



COMPARACIÓN DE TRES PROTOCOLOS DE CENTRIFUGACIÓN  
PARA LA OBTENCIÓN DE FIBRINA RICA EN PLAQUETAS USADO EN  
REVASCULARIZACIÓN PULPAR UTILIZANDO LA CENTRIFUGA  
MERCKEL VWR CLINICAL 200.

Trabajo de Investigación  
Requisito para optar al  
Título de Cirujano Dentista

Alumnas: Carolina Bidart S.  
Cayetana Solari P.

Docente Guía: Prof. Dra. Alicia Caro  
Cátedra de Endodoncia

Valparaíso – Chile  
2014

## DEDICATORIA

Esta tesis se la dedico a mis padres, quienes me han apoyado incondicionalmente para poder llegar a esta instancia de mis estudios, por motivarme y darme la mano cuando sentía que el camino se terminaba, a ustedes por siempre mi corazón y mi agradecimiento.

Gracias a esas personas importantes en mi vida, que siempre estuvieron listas para brindarme toda su ayuda, abuelita mi paciente estrella te adoro, hermanas, amigos y amigas.

A mis compañeros por alegrar cada día en las clases y clínicas, por siempre darme ayuda cuando la necesite, fue increíble conocerlos, los quiero mucho a cada uno de ustedes y les deseo lo mejor en lo que sigue.

Carolina.

A mis padres, gracias por todo lo que me han dado, sin su ayuda y apoyo jamás habría podido terminar esta etapa; gracias por creer en mí. Especialmente a ti mamá, por tu apoyo incondicional, por tu preocupación y cariño, por enseñarme que siempre después de caer hay que pararse y por estar ahí cuando lo necesito.

A mi tía, gracias por tu infinito amor y preocupación, tanto que hacías que mis problemas o preocupaciones fueran casi tuyos. Te adoro. Patty y María, cómo no agradecerles a ustedes, me conocen desde que era un punto y me han acompañado durante este largo proceso de formación académica, no tengo palabras para agradecerles. Las tendré siempre en mi corazón.

A mis amigos de siempre y a todos los que conocí durante estos seis años, sin ustedes no habría sido posible. Simplemente gracias por estar ahí y por todos esos buenos e inolvidables momentos que quedaron guardados en mi corazón. A los que se titulan conmigo y a los que son casi colegas les deseo lo mejor en el camino que elijan, siempre contarán conmigo. Los quiero mucho.

Finalmente a ti, Oliver. Gracias por todo el apoyo, los consejos, abrazos, cariño, toda la paciencia y comprensión. Eres una de las personas más importantes que conocí dentro de este tiempo y estoy infinitamente feliz y agradecida de poder contar contigo como colega, amigo y pololo. Te quiero con todo mi corazón.

Cayetana.

## **AGRADECIMIENTOS**

Durante la realización de esta tesis surgieron muchas dudas y problemas que gracias a su ayuda, apoyo y buena disposición pudimos superar. Los recordaremos siempre con mucho cariño. Gracias a:

Dra. Alicia Caro.

Dra. Daniela Vergara.

Dr. Ricardo Moreno.

Dr. Jorge Torres.

Sr. Andonie Etcheverry.

## INDICE

INTRODUCCIÓN .....	1
MARCO TEÓRICO.....	3
I. COMPLEJO DENTINO- PULPAR .....	3
II. TRATAMIENTO ENDODONTICO.....	4
III. TIPOS DE TRATAMIENTOS ENDOTONTICOS PARA DIENTES INMADUROS.	5
IV. ENDODONCIA REGENERATIVA.....	11
V. BASES BIOLÓGICAS DE LA REGENERACIÓN:.....	15
VI. MECANISMO BIOLOGICO DEL PROCESO DE REGENERACION DENTARIA	33
VII. PROTOCOLOS CLINICOS PARA LA REVASCULARIZACIÓN CON PRF .....	34
VIII. ESTUDIO DEL COÁGULO DE FIBRINA .....	36
IX. COMPOSICIÓN DEL COAGULO DE FIBRINA CON MEJORES PROPIEDADES BIOLÓGICAS .....	43
X. CENTRIFUGAS .....	44
HIPOTESIS .....	48
OBJETIVO GENERAL .....	48
OBJETIVOS ESPECIFICOS .....	48
MATERIAL Y MÉTODO .....	49
DISCUSIÓN .....	66
SUGERENCIAS .....	75
RESUMEN .....	76
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

## INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas ha habido un gran avance en la medicina moderna relacionado a la regeneración tisular, en los inicios de los años 90 se originó la ingeniería tisular, la que ha generado nuevas alternativas de tratamiento para la recuperación de los tejidos alterados. La ingeniería tisular se basa en la producción de células diferenciadas a partir de la relación de células, factores de crecimiento y una matriz de sostén o andamiaje para alcanzar una regeneración funcional (Bansal y Bansal, 2011). Este concepto se ha utilizado también en la odontología en diferentes especialidades, como por ejemplo, Periodoncia, Implantología, Cirugía Maxilofacial, Endodoncia, etc.

Particularmente en la Endodoncia, se busca la regeneración del tejido pulpar en dientes inmaduros que han perdido la vitalidad ya sea por un trauma o caries. Hay varios métodos para lograr el cierre apical de dientes permanentes inmaduros (como por ejemplo la apexogénesis y apexificación) pero ninguno de éstos logra generar un crecimiento radicular en largo y grosor, lo que genera en muchos casos una mayor probabilidad de fractura dentaria, es por esta razón que en 1960 que Nygaard-Östby mostró que tejido vascular dentro del conducto radicular puede ser inducido usando un andamiaje, factores de crecimiento y células madres. En el año 2001 Iwaya et al describe un proceso al cual le llamó *revascularización*. La importancia de la revascularización dentaria es lograr la formación de dentina radicular de manera tridimensional, una constricción apical y tejido pulpar sano a través de las células madres provenientes del tejido periapical o de los Restos epiteliales de Malassez.

La información presente hasta el momento fundamenta biológicamente la revascularización pulpar, sin embargo no existen estudios a largo plazo que tengan evidencia de peso en cuanto a los beneficios y efectos adversos de la terapia regenerativa, esto puede deberse al poco tiempo que se lleva implementando y el difícil seguimiento posterior de los pacientes tratados; también se requieren estudios histológicos acabados que determinen la naturaleza del tejido regenerado que permitan hacer de esta terapia una opción válida y predecible.

Debido a la evidencia de que la revascularización pulpar se produce, es un método simple de realizar y que posee grandes ventajas en comparación con los tratamientos alternativos creemos que es importante aportar conocimiento a esta línea investigativa.

## MARCO TEÓRICO

### I. COMPLEJO DENTINO- PULPAR

Los tejidos que componen la estructura dental son el esmalte, complejo dentino-pulpar y cemento. Las fases de formación del diente se han dividido didácticamente en fase de brote, fase de caperuza y fase de campana.

La dentina es formada por células, los odontoblastos que se diferencian a partir de células ectomesenquimáticas desde de la papila dental. Su formación comienza en el estadio de campana durante el desarrollo dental, la dentina radicular se forma en un estadio ligeramente posterior después que una vaina de células epiteliales (Vaina epitelial radicular o de Hertwig) haya proliferado. La formación radicular no finaliza en los dientes permanentes hasta dos a tres años después de su erupción.

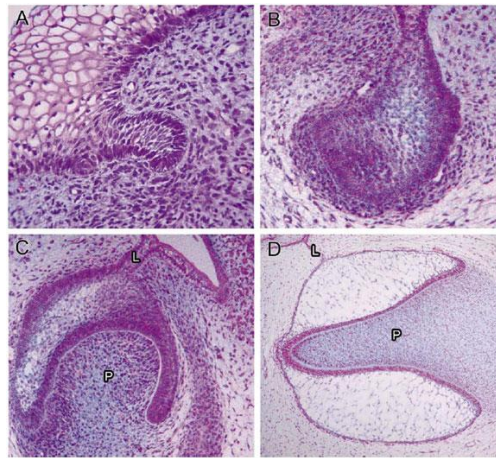


Fig. N°1, etapas de la formación dentaria. A. Fase de brote, B. Fase de caperuza, C. y D. fase campana. *Face and Neck Development in Vertebrates. Manuel Meruan, Carolina Smok, Mariana Rojas. 2012.*

La pulpa dental es el tejido conectivo blando que mantiene a la dentina, contiene células diferenciadas como los odontoblastos y células mesenquimáticas indiferenciadas además de células del sistema inmune. Es un tejido altamente vascularizado e innervado. Embriológica, Histológica y funcionalmente es el mismo tejido que la dentina, es por esto que hablamos de complejo dentinopulpar.

Por último, el esmalte es un tejido ectodérmico formado por el órgano dental que deriva de una proliferación localizada del epitelio oral. Es formado por los ameloblastos que se diferencian dentro del epitelio dental interno.

## II. TRATAMIENTO ENDODONTICO

La endodoncia es un tratamiento que consiste en la extirpación de toda la pulpa dental dañada, la desinfección del conducto radicular y su relleno con un material artificial. (G. Huang, 2009). Es una técnica profesional-sensible, en la cual se pueden cometer una serie de errores, como por ejemplo, bloqueos del conducto, ruptura de instrumentos y perforaciones.

Por otro lado, los dientes con tratamiento de endodoncia convencional no tienen sensaciones como el dolor, permitiendo entonces el progreso de caries sin que el paciente lo note. A pesar de todas las dificultades que presenta esta técnica, hoy en día con el desarrollo de la tecnología se ha llegado a un porcentaje superior al 90% de éxito.



Fig N° 2, Se observan los pasos de un tratamiento de endodoncia en un molar inferior. *El tratamiento de Conducto.* Alberto Meriñán, 2011.

Sin embargo, este tratamiento no está indicado en todos los casos, por ejemplo, no es posible realizar una correcta obturación de los conductos radiculares sin que el ápice de la raíces este completamente cerrado, o sea, el diente debe haber completado su maduración.

Por esta razón se han buscado distintas técnicas que permitan que dientes inmaduros que sufren caries o traumas y que requieran un tratamiento endodóntico, logren cerrar su ápice, para permitir posteriormente la obturación.

### **III. TIPOS DE TRATAMIENTOS ENDOTONTICOS PARA DIENTES INMADUROS**

La preparación convencional de los conductos radiculares en los dientes inmaduros con necrosis pulpar y posibles patologías apicales presenta un desafío al clínico tratante, han existido muchos cambios en los procedimientos como por ejemplo, la instrumentación, la medicación utilizada, los irrigantes y los materiales utilizados para la apicoformación.

En el caso de dientes inmaduros, el amplio diámetro apical hace imposible generar un tope necesario para el material de obturación. En 1966 Alfred L Frank publicó un artículo en el cual describía una técnica clínica que inducía el cierre apical utilizando hidróxido de calcio durante tres a seis meses, con esto demostró que era posible no solo la inducción del cierre del canal sino también la resolución de la patología apical, a esto se le llamó “Apexificación”.

#### **APEXOGÉNESIS:**

Esta técnica se aplica en dientes inmaduros con pulpa vital, involucra los siguientes procedimientos.

- Recubrimiento pulpar indirecto: evita la exposición pulpar protegiendo la dentina profunda, su objetivo principal es detener el avance de la caries favoreciendo una esclerosis dentinaria y estimulando la promoción de una dentina reaccionaria con remineralización de la zona afectada, permitiendo

además, que continúe el desarrollo del tercio apical radicular (Estrela, 2005; Hargreaves y Cohen, 2011).

- Recubrimiento pulpar directo: corresponde a la protección o recubrimiento de exposición franca o pulpar mediante la aplicación directa de sustancias especiales con afinidad de cicatrizar la lesión y preservar su vitalidad (Mc. Donald, 2004; Soares y Goldberg, 2004).
- Pulpotomía: corresponde a la eliminación quirúrgica de una porción pulpar con lesiones inflamatorias o degenerativas, dejando intacto el remanente vital; luego de la extirpación quirúrgica del tejido pulpar superficial, se coloca un material protector con el fin de favorecer la cicatrización del tejido que ha sido amputado (Morales, 2007). Existen dos tipos de pulpotomías:

Parcial: es la amputación de 1 a 2 mm de pulpa cameral.

Total: corresponde a la amputación de toda la pulpa cameral. Esta técnica se realiza si hay exposición pulpar traumática de mayor duración (72 horas) o por caries.

El diente debe someterse a una revisión clínica y radiográfica de manera periódica por lo regular a intervalos de 3 a 6 meses para vigilar la vitalidad pulpar y el desarrollo normal de la raíz o cierre (Olmez A, 1998). El tiempo total de seguimiento varía según el grado inicial de maduración radicular; si la raíz estaba en una etapa muy temprana de desarrollo, su formación puede tomar de 1 a 2 años y las revisiones se hacen por lo menos hasta los 4 años. El éxito clínico se valora por la ausencia de signos clínicos o radiológicos de enfermedad, por la presencia del puente dentinario (clínica y radiográficamente) y por la presencia de un desarrollo continuo de la raíz.

Seltzer y Langeland (1971) opinan que los procedimientos de pulpotomía ocasionan de forma invariable una calcificación progresiva de los conductos. Por lo tanto, después de un desarrollo completo de la raíz estos investigadores defienden la extirpación del tejido pulpar restante y la realización de tratamiento endodóntico. Recomiendan el tratamiento endodóntico a causa de la elevada incidencia de

calcificación continuada. En un estudio de seguimiento sobre el éxito de pulpotomías durante un período de 1 a 5 años, los investigadores extirparon las pulpas por motivos restauradores encontraron unos resultados histológicos normales. Llegaron a la conclusión que tras una pulpotomía en dientes fracturados accidentalmente y con exposiciones pulpares, las lesiones observadas en las pulpas no representan signos histológicos suficientes para indicar una pulpectomía de rutina (Camp J., 2002). Camp y et al (1984) señalan que cuando se ha desarrollado la raíz está contraindicada una nueva intervención para extirpar la pulpa y realizar una obturación del conducto radicular, a menos que por otras consideraciones relacionadas con la restauración, como la necesidad de reintervenir para colocar un perno de retención.

Lasala (1992) sugiere realizar controles sistemáticos a los 6, 12, 18 y 24 meses después de la intervención, durante los cuales se verificará: ausencia total de síntomas dolorosos, presencia del puente de dentina de diversas formas y espesores pero fácilmente apreciables en la radiografías. En especial en los dientes inmaduros se aprecia gradualmente en los lapsos indicados el estrechamiento progresivo en el lumen de los conductos y sobre todo la terminación de la formación radicular y apical.

### APEXICACIÓN:

Es un proceso que promueve la formación de una barrera apical que permite alcanzar el cierre de un ápice abierto de un diente inmaduro con pulpa necrótica con el fin de lograr conformar el espacio radicular para la recepción de un material de obturación adecuado (Huang, 2009, 2012; García-Godoy, et al. ,2012). No permite el crecimiento y desarrollo de otros tipos celulares, más que la secreción de matriz hipermineralizada, dejando un sellado solo en la zona apical pero no desarrolla las paredes en mayor grado (Ding, et al. 2009).

Los materiales que han sido utilizados a través de los años para este procedimiento son:

- Hidróxido de Calcio
- Agregado de trióxido mineral (MTA)

Históricamente, por largo tiempo se uso el hidróxido de calcio en los tratamientos de apexificación en dientes inmaduros con pulpa necrótica, después de lograr el cierre apical se obtura con gutapercha los conductos radiculares (figura N°3).

La tasa de éxito de apicoformación usando hidróxido de calcio llegó a ser tan alta como 95%, sin embargo, la asociación americana de endodoncia ha relatado varios problemas asociados:

1. El tiempo requerido para la formación de la barrera calcificada (3-24 meses).
2. Múltiples citas necesarios para reaplicación de hidróxido de calcio.
3. El efecto a largo plazo (varios meses o más) de hidróxido de calcio sobre las propiedades mecánicas de la dentina. Este material posee un efecto proteolítico muy fuerte; por tanto, en dientes que han sido tratados con una técnica de apicoformación con hidróxido de calcio (además de presentar unas paredes radiculares finas propias de los diente en desarrollo) al efecto adverso del hidróxido de calcio sobre la dentina, la hace progresivamente más frágil, mucho más cuanto más tiempo están en contacto dentina e hidróxido de calcio y se aumenta la incidencia de fracturas cervicales (Cvek M. P, 1992). Este efecto proteolítico al igual que disuelve los restos pulpares en una semana, también afecta la dentina de alrededor, haciéndola con el tiempo (unos meses) más frágil. Es importante conocer la relación entre el tiempo y sus efectos, por lo que el uso del hidróxido de calcio solo deberá limitarse a unas pocas semanas (Miguel Miñana Gómez, 2009).

Posteriormente el MTA fue planteado como una alternativa para la apexificación, este induce la formación de cemento y ofrece varias ventajas sobre el hidróxido de calcio, teniendo una tasa de éxito de 94% (Sarris S, et al. 2008). Recientes investigaciones han podido constatar que el agregado de trióxido mineral induce la formación de tejido apical y su uso está asociado con una menor inflamación de la zona que otros materiales probados (Rocamora M, 2001).

Otro estudio que sustenta la utilización del MTA, es el realizado por Tittle et al. (1996) donde se comparó la efectividad del agregado de trióxido mineral como barrera de obturación apical, con capacidad para estimular el cierre apical de tres factores de crecimiento óseos. Los autores concluyen que los factores de crecimientos óseos juegan un papel importante en la formación y resorción ósea, pero sus efectos en un área inflamada son escasamente conocidos, donde se utilizó MTA las lesiones eran significativamente más pequeñas, por lo que el MTA puede utilizarse como material de obturación en una sola sesión en dientes con ápice abierto.

A diferencia de las técnicas convencionales de apicoformación, el uso de MTA busca crear una barrera rígida contra la que se pueda compactar el material de obturación sin tener que esperar la formación de la barrera de osteocemento y a su vez induce la formación de dicha barrera después de finalizado el procedimiento (Rocamora M, 2001).

El procedimiento clínico recomendado por Torabinejad y Chivian (1999), en la utilización del MTA en dientes permanentes con necrosis pulpar y ápices incompletamente formados, es el siguiente: después de anestésiar, aislar con dique de goma, y preparar un acceso adecuado, el sistema de conductos radiculares, se debe desinfectar, utilizando instrumentos e irrigación con NaOCl. Para desinfectar el conducto radicular, se introduce el hidróxido de calcio como medicamento intraconducto por una semana. Después de irrigar el conducto radicular con NaOCl y eliminar el hidróxido de calcio, se seca con puntas de papel absorbente, se mezcla el polvo del MTA con agua estéril y se lleva la mezcla con un porta amalgama grande al conducto. Posteriormente, se condensa el MTA hacia el ápice radicular de la raíz con

condensadores o puntas de papel. Creando un tapón apical de MTA de 3 a 4 mm. y se controla su extensión radiográficamente.

Al-Kahtani et al.(2005) realizaron un estudio in Vitro en el cual evaluaron la capacidad de sellado del MTA en diferentes espesores colocados en dientes como retroobtusión y sus resultados demostraron que el espesor ideal fue de 5mm debido a que se evitó completamente la filtración bacteriana.

El mecanismo de formación de cemento sobre el MTA, como material de obtusión apical, no está claro. Basado en los resultados de estudios del material en retro obtusiones y en reparación de perforaciones; al parecer el MTA es probablemente capaz de la activación de los cementoblastos al producir la matriz de la formación del cemento. Posiblemente, por su capacidad de sellado. (Torabinejad M, 1999 y 1993), su alto pH, o a la liberación de sustancias que activan los cementoblastos para formar una matriz para la cementogénesis.



Fig. N°3, Tratamiento logrado mediante Apexificación.

A) Radiografía periapical que muestra el ápice abierto y lesión apical de dientes 1.1 y 2.1

B) Radiografía periaapical luego de la necropulpectomía, irrigación, preparación de los conductos. Se pone dentro del conducto hidróxido de calcio con suero, se sella con un material restaurativo intermedio este procedimiento se repite a los 30 días.

C) Radiografía periapical posterior a la obturación de los conductos con gutapercha, se observa el cierre apical.

*KG. Vellore, Calcium hydroxide induced apical barrier in fractured nonvital immature permanent incisors (2010).*

Sin embargo, ninguno de los tratamientos de apicoformación fomenta aún más el desarrollo de la raíz y estos dientes resultan más frágiles siendo más vulnerables a las fracturas radiculares cervicales.

En contraste a esto, existe un tratamiento recientemente llamado “Terapia endodóntica regenerativa”, la cual tiene el potencial de lograr un mayor desarrollo de la raíz, y por lo tanto, puede conferir un mejor pronóstico a largo plazo.

#### **IV. ENDODONCIA REGENERATIVA**

La agresión a los tejidos tiene como resultado su alteración, respondiendo el organismo con un proceso de restauración del tejido afectado. Dicho proceso comienza siempre con la aparición de un coagulo sanguíneo que rellena el defecto y aporta las proteínas necesarias para lograr un tejido fibroso que termina en cicatricial, que no respeta la arquitectura ni funciones originales ni preexistentes. Este proceso se conoce como *Reparación*. En ocasiones el proceso no lleva a una reparación sino a la creación de un tejido similar al original con una arquitectura y

función exactamente iguales, en este caso se habla de *Regeneración* (Pérez-Sierra A. 2011).

La Endodoncia Regenerativa o Revascularización pulpar se ha definido como: “Procesos basados en la biología designados para reemplazar estructuras dañadas, incluyendo dentina y raíz dental, así como también células del complejo dentino pulpar” (Murray PE, 2007).

El concepto de la regeneración pulpar fue promulgado por los clásicos estudios de Nygaard- Östby, quien evaluó los efectos del sangrado provocado a través de la sobre instrumentación en conductos radiculares de humanos o perros, desafortunadamente los análisis histológicos revelaron que una reparación tisular ocurría (fibroblastos, colágeno y escasa vascularidad).

Estudio de casos han demostrado que luego de procedimientos endodónticos regenerativos, hay curación de la periodontitis apical, continúa el desarrollo del ápice de la raíz y aumenta el grosor de la pared del conducto radicular de los dientes inmaduros con necrosis pulpar (Figura N° 4).



Fig. N°4, resultados post tratamiento de endodoncia regenerativa. (A) Radiografía preoperatoria del diente N#29. (B) Seguimiento del caso luego de 5 años del tratamiento de endodoncia regenerativa. *Biologically based treatment of immature permanent teeth with pulpal necrosis: a case series.* Jung IY, Hargreaves KM, 2008.

Los objetivos de la endodoncia regenerativa son:

- Primera meta: eliminación de los síntomas y signos de daño periapical.
- Segunda meta: incrementar el espesor y la longitud del conducto radicular.
- Tercera meta: respuesta positiva al test de sensibilidad.

Las consideraciones comunes para todos los protocolos de los procedimientos de endodoncia regenerativa que se deben tomar en cuenta según Hargreaves, et al. 2008 y Law A, 2013 son:

- Paciente joven con la pulpa necrótica y ápice abierto.
- Nula o mínima instrumentación de las paredes dentinarias.
- Medicación antibiótica intraconducto.
- Generar un coágulo de sangre o un andamiaje protéico en el canal.
- Lograr un sellado coronal efectivo.

Las ventajas de la endodoncia regenerativa son:

- El crecimiento radicular tridimensionalmente logrando el cierre del foramen apical.
- El tejido de reparación se convierte en una parte integral del diente, evitando la microinfiltración bacteriana que implica el uso de sellos artificiales.
- Es un tratamiento más corto que la endodoncia tradicional.
- No existe riesgo de rechazo por parte del sistema inmune (Murray, et al., 2007).

Las principales desventajas son:

- Pocos estudios de seguimiento y a largo plazo.
- Necesidad de varios controles.
- Limitación en pacientes con complicaciones sistémicas (alteración a la coagulación, disfunción plaquetaria, paciente bajo tratamiento de Antiinflamatorios no esteroideos, entre otras).

- Dificil selección de los casos.

Existen dos corrientes que difieren en el tipo de procedimiento clínico para realizar la revascularización pulpar, buscando ambos el mismo objetivo de este tratamiento.

La asociación americana de endodoncia propone utilizar un tipo de andamiaje interno, obtenido mediante la instrumentación del periápice con una lima de diámetro pequeño, 1-2 mm más allá de la longitud de trabajo, logrando generar sangramiento y la posterior formación del coágulo sanguíneo dentro del conducto. El año 2013, esta asociación estableció una guía clínica que describe este procedimiento.

La mayor desventaja de este método es que no es posible asegurar la cantidad y presencia de los factores de crecimiento necesarios. Además de esto, no siempre es posible obtener un sangramiento adecuado, porque el tejido apical se torna más fibroso.

La gran ventaja es que no es necesaria una punción venosa del paciente, ni todo el procedimiento de obtención de la matriz.

La otra corriente de investigación postula la revascularización mediante la obtención de una matriz sintética o natural, la que es introducida dentro del conducto, con el fin de aumentar las probabilidades de éxito del tratamiento. Particularmente, la matriz natural tiene como gran ventaja asegurar una gran cantidad de factores de crecimiento que inducen la reparación y regeneración tisular, agregados plaquetarios como un núcleo para iniciar la mineralización y un coágulo de fibrina que estimula la adhesión celular y la síntesis de colágeno. Los datos clínicos nos revelan que el uso de estas matrices actuaría de forma favorable para el desarrollo de la regeneración sin procesos inflamatorios excesivos, por otra parte, se obtienen resultados en menor tiempo. Gracias a esto último, se disminuye el riesgo de fractura de las raíces tratadas en este periodo.

Por otro lado esta técnica requiere una instrumentación mínima de los conductos, por lo que también se reduce la probabilidad de accidentes en el proceso.

## INDICACIONES DE ENDODONCIA REGENERATIVA

La mayor indicación son casos de dientes permanentes inmaduros con pulpa necrótica causado por caries o por trauma dentoalveolar (TDA). La situación ideal es el paciente que tiene un diámetro apical igual o mayor a 1,1 mm, esto permite la aposición de células madres dentro del conducto radicular para formar nuevos tejidos dentro de éste (Torabinejad y Turman, 2011). La edad de los pacientes va desde los 8 a los 16 años de edad, se requiere que éstos no presenten alergias a los antibióticos utilizados en terapia (metronidazol, moxifloxacino y minociclina).

El éxito de la terapia depende de la capacidad reparadora de los tejidos dentarios del paciente (García-Godoy y Murray, 2012), esto lo podemos evidenciar a través de diversos parámetros que propone la Asociación Americana de Endodoncia (AAE):

- Ausencia de dolor e inflamación de los tejidos observada antes de empezar el tratamiento.
- Resolución de la radiolucidez apical (se observa generalmente a los 6 a 12 meses después del tratamiento).
- Aumento en el ancho de las paredes del conducto radicular (generalmente se observa antes del aumento de la longitud de la raíz, esto ocurre entre los 12-24 meses después del tratamiento).
- Aumento de la longitud de la raíz.
- Cierre apical.

## **V. BASES BIOLÓGICAS DE LA REGENERACIÓN:**

La ingeniería tisular es un campo interdisciplinario, que integra los principios de la biología y la ingeniería para desarrollar sustitutos biológicos que reemplazan o regeneran células humanas, tejidos u órganos en orden de restaurar o restablecer la función normal (Sedgley CM, et al. 2012).

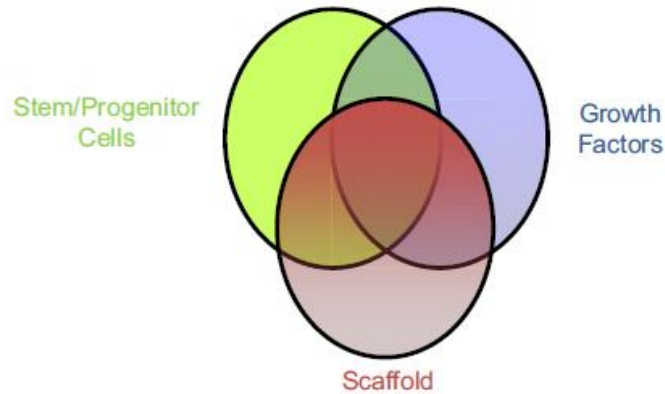


Fig N°5, Principios Básicos de la ingeniería tisular. *Treatment options: biological basis of regenerative endodontic procedures.* Hargreaves KM, Diogenes A, Teixeira FB.2013

## COMPONENTES:

Hay tres elementos claves en la ingeniería tisular:

### **A. CELULAS MADRES**

El primer elemento de la ingeniería de tejidos es una fuente de células capaces de diferenciarse a un tejido deseado. Las células capaces de hacer esto son las células madres, éstas se definen como células indiferenciadas capaces de autorrenovarse y diferenciarse en múltiples linajes, son capaces de generar una célula madre hija y una progenitora (capaz de diferenciarse) en cada división.

Las células madres se encuentran en la pulpa dental, la papila apical e incluso en el tejido periapical inflamado colectado durante los procedimientos endodónticos (Figura N°6). Estos hallazgos sugieren una oportunidad para obtener células madres durante los procedimientos endodónticos. De hecho el sangramiento provocado durante la terapia endodóntica regenerativa revela un flujo masivo de células madres mesenquimáticas al conducto radicular (Kenneth M. Hargreaves y Fabricio B Teixeira, 2013).

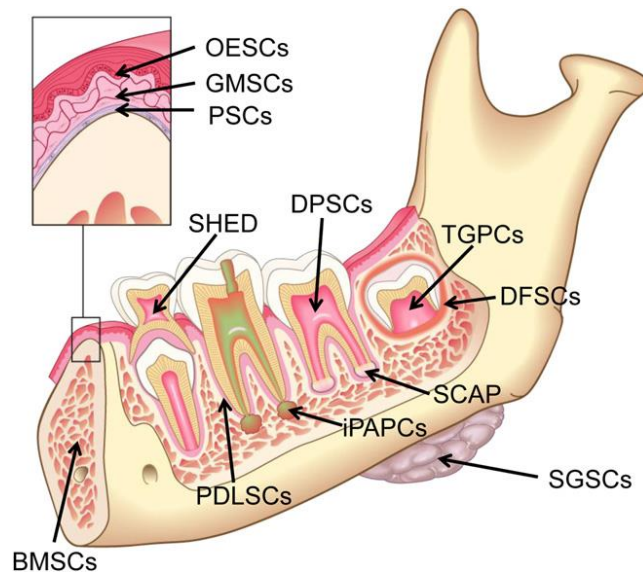


Fig N°6, Esquema que indica la ubicación de las células madres postnatales humanas presentes en tejido dentario, periodontal y óseo. *Treatment options: biological basis of regenerative endodontic procedures. Hargreaves KM, Diogenes A, Teixeira FB.2013*

En la pulpa dental el conjunto de las células indiferenciadas en un diente representa aproximadamente un 1% de la población de células pulpares, éstas son capaces de producir células diferenciadas como respuesta a una señalización específica, esta cantidad se reduce en la medida que envejecemos.

La plasticidad de estas células es su habilidad para diferenciarse en varios tejidos, según esto se dividen en:

- Totipotenciales: con capacidad de formar un organismo completo, incluyendo células embrionarias. Se encuentran en las células embrionarias de 1-3 días.
- Pluripotenciales: puede dar origen a más de 200 tipos celulares pertenecientes al endoderma, mesoderma y ectoderma. Se encuentran en las células del blastocisto de 5-14 días.
- Multipotenciales: célula diferenciada capaz de formar un número limitado de otros tejidos. Se encuentra en el tejido fetal, cordón umbilical y células post natales.

Por otro lado, podemos dividir las células madres en embrionarias y postnatales. Las primeras son pluripotentes capaces de diferenciarse en casi

cualquier tipo celular, así como también mantener un estado indiferenciado. Las segundas, han sido identificadas en los tejidos constituyendo de un 1 a un 4 % del total, que incluyen las células progenitoras. (Smith, et al. 2005). Las células postnatales tienen un potencial de diferenciación limitado en comparación a las embrionarias.

**Células madres pulpares (DPSC):** Una población postnatal de células madres pulpares humanas ha sido identificadas y aisladas mostrando una alta capacidad proliferativa en comparación con las células osteogénicas. Las DPSC tienen la habilidad de diferenciarse en células tipo odontoblastos, quienes pueden formar el complejo dentino-pulpar cuando son transplantadas in vivo. (Gronthos, et al., 2000, Shi, et al., 2005). Las DPSC son capaces de generar nuevas células madres que se pueden diferenciar a odontoblastos, adipocitos y células neurales.

El origen exacto y la localización de las DPSC sigue incierto, sin embargo, estas células desarrollan fenotipos consistentes con un nicho perivascular (Shi y Gronthos, 2003).

**Células madres de la papila apical (SCAP):** Son una población de células madres multipotentes aisladas de la papila apical de dientes humanos (Sonoyama, et al. 2006, 2008).

El tejido blando del exterior del foramen apical expresa marcadores para estas células, los cuales se pierden durante la diferenciación odontogénica. Comparándolas con las DPSC las SCAP proliferan más rápido, son más numerosas y tienen una mayor capacidad para la regeneración de la dentina in vivo. SCAP pueden ser la fuente primaria de odontoblastos que generan la dentina radicular, en contraste con las DPSC, que parecen ser las involucradas en la formación de dentina reparativa. (Lt Friedlander, et al., 2009).

**Células madres del ligamento periodontal (PDLSC):** Recientemente se ha confirmado una población de células madres dentro del ligamento periodontal. (Seo, et al., 2004). El potencial de las PDLSC para desarrollarse en otros linajes celulares y obtener características similares al ligamento periodontal se han establecido a través

de la habilidad de éstas para diferenciarse en cementoblastos, adipocitos y células formadoras de colágeno in vitro, y la capacidad de generar estructuras tipo cemento y ligamento periodontal in vivo. Las células madres pulpares y las PDLSC tienen una expresión similar de genes para la proteínas de la matriz extracelular, factores de crecimiento, receptores, y moléculas de adhesión, sugiriendo la existencia de un origen común y un camino molecular que regula la formación de dentina, cemento y hueso (Shi y Gronthos, 2003).

Se ha investigado y se ha concluido que las células madres de la pulpa y la de papila apical de dientes inmaduros pueden sobrevivir ante una infección o preparación del conducto. Esta es una de las bases que fundamenta la endodoncia regenerativa.

## **B. FACTORES DE CRECIMIENTO**

Los factores de crecimiento son proteínas que se unen a receptores de la membrana celular y actúan como señal para inducir la proliferación celular y/o la diferenciación.

Las plaquetas son una fuente autóloga de factores de crecimiento, entre los más estudiados están: el factor de crecimiento derivados de plaquetas, el factor de crecimiento parecido a la insulina, el factor de crecimiento beta, el factor de crecimiento vascular y el factor de crecimiento de los fibroblastos entre otros.

Los factores de crecimiento presentes en la formación de la pulpa y dentina son:

- Proteína morfogenética ósea.
- Factor de crecimiento transformante Beta.
- Factor de crecimiento fibroblástico.

Las células madres pueden diferenciarse con esta inducción en otros fenotipos celulares dependiendo de su linaje y la exposición a estímulos ambientales, como los factores de crecimiento, matriz extracelular, hipoxia u otras condiciones (Liao J, 2011).

Estudios recientes han revelado que la dentina contiene un gran número de moléculas bioactivas que cuando son liberadas participan en los procesos regenerativos (Sun HH, et al., 2011; Smith AJ, et al., 2012).

### **C. ANDAMIAJE**

Actúa como guía para el crecimiento celular y diferenciación, da soporte para la organización celular, proliferación y vascularización. Pueden ser implantados solos o en conjunto con células madres y factores de crecimiento; juega un papel clave en regular la diferenciación de células madres a través de la liberación local de factores de crecimiento y de la cascada de señales gatillada por la unión de las células madres a la matriz extracelular. Estos pueden ser endógenos (colágeno, ácido hialurónico, dentina) o sintéticos (hidrogeles, MTA, ácido poliglicólico, hidroxiapatita, otros). Las matrices endógenas ofrecen buena biocompatibilidad y bioactividad mientras que los sintéticos tienen mejor tasa de degradación y ofrecen mejores propiedades mecánicas (R. S. Presscot, 2008).

Este material de andamiaje debe ser biocompatible con el tejido receptor, biodegradable en forma gradual sin dejar residuos tóxicos, poroso (para poder contener en su estructura a las células y factores de crecimiento) y efectivo para el transporte de nutrientes y desechos.

Para la regeneración pulpar la matriz ideal corresponde a una que soporte la revascularización e inervación de los tejidos. El lograr una buena vascularización rodeada de tejido duro como sellado debiese tener un buen pronóstico (Zhang y Yelick, 2010).

Un protocolo utilizando un coágulo sanguíneo que actúe como andamiaje en la revascularización de dientes inmaduros infectados ha sido sugerido en muchas investigaciones. Se ha utilizado recientemente el coágulo sanguíneo o plasma rico en plaquetas como andamiaje para el conducto radicular. Se asume también que el sangramiento inducido dentro de un conducto radicular desinfectado producirá un coágulo de sangre que no solo sirve como andamiaje sino que también provee los

factores que estimulan a las células madres para que migren y se diferencien a células tipo odontoblastos (Ronald Wigler, et al., 2013).

La Asociación Americana de Endodoncia ha sugerido un protocolo en el que se introduce una lima K File #20 estéril 2 mm pasando el foramen apical para iniciar el sangramiento dentro del canal radicular, se estima que el tiempo necesario para formar un coágulo estable son 15 min. Solo una vez establecido el coágulo puede ser cubierto con MTA.

## TIPOS DE ANDAMIAJE

### I. SINTÉTICOS

#### A) Ácido Hialurónico:

Es un polisacárido que se encuentra en tejidos blandos de varias especies, es biocompatible, biodegradable y es empleado para promover la movilidad y diferenciación celular en la cicatrización de heridas (Xuejun X, et al. 2004).

El ácido hialurónico ayuda a crear la trama de la matriz extracelular mediante sus interacciones los proteoglicanos o el colágeno. Cuando está muy concentrado puede interaccionar consigo mismo creando mayas o entramados que le aportan al tejido unas propiedades visco-elásticas particulares.

La degradación del ácido hialurónico permite la permeabilización de la matriz extracelular, favoreciendo el trasiego de células. Curiosamente, los restos resultantes de la degradación del ácido hialurónico tienen carácter angiogénico e inflamatorio. Una alta concentración de ácido hialurónico en la matriz extracelular favorece la estabilidad celular e integridad tisular, mientras que la degradación favorece procesos de remodelación tisular. Es un indicio de madurez del tejido. Por otra parte se ha demostrado que su presencia es importante en los nichos de las células madre, donde estimula y la favorece la migración mediante la creación de espacios físicos para que las células se desplacen (Necas J, et al. 2008).

## II. ENDÓGENOS

### B) Colágeno:

El colágeno es el mayor componente de la matriz extracelular y provee gran fuerza tensil en los tejidos. Como andamiaje, permite el fácil posicionamiento de células, factores de crecimiento y su posterior reemplazo con tejido natural después de su degradación (R. S. Presscot, 2008).

Los factores de crecimiento son sustancias que regulan el patrón de desarrollo de los tejidos y, en particular, las posiciones de los diversos tipos de células especializadas dentro de un tejido. Éstos se extienden a partir de una fuente localizada y forman un gradiente de concentración a través de los tejidos en desarrollo. En la formación de los dientes, las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) dictan cuándo ocurrirá la iniciación, morfogénesis, citodiferenciación, y la secreción de matriz. Sin la familia BMP de factores de crecimiento, no se formaría el nudo del esmalte, los dientes y sería poco probable que desarrollen (Nakashima M, 2005).

La matriz de colágeno imita la estructura de la dentina primaria con fibras de colágeno de tipo perpendicular a la capa de odontoblastos y proteínas no colágenas que actúan como factores de crecimiento presentes en el hueso y en la dentina (Almushayt A, et al. 2006). Las fibras proporcionan resistencia a la dentina mineralizada y las proteínas no colágenas se considera que tienen capacidades reguladoras de mineralización (Smith AJ, y et al., 1995). Dentro de los factores de crecimiento, uno de los más importantes es la Dentin matriz protein 1 (DPM1), es una de las proteínas de la matriz extracelular, funciona como factor de crecimiento para células mesenquimáticas indiferenciadas de la pulpa dental, está implicado en la regularización de la mineralización, la DPM1 es crucial en la formación dentaria (He J, et. al, 2003).

El problema usando el colágeno como matriz para atraer a las células madres, es que ocurre una severa contracción de las éstas cuando van hacia esta matriz,

reduciendo su tamaño aproximadamente un 30%. La contracción es proporcional a la densidad de células que migran (G. Huang, 2009).

## B. PLASMA RICO EN PLAQUETAS (PRP)

Es definido como “concentración autóloga de plaquetas en un volumen pequeño de plasma” (Marx, 2004). El concepto de una concentración de plaquetas para mejorar la regeneración fue introducido por Marx y Whitman.

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

EL PRP es utilizado recientemente en la ingeniería de tejidos de la medicina, difiere de un coágulo sanguíneo normal en la cantidad de elementos que lo forman, el PRP tiene un 94% de plaquetas, solo un 5% de glóbulos rojos y un 1% de glóbulos blancos. La composición natural en el lugar de la herida, en cambio supone 95% de células rojas, 4% de plaquetas y un 1% de serie blanca (Arpornmaeklong P, Kochel, 2004).

Este plasma es una fuente rica en plaquetas (de 4 a 6 veces más que los valores normales) y factores de crecimiento, se cree que su aplicación es una forma efectiva para inducir la reparación y regeneración tisular (Goyal, et al., 2011; Torabinejad y Turman, 2011; Vaishnavi, et al., 2011). En la suspensión, las plaquetas aparecen viables y en teoría podrían liberar factores de crecimiento hasta aproximadamente 7 días después de su aplicación.

Las propiedades del PRP se basan en la producción y liberación de múltiples factores de crecimiento diferenciados y de la activación de las plaquetas. Estos factores son fundamentales en la regulación del proceso de cicatrización de heridas y juegan un papel importante en la regulación de procesos celulares, tales como mitogénesis, la quimiotaxis, la diferenciación y el metabolismo.

Marx, et al. (1998) demostraron un aumento en la densidad mineral del hueso de 1,6 a 2.2 veces utilizando injertos óseos autólogos de PRP comparado con injertos sin PRP. Este estudio demostró que las células del injerto autólogo tenían en su membrana receptores para casi todos los factores concentrados en las plaquetas (Silvia V. Rodriguez, et al., 2012).

El PRP genera agregados plaquetarios como un núcleo para iniciar la mineralización, mientras que estimula la proliferación y diferenciación celular del ligamento periodontal y la producción de colágeno. El PRP tiene la habilidad de promover la regeneración en sitios de la injuria, induce la formación inmediata de un coagulo de fibrina y junto a eso estimula la adhesión celular y la síntesis de colágeno. En conjunto con las acciones mediadas con fibrinógeno, el PRP puede producir potentes efectos en las células del ligamento periodontal que no solo reflejan una simple combinación con sus factores de crecimiento.

Marx en 1998 observó la presencia de 2 factores de crecimiento: PDGF, TGF- $\beta$ 1 en los concentrados de plaquetas utilizados. Observó también que las células esponjosas tenían receptores para estos factores de crecimiento, y concluyeron que:

1. La adición de PRP aceleraba la velocidad de formación ósea y el grado de formación ósea durante al menos 6 meses.
2. Era técnicamente posible secuestrar, concentrar y añadir un mayor número de plaquetas (y en consecuencia de factores de crecimiento) a los injertos óseos.
3. Las células madres de la médula esponjosa contenían receptores para los factores de crecimiento. Se hace necesario estudiar por tanto las

características del PRP, el procedimiento de aplicación, los periodos de tiempo en su aplicación en conjunción con la naturaleza de las heridas.

El PRP es utilizado de forma cada vez más frecuente en técnicas quirúrgicas de regeneración tisular.

Existen diferentes métodos de obtención, los protocolos descritos suelen utilizar una doble centrifugación para aumentar la concentración de plaquetas recogidas y este concentrado de plaquetas se mezcla con la trombina y el cloruro de calcio con el fin de inducir la activación masiva de concentrado de plaquetas y la gelificación de la preparación.

El PRP fresco muestra entre un 3 a un 5% de plaquetas activadas, mientras que a las 24 hrs hay un 7-25%. Se logran buenos resultados ante una activación de un 20-30% de plaquetas han sido probados, lo ideal es usarlas dentro de las primeras 6 horas tras su preparación (Marx, 2004).

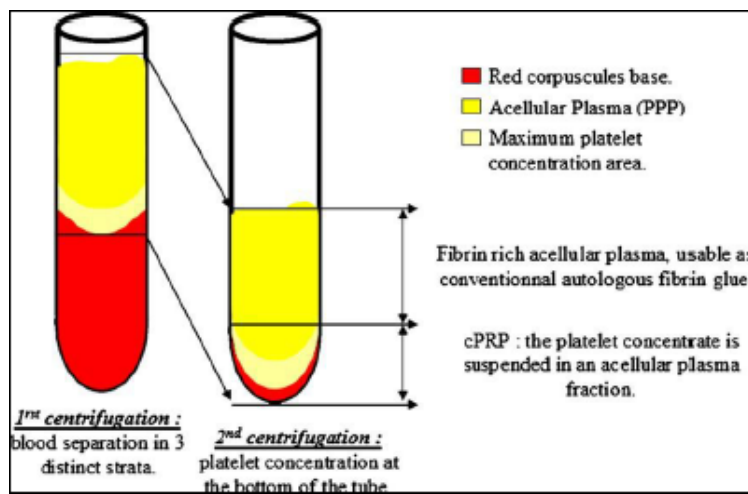


Fig N°7: Procesamiento del PRP. *Platelet-rich fibrin (PRF)* se muestra el tubo luego de la primera y segunda centrifugación. A second-generation platelet concentrate. Part I: Technological concepts and evolution, Dohan et al, 2006

Sin embargo, el principal problema es la activación prematura de plaquetas por utilización de trombina bovina (anticoagulante) y la consecuente pérdida de los factores de crecimiento y producción de una matriz de fibrina menos estable, en donde las citocinas (pequeñas moléculas solubles) son liberadas con demasiada rapidez por no estar estrechamente integradas en el interior de la matriz de fibrina durante la polimerización.

### C. FIBRINA RICA EN PLAQUETAS (FRP)

La fibrina rica en plaquetas representa un nuevo paso en el concepto del uso del gel plaquetario como terapéutica. Se conoce como una segunda generación de plaquetas, la cual se define como un biomaterial autógeno compuesto por leucocitos, plaquetas y fibrina (Donal, et al., 2009).

Entró al mercado por su simplicidad y mejoría de las propiedades en comparación con el PRP. Esta segunda generación de plaquetas elimina los riesgos del uso de trombina bovina, además de no necesitar manejo bioquímico de la sangre. Por lo tanto, para la correcta preparación del FRP, la toma de sangre rápida y centrifugación inmediata, antes de iniciarse la cascada de la coagulación, es absolutamente esencial.

El éxito de la técnica según Dohan, et al. (2009), depende de la velocidad en que se obtiene la sangre y su transferencia a la centrifuga. Sin anticoagulantes la muestra sanguínea comienza a coagular casi inmediatamente al contactar el tubo de vidrio, necesita unos pocos minutos de centrifugación para concentrar el fibrinógeno en la parte media del tubo. Un tiempo mayor hará que la fibrina polimerice en una manera difusa dentro del tubo y solo un pequeño coágulo sin consistencia podrá ser obtenido.

El FRP está en la forma de un gel de plaquetas y puede ser utilizado en combinación con otros injertos o como una membrana.

Se considera como un biomaterial regenerativo que actúa mediante una matriz polimerizada de fibrina rica en plaquetas, leucocitos y citoquinas que favorecen la circulación de las células madres, proliferación de fibroblastos y síntesis de Colágeno tipo I. Se le supone un efecto osteopromotor más que osteoinductor. Hay una gran variabilidad de trabajos clínicos y ensayos experimentales que estudian el papel de PRP/PRF y su efecto en la curación de las fracturas tras una lesión traumática. Su efecto se debe evaluar mediante el estudio radiológico, e histológico incluso complementado con el análisis de parámetros objetivos histomorfométricos.

Los datos clínicos nos revelan que el uso de PRF actuaría como una matriz favorable para el desarrollo de la curación sin procesos inflamatorios excesivos generando la liberación de citoquinas.

En 1994, se empezó a utilizar un adhesivo de fibrina autógena sobre hueso esponjoso durante una cirugía de reconstrucción mandibular. Para obtener la fibrina recurrieron a la separación de una muestra de sangre en sus componentes y emplearon la fracción plasmática como crioprecipitado. Observaron una consolidación ósea precoz, reduciendo el tiempo de 8 semanas a 4 semanas que se atribuyó mayor número de células osteocompetentes que quedaban en la red de fibrina (Nurden A, Nurden ,2008).

La fibrina es una proteína soluble que corresponde a la forma activada de una molécula plasmática llamada fibrinógeno. Está presente en el plasma y en los gránulos alfa de las plaquetas. Cuando el fibrinógeno se activa con la trombina se convierte en fibrina, formando un gel, participa de esta forma en la agregación plaquetaria durante la hemostasia. Es una especie de pegamento biológico capaz de consolidar el grupo inicial de plaquetas, lo que constituye un muro de protección a lo largo de las pérdidas de continuidad vascular durante la coagulación. De hecho, el fibrinógeno es el sustrato final de todas las reacciones de la coagulación.

Se ha demostrado que posterior a la centrifugación aproximadamente un 97% de plaquetas y un 50% de leucocitos de los del volumen de sangre original se concentran en el FRP (N. Bölükbaşı. et al., 2013).

El interés del empleo de esta fibrina es doble, por un lado aporta estabilidad y una matriz de soporte. Y por otro lado entrega sustancias mediadoras capaces de acelerar o mejorar los procesos regenerativos (Saéz- Torres, et al., 2007).

Este producto derivado de la sangre, se puede colectar justo antes de la intervención mediante punción venosa. No existe riesgo de transmisión de enfermedades. Sin embargo, se ha relacionado con la sobreexpresión de factores de crecimiento y sus receptores en tejidos tumorales y displásicos (Saéz-Torres, et al., 2007). Hasta la fecha no se encuentran estudios concluyentes sobre estos posibles riesgos.

El protocolo de obtención es muy simple y poco costoso: la sangre es colectada en un tubo de vidrio o de plástico y es inmediatamente centrifugada. Se forman tres capas, células rojas en el fondo del tubo, plasma acelular (plasma pobre en plaquetas) en la superficie y un coágulo de fibrina en el medio (Fig N°8), (Dohan, et al., 2009).

Puede ser usado directamente como un coágulo de fibrina o después de compresión como una fuerte membrana. (Fig N° 9).

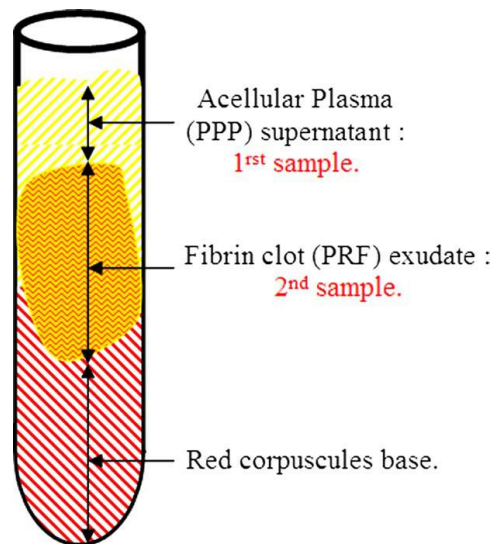


Fig. N°7: representación esquemática de los tres estratos obtenidos después de la centrifugación según el protocolo oficial.

*(Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate.*

*Part III: Leucocyte activation: A new feature for platelet concentrates. M. Dohan, et al., 2006)*

El coágulo de fibrina se forma mediante un proceso de polimerización natural que ocurre durante la centrifugación y su arquitectura natural de fibrina parece ser responsable de una lenta liberación de los factores de crecimiento y glucoproteínas de la matriz durante aproximadamente 7 días (Dohan, et al., 2009).

Las concentraciones de trombina que actúan sobre el fibrinógeno autólogo recogidas son fisiológicas, porque no hay ninguna adición de trombina bovina. Este aspecto es crucial para determinar la organización tridimensional de una red de fibrina. De hecho, durante la gelificación, las fibrillas de fibrina pueden verse en dos arquitecturas bioquímicas diferentes: condensadas con uniones tetra molecular o bilaterales y con conexiones trimoleculares o equiláteras (Gible J. 1990). Las uniones bilaterales se constituyen con fuertes concentraciones de trombina y permiten el engrosamiento de los polímeros de fibrina, lo que lleva a la constitución de una red rígida, no muy favorable a las citocinas y su depósito en el entramado y la migración celular (Fig. 9A). En contraste, las concentraciones bajas trombina implican un porcentaje muy significativo de conseguir las uniones equiláteras. Estas uniones permiten el establecimiento de una fina y flexible red de fibrina, capaz de retener en su entramado mayor cantidad de citocinas y permitirá una migración celular más controlada (Fig. 9B). Además, esta organización tridimensional dará una gran elasticidad a la matriz de fibrina: esto le da a las membranas de fibrina la capacidad de ser flexibles, elásticas, muy fuertes (Gible J. 1990).

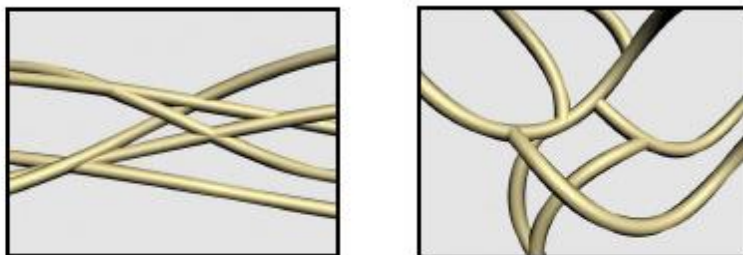


Fig N° 8: Modelo teórico computarizado de la estructura de la fibrina. 9A: Estructura Bilaterales de fibrina. 9B: Estructura equilátera de fibrin.

*Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part I: Technological concepts and evolution, Dohan, et al, 2006.*

Aunque la FRP pertenece a una nueva generación de concentrados de plaquetas, es en primer lugar, tecnología basada en el uso de fibrina. De hecho, la actividad biológica de la molécula de fibrina es suficiente en sí misma para dar cuenta de la capacidad cicatricial significativa del FRP. Y el modo de polimerización lenta confiere a la membrana FRP una arquitectura fisiológica particularmente favorable para apoyar el proceso de cicatrización.

La composición del PRF demuestra la utilidad que posee este andamiaje en los procedimientos de regeneración de tejidos. Está compuesto por:

- Plaquetas: células anucleares que viven de 7-10 días. Sintetizan activamente factores de crecimiento, sobre todo en respuesta a la coagulación. Dentro de los factores de crecimiento que producen encontramos, factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), factor de crecimiento transformante  $\beta$  1 y  $\beta$  2 (TGF), factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), y el factor de crecimiento epitelial. Se discute la presencia del factor de crecimiento tipo insulina. El PDGF y TGF $\beta$  son los responsables de aumentar la velocidad de regeneración y pueden ser separados mediante centrifugación para ser aplicados (Vaishnavi, et al., 2011). Varios estudios han demostrado la participación de estas sustancias en la estimulación de la angiogénesis, inducción de la quimiotaxis, proliferación y diferenciación de las células progenitoras y síntesis de colágeno (Sáez-Torres, et al., 2007).
- Leucocitos: Células cuya función es la defensa del organismo. Cuando los tejidos son invadidos por microorganismos se generan señales químicas que atraen y hacen que se produzca la migración de los leucocitos de los capilares hacia los tejidos a través de las células endoteliales (diapédesis). Participan así en la regeneración celular, activándose cuando existe inflamación. Muchos estudios demuestran que los papeles claves que juegan los leucocitos en este proceso son los de antinfeciosos y reguladores de la inmunidad así como también poseer factores de crecimiento promovedores de la angiogénesis Aún

no se ha encontrado una reacción inflamatoria descontrolada, por el contrario, la presencia de leucocitos se ha asociado a disminuir el dolor post operatorio y la inflamación (Dohan, et al. 2010). Según sus características de tinción específicas, su morfología celular y sus funciones se clasifican en neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos y linfocitos.

- Eritrocitos: Célula especializada en el transporte de oxígeno y dióxido de carbono unidos a hemoglobina, favorece el intercambio de oxígeno y dióxido de carbono entre el interior del eritrocito y el plasma sanguíneo.
- Fibrina: Una parte esencial del proceso de curación es la restauración de un suministro de sangre adecuado. Esto se logra mediante la formación de nuevos microvasos de los vasos existentes, un proceso llamado angiogénesis. Ésta suele ir acompañada de la presencia de células inflamatorias, pérdida de sangre y la deposición de fibrina. La matriz de fibrina actúa no sólo como una matriz de sellado, sino también como un andamiaje para la invasión de leucocitos y las células endoteliales durante la reparación de tejidos. Este proceso es inducido por la adición simultánea de un factor de crecimiento angiogénico (BFGF o VEGF) y la citoquina TNF alfa, y se ve reforzada por la hipoxia. La matriz no sólo facilitan la adhesión celular, sino también la transferencia de señales bioquímicas en de las células como una respuesta a esta interacción. Tiene una alta sensibilidad a las proteasas, tales como plasmina y metaloproteinasas (MMP). La modulación de la estructura de fibrina afecta marcadamente la forma y la estabilidad de la formación de tubo capilar in vitro (Van hinsbergh, et al., 2001).

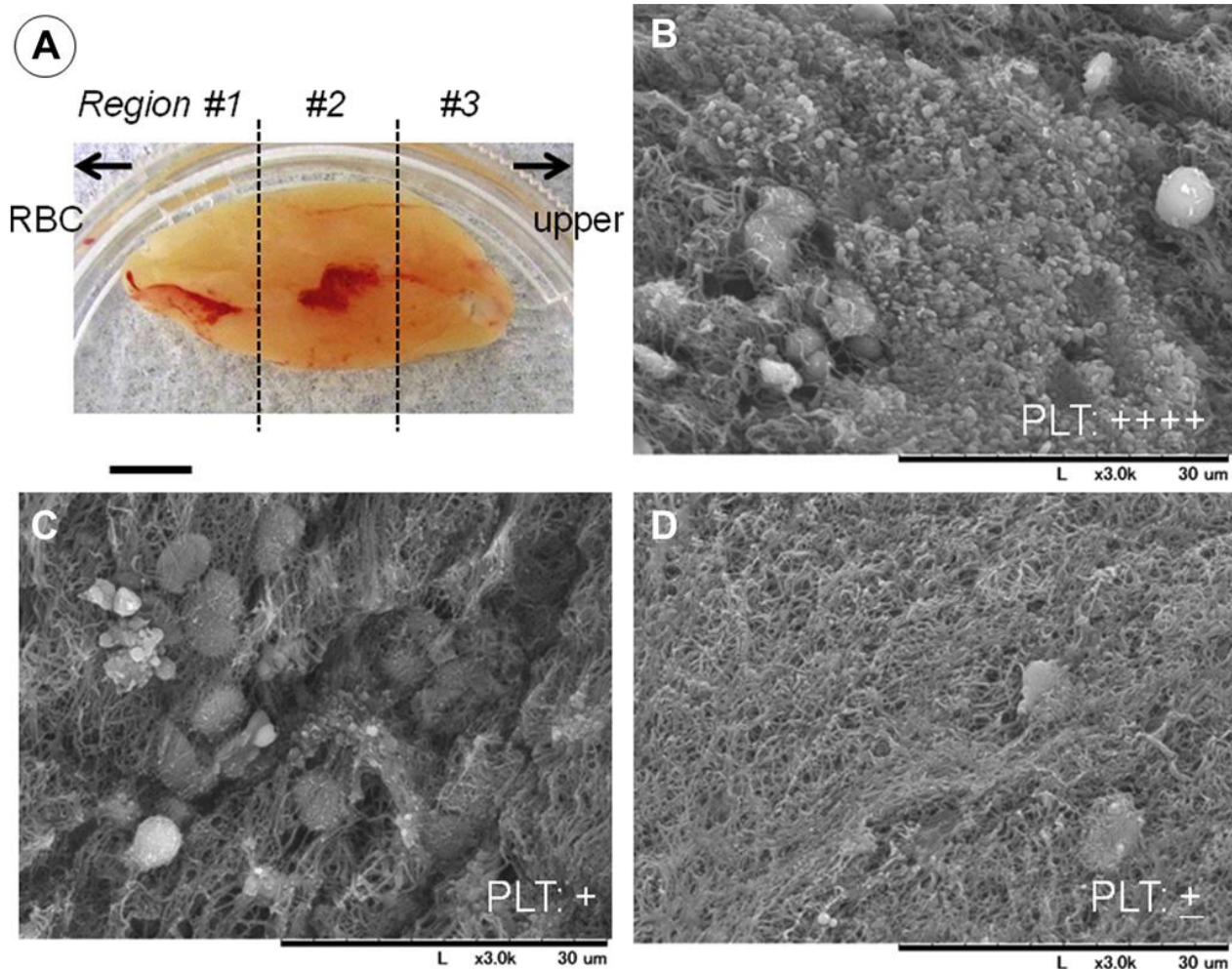


Fig. N° 9. Se observa el coágulo (A) que muestra las diferentes regiones que posteriormente fueron evaluadas en el microscopio electrónico de barrido, la región 1(B) corresponde a la adyacente a la fracción de glóbulos rojos, la región 2 corresponde a la parte central del coágulo (C), la región 3 (D)corresponde a la parte distal. Las plaquetas se encuentran más concentradas en la región 1, la zona que presenta menor concentración plaquetaria es la N° 3. *A proposed protocol for the standardized preparation of PRF membranes for clinical use, M. Kobayashi, et al, 2012.*

## **VI. MECANISMO BIOLÓGICO DEL PROCESO DE REGENERACION DENTARIA**

El proceso regenerativo o revascularización dentaria, como dijimos anteriormente se basa en tres factores; la presencia de células madres, los factores de crecimiento y el andamiaje necesario para que el proceso se lleve a cabo.

Existen diferentes teorías sobre cómo se estimulan las células madres y desde donde migran hacia apical para lograr la diferenciación celular, formando así nuevo tejido que logre terminar con la maduración del diente.

Los orígenes de las células madres que se postulan son:

- Células madres de la pulpa que permanecieron en apical, éstas serían estimuladas por células de la Vaina Epitelial de Hertwig las que son muy resistentes incluso a la inflamación e irritación. Las células madres se diferenciarían en Odontoblastos formando dentina atubular que permite la Apexogenesis y el engrosamiento de las paredes (N. Shah, 2008).
- Células madres multipotentes de la pulpa presentes en dientes permanentes que pueden estar en abundancia en dientes inmaduros que migran hacia las paredes dentinarias remanentes y se diferencian en odontoblastos depositando dentina atubular.
- Células madres del ligamento periodontal que son estimuladas y migran hacia apical diferenciándose a odontoblastos.
- Células madres de la papila apical y de la medula ósea, estas últimas llegan al canal radicular cuando la instrumentación sobrepasa la longitud de trabajo induciendo el sangramiento, de esta forma migran células mesenquimáticas de la medula ósea, que pueden formar hueso o dentina.

El estímulo de estas células para que migren y se diferencien lo otorgan una serie de factores de crecimiento, que se obtienen de un andamiaje externo introducido dentro del conducto radicular o dentro del mismo organismo en el proceso de sangramiento del ápice.

Para permitir este proceso es necesario un andamiaje que les otorgue una matriz física donde las células puedan migrar y diferenciarse; la diferenciación da lugar a diferentes tipos celulares como fibroblastos, osteoblastos, odontoblastos, células endoteliales y del ligamento periodontal.

## **VII. PROTOCOLOS CLINICOS PARA LA REVASCULARIZACIÓN CON PRF**

Se describen en la literatura distintos protocolos clínicos de obtención difiriendo en el tiempo de centrifugado y la velocidad según la centrífuga a utilizar, es por esto que se cree necesario establecer un protocolo estandarizado para la centrífuga presente en la facultad de odontología de la Universidad de Valparaíso para la preparación del FRP que tome los siguientes puntos en consideración:

- Las plaquetas deberían ser preservadas en la red de fibrina con el mínimo daño.
- Factores de crecimiento almacenados en las plaquetas deberían ser retenidos para estimular las células de los tejidos huéspedes que las rodean.
- La red de fibrina tridimensional debería preservarse como andamiaje para las células presentes en los tejidos huéspedes.

A continuación mencionaremos algunas formas de obtención de PRF mencionadas en la literatura:

- A) Una muestra de sangre la que es colectada sin anticoagulantes en tubos al vacío de 10 ml, éstos son centrifugados inmediatamente a 3.000 r.p.m (800g) por 10 min (Choukroun J, et al., 2006).
- B) La forma de obtención utilizada en la cátedra de endodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad de Valparaíso es hasta el momento, 5 minutos a 4.000 r.p.m en la centrífuga mencionada anteriormente (D. Vergara, 2013).

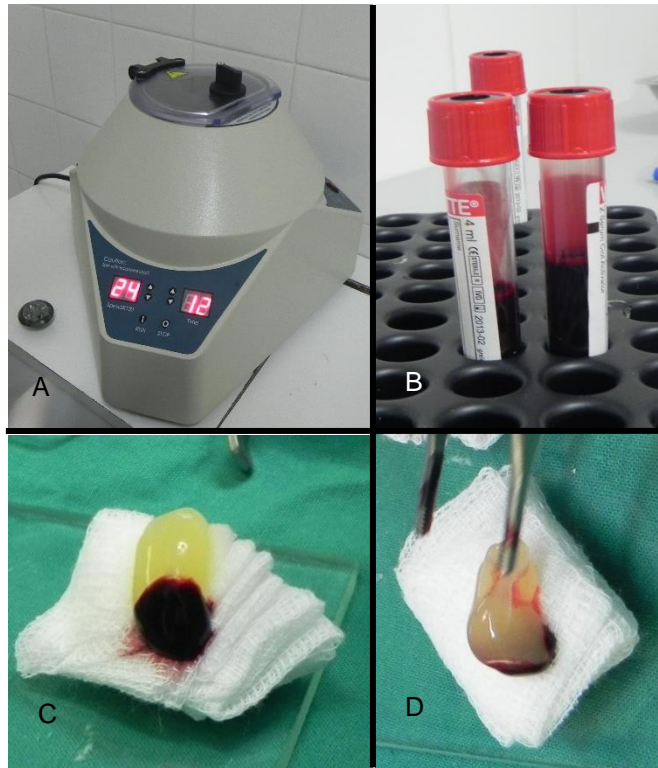


Fig N° 10: A: Centrifuga. B: tubos con la sangre recién obtenida. C: coágulo post centrifugación. D: coágulo de fibrina final. *Imágenes gentileza Dra. Alicia Caro, Endodoncia 2014.*

Una vez realizada la centrifugación, el coágulo se debe separar de la parte roja y del plasma pobre en plaquetas, para esto se utilizan unas pinzas estériles con las que se saca cuidadosamente el coágulo del tubo, luego con unas tijeras estériles se corta la parte del coágulo que será utilizado en la terapia.

Las plaquetas no se distribuyen homogéneamente dentro del coágulo, gracias a la centrifugación se concentran en la parte del coágulo de fibrina que está adyacente a los glóbulos rojos (M. Kobayashi, 2012). Es esta zona llamada “Buffy coat” la que se utiliza para procesos regenerativos, como la revascularización pulpar.

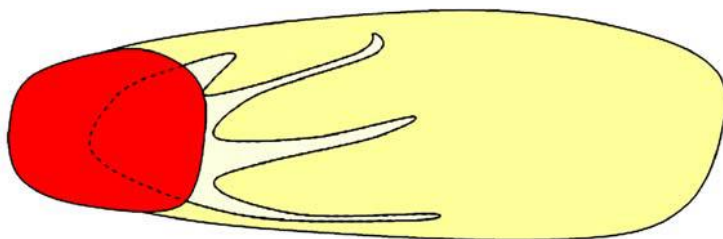


Fig N° 11: Rojo: trombo rojo, gl. Rojos y plaquetas sumergidas dentro de una red firme de fibrina. Crema: coágulo de fibrina. Blanco: "buffy coat", corresponde a la acumulación de plaquetas atrapadas en la matriz de fibrina. *Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part II: Platelet-related biologic features (M. Dohan, et al., 2006).*

## VIII. ESTUDIO DEL COÁGULO DE FIBRINA

### 8.1 ESTUDIO DE LA FIBRINA

La fibrina es la forma activa e insoluble de la molécula plasmática llamada fibrinógeno, juega un rol fundamental en la agregación plaquetaria durante la hemostasia. Su transformación tiene lugar gracias a la presencia de trombina, Factor XIII, fibronectina y calcio plasmático. La activación de las plaquetas inicia al contacto con el tubo y da lugar a la cascada de coagulación.

La fibrina (polímero del fibrinógeno) es una malla protéica constituyente del tapón hemostático, se caracteriza principalmente por su estructura espacial, las dimensiones de sus fibras, el grado de ramificación, porosidad, elasticidad y rigidez, propiedades que dependen de factores como temperatura, concentración de iones y otras sustancias plasmáticas, pero principalmente de fibrinógeno, trombina, factor XIII y calcio (Lauricella, 2007).

Las redes compactas son lisadas más lentamente, mientras que dentro del mismo gel, las fibras delgadas son disueltas antes que las gruesas. Por otra parte, fibras gruesas resultan mejores cofactores de la activación del plasminógeno. La fibrina no es igual en todos los casos, ya que existen muchas variaciones de su estructura a causa de diferentes situaciones fisiológicas, como también alteraciones en sus propiedades vinculadas a trastornos patológicos.

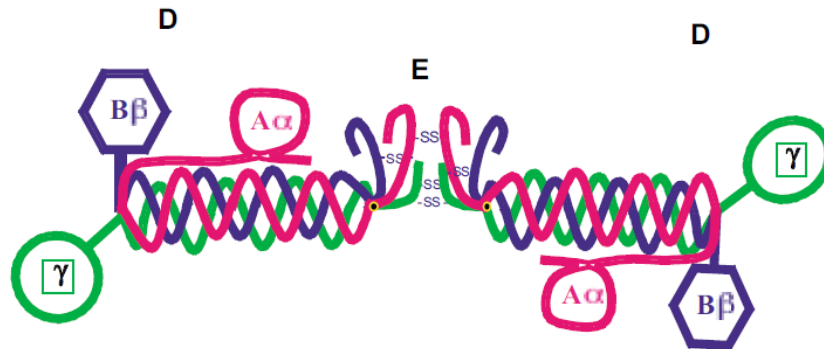


Fig. N°16: esquema del fibrinógeno, cada color representa una cadena polipeptídica. (*Fibrin network variability*, AM. Laricella, 2007)

La fibrina puede ser caracterizada por diferentes propiedades, importantes para la detección de alteraciones. Las más estudiadas son su cinética de formación, estructura, permeabilidad, elasticidad y compactibilidad, entre otras.

La estructura de la fibrina, generalmente evaluada por microscopía electrónica de barrido (MEB) o microscopía confocal, es muy variada (Fig. N°17). La arquitectura global puede ser homogénea (ya sea compacta o abierta) o heterogénea (si posee poros o nudos). Puede cuantificarse el número de ramificaciones por área y diferenciarse las uniones bilaterales o equilaterales, descritas anteriormente. Usualmente una arquitectura compacta de porosidad disminuida se asocia con fibras delgadas, muy ramificadas, mientras que una estructura abierta generalmente se vincula con fibras gruesas. La diferente estructura de la fibrina es un factor determinante de su velocidad de lisis.

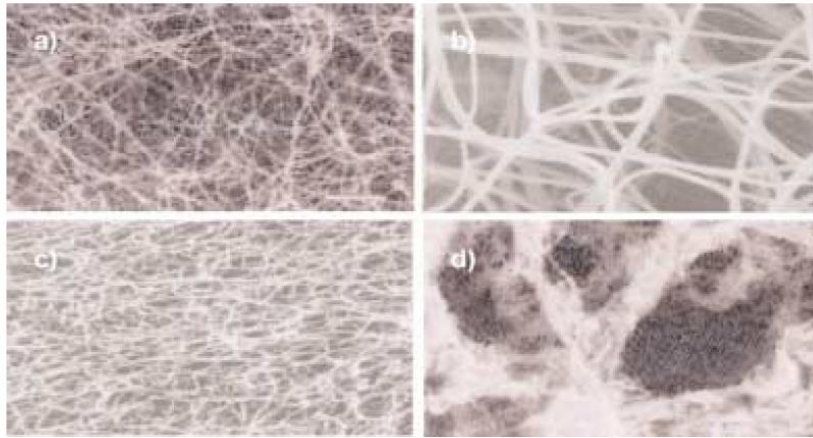


Fig N°17 Arquitectura global de las redes de fibrina: a) homogénea, b) homogénea abierta, c) homogénea compacta, d) heterogénea compacta con grandes poros. (*Fibrin network variability, AM Laricella, 2007*).

Existen numerosos factores que influyen en las características de la red de fibrina, principalmente la concentración y calidad del fibrinógeno (Fbg). Al aumentar la concentración de Fbg, la fibrina resulta más compacta y rígida, de mayor turbidez, menos permeable y más difícil de lisar. Recientemente se ha demostrado que las variantes del Fbg de alto y bajo peso molecular modulan la capacidad angiogénica de células endoteliales en matrices de fibrina. Si bien la actividad del F XIIIa no modifica la estructura de la fibrina, influye drásticamente en sus propiedades, principalmente en las viscoelásticas, la permeabilidad y su susceptibilidad a la lisis. Las redes de fibrina se modifican, además, en una serie de estados patológicos. La glucosa *in vitro* aumenta el grosor de las fibras, disminuyendo la permeabilidad, tanto *in vitro* como *in vivo*.

La velocidad de fibrinólisis está estrechamente relacionada con el tamaño de las fibras y la arquitectura de la red de fibrina. La plasmina corta transversalmente fibras individuales, de modo que dentro del mismo gel, fibras delgadas se lisan antes que las gruesas. Redes de estructura abiertas se lisan más rápidamente que las compactas a causa de la reducida cantidad de fibras por unidad de volumen y la movilidad facilitada de componentes fibrinolíticos.

La fibrina rica en plaquetas también puede analizarse en microscopía óptica (Fig N°19), estudios recientes que evaluaron si el PRF varía según el tipo de tubo utilizado en centrifugación han utilizado este método. Con la tinción de hematoxilina y eosina la matriz de fibrina puede parecer de color rosado homogénea o no a la luz. Los glóbulos rojos y citoplasma de los leucocitos no son fácilmente detectables, pero si es posible observar la red de fibrina con su integridad, que puede variar según el tubo utilizado y según diferentes protocolos de centrifugación. Las plaquetas por su parte son difíciles de observar en este microscopio, debido a que la fibrina actúa como sombra impidiendo el paso de luz a éstas. El núcleo de los leucocitos se puede observar con la tinción de hematoxilina, determinando su número, forma y grado de tinción.

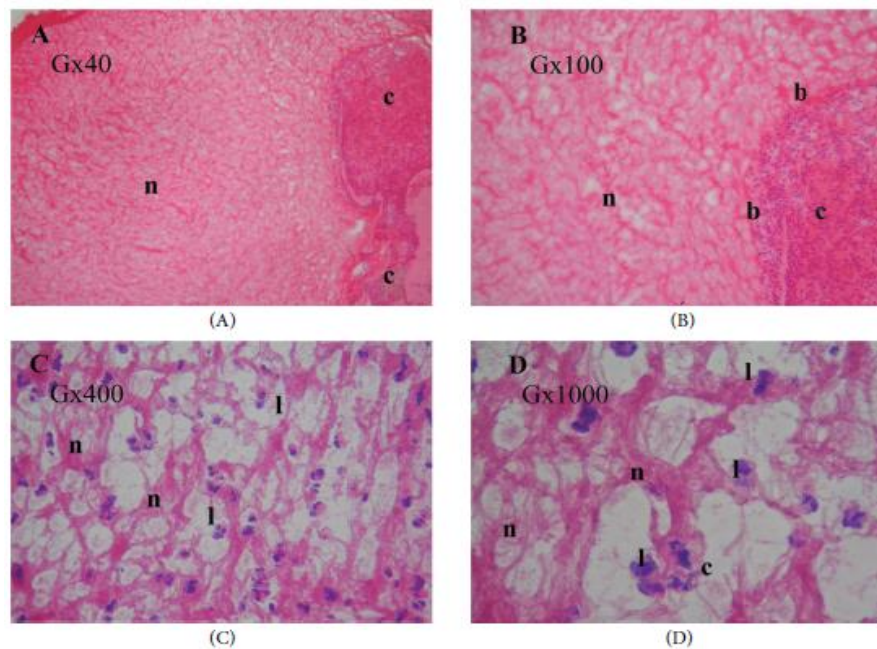


Fig N° 18: El análisis de microscopía de luz del coágulo PRF. Tinción con hematoxilina y eosina. (A) La red de fibrina PRF (rosa claro (n)) y los componentes celulares (c) no eran fácilmente detectables. (B) La red de fibrina PRF (n) adyacente a la zona celular (C) y el borde de fibrina (b) no era fácilmente detectable. (C) Oscuros núcleos azul de leucocitos (l), la frontera entre las estructuras celulares y red de fibrina (n). (D) El celular estructuras (c) se incrusta en la red de fibrina (n). El núcleo de los leucocitos (l) se tiñeron de color azul oscuro con hematoxilina. Los aumentos (G) se indican en cada panel. *A Novel Platelet Concentrate: Titanium-Prepared, Platelet-Rich Fibrin. Mustafa Tunali J, 2014*

## 8.2 ESTUDIO DE PLAQUETAS Y LEOCOCITOS

Las *plaquetas* o *trombocitos* son fragmentos citoplasmáticos anucleados que se producen como consecuencia de la ruptura de los megacariocitos de la médula ósea, las cuales son células extraordinariamente grandes (20 micrones de diámetro), con un núcleo altamente poliploide y un citoplasma subdividido por capas de membranas onduladas. Es por esto que las plaquetas al ser fragmentos celulares son muy pequeñas midiendo de 2 a 4 micrones de diámetro. Cada ml de sangre contiene entre 250.000 a 400.000 plaquetas cuya vida media es de 10 días aproximadamente.

Presentan forma discoidal biconvexa, contiene una membrana externa que es una bicapa de fosfolípidos con proteoglicanos y glucoproteínas que favorecen la adherencia de las plaquetas entre sí, poseen también enzimas importantes para el funcionamiento celular. Tienen un citoplasma con partículas de glucógeno diseminadas o aglomeradas que constituyen la fuente energética de este fragmento, un citoesqueleto (gel visco elástico con partículas de actina entrecruzados) y un sistema canalicular abierto por el cual transporta las GPIIb/IIIa y la GP1b hacia los gránulos. Además consta de un sistema tubular denso que actúa como un sistema de membranas con apariencia, y funciones similares a las del retículo endoplásmico liso de otras células.

Su función principal es la participación de ellas durante la hemostasia en la formación del trombo primario, también juegan un importante rol en los procesos de inflamación, inmunidad de la progresión tumoral y trombosis (Paul Carrillo Mora, 2013).

Contienen una gran cantidad de gránulos de almacenamiento:

- Gránulos lambda: son lisosomas que contienen enzimas hidrolíticas, ayudan a disolver el coágulo cuando éste ha cumplido su función.
- Gránulos delta: contienen ATP, ADP, calcio, histamina y serotonina, los cuales son potentes activadores plaquetarios.

- Gránulos alfa: contienen fibrinógeno, tromboplastina, factor de crecimiento plaquetario, trombospondina y factor Von Willebrand.

Los *leucocitos* pueden dividirse en varias categorías según la función que cumplirán luego a la diferenciación, el sitio de origen o la morfología. Se describe que la función principal de estas células es defender al organismo frente a los agentes exógenos o endógenos que lo ataquen.

En la infancia el número de leucocitos así como su distribución porcentual varía con la edad, estas modificaciones se producen frente a cambios fisiológicos y causas patológicas del paciente. Cada ml de sangre contiene entre 5.000 a 8.000 leucocitos, dividiéndose este total entre todos sus subtipos.

Grupo etario	Cifra leucocitos	Fórmula porcentual $\pm 10\%$	
	Promedio y rango	Neutrófilo	Linfocitos
RN	18 000 (10-30 000)	60	30
1 año	12 000 (6-18 000)	30	60
2-5 años	10 000 (6-15 000)	40	50
6-12 años	8 000 (5-13 000)	50	40

Fig. N° 19: Número aproximado de leucocitos por rango etario. *Rev. chil. pediatr. v.72 n.5 Santiago set. 2001.*

Según su contenido en el citoplasma son divididos en *granulocitos* y *agranulocitos*, según los gránulos destacables en su citoplasma, entre los primeros destacan los *basófilos*, *neutrófilos*, *eosinófilos* y *monocitos*; mientras que los linfocitos se dividen en *linfocitos* y *monocitos*.

- Neutrófilos: corresponden de un 50% a un 70% del total de leucocitos, miden de 12 a 15 micras de diámetro, son los llamados polimorfonucleares debido a que su núcleo presenta de dos a cinco lóbulos unidos. Su función principal es la fagocitosis de bacterias o agentes extraños mediante sustancias liberadas

de sus citoplasmas, estas sustancias matan a los neutrófilos, sus restos más el material digerido se transforman en pus.

- Eosinófilos: comprenden entre un 1 a un 4% del total de leucocitos, su tamaño es similar al del neutrófilo, presentan la mayoría de las veces un núcleo bilobulado. Su función es intervenir en las alergias y reacciones inmunológicas contra parásitos. Su capacidad de fagocitosis es limitada.
  
- Basófilo: corresponden a menos del 1% del total de la fórmula, su núcleo varía entre 10 a 12 micras, es el más pequeño de todos. Su núcleo presenta forma de U con dos o más lóbulos grandes unidos. Como el tipo anterior, éste interviene en las alergias. No fagocita.
  
- Linfocitos: son de un 20 a 30% del total de leucocitos, se ven aumentados frente a cuadros infecciosos, en los niños el porcentaje es mayor debido al constante contacto con antígenos nuevos (Histología de Di Fiore, Jose Hib, 2001).  
Se dividen en pequeños (7 a 8 micrones), medianos (9 a 12 micrones) y grandes (13 a 18 micrones). Su citoplasma es pequeño y basófilo; el núcleo es grande y esférico.  
Según su función se dividen en linfocitos T, linfocitos B y linfocitos nulos o NK. Para poder distinguirlos se deben utilizar métodos inmunohistoquímicos. Hay un 80% de linfocitos T, un 15% del tipo B y un 5% de los linfocitos nulos.
  
- Monocitos: varían entre un 5 a un 8% del total de leucocitos, son la célula más grande de la sangre midiendo desde 12 a 18 micrones de diámetro. Presentan un núcleo extenso y ovalado con una escotadura hacia el centro de la célula. Circulan en la sangre para poder llegar a los tejidos del organismo, lugar en el cual se diferencian a macrófagos. Su función es fagocitar bacterias y partículas extrañas para el organismo. Esta célula continúa viva después de la fagocitosis.

## **IX. COMPOSICIÓN DEL COAGULO DE FIBRINA CON MEJORES PROPIEDADES BIOLÓGICAS**

- Concentración de plaquetas: 1-6 veces la concentración inicial del paciente es el rango ideal que debería tener el coagulo. Mientras mayor es el número de plaquetas, existen más factores de crecimiento liberados (Magalon, et al., 2014). Marx propone que el concentrado de plaquetas debe mostrar aproximadamente 4 veces el número de sangre del paciente.
- Número de glóbulos blancos: Los leucocitos son fundamentales por el rol antimicrobiano que poseen. Es necesaria su existencia en el plasma, generalmente dos veces más del número inicial del paciente. A mayor cantidad no se han reportado efectos de una reacción inflamatoria descontrolados.
- Número glóbulos rojos: Se debe esperar la menor concentración de glóbulos rojos para que no liberan especies de oxígeno reactivo (Magalon, et al., 2014).
- Malla de fibrina: Las características de una malla ideal de fibrina corresponden a una malla que contenga poros homogéneos en tamaño y distribución. Para permitir la correcta migración de las células a través de ella. Por otro lado se prefieren fibras gruesas porque estas se demoran más tiempo en degradar.

## X. CENTRIFUGAS

La centrifugación es un procedimiento físico que permite la separación de partículas, ya sean células, orgánulos, moléculas, etcétera, en base a la diferente velocidad a la que sedimentan en un medio acuoso bajo la acción de un campo centrífugo. Este campo se aplica en unos aparatos denominados centrífugas que por medio de la rotación de una de las piezas, llamada rotor, a gran velocidad dentro de una cámara en la que se puede controlar la temperatura (para evitar la degradación de muestras termosensibles y evitar su sobrecalentamiento por fricción) y realizar el procedimiento en condiciones de vacío cuando sea necesario (para evitar el calentamiento del rotor por el roce con el aire).

Todo cuerpo sometido a un movimiento giratorio según una trayectoria circular de radio **R** con una velocidad angular **w** experimenta una fuerza (**F<sub>c</sub>**) que tiende a alejar al cuerpo del centro de giro.

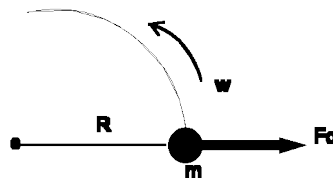


Fig. N° 20. Descripción de la fuerza centrífuga. *L.Rodríguez, Manual de bioquímica Farmacéutica. 2008.*

Esta fuerza se conoce como **Fuerza Centrífuga** y su valor vendrá expresado por:

$F_c: mw^2 R$ , donde:  $m$  = masa del cuerpo,  $w$  = velocidad angular y  $R$  = radio.

En todos los tipos de rotores existentes es fundamental colocar siempre bien equilibradas las cargas (en forma simétrica) para evitar desgastes anormales de rodamientos y vibraciones excesivas en las subidas y bajadas de velocidad.

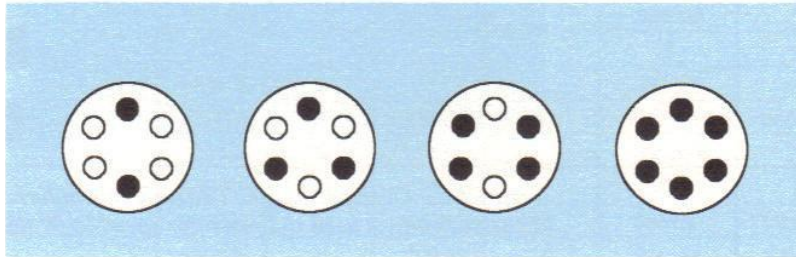


Fig. N° 21. Disposición de los tubos de manera equilibrada. *L.Rodríguez, Manual de bioquímica Farmacéutica. 2008.*

Existen 2 tipos de rotores:

**De ángulo fijo:** Los tubos se alojan con un ángulo fijo respecto al eje de giro. Se usan habitualmente para volúmenes grandes. Los rotores de ángulo fijo se emplean principalmente para sedimentar materiales hasta que formen una masa muy compacta en el fondo del tubo (pellet) y después por decantación, separar fácilmente el sobrenadante del sedimento. Resultan muy eficaces para este propósito debido a que el material se mueve únicamente un corto trecho hasta la pared del tubo de la centrifuga, aquí se acumula y resbala rápidamente hasta el fondo del tubo.

**Basculantes:** Los tubos se hallan dentro de unos cestillos que cuelgan. Estos cestillos están unidos al rotor con un eje y cuando la centrifuga gira, se quedan suspendidos en dirección perpendicular a la del rotor. Se usan en la centrifugación zonal (o en bandas) a través de gradientes de densidad preformados (normalmente de sacarosa o glicerol) o bien para separar partículas con coeficientes de sedimentación muy similares.

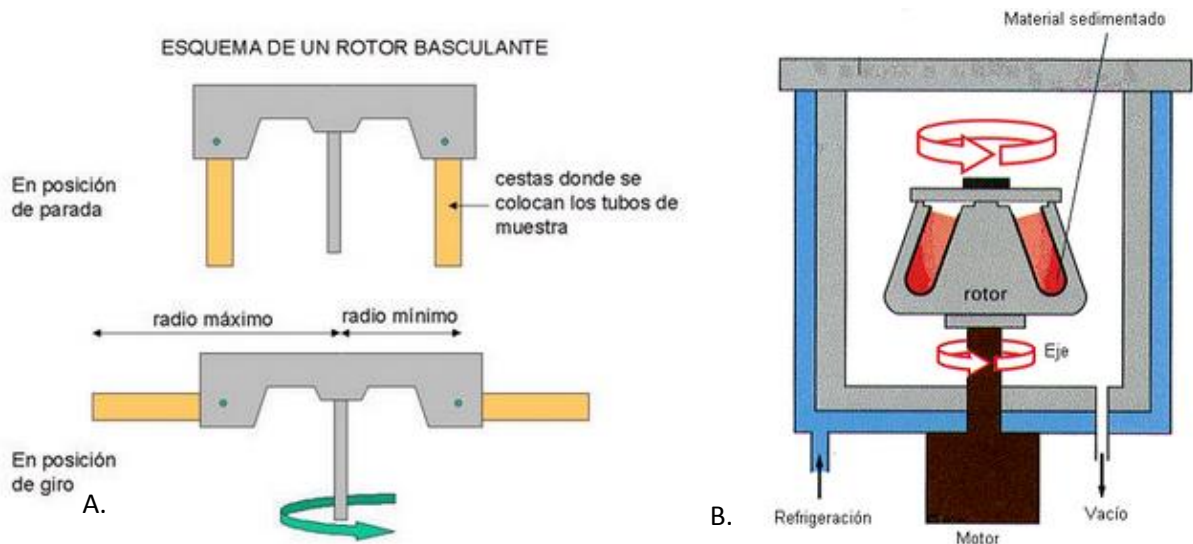


Fig. N° 22. A. Centrifuga de rotor basculante. B. Centrifuga de ángulo fijo. *L.Rodríguez, Manual de bioquímica Farmacéutica. 2008.*

Hay diferentes tipos de centrifugadoras **según el rango de velocidades de giro:**

A. Centrifugas de baja velocidad: también conocidas como de sobremesa o clínicas. De pequeño tamaño y normalmente sin refrigeración. Alcanzan una velocidad máxima de 6.000 r.p.m. Útiles para la separación de partículas grandes como células o precipitados de sales insolubles.

Las centrifugas microfuge o biofuge serían una variante de las anteriores que permiten llegar a velocidades de hasta 13.000 r.p.m, siendo los volúmenes de trabajo muy pequeños (microtubos) y pudiendo ser refrigeradas o no. Son útiles en el campo de la biología molecular.

B. Centrifugas de alta velocidad: Alcanzan velocidades máximas entre 18.000 y 25.000 r.p.m (pueden generar alrededor de 60.000 g). Son refrigeradas y normalmente tienen sistema de vacío para evitar el calentamiento del rotor a causa del roce con el aire. Este mismo sistema de vacío permite que puedan tener un control más exacto de la temperatura que aquellas que no hacen vacío. Son útiles en la separación de fracciones celulares, pero insuficientes para la separación de ribosomas, virus o macromoléculas en general.

C. Ultracentrífugas: Superan las 50.000 r.p.m, por lo que tienen sistemas auxiliares de refrigeración para refrigerar no sólo la cámara del rotor donde están las muestras sino también el motor y además sistemas de vacío para alcanzar un altísimo nivel de vacío. Pueden generar más de 600.000 g, las cuales son suficientes para separar proteínas pequeñas. Las ultracentrífugas se dividen en: **analíticas y preparativas**. La diferencia más importante entre ellas es que la **analítica** cuenta con un sistema óptico para visualizar la sedimentación de la muestra en tiempo real lo que permite la obtención de datos precisos de propiedades de sedimentación (coeficientes de sedimentación, pesos moleculares) siendo éste el objetivo primordial y no la purificación de la muestra para un uso posterior, que sí sería el objetivo de la **preparativa**, útil para aislar partículas de bajo coeficiente de sedimentación (microsomas, virus, macromoléculas), siendo este tipo el inmensamente mayoritario de ultracentrífuga.

## **HIPOTESIS**

Existen diferencias estructurales en la composición del coágulo de fibrina según diferentes protocolos de centrifugación utilizando la centrífuga marca Merckel, modelo VWR Clinical 200.

## **OBJETIVO GENERAL**

Establecer un protocolo de centrifugado propio para la Universidad de Valparaíso utilizando la centrífuga marca Merckel modelo VWR® Clinical 200 para la obtención de Fibrina rica en plaquetas que favorezca el procedimiento de revascularización pulpar.

## **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Comparar tres protocolos de centrifugación a través del estudio del número de sus elementos figurados obtenidos en la fibrina rica en plaquetas.
- Cuantificar las plaquetas y glóbulos blancos antes y después del centrifugado mediante un hemograma.
- Determinar las características biológicas del coágulo de fibrina para ser utilizado en endodoncia regenerativa.

# MATERIAL Y MÉTODO

## Diseño del estudio

Este estudio corresponde a un Estudio descriptivo.

## Universo y el tamaño de la muestra

- Universo: Personas de entre 18 y 24 años.
- Población Objetivo: Personas de entre 18 y 24 años pertenecientes a la carrera de odontología de la Universidad de Valparaíso que cumplan con los criterios de exclusión.
- Muestra: 23 personas calculadas según la fórmula de muestreo aleatorio simple.

Esto se basa en el cálculo de la menor cantidad posible de datos que a la vez sean representativas para estimar los valores de una población mayor. La fórmula esta desglosada en dos partes:

$$1) n_0 = \frac{z^2 * \sigma^2}{e^2}$$

Donde z es valor de tabla buscado en la distribución normal para la confianza deseada, en este caso se trabajara con 95% de confianza y el z toma el valor de 1,96;  $\sigma$  es la varianza de estudio se recomienda trabajar con el valor que maximiza la muestra para así tener el mejor valor de  $n_0$  y este es 0,5; e se define como el error deseado, en este caso mediremos con un error de 0,2.

$$2) n = \frac{n_0}{1 + \frac{(n_0 - 1)}{N}}$$

Donde N es el tamaño de la población objetivo en nuestro caso lo aproximamos a 500 personas.

Por lo tanto se tiene que:

$$n_0 = \frac{1,96^2 * 0,5^2}{0,2^2} = 24,01$$

$$n = \frac{24,01}{1 + \frac{23,01}{500}} = 22.95367 \approx 23 \text{ personas}$$

### **Criterios de exclusión**

- No ser estudiantes de la facultad de odontología de la Universidad de Valparaíso.
- No estar en el rango de edad de 18-24 años.
- Presentar algún tipo de patologías sanguíneas (Anemia, enfermedad Von Willebrand, Leucemia, trombocitopenia, déficit de vitamina K, etc.)
- Haber tomado aspirina dentro de 7 días ni otros medicamentos que alteren la coagulación.
- Estar embarazada.
- Estar bajo tratamiento de AINES.

### **VARIABLES A MEDIR**

#### VARIABLES PRIMARIAS:

- Velocidad de centrifugación (g).
- Tiempo de centrifugación.
- Número estimado de plaquetas cuantificadas luego de centrifugación.
- Número estimado de glóbulos blancos cuantificadas luego de centrifugación.

#### VARIABLES SECUNDARIAS:

- Sexo.
- Edad.
- Número estimado de elementos figurados inicial presentes en la sangre de cada paciente.

## Definiciones

<b>Nombre variable</b>	<b>Definición conceptual</b>	<b>Definición operacional</b>	<b>Tipo de variable</b>
Velocidad centrifugación	Distancia recorrida por diferentes objetos que se mueven en torno a un eje en un tiempo determinado.	Revoluciones por minuto que el operador programe en la centrífuga al momento de realizar el procedimiento.	<b>Cuantitativa continua</b>
Tiempo centrifugación	Magnitud física con la que se mide una serie de acontecimientos.	Minutos que el operador ordene en la centrífuga para programar la duración del procedimiento de centrifugado de muestras.	<b>Cuantitativa continua</b>
N° elementos figurados inicial en sangre de cada paciente	Cantidad de plaquetas, glóbulos rojos y blancos presentes en la sangre.	Cantidad de plaquetas, glóbulos rojos y blancos obtenidas a partir de un hemograma del paciente	<b>Cuantitativa discreta</b>
N° plaquetas estimadas cuantificadas luego de centrifugación	Cantidad de plaquetas concentradas en la parte media del tubo luego de la centrifugación.	Diferencia entre el número de plaquetas inicial y el obtenido del tubo luego de extraerle la fibrina rica en plaquetas.	<b>Cuantitativa discreta</b>
N° gl. Blancos estimados cuantificadas luego de centrifugación	Cantidad de gl. Blancos concentrados en la parte media del tubo luego de la centrifugación.	Diferencia entre el número de gl. Blancos inicial y el obtenido del tubo luego de extraerle la fibrina rica en plaquetas.	<b>Cuantitativa discreta</b>
N° plaquetas estimadas cuantificadas luego de centrifugación	Cantidad de gl. Rojos concentrados en la parte media del tubo luego de la centrifugación.	Diferencia entre el número de gl. Rojos inicial y el obtenido del tubo luego de extraerle la fibrina rica en plaquetas.	<b>Cuantitativa discreta</b>
Sexo	Género sexual.	Femenino o masculino. Observado en la cédula de identidad de los participantes.	<b>Cualitativa dicotómica</b>
Edad	Tiempo que ha vivido una persona.	Expresado en años.	<b>Cuantitativa discreta</b>

Tabla N°I: definición de variables.

## Procedimiento a realizar

Se seleccionarán 23 personas voluntarias que cumplan con los criterios del estudio, serán citados en diferentes días y horarios al laboratorio Cheúl Etcheverry ubicado en Viña del Mar, se opta por este laboratorio debido a que el Dr. Jorge Torres, profesor de la cátedra de microbiología y cirujano dentista, trabaja con ellos para la obtención de PRP.

En el laboratorio los técnicos paramédicos que trabajan ahí, le tomarán las muestras a los pacientes, corresponde a 5 ml de sangre aproximadamente, la sangre será depositada en un tubo de vidrio marca Vacutainer con o sin anticoagulante según sea el caso, el procedimiento se realizará de la siguiente manera:

- Primero se tomará una muestra de sangre la que será analizada mediante un hemograma, para poder realizar este procedimiento la sangre será colectada en un tubo Vacutainer con anticoagulante tipo EDTA. El hemograma será realizado inmediatamente en la máquina Valtek BC-5380.
- Luego se tomara la segunda muestra de sangre en tubos Vacutainer sin anticoagulante para realizar el primer protocolo de centrifugación, **4.000 r.p.m por 5 minutos**. Estos serán centrifugados inmediatamente luego de su obtención.
- Pasados los 5 minutos se procederá a realizar la segunda toma de muestra de sangre la que será centrifugada luego de su obtención a **3.000 r.p.m por 10 minutos**.
- Finalmente, será obtenida la cuarta muestra a la cual se le hará el mismo proceso de centrifugación pero a **2.000 r.p.m por un tiempo de 15 minutos**.

Después de terminar con la etapa de centrifugación de cada una de las muestras, se procederá a extraer el líquido sobrenadante de cada uno de los tubos centrifugados. Esto se realizará utilizando una pipeta, el sobrenadante obtenido será depositado en los tubos Vacutainer con anticoagulante para su posterior análisis de hemograma. Los resultados obtenidos serán tabulados y analizados posteriormente.

El resultado del hemograma nos entregará el conteo plaquetario y leucocitario inicial de cada paciente, posterior a cada centrifugado se forma un precipitado de glóbulos rojos, fibrina y un sobrenadante pobre en plaquetas. El sobrenadante obtenido será sometido a un nuevo hemograma para lograr cuantificar cuántas plaquetas y leucocitos tiene, por lo tanto, se asumirá que el resto de estos elementos estarían dentro del coágulo de fibrina.

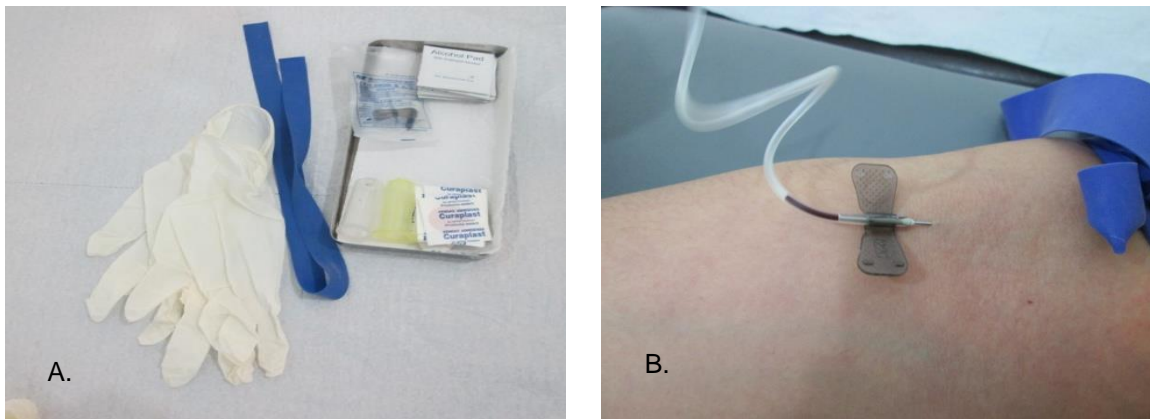


Fig. N°23: A. Materiales para la toma de sangre. B. Procedimiento de toma de sangre realizado por las alumnas tesistas en el laboratorio Cheúl Etcheverry.

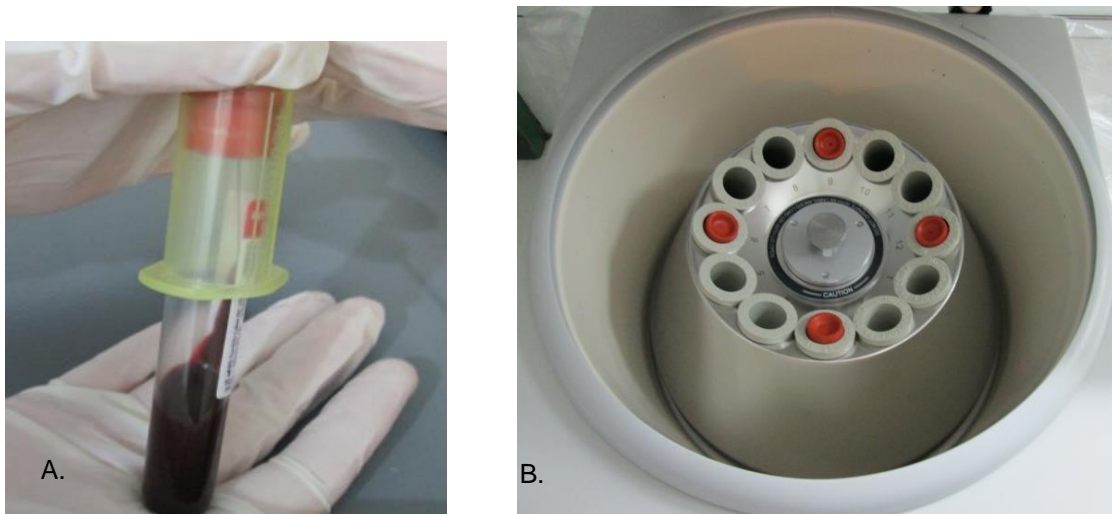


Fig. N° 24: A. Recolección de 5 ml de sangre en tubos Vacutainer. B. Disposición de los tubos con sangre dentro de la centrifuga Merkel.

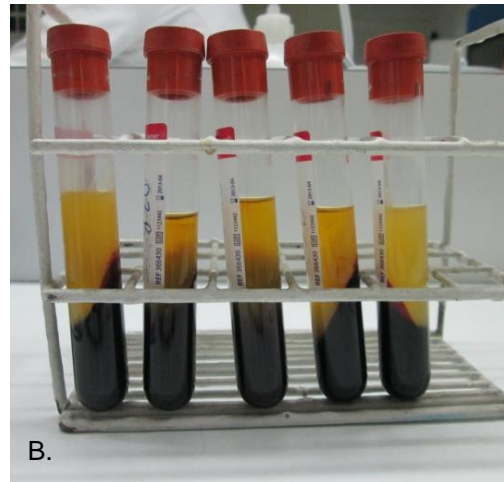


Fig. N° 25: A. Centrífuga Merckel modelo VWR Clinical 200. B. Tubos Vacutainer post centrifugación.

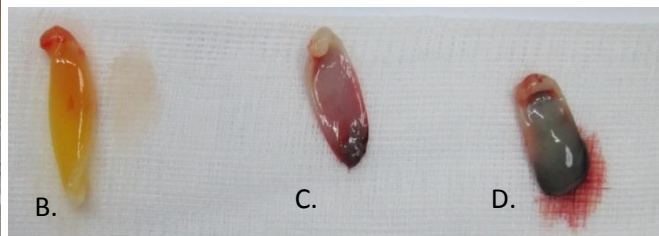
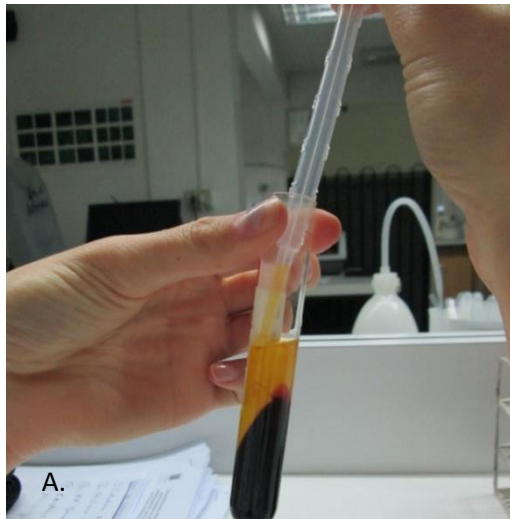


Fig. N° 26: A. Proceso de obtención a través de una pipeta del sobrenadante del tubo centrifugado, B. coágulo obtenido del protocolo de 4.000 r.p.m por 5 minutos, C. Coágulo obtenido del protocolo de 3.000 r.p.m por 10 minutos, D. coágulo obtenido del protocolo de 2.000 r.p.m por 15 minutos.

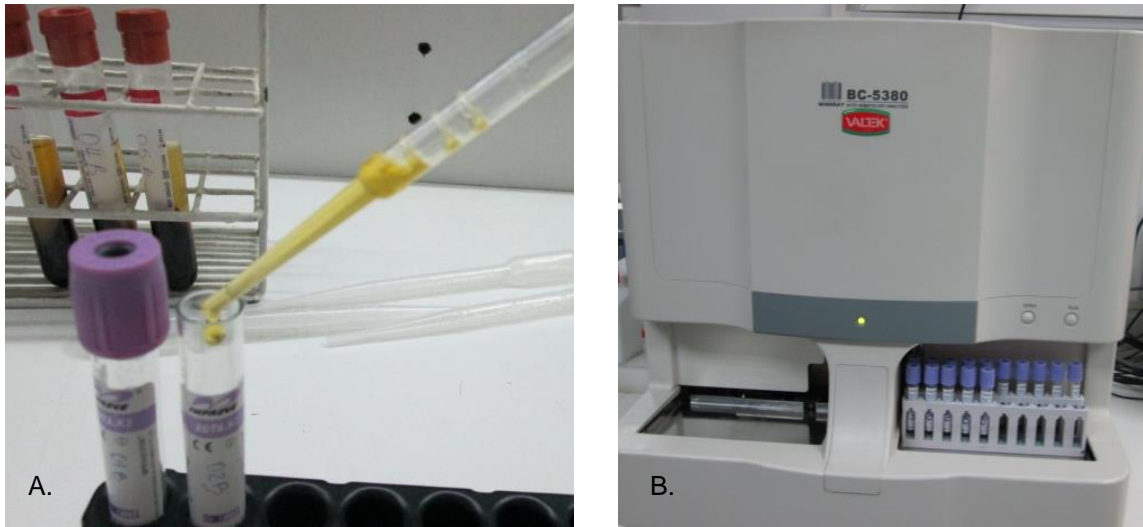


Fig. N° 27: A. Procedimiento en el que se preparan los tubos con el sobrenadante para ser analizados en el hemograma. B. Análisis de hemograma.

### **Sesgos y a las limitaciones del estudio**

Algunos de los problemas que se pueden presentar en el estudio son:

- Mala calibración de la máquina que realiza el hemograma: para esto se debe verificar que se le realice en las mañanas antes de su uso con pacientes la calibración indicada por los fabricantes.
- Que los pacientes no lleguen el día del procedimiento o que lleguen tarde: llamar el día antes para confirmar a cada voluntario su asistencia y recordarles la hora, aparte daremos intervalos de 10 minutos entre las citas de cada uno.
- Paciente que se retire de la investigación: la participación es voluntaria y cada persona puede retirarse cuando quiera del estudio, por lo tanto, se procederá a la elección de alguien más.
- No realizar la centrifugación inmediatamente después de tomada la muestra.
- Dentro del procedimiento de centrifugación existe la posibilidad de que el tubo de vidrio se rompa y se pierda la muestra.

Durante la realización del estudio el problema principal fue la ruptura de 4 de los 6 tubos puestos en la centrifuga en el protocolo 1 (4.000 r.p.m por 5 minutos), para confirmar que esto se debe a la centrifugación realizamos el mismo

procedimiento pero esta vez con suero en los 12 tubos, de éstos se quebraron 9, es por esta razón que se decidió eliminar el protocolo del estudio.

## Plan de trabajo y cronograma

Actividades	2013	2014						
	Septiembre	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Diciembre
Realización del protocolo definitivo de investigación								
Evaluación docente y corrección de errores								
Desarrollo de encuestas y evaluación								
Realización de Pretest								
Realización del estudio y recolección de datos								
Organización y registro de los datos en Excel								
Resultados								
Análisis de los datos								
Presentación de los datos obtenidos								
Discusión y conclusiones								
Entrega de Tesis								
Defensa de Tesis								

# RESULTADOS

## Descripción del software

El análisis estadístico se llevará a cabo en el software SPSS versión 20, los valores obtenidos fueron tabulados para facilitar su comprensión y se muestran en las siguientes tablas y gráficos. Además se realizarán las pruebas de hipótesis necesarias para la comparación de los tratamientos.

## Análisis de resultados

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos Femenino	11	55,0	55,0	55,0
Masculino	9	45,0	45,0	100,0
Total	20	100,0	100,0	

Tabla II: Distribución por sexo de los participantes del estudio.

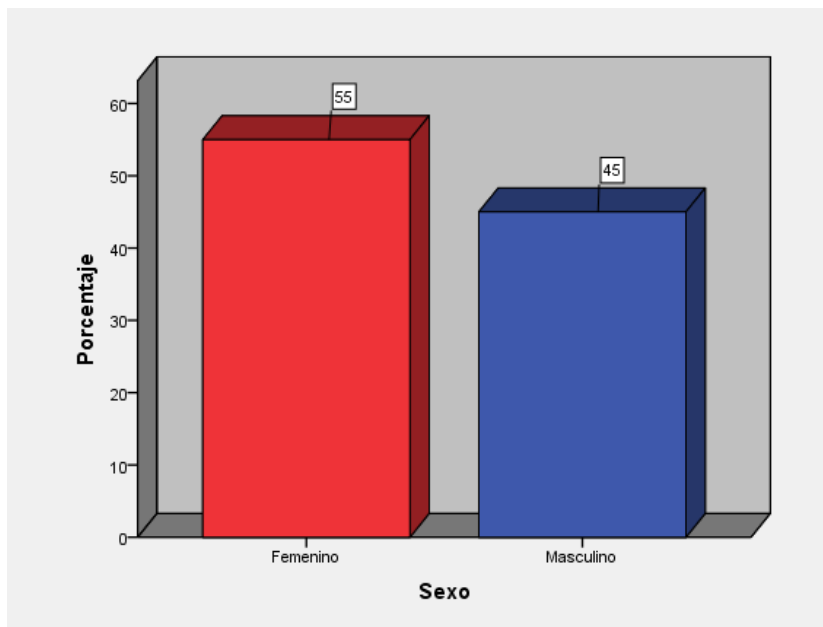


Gráfico 1: Distribución por sexo de los participantes del estudio.

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar
Edad	20	19	24	21,80	1,542
N° plaquetas inicial	20	201000	403000	292800,00	69435,013
N° plaquetas sobrenadante 1	20	0	1000	55,05	222,993
N° plaquetas sobrenadante 2	20	0	90	13,05	26,353
N° gl. Blancos inicial	20	4930	13490	7996,00	2199,295
N° gl. Blancos sobrenadante 1	20	0	90	16,05	23,451
N° gl. Blancos sobrenadante 2	20	0	70	24,50	25,021
N válido (según lista)	20				

Tabla III: valores descriptivos de variables cuantitativas.

Se observa una tabla con los valores descriptivos de cada una de las variables cuantitativas del estudio, destacando N como el número de observaciones vistas (tubos no quebrados), el mínimo, el máximo, la media o promedio de los datos y su desviación estándar que representa parte de la variabilidad de los datos.

Se decide aplicar el test de W de Kendall para la comparación múltiple de los tres elementos y se aplica el test de Wilcoxon para cuando se decide hacer de a dos elementos a la vez, estos tests se aplican porque los datos que estamos evaluando no se distribuyen de forma normal donde el valor P nos dio un valor muy cercano a 0 y, por lo tanto, debemos aplicar alguna prueba no paramétrica como las mencionadas.

### Prueba W de Kendall

N	20
W de Kendall	0,876
Chi-cuadrado	35,043
Grados de libertad	2
P valor.	0,000

Tabla IV: Estadísticos de contraste para plaquetas.

El coeficiente de concordancia de Kendal nos hace ver que los datos si concuerdan (mientras más cercano a 1 los datos concuerdan, por lo tanto, los datos

son coherentes), pero no son estadísticamente iguales, por esto observamos que el valor P es muy cercano a 0 y con esto debemos asumir que si existen diferencias significativas entre los tres procesos y que el número de plaquetas cambia considerablemente del inicial a de los sobrenadantes.

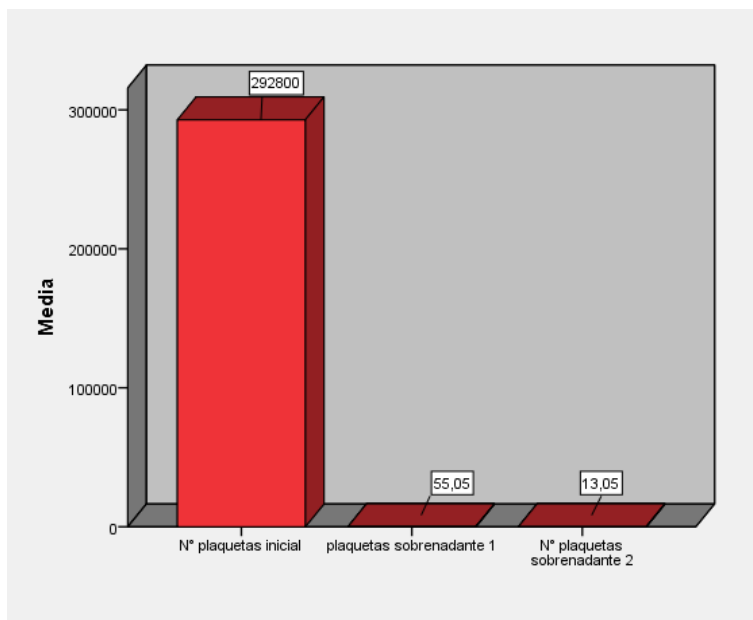


Gráfico 2: Comparación de número de plaquetas inicial con sobrenadantes.

N	20
W de Kendall <sup>a</sup>	0,795
Chi-cuadrado	31,818
Grados de libertad	2
P valor	0,000

Tabla V: Estadísticos de contraste Gl. Blancos.

Tal como en el caso anterior podemos ver que sí, los datos concuerdan pero no son estadísticamente iguales, por lo que lo observamos en la significancia asintótica expresada en el valor P que toma un valor muy cercano a 0 y con esto debemos asumir que si existen diferencias significativas entre los tres procesos y que el número de de glóbulos blancos cambia considerablemente como en el caso anterior.

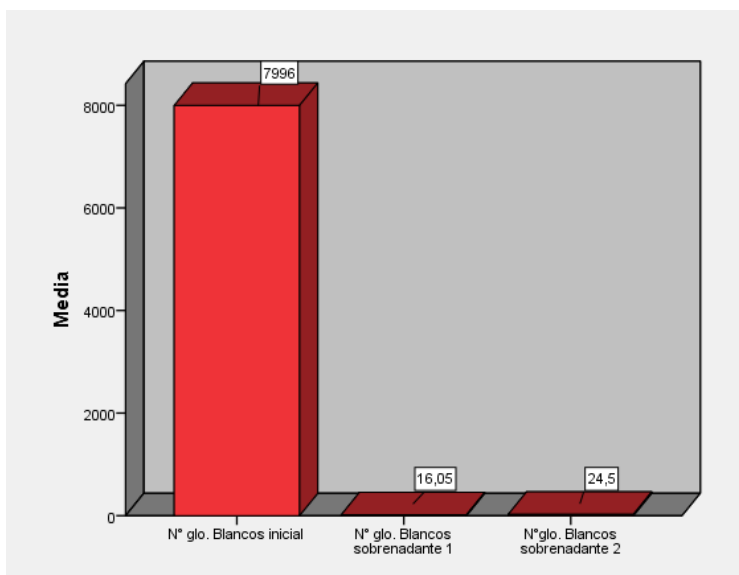


Gráfico 3: comparación de número inicial de glóbulos blancos al número después de centrifugado.

### Prueba de Wilcoxon

	plaquetas sobrenadante 1 / N° plaquetas inicial	N° plaquetas sobrenadante 2 / N° plaquetas inicial	N° plaquetas sobrenadante 2 / plaquetas sobrenadante 1	N° glo. Blancos sobrenadante 1 / N° glo. Blancos inicial	N° glo. Blancos sobrenadante 2 / N° glo. Blancos inicial	N° glo. Blancos sobrenadante 2 / N° glo. Blancos sobrenadante 1
Z	-3,920 <sup>b</sup>	-3,920 <sup>b</sup>	-0,595 <sup>c</sup>	-3,920 <sup>b</sup>	-3,920 <sup>b</sup>	-1,644 <sup>c</sup>
Valor P	0,000	0,000	0,552	0,000	0,000	0,100

Tabla VI: Resultados de la prueba de Wilcoxon, para comparación entre los sobrenadantes de plaquetas.

Se calcula en base a la media, si el valor va sobre la media es positivo, si va bajo la media es negativo.

Acá podemos apreciar que significativamente el que siempre hace la diferencia es el número inicial de cada grupo ya sea plaquetas o glóbulos blancos, ya que como apreciamos en ambos grupos tenemos que al pasar por un centrifugado se presenta

que los grupos son estadísticamente iguales esto lo vemos basándonos en el valor p que al comparar con las plaquetas iniciales este es inferior al 0,05 y al comparar los dos centrifugados notamos que este es superior, por esto podemos concluir que ambos centrifugados son estadísticamente iguales.

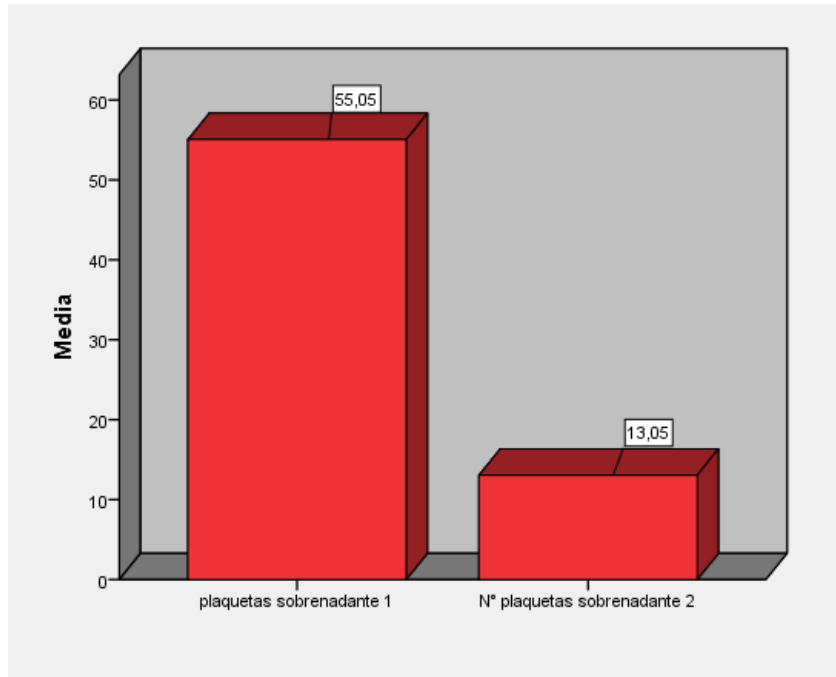


Gráfico 4: Comparación entre el número de plaquetas de los sobrenadantes.

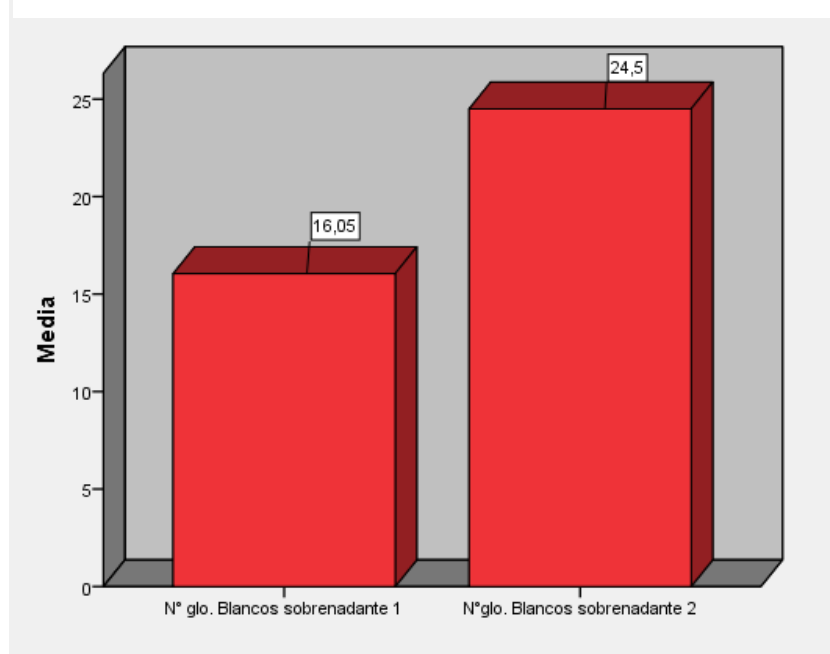


Gráfico 5: Comparación entre el número de Glóbulos Blancos de los sobrenadantes.

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
Dif_pla1	20	201000,00	402000,00	292744,9500	69345,83219
Dif_pla2	20	201000,00	402930,00	292786,9500	69421,78590
Dif_glo1	20	4930,00	13490,00	7979,9500	2200,65566
Dif_glo2	20	4930,00	13490,00	7971,5000	2198,66532
N válido (según lista)	20				

Tabla VII: Resumen de las diferencias entre las plaquetas y glóbulos blancos iniciales y sus centrifugados. Donde, Dif\_pla1= N° Plaquetas iniciales – Sobrenadante1, Dif\_pla2= N° Plaquetas iniciales – Sobrenadante2, Dif\_glo1= N° Globulos iniciales – Sobrenadante1, Dif\_glo2= N° Globulos iniciales – Sobrenadante2.

A continuación, se observan los valores descriptivos de la diferencias, con estos resultados se realiza la prueba de Wilcoxon (Tabla VIII), el resultado del P valor es mayor a 0,05 tanto para plaquetas como para leucocitos, lo que quiere decir que no hay diferencias significativas entre los resultados de la diferencia entre el conteo inicial y el posterior de los centrifugados 1 y 2 en ambos casos.

	Dif_pla2 - Dif_pla1	Dif_glo2 - Dif_glo1
Z	-,595 <sup>b</sup>	-1,644 <sup>b</sup>
P valor	0,552	0,100

Tabla VIII: Estadísticos de contraste, prueba de Wilcoxon.

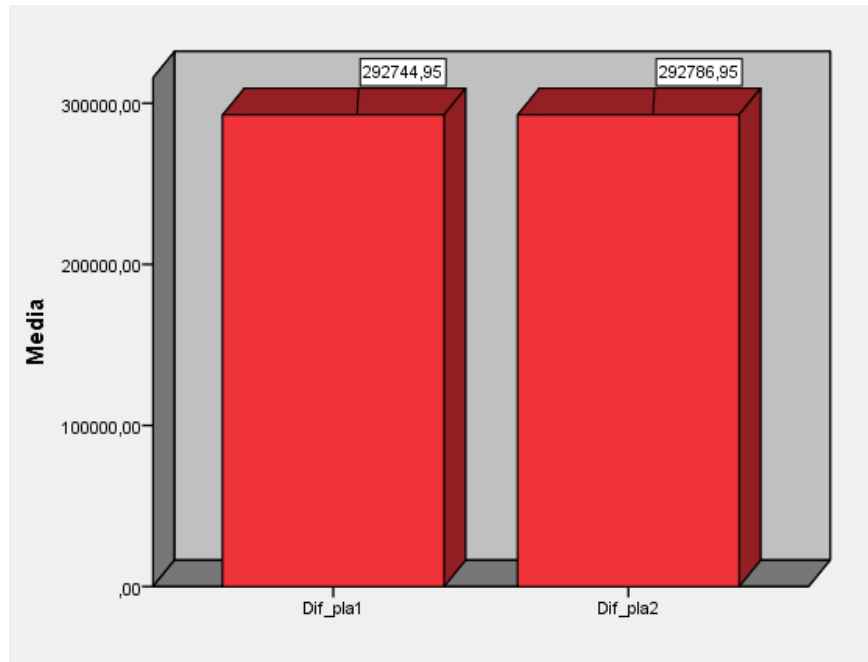


Gráfico 6: comparación entre la diferencia de plaquetas inicial menos sobrenadante 1 y la inicial menos sobrenadante 2.

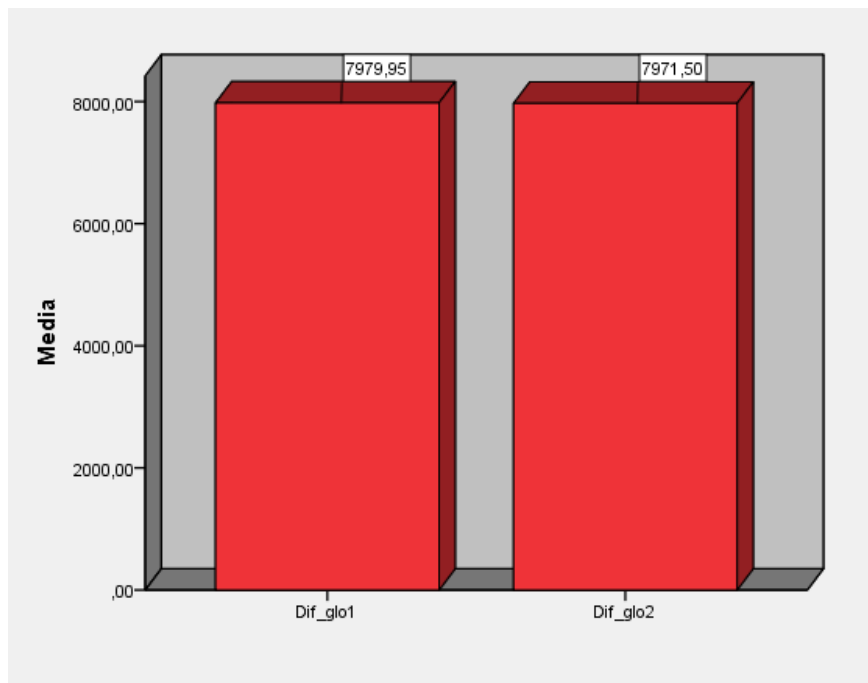


Gráfico 7: comparación entre la diferencia de glóbulos blancos inicial menos sobrenadante 1 e inicial menos sobrenadante 2.

Gráficamente tenemos que no existen diferencias significativas en las diferencias de las plaquetas y de los glóbulos blancos.

	Grupo Etario							
	G1				G2			
	Media	Mínimo	Máximo	Desviación típica	Media	Mínimo	Máximo	Desviación típica
N° plaquetas inicial	288.285,7	213.000,0	393.000,0	71.043,92	295.230,7	201.000,0	403.000,0	71.356,10
plaquetas sobrenadante 1	1,57	,00	10,00	3,74	83,85	,00	1.000,00	275,97
N° plaquetas sobrenadante 2	5,86	,00	30,00	11,26	16,92	,00	90,00	31,46

Tabla IX: Comparación número de plaquetas con respecto a los grupos etarios. \*G1 rango etario de 19 a 21 años, G2 rango etario de 22 a 24 años.

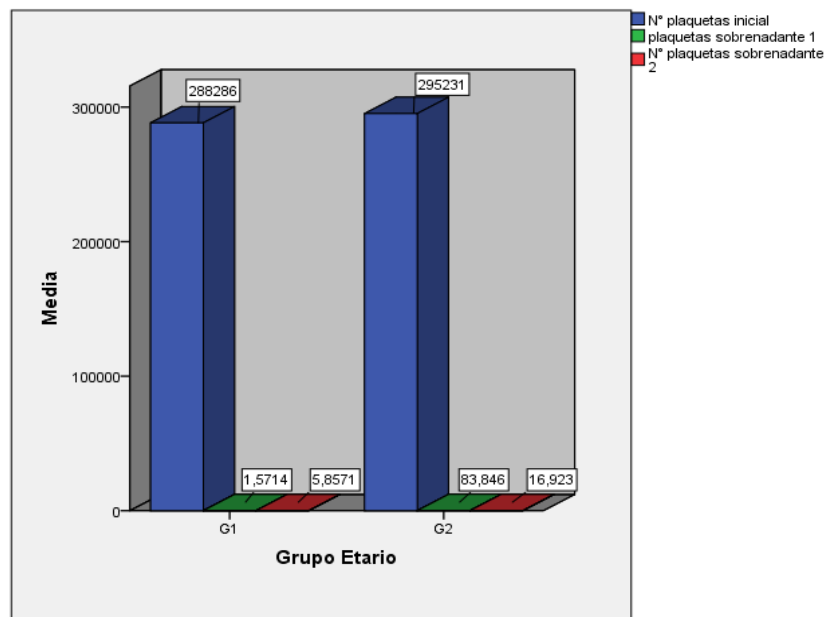


Gráfico 8: Comparación número de plaquetas con respecto a los grupos etarios.

	Grupo Etario*							
	G1				G2			
	Media	Mínimo	Máximo	Desviación típica	Media	Mínimo	Máximo	Desviación típica
N° glo. Blancos inicial	7.227,14	5.670,00	8.790,00	1.045,99	8.410,00	4.930,00	13.490,00	2.565,32
N° glo. Blancos sobrenadante 1	22,86	,00	90,00	32,51	12,38	,00	50,00	17,34
N° glo. Blancos sobrenadante 2	28,57	,00	60,00	26,10	22,31	,00	70,00	25,22

Tabla X: Comparación número de GI. Blancos con respecto a los grupos etarios. \*G1 rango etario de 19 a 21 años, G2 rango etario de 22 a 24 años.

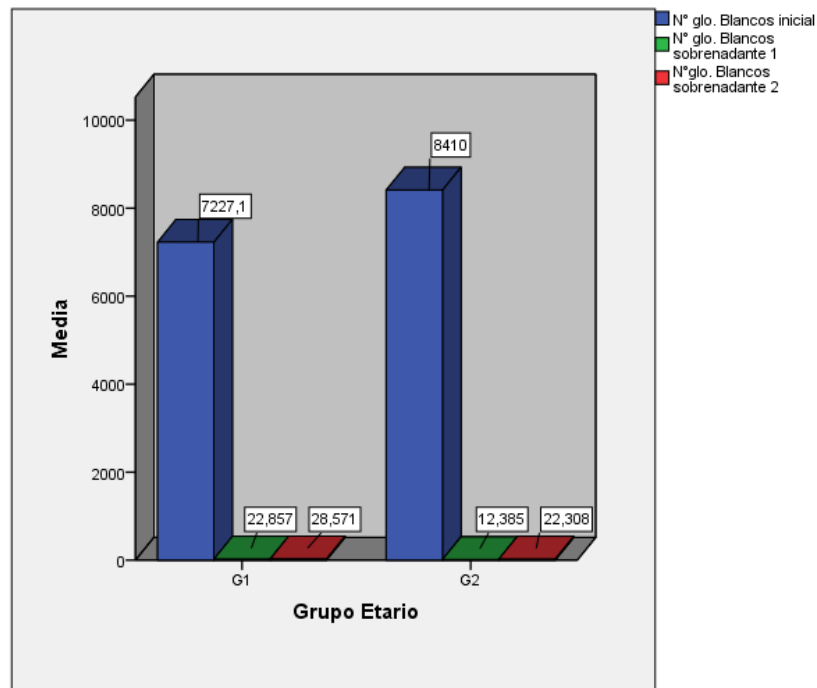


Gráfico 9: Comparación número de GI. Blancos pre y post centrifugación con respecto a los grupos etarios.

	Sexo							
	Femenino				Masculino			
	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo
N° plaquetas inicial	301364	72308	210000	403000	282333	68489	201000	401000
N° plaquetas sobrenadante 1	94	301	0	1000	8	23	0	70
N° plaquetas sobrenadante 2	15	25	0	70	11	30	0	90

Tabla XI: Comparación N° plaquetas obtenidas pre y post centrifugación según sexo.

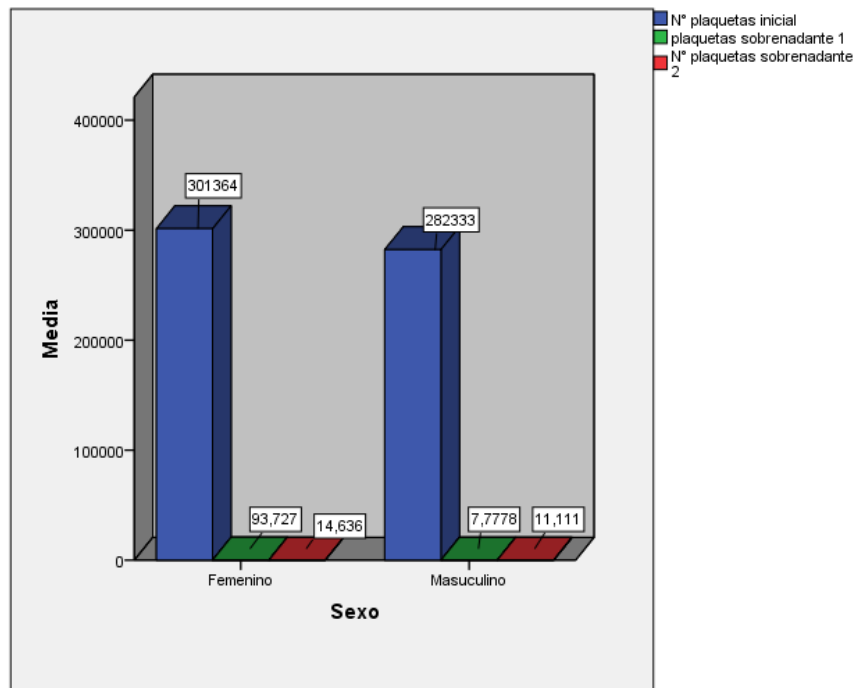


Gráfico 10: Comparación N° plaquetas obtenidas pre y post centrifugación según sexo.

	Sexo							
	Femenino				Masculino			
	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo
N° gl. blancos inicial	7853	2399	4930	13490	8171	2057	5070	12040
N° gl. blancos sobrenadante 1	13	27	0	90	20	19	0	50
N° gl. blancos sobrenadante 2	18	25	0	60	32	24	0	70

Tabla XII: Comparación de gl. blancos pre y post centrifugación según sexo.

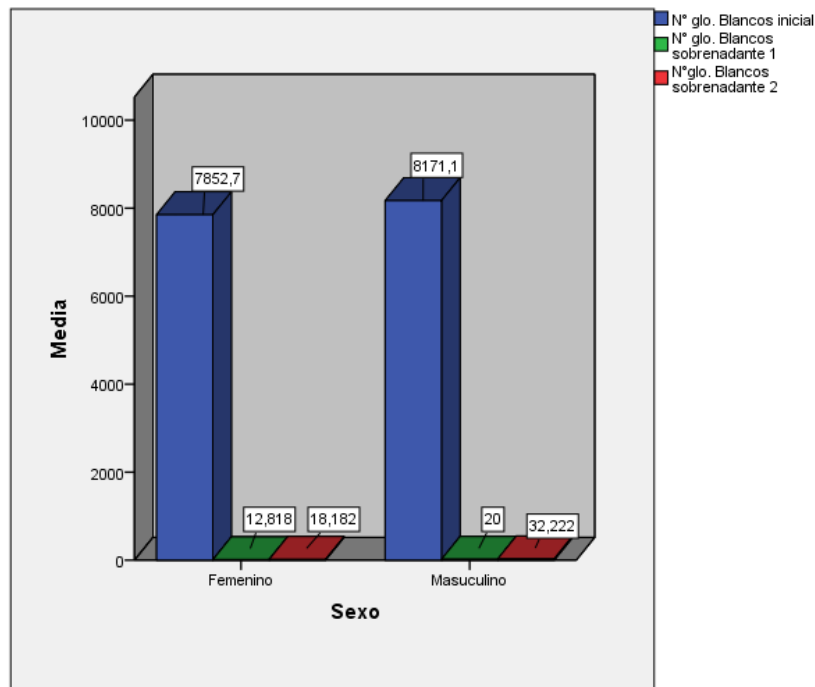


Gráfico 11: Comparación de gl. blancos pre y post centrifugación según sexo.

## DISCUSIÓN

Hasta la fecha se ha investigado bastante sobre los diferentes métodos de obtención de plasma rico en plaquetas, y muchos han demostrado que hay diferencias significativas entre los resultados obtenidos con los distintos protocolos de centrifugación, midiendo principalmente el número de plaquetas, glóbulos blancos, eritrocitos y factores de crecimiento luego de la centrifugación. También se han comparado diferentes sistemas de obtención que involucran centrífugas de distintas características, como tubos de materiales diferentes y distintos tipos de anticoagulantes.

El pionero en plantear un protocolo para fibrina rica en plaquetas fue Choukroun, quien definió centrifugar a 3000 r.p.m por 10 minutos. Muchos estudios posteriores probaron variar esta cifra, utilizar otros sistemas y tubos de diferentes características con el fin de encontrar el protocolo que logre obtener las mejores propiedades biológicas, el mayor número de plaquetas, la integridad de éstas, que contenga leucocitos y baja cantidad de glóbulos rojos, además de que sea una malla de fibrina homogénea en el tamaño y cantidad de poros.

En un estudio de David M. Dohan, et al. (2010) se analizan las diferencias entre los coágulos de fibrina obtenidos en tubos de plástico y vidrio luego de una centrifugación a 3.000 r.p.m por 10 minutos. Las muestras de sangre fueron tomadas a 10 voluntarios hombres entre los 20 y 55 años de edad que no tomaran medicamentos que pudiesen interferir con la coagulación. Inmediatamente después de la obtención de la muestra ésta es centrifugada a las revoluciones mencionadas anteriormente. Los coágulos obtenidos son separados de los glóbulos rojos utilizando pinzas estériles y puestos en recipientes metálicos.

Todas las muestras fueron centrifugadas de la misma manera y se analizó el plasma o sobrenadante que queda en los tubos posterior a la centrifugación mediante un hemograma. Se concluye que aproximadamente un 97% de las plaquetas y leucocitos están inmersos en la red de fibrina (esto debido a que están ausentes en el sobrenadante), dentro de los resultados también encuentran que no

hay diferencias en los coágulos ni sobrenadantes obtenidos en los tubos de vidrio y plástico. Para el conteo de plaquetas y leucocitos se toma el plasma pobre en plaquetas y se somete a un hemograma. Se concluye que no hay diferencias significativas entre los elementos residuales posterior a la formación del coágulo obtenido mediante tubos de vidrio o plástico. Sí se genera una diferencia significativa entre el hemograma de sangre sin centrifugar y la analizada luego de la formación del coágulo, ésta última muestra tener un mínimo conteo de plaquetas y leucocitos, asumiendo entonces la concentración de estos elementos dentro de la fibrina rica en plaquetas.

Nuestro estudio se lleva a cabo para analizar las diferencias entre distintas velocidades y tiempos de centrifugados utilizando en todas las muestras los mismos tubos (Vacutainer de vidrio sin anticoagulante para la centrifugación y con anticoagulante EDTA para el análisis de hemograma), sin embargo la metodología de toma y análisis de las muestras es la misma. Los 23 voluntarios fueron escogidos según un muestreo aleatorio simple, estas personas debían cumplir con los criterios de inclusión del estudio, una de las diferencias que el rango de edad de nuestra investigación fue de 19 a 24 años aproximadamente mientras que el de Dohan, et al. fue un rango mucho más amplio, a su vez ellos consideran solamente hombres mientras que nuestro estudio fue mixto. Esto no supone mayores diferencias ya que los conteos de leucocitos y plaquetas no varían según el sexo ni en el rango de edad mencionado anteriormente, siendo que sí hay diferencias en el conteo de ambos a edades más tempranas.

Tanto en este estudio como en el realizado por D. Dohan y et al. se observó una disminución considerable de plaquetas y leucocitos al extraer el coágulo del tubo, asumiendo que éstos se concentran dentro de la matriz de fibrina.

Magalon et al, 2014 indican que los concentrados plaquetarios deben tener una concentración de 1 a 6 veces la cantidad inicial de plaquetas y al menos un 50% más de leucocitos en relación a la cantidad de glóbulos blancos del paciente. Vemos que con ambos protocolos estos parámetros se cumplen.

Lo más estudiado hasta el momento ha sido la diferencia que existe en el PRP obtenido mediante diferentes protocolos de centrifugación, se han encontrado diferencias tanto en la marca y modelo de la centrífuga como en el número de centrifugados y en la velocidad y tiempo de éstos.

En un estudio de García L. A, et al. (2005) se investigaron cuatro protocolos diferentes de centrifugación para obtener plasma rico en plaquetas, estos difieren en el número de centrifugados, la velocidad y tiempo de los mismos. El primer protocolo utilizado fue el propuesto por Anitua y Andía (2000) de 1800 r.p.m por 8 minutos, el segundo corresponde al propuesto por Obarrio et al. (2000) de 5600 r.p.m por 6 minutos, ambos sin recentrifugado del plasma. El tercer protocolo analizado fue el de Camargo et al. (2002) de 2400 r.p.m por 10 minutos y el último fue el propuesto por García et al. (2005) de 1800 r.p.m por 8 minutos, estos últimos con recentrifugados de 3600 r.p.m por 15 min y 1800 r.p.m por 8 minutos respectivamente. Los resultados del estudio muestran que hay un mayor número de plaquetas presentes en el PRP obtenidas mediante el protocolo de García y col, seguido por el de Anitua y Andía.

Cynthia P. Vendruscolo et al. 2012, compararon 10 protocolos (la fuerza está expresada en  $g$  y el tiempo en minutos) previamente establecidos, utilizando tubos con anticoagulante citrato de sodio a 3,25%, y luego evaluaron el número de plaquetas, eritrocitos y leucocitos. Los resultados revelaron que una menor fuerza centrífuga concentran una mayor cantidad de plaquetas ( $p < 0,05$ ), esta concentración plaquetaria no varía en función del tiempo que tome la centrifugación. Sin embargo, el tiempo si afecta el número de leucocitos, a menor tiempo se genera la mayor concentración de estas células. Los protocolos estudiados fueron analizados mediante ELISA y se concluye que no hay diferencias significativas en la cantidad de TNF  $\beta$  ( $p > 0,05$ ).

Magalon J, et al. 2014, compararon PRP mediante 4 sistemas de preparación y un protocolo desarrollado en su laboratorio. Se evaluó el número de las plaquetas, de glóbulos blancos, las concentraciones de células rojas de la sangre y el estado

de activación de las plaquetas mediante citometría de flujo. Se determinó que si existe diferencia significativa en los diferentes sistemas utilizados, siendo el Sistema Mini GPS III (3.200 r.p.m por 15 minutos) el que proporciona un PRP con una mayor proporción de glóbulos rojos, glóbulos blancos y neutrófilos. Las concentraciones más altas y dosis de plaquetas y factores de crecimiento se obtuvieron con el sistema de mini GPS III. Por otro lado diferentes protocolos de centrifugación no mostraron diferencias en los porcentajes de las plaquetas activadas. Por último, existió una correlación positiva entre la dosis de plaquetas y la de factores de crecimiento activados en este estudio.

Thorsten R. Appel, et al. 2002, compararon tres sistemas de preparación de concentrados de plaquetas Curasan Systems (2400 r.p.m por 10 minutos y luego 3600 r.p.m. por 15 minutos), PCCS (3000 r.p.m. por 3,45 min y luego 3000 r.p.m. por 13 min) y un procedimiento usado comúnmente en laboratorios de medicina, donde realizan solo una centrifugación suave. Los tres sistemas mostraron una disminución del número de plaquetas luego de la centrifugación, siendo el sistema Curassan el que concentra un mayor número de plaquetas final, seguido del sistema PCCS y el sistema de centrifugación suave. Este mismo orden presentaron los conteos de leucocitos y factores de crecimiento luego de las centrifugaciones.

Estos estudios nos indican que si existen diferencias entre las diferentes marcas y modelos de centrifugas como en los tiempos y velocidades de centrifugación. Siendo la obtención de la fibrina rica en plaquetas prácticamente idéntica a la del plasma rico en plaquetas es posible suponer la diferencia existente entre los diferentes protocolos de centrifugación, así como las marcas de centrifugas presentes en el mercado. Es por esta razón que se hace necesario un estudio que permita analizar las posibles diferencias entre coágulos obtenidos mediante los protocolos más utilizados hasta el momento como lo son los estudiados en esta investigación.

A pesar a que todos los estudios mencionados muestran diferencias significativas entre los métodos utilizados, nuestro estudio no arrojó variaciones entre los protocolos estudiados. Esto podría deberse a la pequeña variación en velocidad y

tiempo entre los protocolos estudiados; de todas maneras es necesario comprobar esto mediante estudios que muestren de manera visual la estructura del coágulo como lo hace el microscopio electrónico de barrido.

En todos los casos la centrifugación genera una concentración de plaquetas y leucocitos, sin embargo, lo ideal es lograr concentrar la mayor cantidad de plaquetas y leucocitos posible para así lograr los mejores resultados clínicos en el menor tiempo posible.

Existiendo hasta la fecha un gran número de sistemas y protocolos de centrifugación, no se ha podido concluir cuál de estos es mejor que los demás. Es por esto que es necesario estudiar y determinar el mejor protocolo para cada centrifuga teniendo en consideración variables como tiempo, velocidad, velocidad de aceleración, tipo de rotor, etcétera.

## CONCLUSIÓN

La fibrina rica en plaquetas se conoce como una segunda generación de concentrados plaquetarios, consiste en un biomaterial autógeno compuesto por leucocitos, plaquetas y fibrina. Nació debido a la necesidad de encontrar un método más simple y con mejores propiedades, sin la necesidad de utilizar anticoagulantes, como lo es la generalmente utilizada, la trombina bovina para la obtención de plasma rico en plaquetas. Al ser un procedimiento más simple, rápido y menos costoso es ideal para el uso cotidiano por parte de los diferentes clínicos en la práctica médica y odontológica.

Gracias a su mecanismo de acción y sus resultados en los últimos años, ha sido ampliamente utilizado en todas las áreas de las ciencias de la salud, como un material autógeno que permite la regeneración tisular, siendo una nueva opción de tratamiento que fomenta las propiedades biológicas del funcionamiento de los distintos órganos así como la cicatrización.

En los últimos años se ha incorporado este material en diferentes especialidades de la Odontología tales como periodoncia, implantología, cirugía maxilofacial y endodoncia, entre otros.

En el área de la endodoncia, se ha estudiado este biomaterial en tratamientos regenerativos como la revascularización pulpar, dando resultados favorables, principalmente por lograr un crecimiento radicular tridimensional y el cierre del foramen apical.

Los resultados de este estudio demuestran que hay diferencias significativas entre el conteo de plaquetas y glóbulos blancos inicial y el conteo de los mismos presentes en los sobrenadantes estudiados. Esto se debe al gran número de elementos figurados en el hemograma inicial; que se ven considerablemente disminuidos luego de las centrifugaciones, por lo que se asume que quedarían concentrados dentro del coágulo de fibrina.

Al comparar dos protocolos de centrifugación (3.000 r.p.m. por 10 minutos y 2.000 r.p.m por 15 minutos) mediante el estudio del número de sus elementos figurados obtenidos antes y después del proceso de centrifugación, se concluye que no existen diferencias significativas en cuanto a la cantidad de plaquetas y leucocitos entre los dos sobrenadantes luego de su centrifugación en la centrífuga Merckel modelo VWR Clinical 200.

En base a esto, se rechaza la hipótesis de que existen diferencias significativas entre los resultados que arrojan ambos protocolos, ya que los dos resultan ser ricos en plaquetas y glóbulos blancos, es por esto que la decisión de cuál de los dos protocolos de centrifugación a utilizar para la centrífuga mencionada anteriormente, queda al criterio de cada clínico, dependiendo de factores, tales como, el tiempo, ya que un protocolo involucra 5 minutos menos que el otro y la probabilidad de que se rompan tubos en el proceso de centrifugación. De esta forma el protocolo de 3.000 r.p.m. por 10 minutos tiene la ventaja de ser más rápido y el de 2.000 r.p.m por 15 minutos es el que presenta una menor probabilidad de ruptura de tubos de vidrio durante el procedimiento.

Se concluye también que el protocolo de 4.000 r.p.m por 5 minutos para la centrífuga mencionada anteriormente se debe realizar con tubos de plástico y no de vidrio como se hizo en este estudio, ya que los de vidrio no resisten el roce y la fuerza generada.

Ambos coágulos cumplen con los parámetros mencionados anteriormente de concentrar entre 1 y 6 veces la concentración inicial de plaquetas del paciente, mientras mayor sea la cantidad de trombocitos dentro del coágulo se asume una mayor cantidad de factores de crecimiento liberados que permitirían la migración, proliferación y diferenciación celular. Pasa lo mismo con la concentración de leucocitos, la cual en ambos coágulos obtenidos supera al 50%, éstos tienen el rol de antimicrobianos naturales del organismo. De todas maneras antes de definir esto es necesario estudiar la arquitectura de la fibrina, la cantidad de factores de crecimiento liberados y la indemnidad celular post centrifugación.

## SUGERENCIAS

Es necesario realizar estudios que comparen la calidad biológica y estructural de los coágulos de fibrina obtenidos mediante protocolos de centrifugación diferentes como los evaluados en este estudio, ya que la mayoría de las investigaciones que hay hasta el momento son en base a plasma rico en plaquetas.

Se sugieren estudios posteriores que describan mediante microscopia electrónica de barrido u óptica confocal la arquitectura de la fibrina, la disposición de sus fibras, el tamaño de los poros y su homogeneidad después de su obtención mediante los protocolos propuestos en este estudio, ya que su estructura es primordial para la migración celular. Por otro lado es importante realizar el análisis de la disposición celular dentro de la malla de fibrina, como también la morfología plaquetaria junto con la de los leucocitos. A través del estudio morfológico de las plaquetas se puede determinar si es que éstas liberaron sus factores de crecimiento, ya que si los liberaron no estarían íntegras, durante este procedimiento o lo harán después en el interior del diente.

Se sugiere también realizar una investigación acerca de la cantidad de factores de crecimiento liberados posterior a las centrifugaciones mediante un análisis inmunohistoquímico. Ya que se asume que el mejor protocolo es en el que hay menor cantidad de factores de crecimiento libre, debido a que lo favorable es que estos se liberen al interior del lugar donde va a actuar.

Es importante también analizar cómo varían las propiedades biológicas y características morfológicas del coágulo utilizando un tercer parámetro, la velocidad de aceleración que va desde el 1 al 9 en esta centrífuga, a su vez también se pueden comparar los resultados obtenidos a través de una centrífuga de ángulo fijo y una tipo basculante.

Por último, se sugiere realizar este estudio comparando dos centrifugas de distintas marcas o/y dos tubos diferentes (vidrio o plástico) viendo si estos factores son determinantes para la obtención de un mejor coágulo.

## RESUMEN

La revascularización pulpar es uno de los nuevos tratamientos regenerativos, éste busca terminar con el desarrollo de dientes inmaduros. Una de las técnicas que se propone es introducir un coágulo de fibrina (andamiaje), rico en factores de crecimiento, obtenido luego de la centrifugación de la propia sangre del paciente. Se han estudiado diferentes protocolos de centrifugación para lograr mejores propiedades físicas y biológicas del coágulo. Se extrajo sangre de 23 personas que cumplieran con los criterios de inclusión del estudio. La sangre se centrifugó en la centrífuga Merckel modelo VWR Clinical 200 según tres protocolos diferentes; 4000 r.p.m por 5 min, 2000 r.p.m por 15 min, y 3000 r.p.m por 10 min, luego los sobrenadantes del tubo centrifugado fueron analizados mediante un hemograma en la máquina Valtek BC-5380 del laboratorio Cheul Etcheverry de Viña del Mar. Resultados: Hay diferencias significativas entre el conteo de plaquetas y glóbulos blancos inicial y el conteo de los mismos presentes en los sobrenadantes estudiados, sin embargo no hay diferencias significativas en cuanto a la cantidad de plaquetas y leucocitos entre los sobrenadantes del plasma rico en fibrina luego de su centrifugación. Se concluye que la decisión del protocolo de centrifugación a utilizar, en esta centrífuga, queda al criterio de cada clínico, dependiendo de por ejemplo, factores como el tiempo. El protocolo de 4.000 r.p.m por 5 minutos para la centrífuga mencionada anteriormente se debe realizar con tubos de plástico y no de vidrio.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Al-Kahtani, a. Shostad, S, Schifferle, R, R., & Bhambhani, S. (2005): In-vitro evaluation of microleakage of an orthograde apical plug of mineral tiroxide aggregate in permanent teeth with simulated immature ápices. J Endod. 31(2): 117-9.
2. American association endodontics.2013. AAE Position Statement. Obtenida el 3 Nov. 2013. [http://www.aae.org/uploadedfiles/publications\\_and\\_research/newsletters/endodontics\\_colleagues\\_for\\_excellence\\_newsletter/ecfespring2013.pdf](http://www.aae.org/uploadedfiles/publications_and_research/newsletters/endodontics_colleagues_for_excellence_newsletter/ecfespring2013.pdf)
3. Ana María Lauricella: La Homocisteína modifica las redes de Fibrina. Revista QuímicaViva- Número 3, año 5, diciembre 2006. ISSN 1666-7948.
4. Ana María Lauricella: Fibrin network variability. Acta Bioquím Clín Latinoam 2007; 41 (1): 7-19.
5. Balaram Naik , P Karunakar, M Jayadev , y V Rahul Marshal. (2013): Role of Platelet rich fibrin in wound healing. A critical review. J Dent Conserv 2013 Jul-Aug; 16 (4): 284-293.
6. Banchs F, Trope M. (2004): Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: new treatment protocol?. J Endod;30:196-200.
7. Bansal R, Bansal R. (2011): Regenerative endodontics: a state of the art Indian J Dent Res 2011; 22:122-131.
8. Beca T, Hernández G, Morante S, Bascones A. (2007): Plasma rico en Plaquetas. Una revisión bibliográfica. Av Periodon Implantol. 19, 1: 39-52.
9. Birger Nygaard-Ostby and Olav Hjortdal. (1971): Tissue formation in the root canal following pulp removal, Scand. J. dent. Res. 1971: 79: 333-349.
10. Camp J. (1984): Pulp therapy for primary and young permanent teeth. Dent Clin North Am 1984 Oct;28(4)651-668.
11. Camp J. (2002): Tratamiento endodóncico en pediatría. En:Cohen S, Burns R, editores. Vías de la pulpa. España. Editorial Mosby, 2002:694-734.

12. Choukroun J, Diss A, Simonpieri A. (2006): Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part IV: Clinical effects on tissue healing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;101:e56-e60.
13. Choukroun J, Diss A, Simonpieri A. (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 Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;101:299-303.
14. Cynthia P. Vendruscolo, Armando de M. Carvalho, Livia F. Moraes, Leandro Maia, Diana L. Queiroz, Marcos J. Watanabe, Ana Lucia M. Yamada e Ana Liz G. Alves. (2012): Avaliacao da eficacia de diferentes protocolos de preparo do Plasma Rico em Plaquetas para uso em Medicina Equina. *Pesq. Vet. Bras.* 32(2):106-110.
15. Cvek, M. (1972): Treatment of non-vital permanent incisors with calcium hydroxide. I. Follow-up of periapical repair and apical closure of immature. *Odont. Revy.*, v.23, p. 27-44.
16. David M. Dohan, Choukroun J, Diss A (2006): Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part II: Platelet-related biologic features. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*; 101:e45-e50.
17. David M. Dohan, Choukroun J, Diss A. (2006) Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part III: Leucocyte activation: A new feature for platelet concentrates? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*;101:e51-e55.
18. David M. Dohan, DDS, MS,<sup>a</sup> Joseph Choukroun, MD,<sup>b</sup> Antoine Diss, DDS, MS,<sup>c</sup> Steve L. Dohan, Anthony J. J. Dohan,<sup>e</sup> Jaafar Mouhyi, DDS, PhD,<sup>f</sup> and Bruno Gogly, DDS, MS, PhD. (2006): Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part I: Technological concepts and evolution. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;101:E37-44.
19. David M. Dohan Ehrenfest, Lars Rasmusson and Tomas Albrektsson. (2008): Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). Elsevier, doi:10.1016/j.tibtech.2008.11.009.

20. David M. Dohan Ehrenfest, Marco Del Corso, Antoine Diss, Jaafar Mouhyi, and Jean-Baptiste Charrier (2010): Three-Dimensional Architecture and Cell Composition of a Choukroun's Platelet-Rich Fibrin Clot and Membrane. *J Periodontol* doi: 10.1902/jop.2009.090531.
21. Ding RY, Cheung GS, Chen J, Yin XZ, Wang QQ, Zhang CF (2009): Pulp revascularization of immature teeth with apical periodontitis. *Journal of Endod*; 35(5):745-749.
22. Estrela C. (2005): Cap.4: Tratamiento de la pulpa inflamada. En: *Ciencia Endodóntica*. Editorial Artes médicas Latinoamérica, Primera edición; pp: 88-112.
23. Estrela C. (2005): Cap.12: Hidróxido de Calcio. En: *Ciencia Endodóntica*. Editorial Artes médicas Latinoamérica, Primera edición; pp 457-474.
24. Friedlander LT1, Cullinan MP, Love RM. (2009): Dental stem cells and their potential role in apexogenesis and apexification. *Int Endod J*. 42(11):955-62. doi: 10.1111/j.1365-2591.2009.01622.x.
25. Gabriela Martin, DDS,\* Domenico Ricucci, MD, DDS, Jennifer L. Gibbs, MAS, DDS, PhD, and Louis M. Lin, BDS, DMD, PhD. (2013). *J Endod* 2013;39:138–144.
26. García-Godoy F, Murray P (2012): Recommendations for using regenerative endodontic procedures in permanent immature traumatized teeth. *Dental Traumatology* 2012, 28:33-41.
27. García L. A, Garrido M.B, Pinchevski. R, Póster: determinación del número de plaquetas según 4 protocolos de obtención de PRP. X congreso nacional de periodontología, 2005. Nov. 9. Centro médico docente la trinidad, caracas Venezuela. Sociedad venezolana de periodontología.
28. Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. (2000): Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 5;97(25):13625-30.
29. G.T.-J. Huang, S. Gronthos and S. Shi. Mesenchymal Stem Cells Derived from Dental Tissues vs. Those from Other Sources. Their Biology and Role in Regenerative Medicine. *J Dent Res*. Sep 2009; 88(9): 792–806.

30. Goyal B, Tewari S, Duban J, Sehgal P (2011): Comparative evaluation of platelet rich plasma and guided tissue regeneration membrane in the healing of apicomarginal defects: a clinical study. *J Endod* 2011; 37:773-780.
31. Hargreaves KM, Diogenes A, Teixeira FB. (2013): Treatment options: biological basis of regenerative endodontic procedures. *J Endod*. Mar; 39 (3 Suppl) :S30-43.
32. Hargreaves KM, Geisler T, Henry M, Wang Y. (2008): Regeneration Potential of the Young Permanent Tooth: What Does the Future Hold? *J Endod* ;34:S51-S6.
33. Hargreaves K, Cohen S (2011): Cap.16: Endodoncia regenerativa. En: *Vías de la pulpa*. Editorial Elsevier Mosby. Décima edición; pp: 602-619.
34. Hargreaves K, Cohen S (2011): Cap.23: Endodoncia pediátrica. En: *Vías de la pulpa*. Editorial Elsevier Mosby. Décima edición; pp:808-857.
35. He G, Dahl T, Veis A, George A. (2003): Dentin matrix protein1 initiates hydroxyapatite formation in vitro. *Connect Tissue Res*. 44 Suppl 1:240-5.
36. He L, Lin Y, Hu X, Zhang Y, Wu H. (2009): A comparative study of platelet-rich fibrin (PRF) and platelet-rich plasma (PRP) on the effect of proliferation and Three-Dimensional Architecture and Composition of PRF. Volume 81, Number 4 554. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* ;108:707-713.
37. *Histología di fiore: texto y atlas*, jose hib. Editorial el ateneo. 2001.
38. Huang G (2009): Pulp and dentin tissue engineering and regeneration: current progress. *Regen Med*; 4(5):697-707.
39. Iwaya S, Ikawa M, Kubota M (2001): Revascularization of an immature permanent tooth with apical periodontitis and sinus tract. *Dent Traumatol* 2001; 17:185-188.
40. Jeremy Magalon, Pharm.D., Olivier Bausset, Pharm.D., Nicolas Serratrice, Laurent Giraud, Houssein Aboudou, Julie Veran, Guy Magalon, M.D., Françoise Dignat-Georges, Pharm.D., And Florence Sabatier, Pharm.D. (2014): Characterization and Comparison of 5 Platelet-Rich Plasma Preparations in a Single-Donor Model. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic and Related Surgery*, Vol 30, No 5 (May): pp 629-638.

41. Juliana Valencia Serna, Catalina Pineda Molina. (2013): Construcción de matrices como sustitutos dérmicos: aplicación potencial en la regeneración de piel. *Revista Ingeniería Biomédica*. ISSN 1909-9762; Volumen 7, Número 13. Pp.10-17.
42. Jung IY, Hargreaves KM. (2008): Biologically based treatment of immature permanent teeth with pulpal necrosis: a case series. *J Endod*. Jul;34(7):876-87.
43. KG. Vellore. (2008): Calcium hydroxide induced apical barrier in fractured nonvital immature permanent incisors. *Journal of Indian society of periodontics and preventive dentistry*, Volume: 28, Issue: 2, Page: 110-112.
44. Leonor Patricia Rodríguez Pascual. *Manual de bioquímica Farmacéutica*. Departamento de biología academia de bioquímica (1° versión). 2008
45. L.T. Friedlander, M. P. Cullinan & R. M. Love. (2008): Dental stem cells and their potential role in apexogenesis and apexification. *International endodontic Journal*. doi:10.1111/j.1365-2591.
46. Lic. Milagros García Mesa y Lic. Cristina Coma Alfonso. (2000): Características estructurales y funcionales de las plaquetas. *Rev Cubana Angiol y Cir Vasc*;1(2):132-41.
47. Lic. T.m. Luis Miguel Zamora Gonzales: *Sangre y Hematopoyesis*. Danna Camacho on Sep 11, 2012.
48. Martin Hermann, Oliver Nussbaumer Ralf Knöfler, Paul Hengster, Walter Nussbaumer, Werner Streif. (2010): Real-Time Live Confocal Fluorescence Microscopy as a New Tool for Assessing Platelet Vitality. *Transfus Med Hemother*;37:299–305.
49. M. Kobayashi, Kawase T, Horimizu M, Okuda K, Wolff LF, Yoshie H. (2012): A proposed protocol for the standardized preparation of PRF membranes for clinical use. *Biologicals*. Sep;40(5):323-9.
50. Lasala A. *Endodoncia*. 4ta Edición. Editorial Salvat. 1992.
51. L. Rodríguez, R. Pérez, M. Morales, R. Martínez, S. Oliva. *Manual de prácticas del Laboratorio de Bioquímica farmacéutica*. UPIBI-IPN, 1° edición. 2008.

52. Manuel Meruan, Carolina Smok, Mariana Rojas. (2012): Face and Neck Development in Vertebrates. *Int. J. Morphol.*,30(4):1373-1388.
53. Marx R (2004): Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg* 2004; 62:489-496.
54. Marx R (2001): Platelet- rich plasma (PRP): What is PRP y what is not PRP? *Implant Dentistry*; 10(4): 225-228. (Whitepaper).
55. McDonald, Avery, Dean. Cap.19: Treatment of deep caries, vital pulp exposure and pulpless teeth. *Dentistry for the child and adolescent*. 8va edición, editorial Elsevier Mosby; pp: 413-452. 2004.
56. Miguel Miñana Gómez. Apexificación con hidróxido de calcio vs tapón apical de MTA. 2009.
57. Murray P, García- Godoy F, Hargreaves K. (2007): Regenerative endodontics: a review of current status and call for action. *J endod*; 33;377-390.
58. Mustafa Tunalı , Hakan Özdemir, Zafer Küçükodacı, Serhan Akmanç, Erhan Fıratlı. (2013) : In vivo evaluation of titanium-prepared platelet-rich fibrin (T-PRF): a new platelet concentrate. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 51; 438–443.
59. Mustafa tunalı, Hakan Özdemir, Zafer küçükodacı, Serhan Akman, Emre Yaprak, Hülya Toker, and Erhan fıratlı. (2014): A Novel Platelet Concentrate: Titanium-Prepared Platelet-Rich Fibrin. *Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International*, Article ID 209548.
60. Nakashima M1, Akamine A. (2005): The application of tissue engineering to regeneration of pulp and dentin in endodontics. *J. Endodod*. Oct;31(10):711-8.
61. Necas J, Bartosikova L, Brauner P, Kolar J. (2005): Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinari Medicina* 53:397-411.
62. Nilüfer Bölükbaşı, PhD1,n, SinemYeniyol,PhD1, MervaSolukTekkesin,PhD2, KemalAltunatmaz,PhD3. (2013): The Use of Platelet Rich Fibrin in Combination With Biphasic Calcium Phosphate in the Treatment of Bone Defects: A Histologic and Histomorphometric Study. *Current Therapeutic Research*75; pages:15–21.

63. Orapin V, Horst, Miquella G, Chavez, Andrew H, Jheon K., Tejal Desai, Ophir D. (2012): Stem Cell and Biomaterials Research in Dental Tissue Engineering and Regeneration. *Dent Clin North Am.* Jul; 56(3):495-520. doi: 10.1016/j.cden.2012.05.009.
64. Paul Carrillo-Mora, Adriana González-Villalva, Salvador Israel Macías-Hernández, Carlos Pineda-Villaseñor. (2012): Plasma rico en plaquetas. Herramienta versátil de la medicina regenerativa. *Cir Cir*; 81:74-82.
65. Peter Whittaker and Karin Przyklenk. (2009): Fibrin Architecture in Clots: A Quantitative Polarized Light Microscopy Analysis. *Blood Cells Mol Dis*; 42(1): 51–56. doi:10.1016/j.bcnd.2008.10.014.
66. Prescott RS1, Alsanea R, Fayad MI, Johnson BR, Wenckus CS, Hao J, John AS, George A. (2008): In vivo generation of dental pulp-like tissue by using dental pulp stem cells, a collagen scaffold, and dentin matrix protein 1 after subcutaneous transplantation in mice. *J Endod*; Apr;34(4):421-6. doi: 10.1016/j.joen.2008.02.005.
67. *Rev. chil. pediatr.* v.72 n.5 Santiago set. 2001. ISSN 0370-4106.
68. Rodríguez-Lozano FJ, Bueno C, Insausti CL, Meseguer L, Ramírez MC, Blanquer M, Marín N, Martínez S, Moraleda JM. (2011): Mesenchymal stem cells derived from dental tissues. *Int Endod J*.;44(9):800-6.
69. Sáez- Torres C, Calvo J, Gayá A (2007): Calidad del plasma rico en plaquetas: estudio de la activación plaquetaria. *Rev Esp Cir Oral y Maxilofac*; 29(4): 240-248.
70. Shivashankar VY, Johns DA, Vidyanath S, Kumar M R. (2012): Platelet Rich Fibrin in the revitalization of tooth with necrotic pulp and open apex. *J Conserv Dent* 2012;15:395-8.
71. Soares, Goldberg (2004): Cap.10: Tratamientos conservadores pulpares. En: *Endodoncia. Técnicas y fundamentos.* 1° edición. Editorial Panamericana, Buenos Aires. Argentina; pp: 169- 176.
72. Spyridoula Sarris, Jinous F Tahmassebi, Monty S Duggal and Ian A Cross. (2008): A clinical evaluation of mineral trioxide aggregate for root-end closure

- of non-vital immature permanent incisors in children-a pilot study. *Dental Traumatology*. Volume 24, Issue 1, pages 79–85.
73. Sunitha Raja V, Munirathnam Naidu E. (2008): Platelet-rich fibrin: Evolution of a second-generation platelet concentrate. *Indian J Dent Res*;19:42-6.
  74. Tittle, K; Farley, J; Linkhart, T; Torabinejad, M. (1996): Apical closure induction using bone growth factors and mineral trioxide aggregate. *J. Endod*: 22:198-203.
  75. Thorsten R. Appel, Bernd Pöttsch, Jens Müller, Jens-Jörg von Lindern, Stefaan J. Berge´, Rudolf H. Reich. (2002): Comparison of three different preparations of platelet concentrates for growth factor enrichment. *Clin. Oral Impl. Res*, 13; 522–528.
  76. Tood, Stanford. *Diagnóstico y tratamiento clínico por el laboratorio*. 1988. Salvat. Tomo I. Pág 14.
  77. Torabinejad M, Chivian N. (1999): Clinical applications of mineral trioxide aggregate. *J Endod*;25(3):197-205.
  78. Torabinejad M, Turman M (2011): Revitalization of tooth with necrotic pulp and open apex by using platelet-rich plasma: a case report. *J Endod*; 37:265-268.
  79. Vaishnavi C, Mohan B, Narayanan L (2011): Treatment of endodontically induced periapical lesions using hydroxyapatite, platelet-rich plasma, and a combination of both: An in vivo study. *J Conserv Dent* 2011; 14:140-146.
  80. Vivek Gupta, Vivek K. Bains, G. P. Singh, Ashish Mathur, Rhythm Bains: Regenerative Potential of Platelet Rich Fibrin In Dentistry: Literature Review. *Asian Journal of Oral Health & Allied Sciences - Volume 1, Issue 1, Jan-Mar 2011*.
  81. Volker L.W. Gaßling, DMD, MD, Yahya Açil, PhD, Ingo N. Springer, DMD, MD, PhD, Nina Hubert, and Jörg Wiltfang, DMD, MD, PhD, Kiel, Germany. (2009): *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*;108:48-55.
  82. Wang XJ, Thibodeau B, Trope M, Lin LM, Huang G. (2010): Histologic characterization of regenerated tissues in canal space after the revitalization/revascularization procedure of immature dog teeth with apical periodontitis. *J Endod*; 34:56-63.

83. Weibo Zhang and Pamela C. Yelick. Vital Pulp Therapy—Current Progress of Dental Pulp Regeneration and Revascularization. *International Journal of Dentistry* Volume 2010, Article ID 856087.
84. Yamauchi N, Nagaoka H, Yamauchi S, Teixeira FB, Miguez P, Yamauchi M. (2011): Immunohistological characterization of newly formed tissues after regenerative procedure in immature dog teeth. *J Endod.*;37(12):1636-41.

## **ANEXOS**

### **CUESTIONARIO PACIENTES PARA TESIS DE REVASCULARIZACION**

#### **I. IDENTIFICACIÓN**

NOMBRE:

EDAD:

MAIL:

FONO:

#### **II. ANTECEDENTES MÓRBIDOS**

PATOLOGÍA ACTUAL:

MEDICAMENTOS:

ENFERMEDADES ANTERIORES:

A) PATOLOGÍA SANGUÍNEA/ COAGULACIÓN

B) ANTICONCEPTIVOS ORALES

C) EMBARAZO Y/O LACTANCIA

D) ANTECEDENTE DE LEUCEMIA, PATOLOGÍA HEPÁTICA O RENAL

¿SE LE HA REALIZADO UNA PUNCIÓN VENOSA?, si su respuesta es SÍ ¿ha tenido complicaciones (moretones, que no para de sangrar, le baja la presión, etc)?



**Consentimiento informado para participantes en el estudio de  
“Determinación del protocolo de centrifugación para la obtención de  
Fibrina Rica en Plaquetas usado en Revascularización Pulpar para la  
centrifuga VWR clinical 200”.**

**Investigadores:**

**Alumnas Carolina Bidart y Cayetana Solari.**

**Docente guía Alicia Caro.**

**Universidad de Valparaíso.**

**Facultad de Odontología.**

**Este Documento de Consentimiento Informado tiene dos partes:**

- **Información (proporciona información sobre el estudio)**
- **Formulario de Consentimiento (para firmar si está de acuerdo en participar)**

**Se le dará una copia del Documento completo de Consentimiento Informado**

**Introducción**

Nosotras somos Carolina Bidart y Cayetana Solari, alumnas de sexto año de la Facultad de Odontología de la Universidad de Valparaíso. Para nuestra tesis estamos investigando sobre una técnica que ayuda que los dientes inmaduros (que no han terminado de formarse) sigan su crecimiento y desarrollo luego de haber sufrido caries o traumas. Le daremos información y lo invitaremos a participar de este estudio. No es necesario que nos responda inmediatamente, y antes de decidir puede conversar con quien se sienta más cómodo acerca de la investigación. Pueden haber palabras que usted no entienda, por favor pregúntenos y le explicaremos. (Si surgen preguntas después, también puede hacerlas).

Ud. Puede llamarnos en cualquier momento por si tiene dudas, frente a cualquier cosa que no entienda no dude en preguntar, ningún procedimiento se llevará a cabo si es que Ud. no lo quiere.

Se le dará el tiempo necesario para que lo piense y nos dé posteriormente su respuesta.

**Propósito**

Muchos dientes definitivos que todavía no terminan su desarrollo, sufren de traumas o caries que hacen que el diente deje de estar vivo. Hay varias técnicas que buscan lograr que estos dientes terminen de desarrollarse. Pero la desventaja de estas es que no logran generar un crecimiento de estos dientes en largo y grosor, lo que genera en muchos casos una mayor probabilidad de fractura y además que éstos queden con menor desarrollo que el resto.

Es por esta razón que se está tratando de crear un nuevo tratamiento, una de las técnicas que se propone es introducir un coágulo de sangre propio del paciente dentro de los dientes. La información actual fundamenta este tratamiento, llamándolo “revascularización pulpar”. En nuestra facultad queremos aportar

información sobre este procedimiento y para esto se requieren estudios sobre el coagulo que se introduce en el diente y además su mejor método de obtención. El OBJETIVO DEL PROYECTO ES: **Caracterizar y comparar la estructura de la Fibrina rica en Plaquetas obtenido según tres protocolos diferentes mediante su observación al Microscopio Óptico y pruebas de laboratorio.**

#### Selección de participante

Se ha escogido a este debido a que cumple los siguientes criterios:

- Pacientes ASA I (sano, sin enfermedades sistémicas)
- Voluntarios
- Edad 18 a 24 años
- Residencia en Viña del Mar
- No fumadores
- Que no tomen medicamentos que interfieran con la coagulación ni aspirina
- Mujeres no embarazadas

#### Participación voluntaria

La participación en este estudio es absolutamente voluntaria, si se niega a ser parte de la investigación no habrá ninguna consecuencia.

#### Procedimiento:

Se estudiara la muestra de sangre mediante su observación al Microscopio Óptico y pruebas de laboratorio, para la obtención de ésta utilizaremos un 23 voluntarios sanos que cumpla con los criterios señalados anteriormente.

Generalmente, la sangre que se extrae para muestras, es de una vena antecubetal.

El procedimiento es como sigue:

1. Se limpia el área con un antiséptico.
3. Se introduce una mariposa
4. La sangre fluye hacia una jeringa de recolección especial.
5. Se retira la aguja después de que se ha recogido suficiente sangre. (5ml: el tamaño de una cucharadita de agua)
6. Se aplica presión al sitio de punción



durante un período de cinco a diez minutos para detener el sangrado. Durante este tiempo, se revisa para estar seguro de que el sangrado se detenga.

La muestra de sangre del participante voluntario seleccionado será realizada en el Laboratorio Cheul en Viña del Mar, por un técnico paramédico capacitado. Su participación solo es necesaria el día de la recolección de muestras. Debe estar presente **45 minutos** debido a que la sangre se recolectara en 3 momentos diferentes.

**Este procedimiento se usara para recolectar 20 ml de sangre, 4 tubos en total. 2 al momento de su llegada, 1 a los 15 minutos y otro a los 25 minutos.**

### **Riesgos y beneficios**

#### **i. Riesgos:**

Sangrado excesivo, desmayo o sensación de mareo, hematoma (acumulación de sangre debajo de la piel), Infección (un riesgo leve cada vez que se presenta ruptura de la piel). De ser así puede acudir a la atención de la enfermera de la Facultad.

#### **ii. Beneficios:**

**Beneficios al individuo:** El beneficio en particular no es ninguno, solo nos ayudará a nosotros a estudiar sobre esta técnica.

**Beneficios a futuros pacientes:** La posibilidad de estudiar estas muestras puede beneficiar en el futuro a pacientes de la Universidad de Valparaíso que requieran un tratamiento de alguno de sus dientes que no ha terminado su crecimiento y pueda realizarse en ellos una terapia de revascularización teniendo los conocimientos del coágulo que se introduce y del mejor método de obtención de esta sangre.

**Beneficios a la Odontología:** Con esta investigación aportamos conocimientos sobre esta nueva terapia, que tiene grandes ventajas con respecto a las otras existentes.

### **Reembolsos:**

No existen reembolsos.

### **Confidencialidad:**

Toda la información que se obtenga de analizar las muestras que nos ceda (análisis de fibrina y plaquetas), así como toda la información clínica referente al paciente presente en el cuestionario clínico (enfermedades, medicamentos), será considerada confidencial y tratada en consecuencia.

Para garantizar el anonimato de identidad, la muestra sólo irá identificada desde el momento mismo de la extracción con un código, no con el nombre. Sólo este código, y nunca la identidad, aparecerá donde figure la información clínica. La relación entre el código y la identidad quedará custodiada por alguna persona autorizada del equipo investigador, adoptándose medidas estrictas para que tal información no esté disponible más que para este personal autorizado, que en ningún caso podrá desvelar la identidad a terceros.

### **Derecho a rechazar participar y derecho a retirarse**

No se sienta obligado a participar de este estudio, si no desea participar no se afectará de ninguna forma. Si decide participar puede retirarse en cualquier momento.

Resultados:

Al término de la investigación compartiremos los resultados de la investigación serán publicados, presentados en congresos cursos y utilizados con fines docentes (clases).

Se resguardará la identidad de los que participaron, nunca dando a conocer los datos personales. De todas maneras le enviaremos un resumen de la investigación la cual Ud. podrá compartir con quienes desee.

**Contacto:**

**Frente a cualquier duda sobre el procedimiento, si desea retractarse o aceptar ser parte de esta investigación, o lo que considere pertinente, le adjuntamos nuestros correos electrónicos y celulares:**

**Carolina Bidart: caro\_bidart@hotmail.com fono: 85012390**

**Cayetana Solari: tanasolari@gmail.com fono: 97768881**

## **PART II: Certificado del Consentimiento**

**Me han preguntado acerca de dar mi consentimiento para que participe en esta investigación, tuve la oportunidad de hacer todas las preguntas que quisiera y me han respondido todas mis dudas para que lograra entender todo. Doy mi consentimiento voluntario para participar en este estudio.**

**Nombre** \_\_\_\_\_

**Firma** \_\_\_\_\_

**Fecha** \_\_\_\_\_

### ***Si soy analfabeto***

Un testigo que sabe leer debe firmar, esta persona en lo possible debe ser elegida por el participante y no debe tener algun vínculo con el equipo investigador. Los participantes analfabetos deberán incluir la huella digital de su pulgar.

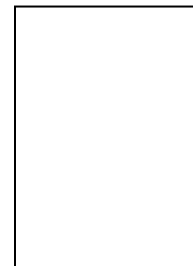
**He sido testigo de la lectura certera de este consentimiento para el apoderado del potencial participante, éste ha tenido la oportunidad de hacer preguntas. Confirmo que da su consentimiento libremente.**

**Nombre del testigo** \_\_\_\_\_

**Huella digital del pulgar del participante**

**Firma del testigo** \_\_\_\_\_

**Fecha** \_\_\_\_\_



***Declaración del investigador***

He leído en voz alta y de manera exacta la información contenida en este formulario al potencial participante y utilizando mis mejores habilidades me he asegurado que el participante entienda que se llevará a cabo lo siguiente:

1. Realización de un cuestionario con respecto a su identificación, salud general y toma medicamentos.

2. Extracción de 4 tubos de 5 ml de sangre por parte de la enfermera de la Facultad de Odontología.

Confirmando que se le ha dado al participante la oportunidad de realizar preguntas sobre el estudio y todas las preguntas han sido respondidas de manera correcta. Confirmando que el individuo no ha sido obligado a dar su consentimiento, siendo éste entregado de manera libre y voluntaria

Se ha entregado una copia de este Formulario de Consentimiento Informado al participante.

Nombre impreso del investigador \_\_\_\_\_

Firma del Investigador \_\_\_\_\_

Fecha \_\_\_\_\_

**Consentimiento informado adicional para donación de muestras de participantes en el estudio de “Determinación del protocolo de centrifugación para la obtención de Fibrina Rica en Plaquetas usado en Revascularización Pulpar para la centrifuga VWR clinical 200”.**

**Investigadores:**

**Alumnas Carolina Bidart y Cayetana Solari.**

**Docente guía Alicia Caro.**

**Universidad de Valparaíso.**

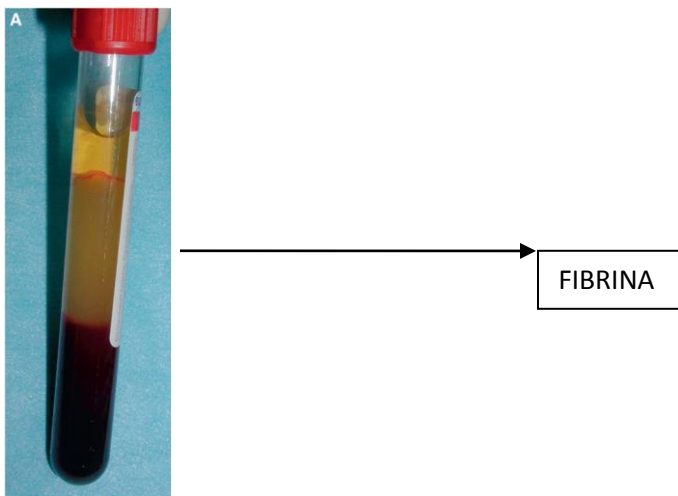
**Facultad de Odontología.**

En este estudio, se sacará sangre a participantes voluntarios para realizar el trabajo de investigación sobre Revascularización dentaria.

La sangre obtenida (20ml) será depositada en tubos de 5 ml, tres de éstos serán centrifugados y uno se usará para medir el hemograma (número de plaquetas específicamente).

La centrifugación se utiliza para separar la sangre en sus diferentes componentes. (Ver imagen) Uno de estos componentes es la fibrina rica en plaquetas (zona amarilla y gelatinosa apuntada por la flecha) la cual es el objetivo del estudio. Este será fijado y analizado en microscopio óptico por un experto.

Usaremos también la zona líquida amarilla más superior del tubo para analizar el número de plaquetas después del centrifugado y el resto de los componentes será eliminado según los procedimientos que indica el Ministerio de Salud de Chile.



El voluntario tendrá todo el derecho a no seguir participando en el estudio si es que así lo decide, se guardará la confidencialidad del donante de muestras en todo momento, no se dará a conocer su identidad en ninguna parte del estudio, solo su sexo y edad.

La duración de la investigación será de aproximadamente 4 meses desde la obtención de las muestras, por lo tanto, este será el periodo de almacenamiento mínimo de ellas.

Luego de finalizar esta investigación y haber analizado las muestras, éstas serán eliminadas para que no exista un uso posterior.

**He tomado conciencia de esta información, me han preguntado sobre esto y he contestado satisfactoriamente. Yo consiento voluntariamente que se guarden mis muestras de la manera que he indicado anteriormente.**

**Nombre del participante** \_\_\_\_\_

**Firma del participante** \_\_\_\_\_

**Fecha** \_\_\_\_\_

**Si soy analfabeto**

Una persona que sepa leer debe firmar (si es posible, esta persona será elegida por el participante y no debe tener conexión con el equipo investigador). Los participantes que son analfabetos deben incluir su huella digital del pulgar.

**Yo he sido testigo de la lectura de este consentimiento al potencial participante, este individuo ha tenido la oportunidad de preguntar. Yo doy fe de que el individuo da su consentimiento libremente.**

**Nombre del testigo** \_\_\_\_\_  
**participante**

**Huella digital del**

**Firma del testigo** \_\_\_\_\_

**Fecha** \_\_\_\_\_



**Para el investigador o la persona que ha tomado el consentimiento**

**Yo leí correctamente toda la información al potencial participante, estoy seguro de que éste entendió que se le hará lo siguiente:**

- 1. Tomar 4 frascos de 5 ml cada uno de sangre venosa**
- 2. Centrifugará su sangre a diferentes revoluciones y tiempos.**
- 3. Las muestras serán analizadas y observadas en el microscopio**

**Confirmando que al participante se le dio la oportunidad de preguntar acerca del almacenamiento de las muestras, todas las preguntas fueron respondidas por el equipo investigador, el consentimiento se ha dado bajo la libertad del paciente sin ninguna amenaza ni chantaje.**

**Nombre del investigador/persona que tomó el consentimiento** \_\_\_\_\_

**firma del**

**investigador /persona que tomó el consentimiento** \_\_\_\_\_

**Fecha** \_\_\_\_\_