la entrada de 5-HT en el citoplasma se activa una quinasa, que provoca la fosforilación de la vimentina y la formación de complejos vimentina-SERT. Por otro lado la transaminación de Rab4 resulta en complejos Rab4-SERT. Ambos complejos impiden el tráfico de SERT hacia la membrana porque no se puede unir a las vesículas transportadoras que participan en el proceso. Así, disminuye la expresión de SERT en la membrana. La entrada de 5-HT provoca también la exocitosis de los gránulos densos y α . (Mercado y cols., 2010)

El hecho de no hallar diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos puede estar determinado por la escasez del tamaño muestral y la falta de homogeneidad de la muestra. Otra de las limitaciones de este estudio es la ausencia de un control de sangre periférica sin centrifugar.

Son necesarios más estudios dirigidos a entender el mecanismo de liberación de 5-HT en los CPs y su interés, dada la multitud y gran diversidad de las funciones que esta proteína tiene en el organismo, tal vez se extienda a otros campos ajenos a la regeneración tisular y ósea. Además, al igual que en

el caso del VEGF, se vuelve imperiosa la necesidad de diseñar futuras investigaciones que determinen si estas diferencias, en el caso de que llegaran a observarse, se traducen en efectos biológicos en los procesos regenerativos óseos *in vitro* e *in vivo*.

Conclusiones

- No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en la cinética de liberación de VEGF y la serotonina en el PRGF y el L-PRF.
- No se encontraron resultados detectables para la mayoría de tiempos en VEGF.
- Se detectaron liberación de 5-HT en ambos CP pero no hubo diferencias los patrones de liberación de 5-HT entre ambos.
- Son necesarias nuevas investigaciones en esta línea con un tamaño muestral más amplio y mejoras en el diseño que permitan confirmar o descartar la hipótesis de este estudio piloto.
- Se abren nuevos campos de estudio en cuanto a las repercusiones de los CP *in vitro* e *in vivo* y su combinación con otras técnicas de regeneración tisular.

Agradecimientos

Al profesorado del Máster Oficial en Ciencias Odontológicas de la Universidad Complutense de Madrid. Su labor ha proporcionado las herramientas metodológicas y la mentalidad crítica y científica que han hecho posible este trabajo y, ojalá, otros muchos.

A la Dra. Herminia Moreno López, D. Francisco González Fernández-Tresguerres, D. Jorge Carballido Fernández y Dña. Alexandra Helm por su participación en la recogida de las muestras biológicas y obtención de los CP.

Al *Máster Propio de Cirugía Bucal e Implantología* de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid, por la cesión de sus instalaciones y del material necesario para preparar los CP. Al Dr. Ignacio Sanz Sánchez por el préstamo de la centrífuga para L-PRF.

En especial al Prof. Dr. Jesús Ángel Fernández-Tresguerres Hernández, Profa. Dra. Elena Vara Ameigeiras y Dra. Lisa Rancan, por su interés, asesoramiento en el análisis por inmunoensayo y su colaboración en términos de acogida en sus laboratorios y de material fungible.

A la Dra. Isabel Fernández-Tresguerres Hernández-Gil, por su apoyo y afecto, que siempre ha trascendido más allá del ámbito meramente académico e investigador.

A mi tutor, Prof. Dr. Jesús Torres García-Denche, por su cercanía, su gran esfuerzo, su incansable ilusión y por su gran pasión por el tema de este trabajo, que ha dirigido con indudable desvelo y paciencia.

A todos ellos, mi más cálido agradecimiento.

Anexos

1. Consentimiento informado para venopunción

Yo, _____

mayor de edad y con DNI nº _____

DECLARO

Que he sido debidamente INFORMADO/A por el Facultativo/a y, en consecuencia, AUTORIZO para que me sea realizado el procedimiento diagnóstico/terapéutico denominado VENOPUNCIÓN.

El procedimiento consiste en la recolección de sangre de una vena. Para ello el sitio se limpia previamente con un desinfectante (antiséptico) y se coloca una banda elástica alrededor de la parte superior del brazo con el fin de aplicar presión en la zona para que la vena se llene de sangre. Posteriormente, se introduce una aguja en la vena y se recoge la sangre en un frasco hermético o en un tubo adherido a la aguja. La banda elástica se retira del brazo, se saca la aguja y el sitio se cubre con un vendaje para detener el sangrado. La sensación dolorosa producirá una incomodidad leve, aunque de corta duración

Me doy por enterado/a de los siguientes riesgos asociados a dicho procedimiento:

Riesgos frecuentes:

- Hematoma, por lo que será conveniente que después se realice presión sobre la zona puncionada.
- Sangrado excesivo.
- Desmayo o sensación de mareo.

Riesgos infrecuentes:

- En algunos pacientes, por sus características individuales, resulta difícil extraer la muestra de sangre, por lo que tal vez sea preciso puncionarles repetidas veces hasta obtener la muestra de sangre.
- En muy raras ocasiones puede darse lesión nerviosa, que se manifiesta como dolor intenso, hormigueo o irradiación del dolor por el brazo.

Declaraciones y firmas

Paciente

D./Dña. _____ con DNI _____
declaro que el/la facultativo/a, LAURA BACA GONZÁLEZ me ha explicado de forma satisfactoria qué es, cómo se realiza y para qué sirve esta exploración/intervención. También me ha explicado los riesgos existentes y las posibles molestias o complicaciones.

He comprendido perfectamente todo lo anterior, he podido aclarar las dudas planteadas, y doy mi consentimiento para que me realicen dicha exploración/intervención. He recibido copia del presente documento. Sé que puedo retirar este consentimiento cuando lo desee.

En Madrid, a ___ de _____ de 20 _____

Firma de el/la paciente.

Facultativo

Dr/Dra. LAURA BACA GONZÁLEZ. He informado a este/a paciente del propósito y naturaleza del procedimiento descrito y de sus riesgos. Asimismo, se le preguntó sobre posibles alergias, la existencia de otras enfermedades o cualquier otra circunstancia patológica personal que pudiera condicionar la realización de la exploración/intervención. Se incorpora este documento a la historia clínica del paciente.

En Madrid, a ___ de _____ de 20 _____

Nº colegiado:

NEGATIVA DEL PACIENTE A LA REALIZACIÓN

REVOCACIÓN DE LA DECISIÓN POR EL PACIENTE

En Madrid, a ___ de _____ de 20 _____

Firma de el/la paciente.

Nº colegiado:

2. Consentimiento informado para participación en el estudio

Título del estudio:

“Concentrados plaquetarios y cinética de liberación de factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y serotonina. Eficacia de Protocolos Quirúrgicos y Regenerativos en Implantología.”

Investigador principal:

Laura Baca González.

Sede donde se realizará el estudio:

Facultad de Odontología. Universidad Complutense de Madrid.

Nombre del paciente:

Introducción

A usted se le está invitando a participar voluntariamente en este estudio de investigación científica. Antes de decidir si participa o no, debe conocer y comprender todas las características del mismo. Este proceso se conoce como consentimiento informado. Siéntase con absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto.

Una vez que haya comprendido el estudio y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento, de la cual se le entregará una copia firmada y fechada.

El estudio tiene como principal objetivo determinar la cinética de liberación de dos proteínas, VEGF y serotonina, entre dos concentrados plaquetarios

distintos en función de la técnica de preparación y características (*Plasma rico en factores de crecimiento* o PRGF, por sus siglas en inglés, y *plasma rico en fibrina* o L-PRF)

Los concentrados plaquetarios son fracciones que se obtienen a partir de una muestra centrifugada de la propia sangre del paciente. Se caracterizan por tener un alto contenido en plaquetas y factores de crecimiento que favorecen la cicatrización.

Para ello se extraerán cuatro tubos de sangre de 9mL cada uno y se someterán al tratamiento pertinente para la obtención de cada concentrado plaquetario para, posteriormente, centrifugarlos y preparar las muestras de PRGF y L-PRF. Dichas muestras se analizarán en laboratorio mediante pruebas de inmunoensayo para determinar la presencia de las proteínas anteriormente mencionadas.

El calendario de citas consistirá en una única visita de media hora de duración aproximada para la extracción de sangre.

Aclaraciones:

- Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria. En caso de no hacerlo se le ofrecerán las alternativas terapéuticas en función de su caso.
- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la invitación.
- Si decide participar en el estudio puede retirarse en el momento que lo desee, aun cuando el investigador responsable no se lo solicite, pudiendo informar o no, las razones de su decisión, la cual será respetada en su integridad.
- La participación en este estudio no supondrá ningún incremento sobre el precio final de su tratamiento rehabilitador.

- No recibirá pago por su participación ni beneficio directo por el hecho de participar en el estudio, ya que los resultados tendrán un interés científico. No obstante, en el caso que los datos pudieran proporcionarle un potencial beneficio con respecto a la enfermedad, le serán comunicados siempre que, con anterioridad, no hubiera manifestado por escrito el deseo de no recibir este tipo de información.
- Los riesgos son los inherentes a la extracción de sangre y se detallan por separado en el documento de consentimiento informado para este procedimiento.
- La principal incomodidad serían las derivadas de un procedimiento de extracción de sangre convencional.
- En el transcurso del estudio usted podrá solicitar información actualizada sobre el mismo al investigador responsable.
- La información obtenida en este estudio, utilizada para la identificación de cada paciente, será mantenida con estricta confidencialidad por el grupo de investigadores.

Propósito

Los concentrados plaquetarios facilitan la cicatrización de los tejidos después de una cirugía. Existen varias formas de preparación de estos concentrados. El objetivo de este estudio es determinar la cinética de liberación de proteínas entre dos modalidades de concentrados plaquetarios.

Selección de participantes

Se está invitando a participar en este estudio a todos los voluntarios sanos que cumplen los criterios de inclusión.

Procedimientos:

- Venopunción y extracción de sangre.

Consentimiento informado:

Yo, _____, con DNI_____ he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Convengo en participar en este estudio de investigación. Recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento.

Firma del participante

Fecha

Investigador responsable:

He explicado al Sr(a). _____ la naturaleza y los propósitos de la investigación; le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normativa correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apego a ella. Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

Firma del investigador/colaborador

Fecha

Bibliografía

Anitua, E., Prado, R., Troya, M., Zalduendo, M., De la Fuente, M., Pino, A., Muruzabal, F. y Orive, G. (2016): Implementation of a more physiological plasma rich in growth factor (PRGF) protocol: Anticoagulant removal and reduction in activator concentration. *Platelets*, 27(5), pp. 459-466.

Anitua, E., Prado, R., Orive, G. (2015a): Closing regulatory gaps: New ground rules for platelet-rich plasma. *Trends in Biotechnology*, 33(9), pp. 492-495.

Anitua, E., Zalduendo, M., Prado, R., Alkhraisat, M. H. y Orive, G. (2015b): Morphogen and proinflammatory cytokine release kinetics from PRGF-Endoret fibrin scaffolds: Evaluation of the effect of leukocyte inclusion. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 103(3), pp. 1011-1020.

Anitua, E., Elacho, B., Prado, R., Aguirre, J. J., Sánchez, M., Padilla, S., Aranguren, X. L., Abizanda, G., Collantes, M., Hernandez, M., Perez-Ruiz, A., Peñuelas, I., Orive, G. y Prosper, F. (2015c): Infiltration of plasma rich in growth factors enhances in vivo angiogenesis and improves reperfusion and tissue remodeling after severe hind limb ischemia. *Journal of Controlled Release*, 202, pp. 31-39.

Anitua, E., Zalduendo, M., Troya, M., Padilla, S. y Orive, G. (2015d): Leukocyte Inclusion within a platelet rich plasma-derived fibrin scaffold stimulates a more pro-inflammatory environment and alters fibrin properties, *PLoS ONE*, 10(3), pp. e0121713.

Anitua, E., Troya, M. y Orive, G. (2013a): An autologous platelet-rich plasma stimulates periodontal ligament regeneration. *Journal of Periodontology*, 84(11), pp. 1556-1566.

Anitua, E., Zalduendo, M., Hamdan, M. A. y Orive, G. (2013b) Release kinetics of platelet-derived and plasma-derived growth factors from autologous plasma rich in growth factors. *Annals of Anatomy*, 195(5), pp. 461-466.

Anitua, E. (1999): Plasma rich in growth factors: Preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 14(4), pp. 529-535.

Arora, S., Kotwal, U., Dogra, M. y Doda, V. (2017): Growth factor variation in two types of autologous platelet biomaterials: PPR versus PRF. *Indian Journal of Hematology & Blood Transfusion: An official journal of Indian Society of Hematology and Blood Transfusion*, 33(2), pp. 288-292.

Aryal, R., Chen, X., Fang, C. y Hu, Y. (2014): Bone Morphogenetic Protein-2 and Vascular Endothelial Growth Factor in bone tissue regeneration: New insight and perspectives. *Orthopaedic Surgery*, 6(3), pp. 171-178.

Badran, Z., Abdallah, M., Torres, J. y Tamimi, F. (2017): Platelet concentrates for bone regeneration: Current evidence and future challenges. *Platelets*, , 29(2):105-112.

Bayer, E. A., Gottardi, R., Fedorchak, M. V. y Little, S. R. (2015): The scope and sequence of growth factor delivery for vascularized bone tissue regeneration. *Journal of Controlled Release*, 219, pp. 129-140.

Berger, M., Gray, J. A. y Roth, B. L. (2009): The expanded biology of serotonin. *Annual Review of Medicine*, 60(1), pp. 355-366.

Brenner, B., Harney, J. T., Ahmed, B. A., Jeffus, B. C., Unal, R., Mehta, J. L. y Kilic, F. (2007): Plasma serotonin levels and the platelet serotonin transporter. *Journal of Neurochemistry*, 102(1), pp. 206-215.

Bissel, L., Tibrewal, S., Sahni, V. y Wasim, S. (2015): Growth factors and platelet rich plasma in anterior cruciate ligament reconstruction. *Current Stem Cell Research & Therapy*. 10, pp. 19-25.

Cabaro, S., D'Esposito, V., Gasparro, R., Borriello, F., Granata, F., Mosca, G., Passaretti, F., Sammartino, J. C., Beguinot, F., Sammartino, G., Formisano, P. y Riccitiello, F. (2018): White cell and platelet content affects the release of bioactive factors in different blood-derived scaffolds. *Platelets*, 29(5), pp. 463-467.

Calatayud Sierra, J., y Martín, G. (2003): *Bioestadística en la investigación odontológica : manual de bioestadística aplicada a la investigación en Odontología*. Madrid: Pues.

Chen, F. M., Zhang, J., Zhang, M., An, Y., Chen, F., Wu, Z. F. (2010): A review on endogenous regenerative technology in periodontal regenerative medicine. *Biomaterials*, 31(31), pp. 7892-7927.

Chen, F. M., Zhao, Y. M., Wu, H., Deng, Z. H., Wang, Q. T., Zhou, W., Liu, Q., Dong, G. Y., Li, K., Wu, Z. F., Jin, Y. (2006): Enhancement of periodontal tissue regeneration by locally controlled delivery of Insulin-like Growth Factor-I from dextran-co-gelatin microspheres. *Journal of Controlled Release*, 114(2), pp. 209-222.

Choukroun, J., Diss, A., Simonpieri, S., Girard, M., Schoeffler, C., Dohan, S. L., Dohan, D. M., Dohan, A. J. J. y Mouhyi, J. (2006): Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part V: Histologic evaluations of PRF effects on bone allograft maturation in sinus lift. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, 101(3), pp. 299-303.

Davis, V. L., Abukabda, A. B., Radio, N. M., Witt-Enderby, P. A., Clafshenkel, W. P., Cairone, J. V. y Rutkowski, J. L. (2014): Platelet-rich preparations to improve healing. Part I: Workable options for every size practice. *The Journal of Oral Implantology*, 40(4), pp. 500-510.

Dohan Ehrenfest, D. M., Pinto, N. R., Pereda, A., Jiménez, P., Corso, M. D., Kang, B., Nally, M., Lanata, N., Wang, H. y Quirynen, M. (2018): The impact of the centrifuge characteristics and centrifugation protocols on the cells, growth factors, and fibrin architecture of a leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) clot and membrane. *Platelets*, 29(2), pp. 171-184.

Dohan Ehrenfest, D. M., Bielecki T., Jimbo R., Barbé G., Del Corso M., Inchingolo F., Sammartino G. (2012): Do the fibrin architecture and leukocyte content influence the growth factor release of platelet concentrates? An evidence-based answer comparing a platelet-rich plasma (P-PRP) gel and a leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 13, pp. 1145-1152.

Dohan Ehrenfest, D. M., Rasmusson, L. y Albrektsson, T. (2008): Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends in Biotechnology*, 27(3), pp. 158-167.

Dohan Ehrenfest, D. M., Dohan, S. L., Dohan, A. J. J., Choukroun, J., Diss, A., Mouhyi, J. y Gogly, B. (2006a): Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part II:

Platelet-related biologic features. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, 101(3), pp. e45-50.

Dohan, D. M., Choukroun, J., Diss, A., Dohan, S. L., Dohan, A. J., Mouhyi, J., Gogly, B. (2006b) A second-generation platelet concentrate. Part III: leucocyte activation: a new feature for platelet concentrates? *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, 101(3), pp. e51-55.

Ducy, P. y Karsenty, G. (2010): The two faces of serotonin in bone biology. *Journal of Cell Biology*, 191(1), pp. 7-13.

El Bagdadi, K., Kubesch, A., Yu, X., Al-Maawi, S., Orlowska, A., Dias, A., Booms, P., Dohle, E., Sader, R., Kirkpatrick, C. J., Choukroun, J., Ghanaati, S. (2017): Reduction of relative centrifugal forces increases growth factor release within solid platelet-rich-fibrin (PRF)-based matrices: A proof of concept of LSCC (low speed centrifugation concept). *European Journal of Trauma and Emergency Surgery*. Disponible en: doi: 10.1007/s00068-017-0785-7.

Enzo (2017): Serotonin ELISA kit. Disponible en: http://www.enzolifesciences.com/fileadmin/files/manual/adi-900175_insert.pdf [consulta: 5-11-2017]

Eren, G., Gürkan, A., Atmaca, H., Dönmez, A. y Atilla, G. (2016): Effect of centrifugation time on growth factor and MMP release of an experimental platelet-rich fibrin-type product. *Platelets*, 27(5), pp. 427-432.

Fidalgo, S., Ivanov, D. K. y Wood, S. H. (2013): Serotonin: From top to bottom. *Biogerontology*, 14(1), pp. 21-45.

Fujioka-Kobayashi, M., Miron, R. J., Hernandez, M., Kandalam, U., Zhang, Y. y Choukroun, J. (2017): Optimized platelet-rich fibrin with the low-speed concept: Growth factor release, biocompatibility, and cellular response. *Journal of Periodontology*, 88(1), pp. 112-121.

Gamal, A. Y., Abdel Ghaffar, K. A. y Alghezwy, O. A. (2016): Crevicular fluid growth factors release profile following the use of platelet-rich fibrin and plasma rich growth factors in treating periodontal intrabony defects: A randomized clinical trial. *Journal of Periodontology*, 87(6), pp. 654-662.

Grosso, A., Burger, M. G., Lunger, A., Schaefer, D. J., Banfi, A. y Di Maggio, N. (2017): It takes two to tango: Coupling of angiogenesis and osteogenesis for bone regeneration. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 5, 68. Disponible en: doi: 10.3389/fbioe.2017.00068.

Hankenson, K. D., Gagne, K. y Shaughnessy, M. (2015). Extracellular signaling molecules to promote fracture healing and bone regeneration. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 94, pp. 3-12.

Hu, K. y Olsen, B. R. (2017): Vascular Endothelial Growth Factor control mechanisms in skeletal growth and repair. *Developmental Dynamics*, 246(4), pp. 227-234.

King, E. M., Cerajewska, T. L., Locke, M., Claydon, N. C. A., Davies, M. y West, N. X. (2018): The efficacy of plasma rich in growth factors for the treatment of alveolar osteitis: A randomized controlled trial. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 76(6), pp. 1150-1159.

Kobayashi, E., Flückiger, L., Fujioka-Kobayashi, M., Sawada, K., Sculean, A., Schaller, B. y Miron, R. (2016): Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF. *Clinical Oral Investigations*, 20(9), pp. 2353-2360.

Kobayashi, M., Kawase, T., Okuda, K., Wolff, L. y Yoshie, H. (2015): In vitro immunological and biological evaluations of the angiogenic potential of platelet-rich fibrin preparations: A standardized comparison with PRP preparations. *International Journal of Implant Dentistry*, 1(1), pp. 1-11.

Marx, R. E. (2001): Platelet-rich plasma (PRP): What is PRP and what is not PRP? *Implant Dentistry*, 10(4), pp. 225-228.

Masaki, H., Okudera, T., Watanebe, T., Suzuki, M., Nishiyama, K., Okudera, H., Nakata, K., Uematsu, K., Su, C. y Kawase, T. (2016): Growth factor and pro-inflammatory cytokine contents in platelet-rich plasma (PRP), plasma rich in growth factors (PRGF), advanced platelet-rich fibrin (A-PRF), and concentrated growth factors (CGF). *International Journal of Implant Dentistry*, 2(1), pp. 1-6.

Mercado, C. P. y Kilic, F. (2010): Molecular mechanisms of SERT in platelets: Regulation of plasma serotonin levels. *Molecular Interventions*, 10(4), pp. 231-241.

Ortuño, M. J., Robinson, S. T., Subramanyam, P., Paone, R., Huang, Y., Guo, X. E., Colecraft, H. M., Mann, J. J. y Ducy, P. (2016): Serotonin-reuptake inhibitors act centrally to cause bone loss in mice by counteracting a local anti-resorptive effect. *Nature Medicine*, 22(10), pp. 1170-1179.

Passaretti, F., Tia, M., D'Esposito, V., Pascale, M. D., Del Corso, M. D., Sepulveres, R., Liguoro, D., Valentino, R., Beguinot, F., Formisano, P. y Sammartino, G. (2014): Growth-promoting action and growth factor release by different platelet derivatives. *Platelets*, 25(4), pp. 252-256.

Qiao, J., An, N. y Ouyang, X. (2017): Quantification of growth factors in different platelet concentrates. *Platelets*, 28(8), pp. 774-778.

Rodríguez-Flores, J., Palomar-Gallego, M., Enguita-Valls, A., Rodríguez-Peralto, J. y Torres, J. (2011): Influence of platelet-rich plasma on the histologic characteristics of the autologous fat graft to the upper lip of rabbits. *Aesthetic Plastic Surgery*, 35(4), pp. 480-486.

Schär, M., Diaz-Romero, J., Kohl, S., Zumstein, M. y Nestic, D. (2015): Platelet-rich concentrates differentially release growth factors and induce cell migration *in vitro*. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 473(5), pp. 1635-1643.

Su, C. Y., Kuo, Y. P., Tseng, Y. H, Su, C. H, Burnouf, T. (2009): *In vitro* release of growth factors from platelet-rich fibrin (PRF): A proposal to optimize the clinical applications of PRF. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, 108(1), pp. 56-61.

Tayapongsak, P., O'brien, D. A., Monteiro, C. B. y Arceo-Diaz, L. Y. (1994): Autologous fibrin adhesive in mandibular reconstruction with particulate cancellous bone and marrow. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 52(2), pp. 161-165.

Temmerman, A., Vandessel, J., Castro, A., Jacobs, R., Teughels, W., Pinto, N. y Quirynen, M. (2016): The use of Leucocyte and Platelet-Rich Fibrin in socket management and ridge preservation: A split-mouth, randomized, controlled clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology*, 43(11), pp. 990-999.

Wadhwa, R., Kumar, M., Talegaonkar, S. y Vohora, D. (2017): Serotonin reuptake inhibitors and bone health: A review of clinical studies and plausible mechanisms. *Osteoporosis and Sarcopenia*. 3(2), pp. 75-81.

Whitman, D. H., Berry, R. L. y Green, D. M. (1997): Platelet gel: An autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *Journal of Oral Maxillofacial Surgery*. 55(11), pp. 1294-1299.