

UNIVERSIDAD DE CALDAS
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

EVALUACION ULTRAESTRUCTURAL DE COAGULOS DE FIBRINA RICA EN
PLAQUETAS (FRP) DE CANINOS

DANIEL GUSTAVO MARULANDA MARIN.

TESIS PRESENTADA AL PROGRAMA DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS VETERINARIAS – ÁREA
DE ENFOQUE: CIRUGÍA DE PEQUEÑOS
ANIMALES, COMO PARTE DE LOS REQUISITOS
PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
MAESTRÍA.

MANIZALES

2020

UNIVERSIDAD DE CALDAS
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

EVALUACION ULTRAESTRUCTURAL DE COAGULOS DE FIBRINA RICA EN
PLAQUETAS (FRP) DE CANINOS

DANIEL GUSTAVO MARULANDA MARIN.
Médico Veterinario Zootecnista

ORIENTADOR: Dr. RAÚL FERNANDO SILVA
MOLANO

TESIS PRESENTADA AL PROGRAMA DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS VETERINARIAS – ÁREA
DE ENFOQUE: CIRUGÍA DE PEQUEÑOS
ANIMALES, COMO PARTE DE LOS REQUISITOS
PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
MAESTRÍA.

MANIZALES

2020

Dedicado a mis padres, por su amor y esfuerzo
en brindarme siempre una buena educacion.

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Raul Fernando Silva por ser mi maestro y transferirme sin recelo sus conocimientos en el ámbito quirúrgico, por todo su apoyo y ayuda en la realización de este trabajo

Al Doctor Jorge Uriel Carmona por su ayuda en esta investigación y por admitirme en su Grupo de Investigación.

A la Doctora Catalina Lopez por su ayuda, por resolver siempre mis dudas en todo lo relacionado con este trabajo.

A todas las personas que de alguna manera contribuyeron a la realización de este trabajo.

CONTENIDO

RESUMEN	9
ABSTRACT	11
INTRODUCCIÓN.....	13
MARCO TEÓRICO.	16
ESTRUCTURA	16
PROPIEDADES	20
USO DE FRP EN PÉRDIDAS DE TEJIDOS BLANDOS	21
USO DE FRP EN TEJIDOS OSEO	22
TECNICAS DE OBTENCIÓN DE FRP.....	23
MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
DISCUSION.....	40
CONCLUSIONES.....	42
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.	44

LISTA DE FIGURAS.

Figura 1. Representación esquemática (no a escala) del fibrinógeno	17
Figura 2. Representación esquemática del fibrinógeno y la fibrina con principales dominios estructurales y sitios de asociación.....	18
Figura 3. Modelado informático teórico de las uniones tetramoleculares o bilaterales y trimoleculares o equiláteras de las redes de fibrina.....	19
Figura 4. Representación esquemática del proceso de obtención de muestras en cada individuo.....	25
Figura 5. Proceso de moldeado del coagulo a malla	27
Figura 6. Fotografías MEB a 60 y 100 aumentos de coagulos generados por diferentes protocolos de centrifugación y en reposo	35
Figura 7. Fotografías MEB a 2000 aumentos de coagulos generados por diferentes protocolos de centrifugación.	36
Figura 8. Fotografías MEB a 60 y 100 aumentos de mallas generadas por diferentes protocolos de centrifugación..	38
Figura 9. Fotografías MEB a 2000 aumentos de un coagulo y dos mallas generados por diferentes protocolos de centrifugación	39

LISTA DE DIAGRAMAS.

Diagrama 1. Comparación pareada de los tipos de protocolo y valor promedio de leucocitos.....	30
Diagrama 2. Comparación pareada de los tipos de protocolo y valor promedio de linfocitos.	31
Diagrama 3. Comparación pareada de los tipos de protocolo y valor promedio de granulocitos	32
Diagrama 4. Comparación pareada de los tipos de protocolo y valor promedio de plaquetas.	33
Diagrama 5. Comparación pareada de los tipos de protocolo y valor promedio de eritrocitos.....	34

LISTA DE TABLAS.

Tabla 1. Tamaño celular referencia en la especie canina comparado tamaño promedio	39
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS.

ALT	Alanina aminotransferasa
CAP	Concentrado autólogo de plaquetas
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
FPA	Fibrinopéptido A
FPB	Fibrinopéptido B
FRP	Fibrina rica en plaquetas
IL-1	Interleucina uno
IL-6	Interleucina seis
MEB	Microscopía electrónica de barrido
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PRP	Plasma rico en plaquetas
TGFβ1	Factor de crecimiento transformante beta uno
TNFα	Factor alfa de necrosis tumoral
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
Arg	Arginina
Gli	Glicina

RESUMEN

El propósito de este estudio fue estandarizar y describir un método para la formación de un coagulo o malla de fibrina rica en plaquetas en caninos que fuera estable molecularmente para su caracterización y posible aplicación clínica. Se emplearon 13 perros adultos, de ambos sexos, aclínicamente sanos con edades entre 2 y 7 años y un peso igual o superior a 20kg. Estos ingresaron al área de clínica quirúrgica del Hospital Veterinario de la Universidad de Caldas para un procedimiento electivo. A cada canino se le tomó una muestra de 34 ml de sangre entera dividida en seis tubos; uno con anticoagulante EDTA que fue empleado para realizar conteo celular basal y cinco tubos sin anticoagulante, pero con sílice micronizado que fueron a su vez divididas en tres grupos los cuales recibieron diferentes tipos de procesos y fueron llamados protocolo de centrifugación N°1 (2 tubos) a 410g durante 10 minutos, descrito por Dohan *et al.* para obtener fibrina rica en plaquetas en la especie humana, protocolo de centrifugación N°2 (2 tubos) a 191g durante 6 minutos, protocolo descrito por Silva *et al.* para obtener concentrado autólogo de plaquetas en la especie canina; y el denominado control (1 tubo) que fue dejado en reposo para obtener una comparación posterior entre estos mediante microscopia electronica de barrido y un conteo automatizado del sobrenadante residual de cada tubo.

Evaluar la distribución celular dentro del coágulo no fue posible debido a la característica gelatinosa que presenta la estructura y que envuelve las células, en este caso solo se pudo comprobar su presencia por visualización directa de cuerpos celulares parcialmente atrapados o adheridos a la superficie del coagulo. Sin embargo, al realizar conteo hematológico al sobrenadante de cada tubo se pudo determinar que existe una diferencia estadísticamente significativa del coagulo generado en reposo también denominado control, respecto a los coágulos generados por los protocolos 1 y 2 en términos de eritrocitos. El análisis de las demás estructuras celulares demostró que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre estos.

Por otro lado La manipulación de la sangre mediante los dos tipos de protocolos si permitió la obtención de un coagulo y una malla estable y resistente, con características visco elásticas

deseables al momento de una aplicabilidad clínica. Sin embargo, el tamaño del coagulo generado con el protocolo N°1 logra una estructura de 1cm a 1.5cm más largo, siendo este tipo de estructura más deseable cuando se enfrentan lesiones de gran tamaño o con grandes pérdidas de tejido.

Palabras Clave: fibrina, fibrina rica en plaquetas, coagulo, bioandamio, caninos.

ABSTRACT

The purpose of this study was to standardize and describe a method for the formation of a platelet-rich fibrin clot or mesh in canines that was molecularly stable for characterization and possible clinical application. Thirteen adult dogs, of both sexes, were used clinically healthy with ages between 2 and 7 years and a weight equal to or greater than 20 kg. These entered the surgical clinic area of the Veterinary Hospital of the University of Caldas for an elective procedure. Each canine is taken a 34 ml sample of whole blood divided into six tubes; one with EDTA anticoagulant that was used to perform a basal cell count and five tubes without anticoagulant, but with micronized silica that were in turn divided into three groups which had different types of processes and were called centrifugation protocols N°1 (2 tubes) at 410 g for 10 minutes, described by Dohan et al. to obtain platelet-rich fibrin in the human species, centrifugation protocol N°2 (2 tubes) at 191g for 6 minutes, protocol labeled by Silva et al. to obtain autologous platelet concentrate in the canine species; and the so-called control (1 tube) that was left to rest to obtain a subsequent comparison between these using scanning electron microscopy and an automated count of the residual supernatant of each tube.

Evaluating the cellular distribution within the clot was not possible due to the gelatinous characteristic that the structure presents and that surrounds the cells. In this case, its presence could only be detected by direct visualization of the cell bodies trapped or adhering to the surface of the clot. However, by performing a hematological count on the supernatant of each tube, it was possible to determine that there is a statistically significant difference between the resting clot, also called control, with respect to the clots generated by protocols 1 and 2 in terms of erythrocytes. The analysis of the other mobile structures showed that there is no statistically significant difference between them.

On the other hand, the manipulation of the blood by means of the two types of protocols if obtaining a clot and a stable and resistant mesh, with desirable elastic visual characteristics at the time of clinical applicability. However, the size of the generating clot with protocol No. 1 achieves a structure of 1 cm to 1.5 cm longer, this type of structure being more desirable when large lesions are present or with large tissue losses.

Key Words: fibrin, platelet rich fibrin, clot, bioscaffold, canines.

INTRODUCCIÓN.

En la actualidad gran parte de la investigación clínica se ha encaminado al desarrollo de aditivos quirúrgicos bioactivos que ayuden a regular el proceso de inflamación y disminuyan los tiempos de cicatrización, pues para los cirujanos es común afrontar después de cada intervención complejos fenómenos de remodelación tisular y las consecuencias sobre la curación y la supervivencia del tejido que estos conllevan (Dohan et al. 2006a). Uno de estos aditivos bioactivos es la fibrina, una proteína fibrosa involucrada en el proceso de coagulación. La cual ha sido estudiada mostrando diversas propiedades como: regeneración de tejido, pegamento para tejido, aporte de factores de crecimiento y una aparente modulación del sistema inmune, propiedades de alto interés tanto en el campo de la cirugía como en el de la ingeniería de tejidos (Paul 2011). La fibrina es la forma activa de una molécula plasmática llamada fibrinógeno. Esta molécula fibrilar soluble está presente tanto en plasma como en los gránulos- α de las plaquetas y juega un papel determinante en la agregación plaquetaria durante la hemostasia (Dohan et al. 2006a). Aunque las propiedades mecánicas de los coágulos de fibrina *in vivo* son aún en gran parte desconocidas, no hay duda que algunas de estas propiedades como viscosidad y elasticidad serían de gran utilidad en escenarios clínicos (Weisel 2004).

El uso de fibrina como adhesivo y bioandamios está documentado por muchos autores, y en la actualidad hay disponibles algunas mallas de manera comercial, donde la trombina se combina con fibrinógeno para formar un hidrogel de fibrina, en algunos casos se incorporan péptidos bioactivos y factores de crecimiento que mejoran la funcionalidad como andamio precursor de tejido, pues al incorporar estos péptidos facilita la adhesión de las células al armazón que promueve (Ahmed, Dare, and Hincke 2008). Sin embargo, su uso sigue siendo controvertido por el alto riesgo de una infección cruzada y posible transmisión viral en adhesivos comerciales y la complejidad de los protocolos de fabricación para adhesivos autólogos; ofreciendo estos últimos la mejor alternativa debido al bajo nivel de fibrinógeno, que es más adecuado para el crecimiento celular (De la Puente and Ludeña 2014).

Por otro lado, terapias regenerativas a base de (PRP) Plasma Rico en Plaquetas han venido ganando popularidad en la medicina musculo esquelética por su potencial para ayudar en la reparación de tejidos con baja capacidad de curación (Wu, Diaz, and Borg-stein 2016). Esta opción de tratamiento autólogo esta descrito para una variedad de afecciones, que incluyen lesiones de cartílago, tendinopatías y artrosis temprana, y a su vez existen varias formulaciones y métodos de preparación que varían según el autor. Dohan Ehrenfest *et al* describieron un sistema de clasificación basado en dos factores: contenido celular, principalmente en referencia a glóbulos blancos y una arquitectura de fibrina. Con estos parámetros, el PRP se puede agrupar en 4 diferentes tipos: “Pure” PRP (P-PRP), que no contiene leucocitos y tiene una red de fibrina de baja densidad. El PRP rico en leucocitos (L-PRP) tiene concentraciones aumentadas de glóbulos blancos además de una alta concentración de plaquetas, pero también tiene una red de fibrina de baja densidad. La fibrina pura rica en plaquetas (P-FRP) que está libre de leucocitos, pero tiene una red de fibrina de alta densidad y finalmente, la fibrina rica en leucocitos y plaquetas (L-FRP) que combina tanto concentraciones aumentadas de leucocitos como una red de fibrina de alta densidad. Preparaciones que presentan una red de fibrina de baja densidad permiten aplicaciones inyectables, y se usan comúnmente en medicina ortopédica y deportiva. Las preparaciones con una red de fibrina de alta densidad, permiten un coágulo con factores de crecimiento presentes en la estructura matriz (Lansdown and Fortier 2017).

La fibrina rica en plaquetas (FRP) pertenece a una nueva generación de concentrados de plaquetas orientados a una manipulación facilitada de la sangre. Este concentrado celular es una nueva familia del concentrado de plasma rico en plaquetas (PRP). Ha sido desarrollado en Francia por Choukroun *et al* gracias a protocolos de producción simplificados para obtener un nuevo tipo de adhesivo de fibrina, que no es ni un pegamento, ni un concentrado de plaquetas clásico, sino más bien una red o malla que permite crear una matriz cicatricial autóloga (Dohan et al. 2006a); de hecho FRP presenta una polimerización lenta durante su elaboración lo que genera una red de fibrina muy similar a la que se presenta de manera natural, dicha red conduce a una migración y proliferación celular más eficiente y por lo tanto una mejor cicatrización, a diferencia de la fibrina polimerizada de manera artificial pues en

este caso su estructura tridimensional depende de la adición de trombina bovina (Chatterjee, Agarwal, and Subbaiah 2014; Dar et al. 2016; Dohan Ehrenfest et al. 2010; Nanditha et al. 2017).

En este concentrado las plaquetas y las citocinas liberadas se acumulan en gran medida en un coágulo de fibrina (Dohan Ehrenfest et al. 2010); los gránulos que poseen las plaquetas contienen muchas proteínas, algunas específicas de plaquetas (Ej., beta-tromboglobulinas) otras proteínas no específicas (fibronectina, trombospondina, fibrinógeno, factores de crecimiento, inhibidores de la fibrinólisis, inmunoglobulinas, etc.), además de calcio y serotonina (Chatterjee, Agarwal, and Subbaiah 2014),(Dohan et al. 2006b). Después de que se activan y degranulan, las plaquetas se agregan en el sitio de curación y allí liberan citocinas (IL-1 beta, IL-6, factor-alfa de necrosis tumoral TNF α) (Chatterjee, Agarwal, and Subbaiah 2014),(Dohan et al. 2006c), y factores de crecimiento (factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF β 1), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento vascular (VEGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF) que estimulan la migración y proliferación celular dentro de la matriz de fibrina y así comienza la primera etapa de curación (Chatterjee, Agarwal, and Subbaiah 2014),(Dohan et al. 2006b). Así mismo la FRP puede disminuir muchos efectos nocivos en el sitio inflamado durante el acto quirúrgico y, por lo tanto, podría ejercer un tipo de regulación del sistema inmune, con propiedades benéficas en el control de la inflamación y disminución de las infecciones postoperatorias (Dohan Ehrenfest et al. 2010),(Chatterjee, Agarwal, and Subbaiah 2014),(Dohan et al. 2006c).

En medicina veterinaria se tienen reportes de protocolos exitosos para la colección de concentrados autólogos de plaquetas en diferentes especies (Carmona et al. 2006; Silva et al. 2011a, 2011b), y con buenos resultados a la hora de aplicaciones clínicas (Parra, Vergara and Silva 2017; R. F. Silva, J. U. Carmona 2013; Silva, Rezende, and Carmona 2011). Sin embargo, la fibrina rica en plaquetas (FRP) permite obtener un nuevo tipo de adhesivo de fibrina, en forma de red o malla que facilita crear una matriz cicatricial autóloga (Dohan et al. 2006a), ofreciendo una gran variedad de aplicaciones, tal es el caso de los “bioandamios”

usados en la formación y regeneración de los tejidos, gracias a la capacidad que poseen de guiar el cultivo, y el crecimiento celular.

Estas acciones terapéuticas son de gran importancia en situaciones clínicas de consideración como lesiones traumáticas con grandes pérdidas de tejido donde se requiere recuperar el mismo rápidamente, o como en la ingeniería de tejidos donde se trabaja en la fabricación de órganos completos. Esto gracias a que la estructura que se forma es muy similar a la matriz celular, la cual es precursora de cualquier tipo de tejido (De la Puente and Ludeña 2014; Paul 2011). No obstante, la información que se tiene acerca de la fibrina rica en plaquetas actualmente está fundamentada en gran parte de estudios realizados en la especie humana y equina, faltando así información científica sólida para el conocimiento de este nuevo adhesivo y su posible aplicación en la especie canina.

El propósito de este estudio fue estandarizar y describir un método que garantice la formación de un coagulo o malla de fibrina rica en plaquetas (FRP) estable molecularmente para su caracterización y posible aplicación clínica.

MARCO TEÓRICO.

ESTRUCTURA.

El fibrinógeno también denominado factor I (uno) de la coagulación; es una glucoproteína plasmática soluble, alargada, de 45 nm que consta de dos dominios D externos, cada uno conectado a un dominio E central por un segmento enrollado en espiral (Paul 2011) (Mosesson 2005) (Murray. et al. 2010)(Standeven, Ariëns, and Grant 2005). Esta molécula está compuesta de tres pares no idénticos de cadenas polipeptídicas ($A\alpha$, $B\beta$, γ) las cuales constan de 610, 461 y 411 residuos de aminoácidos, respectivamente (Paul 2011)(Mosesson 2005)(Murray. et al. 2010). Las cadenas $B\beta$ y γ contienen oligosacáridos complejos enlazados a asparagina (Murray. et al. 2010).

Las regiones amino terminal de las seis cadenas están muy próximas debido a enlaces covalentes de cinco puentes disulfuro (Paul 2011), mientras que las regiones carboxilo terminal se separan, dando lugar a una molécula alargada y asimétrica. Las porciones A α y B β de las cadenas A y B, designadas fibrinopéptido A (FPA) y fibrinopéptido B (FPB), respectivamente, portan cargas negativas excesivas como resultado de la presencia de residuos aspartato y glutamato. Estas cargas negativas se encuentran en los extremos amino terminal de las cadenas, y favorecen la solubilidad del fibrinógeno en el plasma, además causan repulsión electrostática entre moléculas de fibrinógeno lo que previene la agregación (Murray. et al. 2010).

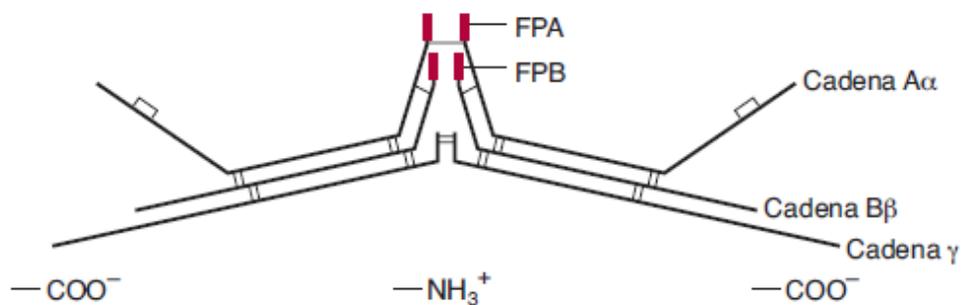


Figura 1. Representación esquemática (no a escala) del fibrinógeno, que muestra pares de cadenas A α , B β y γ unidas mediante enlaces disulfuro. (FPA, fibrinopéptido A; FPB, fibrinopéptido B.)

Imagen tomada de Robert K. Murray. [et al.] / Harper: Bioquímica ilustrada. México, D.F.

McGraw-Hill Interamericana. 2013, p654; 29a.Ed.

La fibrina se forma cuando, los enlaces Arg-Gli entre los fibrinopéptidos y las porciones α y β de las cadenas A α y B β del fibrinógeno son hidrolizadas por acción de la trombina. Esta liberación de los fibrinopéptidos por la trombina genera un monómero de fibrina, que tiene la estructura de las subunidades (α , β , γ). Dado que el FPA y FPB sólo contienen 16 y 14 residuos de aminoácidos, respectivamente, la molécula de fibrina retiene 98% de los residuos presentes en el fibrinógeno (Murray. et al. 2010).

La eliminación de los fibrinopéptidos expone sitios de unión denominados EA y EB iniciando así la polimerización de la fibrina. Cada sitio EA se combina con un bolsillo constitutivo de unión complementaria (Da) en el dominio D de moléculas vecinas, estas asociaciones EA:Da permiten que los monómeros de fibrina se agreguen de manera espontánea en una disposición alineada regularmente escalonada, de dominios D externos sobrepuestos formando protofibrillas que se autoensamblan lateralmente y en haces de fibras ramificadas formando un biopolímero gelatinoso con una estructura de red porosa o malla tridimensional. Esta estructura también conocida como coágulo de fibrina tiene la característica de ser insoluble y más bien débil; sólo se mantiene unido por la asociación no covalente de monómeros de fibrina (Paul 2011).

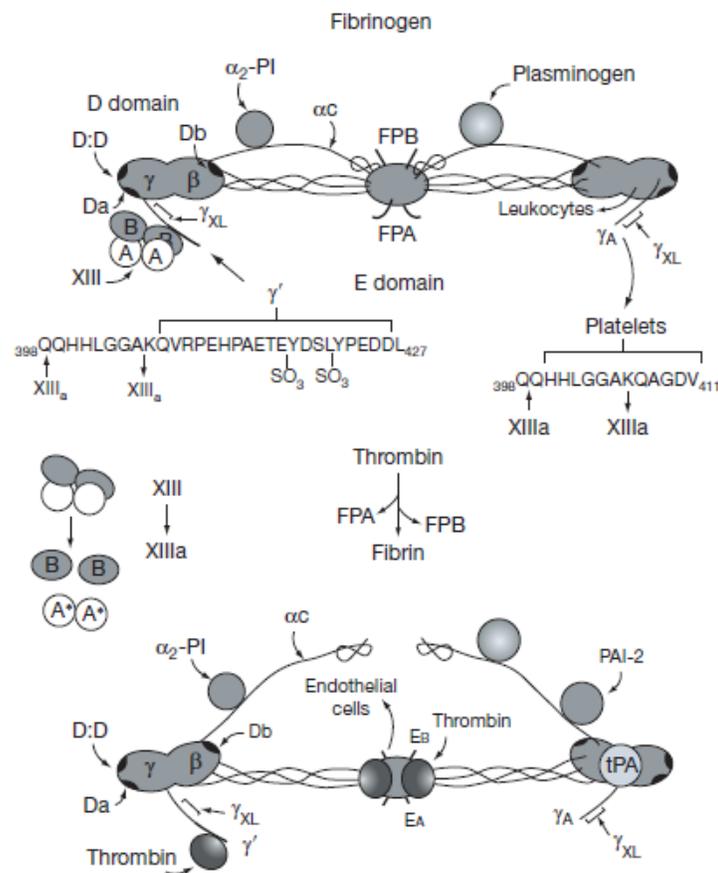


Figura 2. Representación esquemática del fibrinógeno y la fibrina que muestra los principales dominios estructurales, los sitios de asociación que participan en la polimerización y la reticulación de fibrina además de otras interacciones de unión molecular y celular. Mitad inferior de la figura: La escisión por trombina a los dos conjuntos de fibrinopéptidos (FPA, fibrinopéptido A; FPB, fibrinopéptido B.) de las cadenas $\alpha\alpha$, $\beta\beta$ de las moléculas de fibrinógeno expone los sitios EA y EB (inicio de la polimerización). Imagen tomada Ducheyne, P. [*et al.*], (Eds.). (2015). *Comprehensive biomaterials* (Vol. 1), pág. 306. Newnes.

“La trombina además de convertir el fibrinógeno en fibrina también convierte el factor XIII en factor XIIIa (activado). Esta es una transglutaminasa específica que forma enlaces covalentes entre moléculas de fibrina al formar enlaces peptídicos entre los grupos amida de la glutamina y los grupos amino de residuos de lisina” (Murray. *et al.* 2010), lo que produce un coágulo de fibrina más estable con mayor resistencia a la proteólisis (K. *et al.* 2010)(Standeven, Ariëns, and Grant 2005)(Mosesson, Siebenlist, and Meh 2006). Ahora bien, según Dohan, D. M. *et al.* (2006) es probable que haya dos tipos diferentes de ramificación que definen la estructura del coágulo: en el primer tipo, las fibrillas bicatenarias se alinean de lado a lado y forman un punto de ramificación tetramolecular o bilateral que admite resistencia y rigidez en el coágulo. El segundo tipo de ramificación es trimolecular o equilátero, configuración que se obtiene por la fusión de tres moléculas de fibrina que unen tres protofibrillas de doble cadena de igual ancho, evento que probablemente se produce con mayor frecuencia cuando la velocidad de liberación del fibrinopéptido es lenta (Dohan *et al.* 2006a).

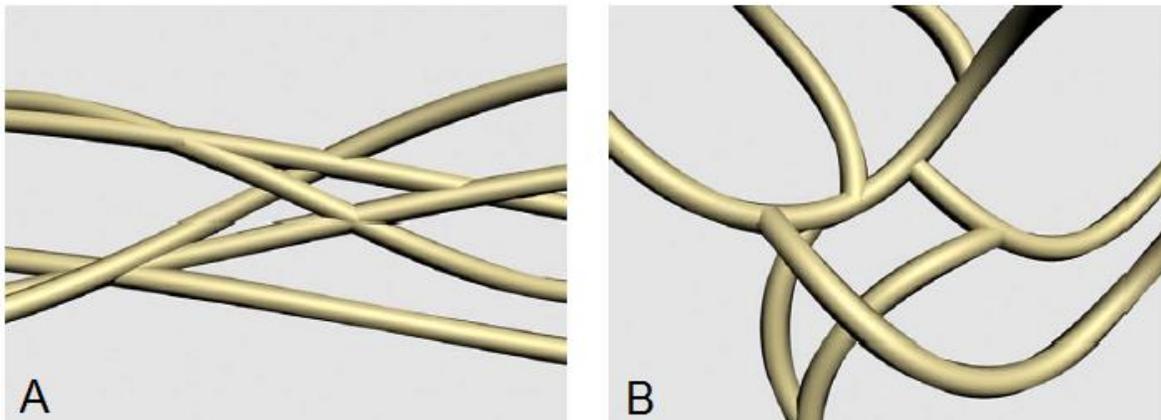


Figura 3. A. Modelado informático teórico de las uniones tetramoleculares o bilaterales de las mallas de fibrina (arquitectura de red rígida). B. Uniones de mallas de fibrina trimoleculares o equiláteras (arquitectura de red flexible) (D-TEP v1.3). Imagen tomada de Dohan, D. M. [*et al.*] (2006). Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 101(3), e41-e42. [6]

PROPIEDADES

La fibrina es un polímero viscoelástico, lo que significa que tiene propiedades elásticas y viscosas. La elasticidad (o rigidez) se caracteriza por una deformación mecánica reversible, mientras que la viscosidad (o plasticidad) se caracteriza por una deformación irreversible inducida por la fuerza. Los biomateriales viscoelásticos difieren en el grado de las propiedades elásticas y viscosas, que se cuantifican midiendo las respuestas a la deformación (Litvinov and Weisel 2017); para Ducheyne P. *et al* (2015) “los diferentes componentes del coágulo de fibrina influyen en su estructura y también afectan sus propiedades mecánicas” (Paul 2011).

Para los coágulos de fibrina, el componente elástico generalmente es mayor que el componente viscoso, aunque este último aumenta rápidamente a mayores tasas de deformación. En los experimentos de fluencia, en los que se miden cambios constantes en la tensión tras la aplicación de estrés, algunos coágulos no cambian en su rigidez, lo que significa que la fibrina es una estructura "autorreparadora", probablemente porque la estructura en conjunto es reversible (Litvinov and Weisel 2017).

En un contexto médico-quirúrgico las propiedades estructurales del coagulo son importantes y de consideración, pero dependen en gran medida de las condiciones de polimerización. La situación clínica a la cual se vea enfrentado el médico-cirujano hará dichas propiedades deseables o no. Por ejemplo, el grado de viscoelasticidad de un trombo en un vaso sanguíneo determinará si el flujo sanguíneo es capaz de romperlo o por el contrario se convertirá en un émbolo. En el caso de la hemostasia, la estructura del coagulo debe ser lo suficientemente fuerte como para soportar la presión del flujo sanguíneo (Paul 2011)(Weisel 2004).

Por su parte en un estudio donde se analizó el efecto de distintas concentraciones de trombina y de la transglutaminasa (factor XIII) en la red de fibrina y la resistencia mecánica de esta, se observó que la concentración de trombina si influye en la cinética de polimerización, pero no en el desarrollo de las propiedades mecánicas (Paul 2011). Mientras que a un aumento en el contenido del factor XIII parece incrementar la rigidez del coagulo y eliminar la deformación inelástica o irreversible (Weisel 2004).

USO DE FRP EN PÉRDIDAS DE TEJIDOS BLANDOS

En la actualidad en las áreas clínicas donde se muestran grandes beneficios con FRP es la cirugía maxilofacial, y la periodoncia pues en estos campos es donde se observan aplicaciones clínicas constantes en la regeneración de grandes pérdidas de tejido por lesiones, soportado por una buena cantidad de estudios de casos clínicos donde se muestra su efectividad (Nanditha et al. 2017). Según Mohanty.*et al* (2014) comparó la membrana de FRP con la membrana de colágeno disponible comercialmente para cubrir lesiones similares y encontró que la membrana de FRP es mejor debido a que posee una manipulación facilitada, mejor resistencia a la rotura, mejor curación clínica, y mejor epitelización de la herida en el examen histopatológico postoperatorio (Mohanty, Pathak, and Dabas 2014).

Por su lado Miron.*et al* (2017), recogieron datos relacionados con la utilización de FRP para la curación de heridas y la regeneración tejidos blandos. Analizaron una variedad de artículos los cuales fueron clasificados en 7 estudios in vitro, 11 in vivo y 31 estudios clínicos. El 85% de los estudios in vitro y el 100% de los estudios in vivo mostraron que el uso de FRP es significativamente ventajoso. El 58% de los estudios clínicos informaron curación positiva de heridas con FRP y el 87% de los estudios clínicos apoyaron el uso de FRP. Con estos resultados los investigadores proponen que la FRP es un material viable para la regeneración y el aumento de tejidos blandos con resultados beneficiosos (Nanditha et al. 2017)(Miron et al. 2017).

Además, existen reportes de uso de FRP en la corrección de defectos asociados al tracto urinario en hombres, donde se estudió el resultado al cubrir los sitios de uretroplastias

correctivas por hipostasias distales. Los autores reportan que después de 8 meses de seguimiento no se observó una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control y el grupo de prueba. Sin embargo, las complicaciones postoperatorias fueron menores en el grupo de prueba el cual recibió la FRP en los sitios quirúrgicos (Nanditha et al. 2017)(Guinot et al. 2014). A su vez existe un informe de caso que se enfoca en la reparación de una fístula uretrocutánea en un niño de 3 años que se produjo como una complicación después de la reparación de hipospadia (Nanditha et al. 2017)(Soyer et al. 2013). En mujeres también se encuentran estudios informando de las bondades del pegamento de tejidos a base de FRP en una combinación con plasma autólogo rico en plaquetas como abordaje mínimamente invasivo para el cierre de la fístula vesicovaginal con resultados satisfactorios (Nanditha et al. 2017)(Shirvan, Alamdari, and Ghoreifi 2013).

Otras aplicaciones de FRP en cirugía de tejidos blandos es la inserción de membranas de FRP en la córnea para la prevención de perforación corneal, donde se observó que el dolor y la inflamación conjuntival se redujeron y se pudo prevenir la perforación corneal en casos de descemetocele severo (Nanditha et al. 2017)(Can et al. 2016). En lesiones nerviosas se descubrió que la fibrina rica en plaquetas puede inducir una recuperación sensorial y motora limitada pero adecuada además de reducir el dolor neuropático (Nanditha et al. 2017)(Kuffler et al. 2011). Por otro lado, selladores autólogos de fibrina rica en plaquetas para la reparación de hernias inguinales (Nanditha et al. 2017)(De Hingh et al. 2009) y aplicación post-quirúrgica de FRP en prolapso vaginal recurrente también han sido reportados con muy buenos resultados (Nanditha et al. 2017)(Gorlero et al. 2012).

USO DE FRP EN TEJIDO OSEO

En el campo de la ortopedia numerosos andamios han sido probados con el objetivo de mejorar la viabilidad celular, unión, proliferación, diferenciación osteogénica, vascularización, integración al huésped y soporte de carga, rasgos principales que describen un andamio adecuado para la regeneración ósea (Roseti et al. 2017); a su vez el uso de FRP en el tratamiento de las lesiones quísticas parece ser un nuevo enfoque terapéutico que promueve la regeneración ósea más rápida (Dar et al. 2016). Además, las membranas de FRP

mostraron un nivel de proliferación celular (cualitativo y cuantitativo) más alto respecto a estructuras de colágeno, mostrando entonces una gran capacidad como un andamio para la proliferación de células periosticas humanas en un cultivo in vitro (Gassling et al. 2010).

También se ha observado, en cuanto a tejido óseo se refiere, que la FRP muestra un mejor comportamiento y unas mejores tasas de regeneración celular cuando es combinado con componentes que se asemejan o hacen parte de dicho tejido. Como explica Sheu *et al.* Quien evaluó la eficacia de auto-implantes de cartílago en el cóndilo femoral medial, más la aplicación de fibrina rica en plaquetas como tratamiento para llenar defectos y regenerar cartílago en un modelo porcino; este autor observo que el procedimiento fue más efectivo cuando se combinó la FRP con condrocitos autólogos, lo que puede proporcionar una técnica para abordar los defectos del cartílago in vivo (Sheu et al. 2017). Igualmente, Bölükbaşı *et al.* demostraron que la FRP mezclada con fosfato de calcio bifásico presento un aumento histomorfométrico en la formación de hueso en comparación con la FRP sola al momento de regenerar defectos óseos creados quirúrgicamente en tibias de ovejas (Bölükbaşı et al. 2013). Sin embargo, y a pesar de los buenos resultados en el enfoque clínico de la Ingeniería de tejidos óseos los andamios de fibrina no han tenido lugar a gran escala todavía, debido a la necesidad de estudios más profundos, los altos costos de fabricación y la dificultad de obtener aprobación regulatoria (Dar et al. 2016)(Roseti et al. 2017).

TÉCNICAS DE OBTENCIÓN DE FRP

La fibrina rica en plaquetas (FRP) no es más que sangre que se centrifuga sin adicionar ninguna sustancia, no se requiere de ningún tipo agente gelificante (Dohan et al. 2006a)(Chatterjee, Agarwal, and Subbaiah 2014). El protocolo estandarizado para obtención de FRP en humanos es muy simple: se toma una muestra de sangre sin anticoagulante en tubos de 10 ml que se centrifugan inmediatamente a 3000 rpm (según el autor aproximadamente 400 G) durante 10 minutos. La ausencia de anticoagulante implica la activación plaquetaria inmediatamente la sangre entra en contacto con el tubo y hay liberación de los factores de coagulación (Dohan et al. 2006a).

Después de la centrifugación se obtiene el plasma acelular, que se acumula en la parte superior del tubo. En la parte central del tubo, se obtiene un coágulo de fibrina, justo entre los glóbulos rojos ubicados en la parte inferior y el plasma acelular en la parte superior. Las plaquetas están atrapadas masivamente en las mallas o coágulos de fibrina. Un manejo rápido es la única forma de obtener un coágulo de FRP de buena calidad y que sea aplicable en situaciones clínicas. Si el tiempo transcurrido entre recolectar sangre y comenzar la centrifugación es demasiado largo, la fibrina se polimerizará de forma difusa en el tubo y solo se obtendrá un pequeño coágulo de sangre sin consistencia (Dohan et al. 2006a).

Por otro lado R.F. Jiménez-Aristizabal et al. (2017) reporta un protocolo adicional para obtener FRP en equinos el cual consta de una centrifugación a 240 G durante 8 minutos, con efectos muy similares en esta especie al protocolo descrito por Choukroun como encapsulamiento de plaquetas y factores de crecimiento en el coagulo que se forma (Jiménez-Aristizabal et al. 2017).

MATERIALES Y MÉTODOS

ANIMALES

Se emplearon 13 caninos adultos (*Canis Lupus Familiaris*), clínicamente sanos con edades entre 2 y 7 años y un peso igual o superior a 20kg. Los caninos ingresaron al área de clínica quirúrgica del Hospital Veterinario para un procedimiento electivo. A cada canino se le realizó hemoleucograma, creatinina y alanina aminotransferasa (ALT), los cuales se encontraron dentro de los parámetros normales. De estos animales se tomó una muestra de 34 ml de sangre entera, a cada individuo la cual fue empleada para producir los hemoderivados que fueron evaluados en el estudio.

OBTENCION DE LA SANGRE.

La recolección de las muestras en cada individuo se realizó el día del procedimiento electivo programado, justo antes de realizar la pre-medicación anestésica, durante el proceso de preparación quirúrgica. Se ubicó el paciente en decúbito lateral izquierdo y se extrajo sangre

de la vena yugular mediante un catéter mariposa 21 G (Terumo, Leuven, Belgium), la cual fue recolectada en tubos (BD Vacutainer® Safety-Lok™). Para cada animal, se tomaron muestras de sangre en 6 tubos los cuales fueron divididos de la siguiente manera.

Un (1) tubo de 4ml con anticoagulante EDTA (Vacuette®). Esta muestra se utilizó para realizar conteo celular basal mediante un contador hematológico automatizado por impedancia volumétrica (Nihon Kohden, Celltac Alpha, MEK-6450J.).

Cinco (5) tubos plásticos de 6 mL, sin anticoagulante y recubiertos con sílice micronizado (Improbe® Evacuated Blood Collection Tube – Clot Activator). Estas 5 muestras fueron a su vez divididas en 3 grupos los cuales recibieron diferentes tipos de procesos y fueron llamados protocolo de centrifugación N°1 (2 tubos), protocolo de centrifugación N°2 (2 tubos), y control (1 tubo) para obtener una comparación posterior entre estos. La centrifugación de las muestras se realizó inmediatamente después de la recolección. (ver figura 1)

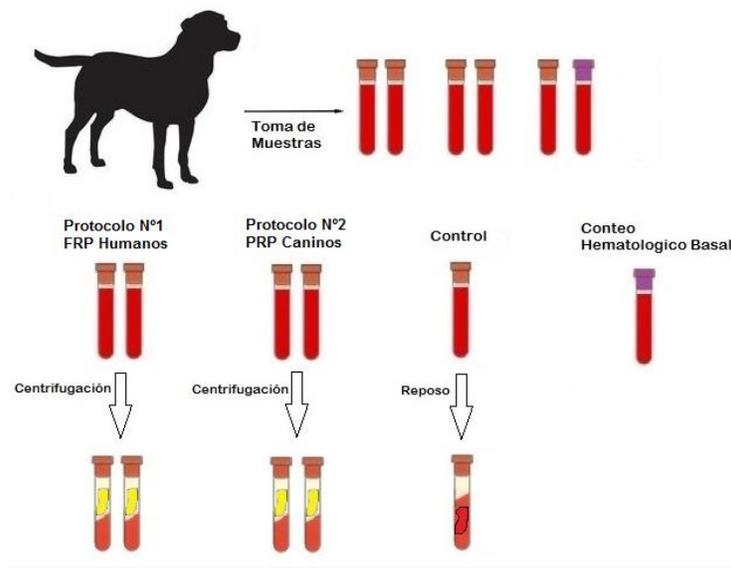


Figura 4: Representación esquemática del proceso de obtención de muestras en cada individuo, incluidos el tubo control y conteo hematológico basal (hemoleucograma).

PROTOCOLOS

PROTOCOLO DE CENTRIFUGACIÓN N°1:

Dos tubos de muestra de cada individuo fueron centrifugados a una fuerza de 410g durante 10 minutos. Protocolo descrito por Dohan *et al.* (Silva et al. 2011a) para obtener fibrina rica en plaquetas (FRP) en la especie humana. Se obtuvieron dos coágulos según este protocolo. Cada coagulo tuvo un posterior tratamiento, el primero se fijó completamente sin modificar su estructura y el segundo sufrió un moldeado en forma de malla antes de su fijación en Glutaraldehído al 2%

PROTOCOLO DE CENTRIFUGACIÓN N°2:

Otros dos tubos de muestra de cada individuo, se centrifugaron a una fuerza de 191g durante 6 minutos, protocolo descrito por Silva *et al.* (Dohan et al. 2006b) para obtener concentrado autólogo de plaquetas (CAP) en la especie canina. Se obtuvieron dos coágulos según este protocolo. Cada coagulo tuvo un posterior tratamiento, al igual que en el protocolo N°1 el primer coagulo se fijó completamente sin modificar su estructura y el segundo sufrió un modelado en forma de malla antes de su fijación en Glutaraldehído al 2%. Para ambos protocolos se utilizó una centrifuga Hettich ROTOFIX-32.

El tubo denominado control se dejó en reposo a temperatura ambiente. Esto se hizo con la intención de generar un coagulo con unas características de formación diferentes a las de centrifugación, más semejantes a una formación *in vivo*; con el cual comparar las diferencias o similitudes físicas entre un coagulo formado por centrifugación y un coagulo generado en reposo. Se intentó realizar un modelado de malla de este coagulo generado en reposo sin efecto positivo en los experimentos realizados; debido a que la estructura y las características visco elásticas difieren en gran medida respecto a los obtenidos mediante centrifugación.

ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y CELULAR DEL COAGULO DE FIBRINA.

Independientemente del protocolo utilizado, los coágulos generados mediante centrifugación se retiraron del tubo usando pinzas de disección con garra y se les separó la base del coagulo de células rojas con unas tijeras. Uno de los coágulos de cada protocolo ya libre de su porción roja se ubicó de manera individual en un dispositivo de acero inoxidable (CE Medentra Stainless) utilizado para comprimir el coagulo y generar un modelado de malla. El otro coagulo de cada protocolo no se sometió a ningún tipo de compresión su estructura se conservó intacta (Figura2). El resultado es la generación de dos coágulos completos formados mediante protocolos de centrifugación N°1 y N°2 respectivamente, al igual que dos mallas moldeadas pero cuyos coágulos base fueron obtenidos de igual manera mediante protocolos de centrifugación N°1 y N°2. En ambas estructuras tanto coagulo completo como malla se observó gran resistencia a una manipulación fuerte sin presentarse deterioro o daño. La estructura moldeada en forma de malla necesito una mayor fuerza de tensión para su rompimiento.

El coágulo generado en reposo se extrajo de igual forma de los tubos. Su celularidad roja fue homogénea en toda la estructura por lo que no se realizaron separaciones o cortes de este coagulo.

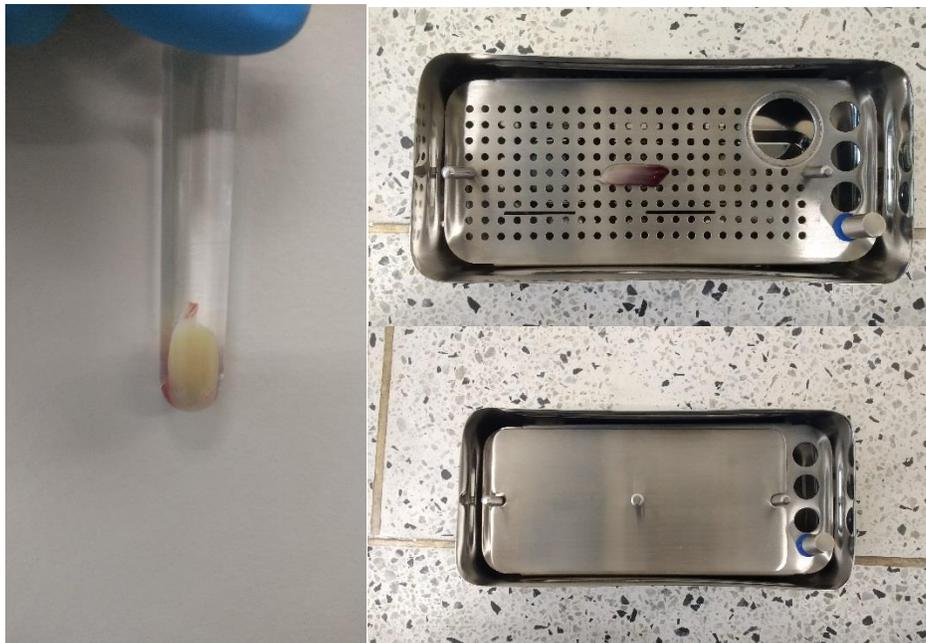


Figura 5: (A) Coagulo generado mediante protocolo N°2 en proceso de fijación en Glutaraldehído (B) Coagulo generado mediante protocolo N°2 dispuesto en dispositivo CE Medentra Stainless para posterior moldeado en forma de malla (C) dispositivo CE Medentra Stainless durante el proceso de moldeado, se aprecia una estructura metálica en forma de lámina que recubre, aplana y extrae el sobrenadante del coagulo.

Los coágulos enteros generados por los dos diferentes protocolos de centrifugación, las mallas modeladas y el coagulo generado en reposo de cada individuo se sumergieron en Glutaraldehído al 2% para la fijación del tejido durante una y media horas. Posteriormente se trataron por desecación (a temperatura ambiente) durante 24 horas. Se recubrieron con micro pulverización de oro y se examinaron en el centro de microscopia electrónica de barrido (MEB) (FEI-QUANTA 250 Environmental Scanning Electron Microscope-ESEM) de la Universidad de Caldas. Las fotografías se tomaron a 15 kV con aumentos entre 60 a 2000. MEB se utilizó para confirmar mediante visualización directa la identificación de los cuerpos celulares atrapados en la matriz (leucocitos, plaquetas y glóbulos rojos) así mismo para analizar mediante visualización directa la arquitectura general de la estructura matriz de fibrina que se forma.

Después que los coágulos fueron retirados de los tubos para su respectivo proceso hemoderivado y análisis MEB, el sobrenadante residual en el tubo se sometió a un conteo hematológico automatizado por impedancia volumétrica (Nihon Kohden, Celltac Alpha, MEK-6450J.). Esto con la intención de obtener el valor celular atrapado en los coágulos generados por los diferentes protocolos (protocolo N°1, protocolo N°2 y control). Se logró comparando el valor del sobrenadante con los niveles basales de cada individuo obtenidos mediante el hemoleucograma inicial. La diferencia entre estos dos valores se consideró como la cantidad de células atrapadas en cada coagulo

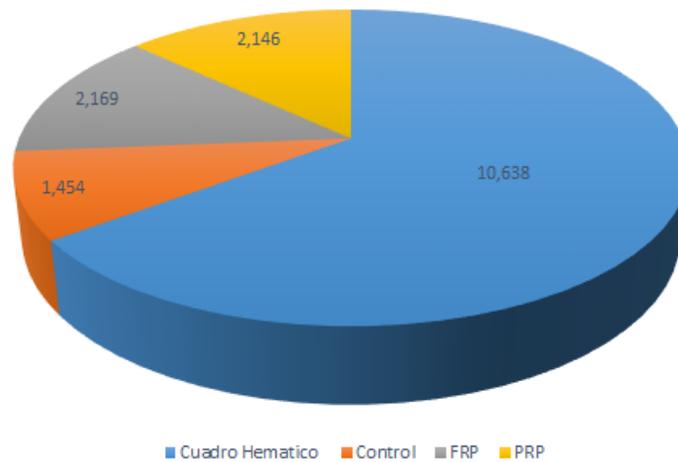
ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para comparar la celularidad basal inicial con la obtenida al final de los procedimientos de obtención de FRP se realizó un conteo hematológico automatizado por impedancia volumétrica al sobrenadante de cada tubo después de sacar el coagulo en el laboratorio de

terapia regenerativa de la Universidad de Caldas (Nihon Kohden, Celltac Alpha, MEK-6450J.). Esto permitió determinar una aproximación de la cantidad de células que quedaron atrapadas en el coagulo, para cada protocolo.

Los recuentos celulares estudiados para cada protocolo no presentaron una distribución normal (prueba de Shapiro-Wilk ($P < 0,05$)). Los valores de eritrocitos, leucocitos, linfocitos y plaquetas entre protocolos fueron comparados con el valor basal (cuadro hemático), mediante la prueba de (Kruskall-Wallis) arrojando como resultado diferencia significativa entre estos. Se procede entonces con una prueba de Dunnett comparación pareada y se observa que no hay una diferencia significativa entre protocolo N°1, N°2 y control para estructuras celulares como leucocitos, linfocitos y plaquetas; esto indica que los tres tipos de coagulo retuvieron la misma cantidad de estos cuerpos celulares. Sin embargo, cuando se analizaron los eritrocitos se apreció una diferencia significativa del coagulo formado en reposo denominado control respecto a los demás protocolos. Lo que indica que este tipo de coagulo atrapa una mayor cantidad de eritrocitos.

Valor medio de Leucocitos por tipo de Protocolo

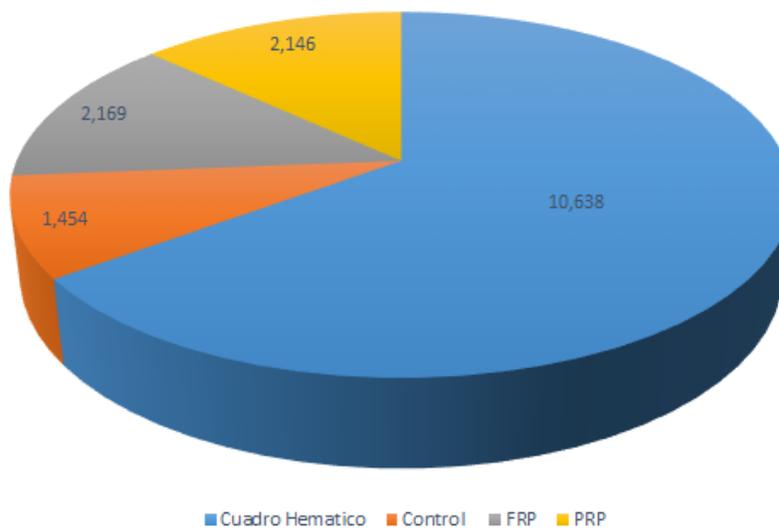


Comparaciones pareada de Tipo de Protocolo para Leucocitos

Muestra 1-Muestra 2	Estadístico de contraste	Error estándar	Desv. Estadístico de contraste	Sig.	Sig. ajust.
Control-FRP	-7,615	5,939	-1,282	,200	1,000
Control-PRP	-10,577	5,939	-1,781	,075	,449
Control-Cuadro Hematico	31,962	5,939	5,382	,000	,000
FRP-PRP	-2,962	5,939	-,499	,618	1,000
FRP-Cuadro Hematico	24,346	5,939	4,100	,000	,000
PRP-Cuadro Hematico	21,385	5,939	3,601	,000	,002

Diagrama 1: Comparación pareada de los tipos protocolo respecto al valor de leucocitos. No se observa una diferencia significativa ($P > 0,05$) de los coágulos obtenidos mediante los protocolos 1, 2 y en reposo.

Valor medio de Linfocitos por tipo de protocolo

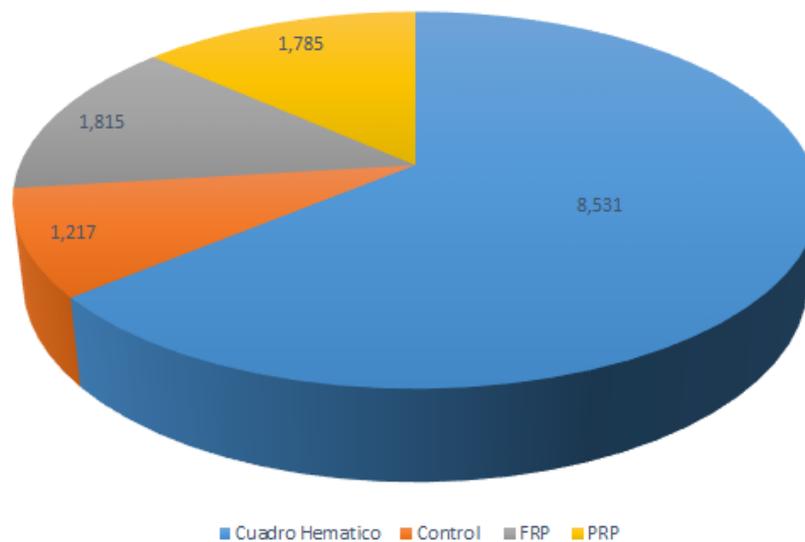


Comparaciones entre parejas por tipo de Protocolo para Linfocitos

Muestra 1-Muestra 2	Estadístico de contraste	Error estándar	Desv. Estadístico de contraste	Sig.	Sig. ajust.
Control-FRP	-1,526	5,908	-,258	,796	1,000
Control-PRP	-1,641	5,908	-,278	,781	1,000
Control-Cuadro Hematico	25,603	5,908	4,333	,000	,000
FRP-PRP	-,115	5,789	-,020	,984	1,000
FRP-Cuadro Hematico	24,077	5,789	4,159	,000	,000
PRP-Cuadro Hematico	23,962	5,789	4,139	,000	,000

Diagrama 2: Comparación pareada de los tipos protocolo respecto al valor de linfocitos. No se observa una diferencia significativa ($P > 0,05$) de los coágulos obtenidos mediante los protocolos 1, 2 y en reposo.

Valor medio de Granulocitos por tipo de Protocolo

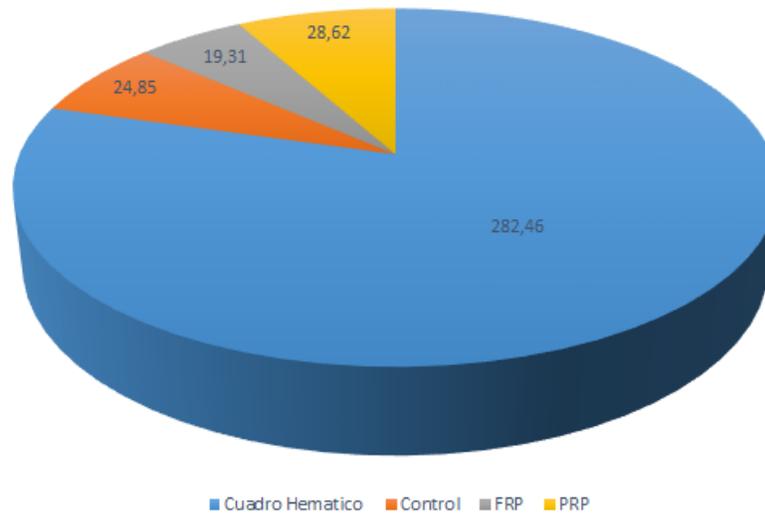


Comparaciones entre parejas por tipo de Protocolo para Granulocitos

Muestra 1-Muestra 2	Estadístico de contraste	Error estándar	Desv. Estadístico de contraste	Sig.	Sig. ajust.
Control-FRP	-7,282	5,947	-1,225	,221	1,000
Control-PRP	-10,974	5,947	-1,845	,065	,390
Control-Cuadro Hematico	31,436	5,947	5,286	,000	,000
FRP-PRP	-3,692	5,827	-,634	,526	1,000
FRP-Cuadro Hematico	24,154	5,827	4,145	,000	,000
PRP-Cuadro Hematico	20,462	5,827	3,512	,000	,003

Diagrama 3: Comparación pareada de los tipos protocolo respecto al valor de granulocitos. No se observa una diferencia significativa ($P > 0,05$) de los coágulos obtenidos mediante los protocolos 1, 2 y en reposo.

Valor medio de Plaquetas por tipo de Protocolo

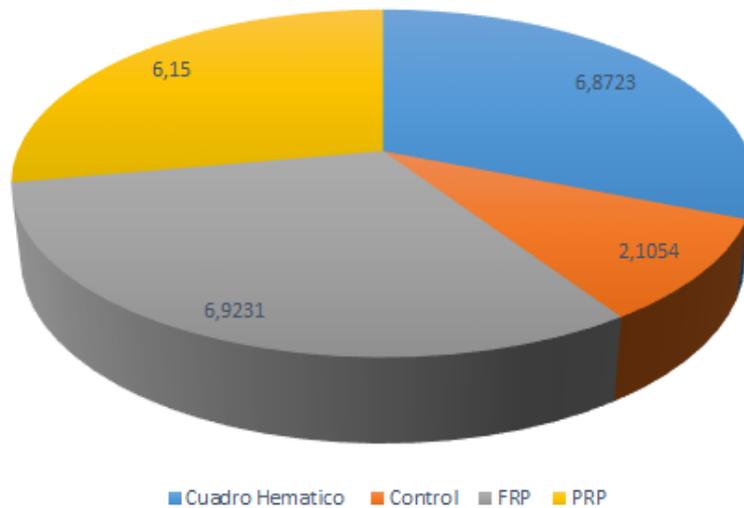


Comparaciones entre parejas por tipo de Protocolo para Plaquetas

Muestra 1-Muestra 2	Estadístico de contraste	Error estándar	Desv. Estadístico de contraste	Sig.	Sig. ajust.
FRP-PRP	-1,346	5,939	-,227	,821	1,000
FRP-Control	3,154	5,939	,531	,595	1,000
FRP-Cuadro Hematico	27,500	5,939	4,631	,000	,000
PRP-Control	1,808	5,939	,304	,761	1,000
PRP-Cuadro Hematico	26,154	5,939	4,404	,000	,000
Control-Cuadro Hematico	24,346	5,939	4,099	,000	,000

Diagrama 4: Comparación pareada de los tipos protocolo respecto al valor de plaquetas. No se observa una diferencia significativa ($P > 0,05$) de los coágulos obtenidos mediante los protocolos 1, 2 y en reposo.

Valor medio de Eritrocitos por tipo de Protocolo



Comparaciones entre parejas por tipo de Protocolo para Eritrocitos

Muestra 1-Muestra 2	Estadístico de contraste	Error estándar	Desv. Estadístico de contraste	Sig.	Sig. ajust.
Control-PRP	-20,538	5,944	-3,455	,001	,003
Control-FRP	-23,154	5,944	-3,895	,000	,001
Control-Cuadro Hematico	26,615	5,944	4,478	,000	,000
PRP-FRP	2,615	5,944	,440	,660	1,000
PRP-Cuadro Hematico	6,077	5,944	1,022	,307	1,000
FRP-Cuadro Hematico	3,462	5,944	,582	,560	1,000

Diagrama 5: Comparación pareada de los tipos de protocolo respecto al valor de eritrocitos, se observa una diferencia significativa ($P < 0,05$) del coágulo obtenido en reposo, respecto a los protocolos 1 y 2.

RESULTADOS EVALUACION MEB

Independiente del tipo de protocolo utilizado para la obtención, la visualización del coágulo sin compresión y del moldeado en malla, se realizó inicialmente entre 60 y 100 aumentos; se observaron algunas diferencias principalmente entre los coágulos control y los obtenidos por los dos diferentes protocolos descritos anteriormente.

La calidad estructural es quizás la diferencia más notable entre estos, se aprecia de manera general una arquitectura más conservada, estable y homogénea en los coágulos obtenidos por los dos diferentes protocolos dando un aspecto de estructura compacta; a diferencia de los controles obtenidos en reposo los cuales se observan con una mayor cantidad de grietas e imperfecciones, fracturas de bordes finos y en algunas ocasiones este coagulo está incompleto (seccionado), observándose además una aparente ausencia de estructura interna por segmentos. esto debido a la fragilidad que presenta durante el proceso de fijación, desecación y posterior manipulación durante la visualización en MEB. (Figura 3)

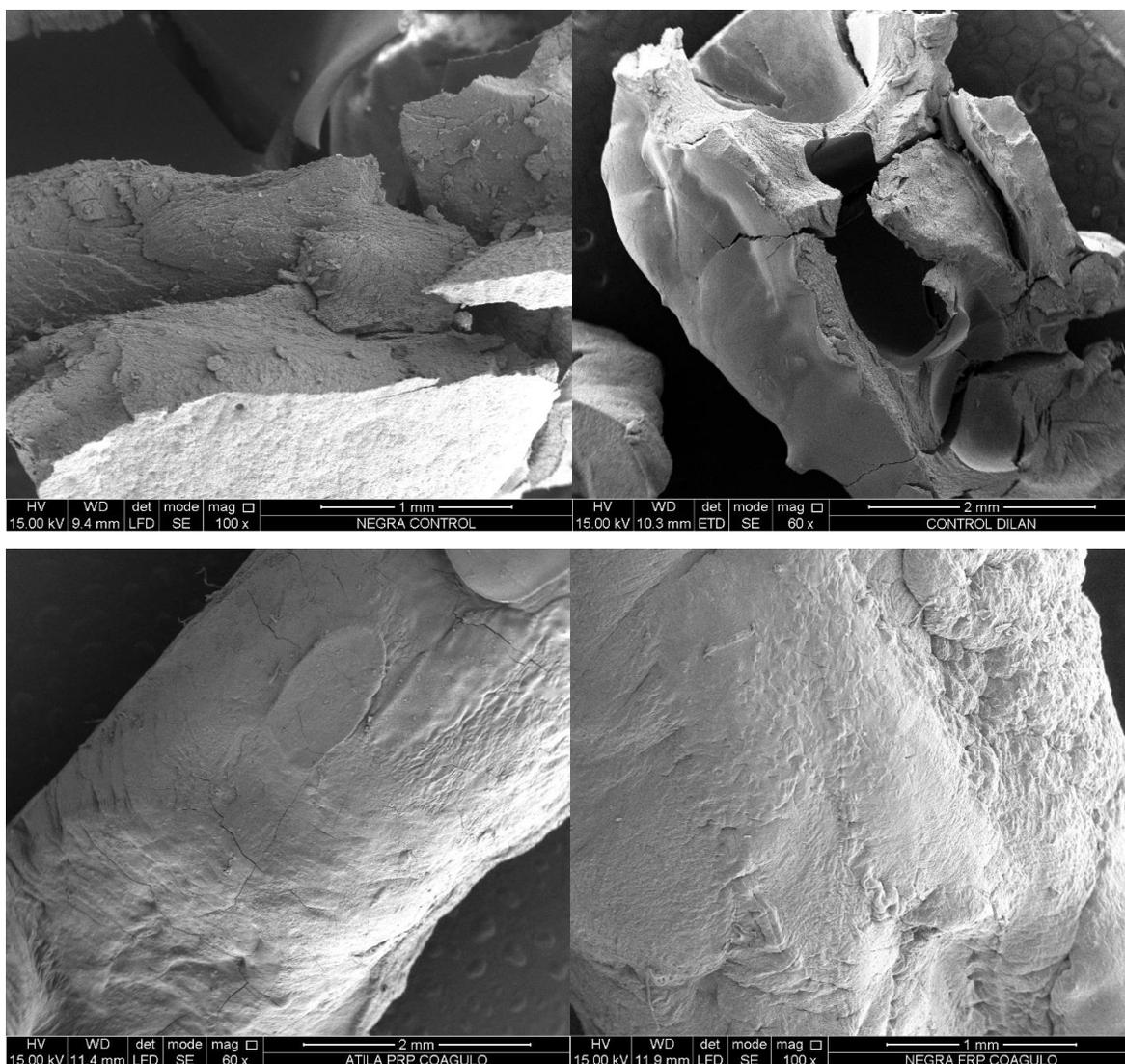
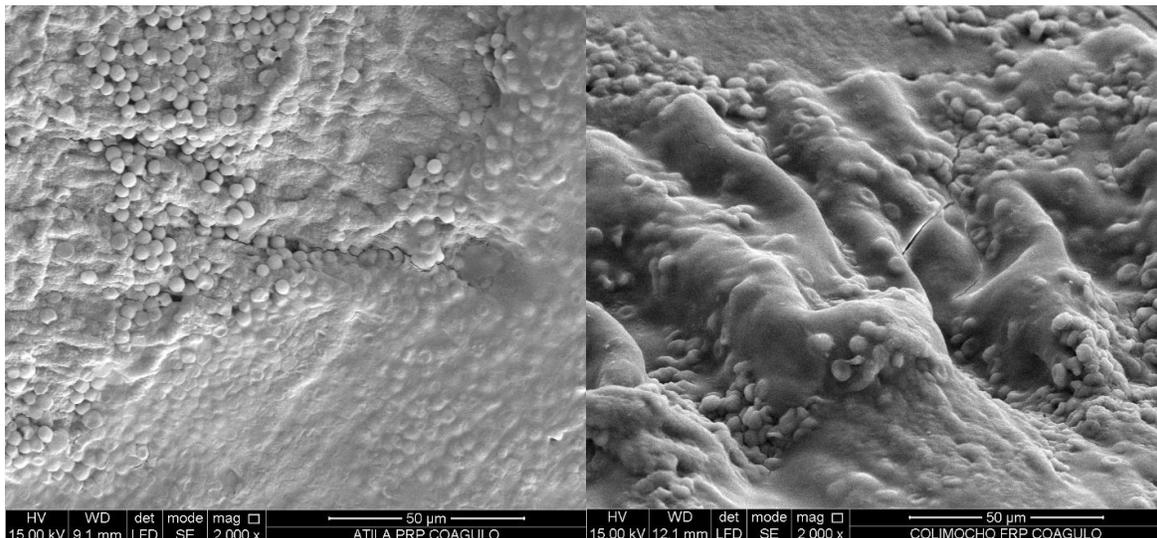


Figura 6: (A) Fotografía MEB a un aumento de 60X de coágulo control generado en reposo. Se observa una estructura con múltiples grietas y fracturas, además de una aparente ausencia de estructura interna por segmentos. (B) Fotografía MEB a un aumento de 100X de coágulo control, se observa estructura fracturada y bordes finos; este tipo de estructura se genera debido a la fragilidad que presentan durante su manipulación pre y post fijación en Glutaraldehído. (C) Fotografía MEB a 60X de la parte central de un coagulo formado mediante un protocolo para PRP; se observa una estructura homogénea y compacta, con una mínima cantidad de grietas y de menor tamaño en comparación con los coágulos control. (D) Fotografía MEB a 100X parte central de un coagulo formado mediante un protocolo para FRP; se aprecia una superficie un poco más irregular en comparación con el coagulo obtenido mediante protocolo para PRP, pero aun su estructura sigue siendo homogénea y regular en comparación con los coágulos control.

Durante el análisis del coagulo completo y modelado mediante MEB, no fue posible realizar un conteo celular que estimara el porcentaje atrapado en la matriz de fibrina, esto debido a que las células quedan ocultas dentro de esta estructura densa y homogénea impidiendo su visualización en algunos casos. En la figura 4 se aprecian imágenes MEB a 2000X de coágulos obtenidos tanto a protocolos N°1 como N°2 en estas se pueden observar las células atrapadas de manera parcial en la estructura matriz, demostrando que las células pueden quedar en la porción interna; no siendo visualizadas en algunos casos mediante MEB.



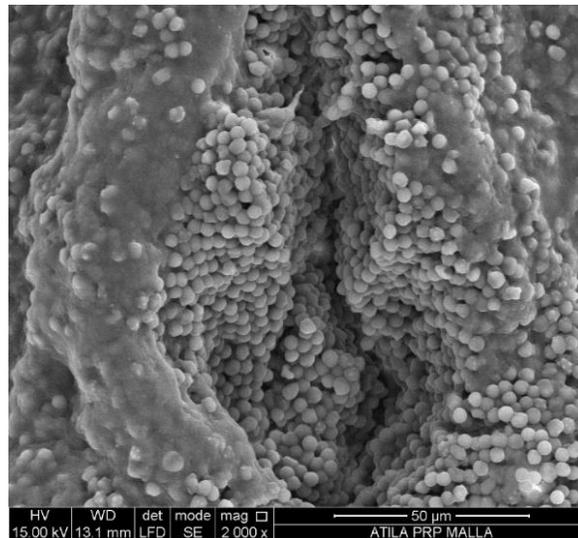


Figura 7: (A) Fotografía MEB a 2000X de un coágulo generado mediante un protocolo para PRP en la especie canina, se observan cuerpos celulares atrapados en la matriz de fibrina, obsérvese como algunos quedan casi totalmente ocultos, así como otros solo están adheridos a la superficie (B) Cuerpos celulares que son cubiertos parcial y totalmente por la estructura densa y homogénea de la fibrina. Fotografía MEB a 2000X de un coágulo generado mediante protocolo para FRP en humanos. (C). Conglomerado de estructuras celulares identificadas en imagen MEB a 2000X en un coágulo generado mediante protocolo de centrifugación para PRP y posteriormente modelado en malla.

Sin embargo, al observar nuevamente algunas imágenes a 60 y 100X de coágulos que fueron modelados en forma de malla y que fueron obtenidos tanto a protocolos de FRP como de PRP, se evidenció una mayor cantidad de células en la porción más próxima al contenido celular rojo retirado previamente. Esta visualización se logra al comprimir la estructura densa que envuelve las células, reduciendo así el volumen de la estructura matriz y dejando en evidencia los cuerpos celulares. También es evidente en las fotografías el moldeado que ejerce el dispositivo sobre el coágulo, dejando marcas circulares de 1.5 mm de diámetro y con un volumen mayor de fibrina. Además, se visualizan algunos pliegues o doblamientos que se generan en la estructura malla durante el proceso de desecación. (Figura 5).

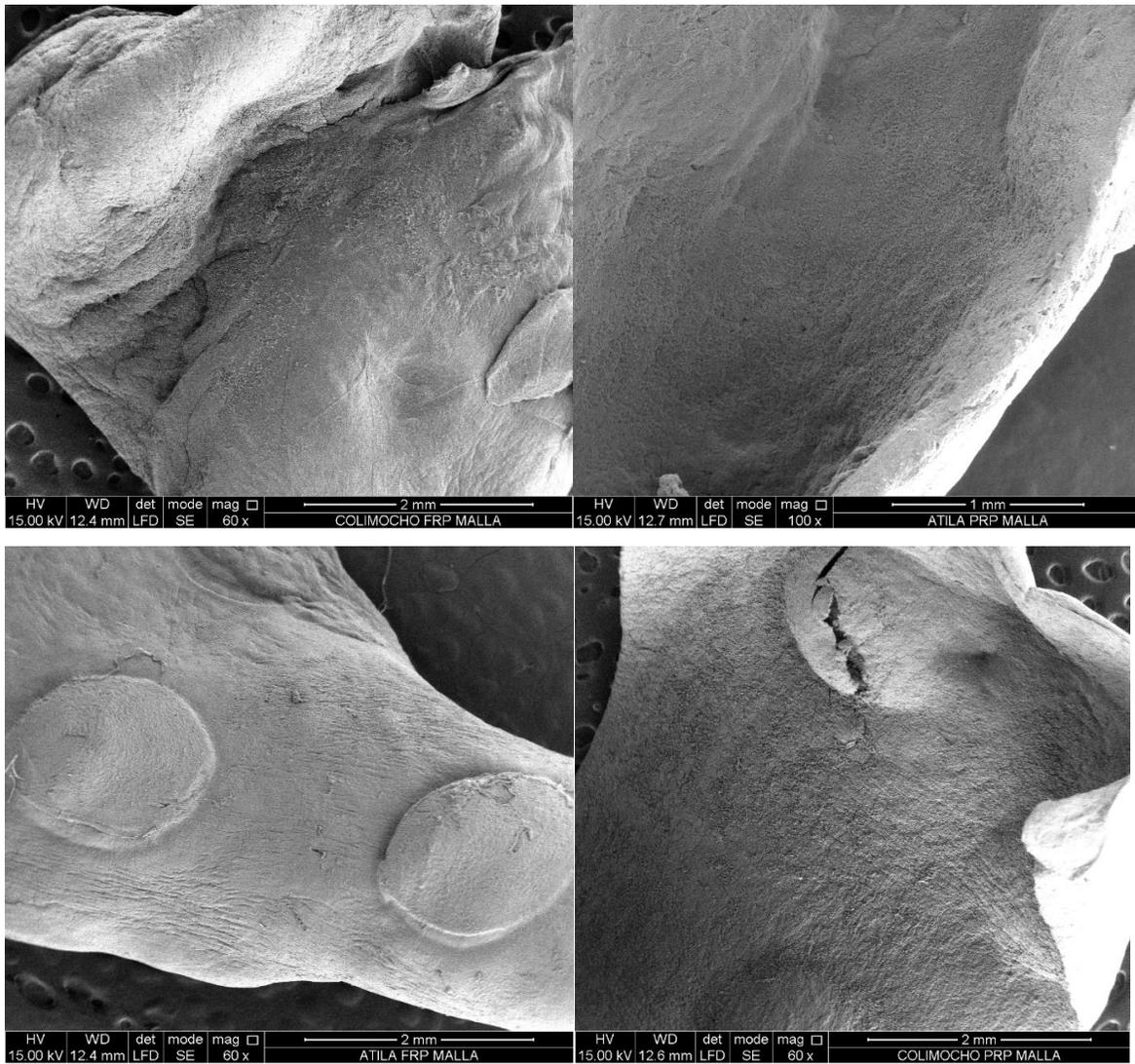


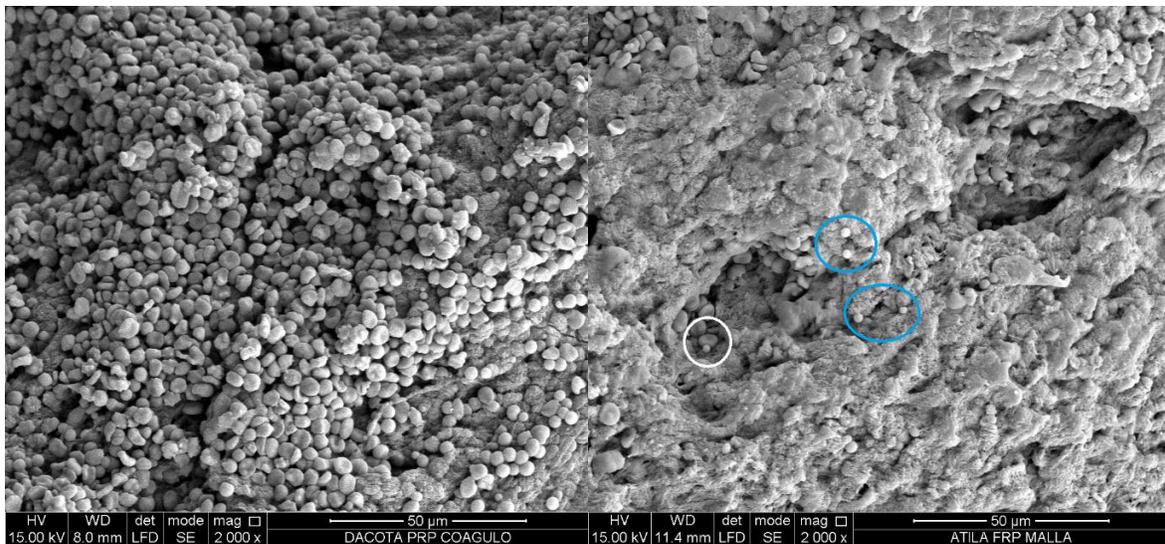
Figura 8: (A) y (B) Fotografía MEB a 60X y 100X respectivamente; de coágulos generados mediante protocolos para FRP y PRP y posterior modelado en forma de malla; se observa una mayor cantidad de estructuras celulares atrapadas en la porción de fibrina más próxima al paquete celular rojo que se retiró previamente. (C) Porción más lejana respecto al paquete celular rojo de una malla obtenida mediante un protocolo para FRP; se observan estructuras circulares de 1,5mm de diámetro con una mayor concentración de fibrina además de poca celularidad respecto a la porción más próxima. Fotografía MEB a 60X. (D). Imagen de malla obtenida mediante protocolo de PRP, la cual presenta contracción o plegamiento, debido al proceso de desecación, también se observa la estructura circular de 1,5mm de diámetro que se genera debido al efecto mecánico del dispositivo de moldeado.

Por otra parte, la identificación y posible diferenciación de los cuerpos celulares se realizó mediante medición de los mismos a 2000X. Teniendo en cuenta las características morfológicas de cada célula además de los valores de tamaño estandarizados para la especie canina.

Tipo de Célula	Valor de Referencia	Valor Promedio Obtenido en MEB
Eritrocitos	6-7 μ	5,7 μ
Plaquetas	2,2-3,7 μ	2,2 μ
Leucocitos	9-15 μ	9,3 μ

Tabla 1: Tamaño celular de referencia en la especie canina comparado el tamaño promedio obtenido mediante medición de los cuerpos celulares en MEB.

Para la medición se utilizó ImageJ (software de procesamiento de imagen digital de dominio público). En ambos protocolos se lograron identificar cuerpos celulares que oscilaron entre 2 y 9 μ (Figura 6).



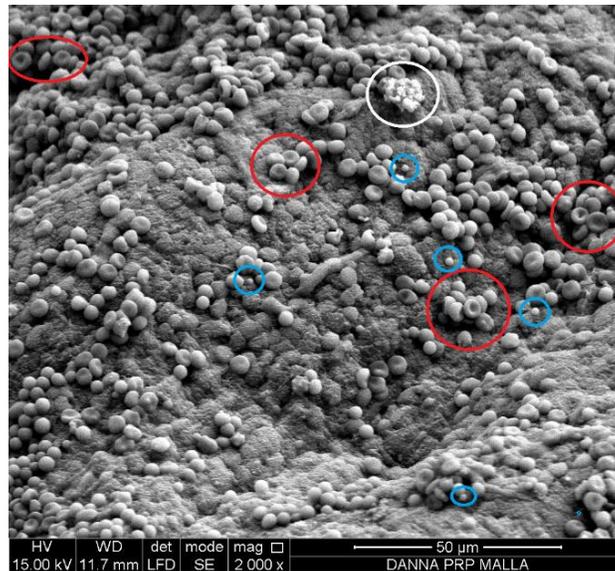


Figura 9: (A) Fotografía MEB a 2000X; de un coágulo generado mediante protocolo para PRP; se evidencia gran cantidad de estructuras celulares adheridas a la superficie, y algunas otras atrapadas en el interior de la matriz. (B) Fotografía MEB a 2000X de una malla obtenida mediante un protocolo para FRP; dentro del círculo blanco se aprecia un eritrocito junto a una plaqueta no activa; los círculos azules muestran más plaquetas inactivas atrapadas en la estructura de fibrina. (C). Imagen de malla obtenida mediante protocolo de PRP, en esta imagen se aprecian tres diferentes cuerpos celulares; dentro del círculo blanco se aprecia un linfocito, los círculos rojos muestran eritrocitos y los círculos azules muestran plaquetas no activas.

DISCUSIÓN

Evaluar la distribución celular dentro del coágulo y la malla moldeada no fue posible debido a la característica gelatinosa que presenta la estructura y que envuelve las células ocultándolas a MEB, en este caso solo se pudo comprobar su presencia por visualización directa de cuerpos celulares parcialmente atrapados o adheridos a la superficie del coágulo. Sin embargo, al realizar conteo hematológico al sobrenadante de cada tubo se pudo determinar que una gran porción celular quedo atrapada en los tres tipos de coágulos existiendo una diferencia estadísticamente significativa del coágulo generado en reposo también denominado control, respecto a los coágulos generados por los protocolos 1 y 2 en

términos de eritrocitos. El análisis de las demás estructuras celulares demostró que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre estos.

Por otro lado; las diferencias estructurales y de resistencia entre el coagulo en reposo y los generados por los protocolos de centrifugación se debieron quizás a la forma en que se polimeriza la fibrina. Como lo describe Dohan *et al.* (Dohan et al. 2006b) durante la centrifugación la polimerización de la fibrina se lleva a cabo de forma natural sin aditivos que inicien este proceso por lo tanto se presenta de manera lenta y progresiva generando una red de fibrina con una organización tridimensional mucho más homogénea incluso más altamente coherente que los coágulos de fibrina generados *in vivo*.

Este modo de polimerización progresiva facilita una mayor incorporación de las citocinas circulantes a los coágulos y esto a su vez implica un aumento de la vida útil de estas citocinas, ya que al implantar un coagulo en una lesión las citocinas permanecen *in situ* y son liberadas cuando las células comienzan la remodelación de la matriz cicatricial, es decir, cuando tienen que ser estimuladas para iniciar la reconstrucción del sitio lesionado (Nanditha et al. 2017). Además, durante el proceso de centrifugación los hematíes son separados del coagulo lo que también puede tener un efecto de resistencia estructural al disminuir la cantidad de células alojadas en la matriz.

Para este estudio una mejor preparación de las muestras para MEB quizás arrojará mejores resultados, en este estudio se dificultó debido a la ausencia de un secador de punto crítico, el cual permite una mejor preparación de las muestras para el microscopio electrónico.

CONCLUSIONES

Al realizar una recolección de muestra en un tubo sin anticoagulante, permite que la manipulación de la sangre y el contacto de esta con sílice micronizado incluido en el tubo sea el que inicie una coagulación por la vía intrínseca. Quedando atrapadas las células en los coágulos de fibrina. Esto se comprobó mediante la visualización directa de los cuerpos celulares en MEB.

En el análisis cuantitativo se observó una diferencia significativa entre el coagulo generado en reposo, y los coágulos generados mediante los dos tipos de protocolos en cuanto a eritrocitos; es decir el coagulo control retiene un mayor porcentaje eritrocitario, algo que no es relevante al momento de una aplicación clínica del coagulo.

En cuanto a leucocitos y plaquetas los tres coágulos atrapan la misma cantidad de células; sin embargo, características como resistencia estructural a la manipulación y a la fuerza de tensión de los coágulos generados por protocolo N°1 y N°2 son mayores respecto al coagulo control generado en reposo.

La manipulación de la sangre mediante los dos tipos de protocolos si permitió la obtención de un coagulo y una malla estable y resistente, con características visco elásticas deseables al momento de una aplicabilidad clínica. Sin embargo, el tamaño del coagulo generado con el protocolo N°1 logra una estructura de 1cm a 1.5cm más largo, siendo este tipo de estructura más deseable cuando se enfrentan lesiones de gran tamaño o con grandes pérdidas de tejido. Las posibilidades que nos brinda la fibrina rica en plaquetas FRP respecto al PRP clásico lo hace una buena opción al momento de una aplicación clínica. La fibrina presenta una serie de características especiales y deseadas al momento de la cicatrización y la regeneración celular, características como el conjunto de células, citocinas, y glicoproteínas estructurales enmarañadas dentro de la red que se polimeriza lentamente y que le confiere una arquitectura fisiológica particularmente favorable para apoyar el proceso de cicatrización, favoreciendo los mecanismos de defensa, incluso regulando la inflamación en los sitios tratados, esto gracias la liberación de estas moléculas durante la remodelación de la matriz celular.

Según estas características se puede considerar la FRP como un biomaterial de curación pues cuenta con todos los parámetros necesarios que permiten un proceso cicatricial óptimo, logrando desde un punto de vista clínico, acelerar los procesos de cicatrización fisiológica.

La compresión mecánica del coagulo permitió generar una estructura en lámina con mayor resistencia a la fuerza de tensión, además evidencio que la mayor cantidad de células queda atrapada en la porción más próxima a la interfase entre la línea roja y blanca del coagulo, haciendo esta porción particularmente conveniente.

A pesar que la mayor información sobre fibrina rica en plaquetas se encuentra en medicina humana, es posible que su utilización en caninos y felinos demuestre resultados similares. Es aquí donde se hace necesario realizar investigaciones que permitan establecer su viabilidad y aplicación en pequeños animales.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

- Ahmed, Tamer A.E., Emma V. Dare, and Max Hincke. 2008. "Fibrin: A Versatile Scaffold for Tissue Engineering Applications." *Tissue Engineering Part B: Reviews* 14(2): 199–215. <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/ten.teb.2007.0435>.
- Bölükbaşı, Nilüfer, Sinem Yenyol, Merva Soluk Tekkesin, and Kemal Altunatmaz. 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 - Clinical and Experimental* 75: 15–21.
- Can, Mehmet Erol et al. 2016. "Urgent Therapeutic Grafting of Platelet-Rich Fibrin Membrane in Descemetocoele." *Cornea* 35(9): 1245–49. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27362878> <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00003226-201609000-00017>.
- Carmona, J U, P Marti, E Bach, and M Prades. 2006. "Evaluation of Single and Double Centrifugation Tube Methods for Concentrating Equine Platelets." 81: 237–45.
- Chatterjee, Anirban, Prerna Agarwal, and Shobha Krishna Subbaiah. 2014. "Platelet Rich Fibrin: An Autologous Bioactive Membrane." *Apollo Medicine* 11(1): 24–26. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0976001614000088>.
- Dar, Manzoor et al. 2016. "Use of Autologous Platelet-Rich Fibrin in Osseous Regeneration after Cystic Enucleation: A Clinical Study." *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research* 6: S29–32.
- Dohan, David M. et al. 2006a. "Platelet-Rich Fibrin (PRF): A Second-Generation Platelet Concentrate. Part I: Technological Concepts and Evolution." *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology* 101(3).
- . 2006b. "Platelet-Rich Fibrin (PRF): A Second-Generation Platelet Concentrate. Part II: Platelet-Related Biologic Features." *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology* 101(3).
- . 2006c. "Platelet-Rich Fibrin (PRF): A Second-Generation Platelet Concentrate. Part III: Leucocyte Activation: A New Feature for Platelet Concentrates?" *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology* 101(3).
- Dohan Ehrenfest, David M. et al. 2010. "Three-Dimensional Architecture and Cell Composition of a Choukroun's Platelet-Rich Fibrin Clot and Membrane." *Journal of Periodontology* 81(4): 546–55. <http://www.joponline.org/doi/10.1902/jop.2009.090531>.
- Gassling, Volker et al. 2010. "Platelet-Rich Fibrin Membranes as Scaffolds for Periosteal Tissue Engineering." *Clinical Oral Implants Research* 21(5): 543–49.
- Gorlero, Franco et al. 2012. "New Approach in Vaginal Prolapse Repair: Mini-Invasive Surgery Associated with Application of Platelet-Rich Fibrin." *International Urogynecology Journal* 23(6): 715–22.
- Guinot, A. et al. 2014. "Preliminary Experience with the Use of an Autologous Platelet-Rich Fibrin Membrane for Urethroplasty Coverage in Distal Hypospadias Surgery." *Journal of Pediatric Urology* 10(2): 300–305. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpuro.2013.09.026>.

- De Hingh, I. H J T et al. 2009. "Mesh Fixation with Autologous Platelet-Rich Fibrin Sealant in Inguinal Hernia Repair." *European Surgical Research* 43(3): 306–9.
- Jiménez-Aristizabal, Román F. et al. 2017. "Long-Term Cytokine and Growth Factor Release from Equine Platelet-Rich Fibrin Clots Obtained with Two Different Centrifugation Protocols." *Cytokine* 97(26): 149–55. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2017.06.011>.
- K., Murray Robert et al. 2010. *Harper. Bioquímica Ilustrada*.
- Kuffler, Damien P., Onix Reyes, Ivan J. Sosa, and Jose Santiago-Figueroa. 2011. "Neurological Recovery across a 12-Cm-Long Ulnar Nerve Gap Repaired 3.25 Years Post Trauma: Case Report." *Neurosurgery* 69(6): 1321–26.
- De la Puente, Pilar, and Dolores Ludeña. 2014. "Cell Culture in Autologous Fibrin Scaffolds for Applications in Tissue Engineering." *Experimental Cell Research* 322(1): 1–11. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2013.12.017>.
- Lansdown, Drew A, and Lisa A Fortier. 2017. "Platelet-Rich Plasma : Formulations , Preparations , Constituents , and Their Effects." *Operative Techniques in Sports Medicine* 25(1): 7–12. <http://dx.doi.org/10.1053/j.otsm.2016.12.002>.
- Litvinov, Rustem I., and John W. Weisel. 2017. "Fibrin Mechanical Properties and Their Structural Origins." *Matrix Biology* 60–61: 110–23. <http://dx.doi.org/10.1016/j.matbio.2016.08.003>.
- Miron, Richard J. et al. 2017. "Platelet-Rich Fibrin and Soft Tissue Wound Healing: A Systematic Review." *Tissue Engineering Part B: Reviews* 23(1): 83–99. <http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/ten.teb.2016.0233>.
- Mohanty, Sujata, Himani Pathak, and Jitender Dabas. 2014. "Platelet Rich Fibrin: A New Covering Material for Oral Mucosal Defects." *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research* 4(2): 144–46. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jobcr.2014.03.003>.
- Mosesson, M. W. 2005. "Fibrinogen and Fibrin Structure and Functions." *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 3(8): 1894–1904.
- Mosesson, Michael W., Kevin R. Siebenlist, and David A. Meh. 2006. "The Structure and Biological Features of Fibrinogen and Fibrin." *Annals of the New York Academy of Sciences* 936(1): 11–30. <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1749-6632.2001.tb03491.x>.
- Mvz, Catalina López, and Jorge U Carmona Mvz. 2014. "Journal of Equine Veterinary Science Platelet-Rich Plasma as an Adjunctive Therapy for the Management of a Severe Chronic Distal Limb Wound in a Foal." *Journal of Equine Veterinary Science* 34(9): 1128–33. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2014.06.007>.
- Nanditha, S., Balamani Chandrasrinivasan Chandrasekaran, Senthilkumar Muthusamy, and Kavitha Muthu. 2017. "Apprising the Diverse Facets of Platelet Rich Fibrin in Surgery through a Systematic Review." *International Journal of Surgery* 46: 186–94. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijssu.2017.08.558>.
- Parra Castro, Estefanía, Andrea Vergara, and Fernando Silva Molano. 2017. "Author ' S Accepted Manuscript." *Topics in Companion Animal Medicine*. <http://dx.doi.org/10.1053/j.tcam.2017.05.001>.
- Paul, Ducheyne. 2011. 1 *Comprehensive Biomaterials*.
- R. F. Silva, J. U. Carmona, and C. M. F. Rezende. 2013. "Use of Intra-Articular Autologous Platelet Concentrates as Coadjutants in the Surgical Arthroscopy Treatment of Elbow Dysplasia in a Bitch Uso Intra-Articular de Concentrados Autólogos de Plaquetas Como

- Coadyuvantes En El Tratamiento Artroscópico de Una D.” *Archivos de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile* 45(2): 213–17.
- Roseti, Livia et al. 2017. “Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the Art and New Perspectives.” *Materials Science and Engineering C* 78: 1246–62. <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.017>.
- Sheu, S. Y. et al. 2017. “The Effect of Platelet-Rich Fibrin on Autologous Osteochondral Transplantation: An in Vivo Porcine Model.” *Knee*: 1–10.
- Shirvan, Maliheh Keshvari, Daryoush Hamidi Alamdari, and Alireza Ghoreifi. 2013. “A Novel Method for Iatrogenic Vesicovaginal Fistula Treatment: Autologous Platelet Rich Plasma Injection and Platelet Rich Fibrin Glue Interposition.” *Journal of Urology* 189(6): 2125–29. <http://dx.doi.org/10.1016/j.juro.2012.12.064>.
- Silva, R F, C M F Rezende, and J U Carmona. 2011. “Uso de Concentrados Autólogos de Plaquetas Intraarticulares Como Coadyuvantes En El Tratamiento Quirúrgico de La Rotura Del Ligamento Cruzado Anterior En Una Perra Use of Intra-Articular Autologous Platelet Concentrates as Coadjunctants in the Surgical Treatment of a Cranial Cruciate Ligament Rupture in a Bitch.” 316: 313–16.
- Silva, R F, C M F Rezende, F O Paes-leme, and J U Carmona. 2011a. “Evaluación Del Método Del Tubo Para Concentrar Plaquetas Caninas : Estudio Celular Evaluation of the Tube Method for Concentrating Canine Platelets : Cellular Study.” 98: 95–98.
- . 2011b. “Evaluación Del Método Del Tubo Para Concentrar Plaquetas Felinas : Estudio Celular Evaluation of the Tube Method for Concentrating Feline Platelets : Cellular Study.” 190: 187–90.
- Soyer, Tutku et al. 2013. “Use of Autologous Platelet Rich Fibrin in Urethracutaneous Fistula Repair: Preliminary Report.” *International Wound Journal* 10(3): 345–47.
- Standeven, Kristina F., Robert A S Ariëns, and Peter J. Grant. 2005. “The Molecular Physiology and Pathology of Fibrin Structure/function.” *Blood Reviews* 19(5): 275–88.
- Weisel, John W. 2004. “The Mechanical Properties of Fibrin for Basic Scientists and Clinicians.” *Biophysical Chemistry* 112(2–3 SPEC. ISS.): 267–76.
- Wu, Peter I-kung, Robert Diaz, and Joanne Borg-stein. 2016. “P L a T E L E T - R I c H P l a S M a.” 27: 825–53.