



UNIVERSIDAD PERUANA  
CAYETANO HEREDIA

“MEDICIÓN DEL FACTOR DE  
CRECIMIENTO ENDOTELIAL  
VASCULAR DEL PLASMA RICO EN  
PLAQUETAS SEGÚN DIFERENTES  
CONCENTRACIONES DE GLUCONATO  
DE CALCIO VARIANDO EL TIEMPO Y  
FUERZA GRAVITACIONAL DE  
CENTRIFUGACIÓN”

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE  
MAESTRO EN INMUNOLOGÍA

MARIE ANGELIQUE GABRIELA LAZO  
BETETTA

LIMA – PERÚ

2022



**ASESOR**

Mg. Carmen Carolina Tokumura Tokumura

**CO ASESOR**

Lic. Erik Alexander Sánchez Tregear

**JURADO DE TESIS**

DRA. ROSA PATRICIA HERRERA VELIT

PRESIDENTE

DR. ELEAZAR ANTONIO ANTUNEZ DE MAYOLO RAMIS

VOCAL

DRA. ISKRA TUERO OCHOA

SECRETARIA

## **DEDICATORIA**

A mis padres que me enseñaron la perseverancia.

A mis colegas y maestros por su apoyo

A mi hijo por ser mi motivación diaria.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios

## **FUENTES DE FINANCIAMIENTO**

Tesis Autofinanciada

evaluación para la obtención de otro grado o diploma que no sea el presente.

<b>Teléfono de contacto (fijo / móvil)</b>	<b>964393220</b>
<b>E-mail</b>	<b>lazobetetta@gmail.com</b>



-----  
**Firma del Egresado**

**Dni 70006222**

## TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN

ABSTRACT

I.	INTRODUCCIÓN .....	1
II.	PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN .....	5
II.1.	Marco teórico.....	5
II.1.1.	Componentes básicos del PRP.....	6
II.1.2.	Historia del PRP y factores de crecimiento en medicina regenerativa.....	9
II.1.3.	Métodos de obtención y cuantificación de factores de crecimiento .....	24
II.2.	Justificación del estudio.....	26
II.3.	Hipótesis .....	28
II.4.	Objetivos .....	28
II.4.1.	Objetivo general .....	28
II.4.2.	Objetivos específicos.....	28
III.	METODOLOGÍA.....	29
III.1.	Diseño del estudio.....	29
III.2.	Población de estudio y muestra .....	30
III.3.	Procedimientos .....	33
III.4.	Conteo de plaquetas y parámetros hematológicos.....	40
III.5.	Ensayo de ELISA .....	40
III.6.	Análisis estadístico .....	60
IV.	RESULTADOS.....	62
IV.1.	Datos epidemiológicos de los donantes enrolados.....	62
IV.2.	Parámetros hematológicos y análisis de los métodos de concentración de plaquetas .....	62
IV.3.	Cuantificación y análisis de VEGF mediante el ensayo de ELISA...65	
IV.3.1.	Análisis de cuantificación de VEGF de acuerdo a las diferentes modalidades de centrifugación (CS y CD).....	67
IV.3.2.	Análisis de Cuantificación de VEGF de acuerdo a las diferentes diluciones de Glu.Ca en CS. ....	68

IV.3.3. Análisis de cuantificación de VEGF de acuerdo a las diferentes diluciones de Glu.Ca en CD.....	70
V. DISCUSION.....	71
V.1. Obtención de PRP .....	71
V.2. Evaluación de los métodos de centrifugado y diluciones de Glu.Ca..	74
V.3. Limitaciones .....	76
VI. CONCLUSIONES.....	78
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	79
VIII. ANEXOS	



## **ABREVIATURAS**

CD: Centrifugación doble

CS: Cetrifugación simple

D0: Dilución sin gluconato de calcio en plasma rico en plaquetas

D1: Dilución de gluconato de calcio en 1/5 (0.02 g/mL) en plasma rico en plaquetas

D2: Dilución de gluconato de calcio en 1/10 (0.01 g/mL) en plasma rico en plaquetas

D3: Dilución de gluconato de calcio en 1/20 (0.005 g/mL) en plasma rico en plaquetas

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay

FC: Factor de crecimieto

FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos

GB: Globulos blancos

GR: Globulos rojos

GLU.CA: Gluconato de cálcio al 10 %

IGF: Factor de crecimiento similar a la insulina

PDGF: Factor de crecimiento derivado de las plaquetas

PDGF A: Factor de crecimiento derivado de las plaquetas A

PDGF B: Factor de crecimiento derivado de las plaquetas B

PDGF C: Factor de crecimiento derivado de las plaquetas C

PRP: Plasma rico en plaquetaas

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

## RESUMEN

**Introducción:** Plasma rico en plaquetas (PRP) es un producto terapéutico, con una amplia aplicación en medicina regenerativa y cosmética, debido a que es importante reservorio de factores de crecimiento como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), responsable de los procesos en angiogénesis y regeneración de tejidos dañados. Sin embargo, la obtención de PRP no presenta una estandarización actual, ni valoración de los diferentes factores de crecimiento, afectando la efectividad, tiempo y dinero en el tratamiento de los pacientes. **Objetivo general:** Comparar las cantidades liberadas de VEGF en PRP activado con diferentes diluciones Glu.Ca, en PRP obtenido por los métodos de Centrifugación simple (CS) y Centrifugación doble (CD). **Materiales y métodos:** Fueron enrolados 20 voluntarios sanos entre 18 a 40 años de edad. Las muestras de sangre fueron sometidos a dos métodos de centrifugación: CS y CD, el PRP obtenido fue activado con diferentes diluciones y concentraciones de Glu.Ca 10% 1/5 D1 (0.02 g/mL), 1/10 D2 (0.01 g/mL) y 1/20 D3 (0.005 g/mL), el VEGF liberado fue cuantificado mediante ELISA directo a 450nm. **Resultados:** Las plaquetas concentradas mediante el método de CS y CD, mostraron una mediana y un rango intercuartil de:  $408.5 \times 10^3$  plaquetas/uL (382.75-473.0) y  $532.5 \times 10^3$  plaquetas/uL (410.5-613.0) respectivamente, no se encontró diferencia significativa entre ambos métodos. Con respecto a la cuantificación de VEGF, se encontró diferencia significativa entre el método de CS vs CD para la liberación de VEGF con un  $p < 0.0001$ . Con respecto a las diluciones no se encontró diferencias significativas entre las diluciones D1, D2 y D3 en los métodos de CS y CD con un  $p > 0.05$ . **Conclusiones:** El método de CS,

mostro mayor liberación de VEGF con respecto al método de CD. Las diluciones de Glu.Ca 1/5 D1 (0.02 g/mL) y 1/10 D2 (0.01 g/mL), fueron las que produjeron mayor liberación de VEGF en el método de CS.

**Palabras clave:** ELISA, Factor de Crecimiento Endotelial Vascular, Plasma Rico en Plaquetas, Gluconato de Calcio.

## **ABSTRACT**

**Introduction:** Platelet-rich plasma (PRP) is a therapeutic product, with a wide application in regenerative and cosmetic medicine, because it is an important reservoir of growth factors such as vascular endothelial growth factor (VEGF), responsible for the processes in angiogenesis and regeneration of damaged tissues. However, obtaining PRP does not present a current standardization, nor assessment of the different growth factors, affecting the effectiveness, time and money in the treatment of patients. General objective: To compare the amounts of VEGF released in activated PRP with different Glu.Ca dilutions, in PRP obtained by the Simple Centrifugation (CS) and Double Centrifugation (CD) methods. **Materials and methods:** 20 healthy volunteers between 18 and 40 years of age were enrolled. The blood samples were subjected to two centrifugation methods: CS and CD, the PRP obtained was activated with different dilutions and concentrations of Glu.Ca 10% 1/5 D1 (0.02 g/mL), 1/10 D2 (0.01 g/mL) and 1/20 D3 (0.005 g/mL), the released

VEGF was quantified by direct ELISA at 450nm. **Results:** Concentrated platelets using the CS and CD methods showed a median and interquartile range of: 408.5 x 10<sup>3</sup> platelets/uL (382.75-473.0) and 532.5 x 10<sup>3</sup> platelets/uL (410.5-613.0), respectively. difference means between both methods. Regarding the VEGF quantification, a significant difference was found between the CS vs CD method for VEGF release with p<0.0001. Regarding the dilutions, no significant differences were found between the D1, D2 and D3 dilutions in the CS and CD methods with a p>0.05. **Conclusions:** The CS method showed a greater release of VEGF compared to the CD method. The Glu.Ca dilutions 1/5 D1 (0.02 g/mL) and 1/10 D2 (0.01 g/mL), were the ones that produced the highest release of VEGF in the CS method.

**Keywords:** ELISA, Vascular Endothelial Growth Factor, Platelet Rich Plasma, Calcium Gluconate.

## **I. INTRODUCCIÓN**

El plasma rico en plaquetas (PRP) es una porción de plasma autólogo, obtenido mediante centrifugación, usualmente enriquecido en plaquetas entre 3-5 veces más que los niveles basales en el plasma <sup>1</sup>. Contiene altas concentraciones de factores de crecimiento (FC) autógenos como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés), el factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF, por sus siglas en inglés), el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF, por sus siglas en inglés) y algunas proteínas y péptidos como el fibrinógeno, fibronectina, osteonectina y citocinas <sup>1</sup>.

El PRP, al ser un biomaterial autólogo, no tiene posibilidad de rechazo; aparte, se obtiene de manera sencilla mediante centrifugación y su costo no es elevado. En el año 1987 se realizó una de las primeras aplicaciones del PRP en una cirugía cardiovascular, esto con el objetivo de minimizar el uso de transfusiones sanguíneas <sup>2</sup>. La razón de su uso y su potencial terapéutico radica en la alta concentración de plaquetas y la capacidad, de estos últimos, de liberar cantidades suprafisiológicas de FC esenciales que proveerían un estímulo regenerativo y de reparación de tejidos con bajo potencial de curación <sup>3</sup>.

El PRP se ha utilizado en diferentes campos de la medicina como; hematología, odontología, dermatología, estética, tricología y medicina del deporte, existiendo una gran cantidad de reportes y publicaciones, sin embargo, estos datos a menudo no son reproducibles, ya que existen muchas variables a considerar como; métodos de

preparación, administración, dosis, seguimiento y resultados esperados, existiendo una falta de consenso sobre la estandarización preparación basada selectivamente en la biofisiológica plaquetaria y la indicación de uso<sup>4</sup>.

Un estudio de meta análisis, el cual aborda estas variables como protocolos de preparación de PRP y la composición del producto PRP final, fue realizado con la finalidad de brindar recomendaciones para su uso en medicina cosmética, menciona que existen muchos métodos de preparación PRP, todas utilizan la centrifugación diferencial, pero se pueden clasificar en dos métodos principales: Técnica abierta (método manual), implica la preparación de PRP al medio ambiente, tanto pipetas y tubos se esterilizan por separado, y la Técnica cerrada, este método implica el uso de kits comerciales, la sangre o PRP no se expone al medio ambiente durante el proceso de preparación<sup>4</sup>.

Tanto los métodos manuales<sup>5,6</sup> y kits comerciales<sup>6,7</sup>, para obtener PRP, han sido evaluados y comparados bajo diferentes parámetros como; cantidad de sangre periférica utilizado, tiempo y fuerza centrifuga utilizado, conteo de plaquetas, conteo de glóbulos rojos y conteo de glóbulos blancos, dando resultados variados sin que exista hasta el momento una metodología consenso o estándar para obtener PRP. Con respecto a los kits comerciales, se encontró un estudio donde se comparó 4 diferentes kits comerciales; GPS III (Biomet), SmartPrep2 (Harvest), Magellan (Arteriocyte Medical) y ACP (Arthrex), se utilizo entre 15-52 mL de sangre periférica para la obtención PRP, encontrándose una concentración plaquetaria entre 3-6 veces con respecto al control o basal, así mismo se encontró también una concentración de glóbulos blancos entre 3-6 veces con respecto al basal, adicionalmente se comparo la

glucosa y esta también estuvo concentrada en 3-6 veces con respecto al basal, estos resultados indican que existe grandes variaciones en la composición y concentración de plaquetas, aun utilizando kits comerciales, destacando la necesidad de estandarizar la extracción PRP para uso clínico<sup>7</sup>. Con respecto a los métodos manuales, Sabarish y colaboradores, compararon 3 métodos manuales de diferentes investigadores los cuales fueron replicados en el estudio; Marx R (método 1), Okuda K (método 2) y Landesberg R (método 3), en todos ellos se utilizó 2 mL de sangre total periférica, con respecto a las condiciones de tiempo y fuerza centrifuga todos realizaron doble centrifugado; método 1(1000 rpm x 4 min, seguido de 800 rpm x 9 min.), método 2 (2400 rpm x 10 min, seguido de 3600 rpm x 10 min.) y método 3 (1400 rpm x 10 min, seguido de 1600 rpm x 10 min.). Los resultados de porcentaje enriquecimiento plaquetario fueron: método 1 (160.3%), método 2 (119.2%) y método 3 (125.5%), este estudio comparativo sugiere que una velocidad y tiempo de centrifugación más bajos proporciona un mayor porcentaje de enriquecimiento de plaquetas, así mismo la razón de la reducción en el recuento de plaquetas a mayor velocidad y tiempo de centrifugación se debe a la aglomeración o desintegración de plaquetas, cuando tal desintegración ocurre antes de la activación del PRP, los factores de crecimiento se liberan en un estado inactivo que puede influir en el proceso de cicatrización de heridas<sup>5</sup>.

La comparación de los método manuales y kits comerciales por Gupta y colaboradores, también fueron evaluados, en cuanto a la producción de PRP, en vista que no existe un protocolo estándar. Para el método manual se utilizó 20 mL de sangre total periférica, doble centrifugado, primer golpe de centrifugado a 160 g x 10 min (cerca de 923 rpm)

y el segundo golpe de centrifugado 400 g x 10 min (cerca de 1460 rpm), con respecto al kit comercial (DrPRP-Kit®, REMI Laboratory Instruments), se utilizó 18 mL de sangre total periférica, fue centrifugado doblemente; primera centrifugada a 2700 rpm x 12 min y segunda centrifugada a 3200 rpm por 7 min. La concentración plaquetaria fue mayor en el método manual (4.17 veces) que con el kit comercial (2.65 veces) con respecto a sus basales, destacando que el método manual de doble centrifugado es más económico y con porcentaje de enriquecimiento mayor que el kit comercial DrPRP-Kit®, REMI Laboratory Instruments quien tiene aprobación por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA)<sup>6</sup>

La activación de PRP se refiere principalmente a dos procesos que son: liberación de factores de crecimiento (FC) de las plaquetas después de la degranulación y escisión de fibrinógeno para formar la matriz. Por otro lado, la liberación del factor de crecimiento de las plaquetas se puede realizar por diferentes activadores como la trombina, cloruro de calcio<sup>4</sup>, gluconato de calcio, batroxobina o sus combinaciones<sup>8</sup>, con respecto a los efectos mecánicos en el PRP como congelación/descongelación permite un manejo del paciente más aplicable, pero se puede alterar la función plaquetaria, el patrón de liberación del factor de crecimiento, favorecer la acumulación de citocinas pirogénicas, y aumentar el riesgo de proliferación bacteriana, se prefiere la administración fresca de PRP en los pacientes. Hosny y colaboradores evaluaron la concentración de VEGF utilizando PRP fresco como PRP almacenado a -40°C por una semana y por 3 semanas, para la activación de PRP fue utilizado Gluconato de Calcio al 5% (0.05 g/mL) o Gluconato de Calcio al 5% (0.05 g/mL) + Trombina. Los



resultados de VEGF obtenidos no encontraron diferencia significativa entre la cantidad de VEGF (pg/mL) obtenido de PRP fresco con respecto al congelado, y con respecto al uso de activador Glu.Ca (5%) vs Glu.Ca (5%) + trombina tampoco se encontró diferencia significativa<sup>8</sup>. Sin embargo, otro estudio por Roh y colaboradores compararon la liberación de factores de crecimiento del PRP obtenido mediante dos métodos de centrifugado; Centrifugación Simple (CS) (900 g x 5 min) y Centrifugación Doble (CD) (900 g x 5 min, seguido de 1500 g x 15 min), previamente activado el PRP con Gluconato de Calcio 10% (0.104 g/mL) o Gluconato de Calcio 10% (0.104 g/mL) + trombina (50 UI/mL), los resultados obtenidos muestran que existe mayor liberación de VEGF en PRP activado con Gluconato de Calcio 10% + trombina que con Gluconato de Calcio 10% solo, probablemente debido al efecto quelante del Ca<sup>2+</sup> por el ACD (Citrato dextrosa), así mismo las preparaciones de PRP mediante los métodos de Centrifugado Simple (CS) generalmente dan como resultado una concentración más baja de plaquetas y glóbulos blancos (PRP pobres en leucocitos), que los métodos de Centrifugado Doble (CD) que dan como resultado una mayor concentración de plaquetas y glóbulos blancos (PRP rico en leucocitos), obteniéndose una concentración de plaquetas de 2.1 veces (CS) y 7.8 veces (CD) más con respecto al control respectivamente<sup>8,9</sup>

## **II. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN**

### **II.1.Marco teórico**

### II.1.1. Componentes básicos del PRP

La sangre está conformada por una sustancia intercelular líquida denominada plasma, de color amarillento, en el que se hallan en suspensión los hematíes, leucocitos y plaquetas<sup>10,11</sup>. Para poder obtener el plasma, éste se puede separar del componente celular mediante el proceso de centrifugación, es decir, hacer girar la sangre completa anticoagulada dentro de una centrífuga; debido a que el plasma es más ligero, se forma una capa superior amarillenta, mientras que las células sanguíneas más densas se ubican en posición inferior del tubo (hematíes caen al fondo y los leucocitos se disponen entre los hematíes y el plasma)<sup>10,12</sup>.

El plasma es una mezcla compleja que constituye el 55% del volumen de la misma sangre<sup>11</sup>. Contiene agua, sales inorgánicas (bicarbonato, cloruro, fosfato), compuestos orgánicos y más de 1000 proteínas, cada una de las cuales puede sufrir una activación, degradación o eliminación adicional durante el procesamiento, almacenamiento y preparación para uso en pacientes<sup>11,13</sup>.

Las plaquetas son células anucleadas, discoideas, con un diámetro aproximado de 2-3  $\mu\text{m}$  y cuya función principal es regular la hemostasia<sup>11,14</sup>. Proviene de células nucleadas grandes (30-100  $\mu\text{m}$ ) llamadas megacariocitos, quienes residen principalmente en la médula ósea<sup>14</sup>. Un adulto sano produce al día un promedio de  $1 \times 10^{11}$  plaquetas, con un tiempo de vida media de 7 a 10 días<sup>15</sup>. Las plaquetas presentan una ultra estructura plaquetaria que está subdividida en tres áreas

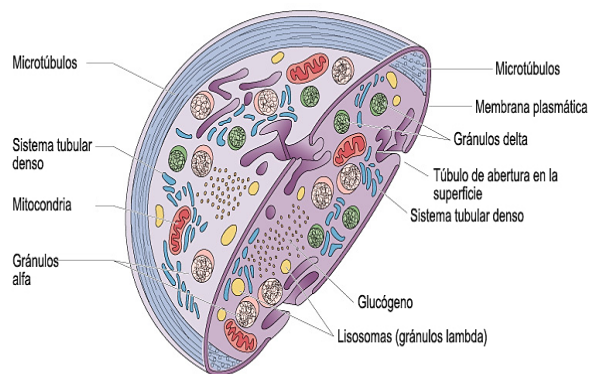
topográficas: membrana plaquetaria (cuyo rol principal es mantener la integridad vascular y detener posibles sangrado), la región de gránulos y organelas intracitoplasmáticas (lugar donde predominan los gránulos  $\alpha$ , gránulos delta, gránulos lambda y peroxisomas) y la tercera área es el citoesqueleto (formado por proteínas motoras)<sup>16,17</sup>.

Los gránulos de las plaquetas desempeñan funciones muy importantes en la hemostasia (**Figura 1**). Los gránulos delta (también llamados gránulos densos) contienen calcio, fósforo inorgánico, serotonina, pirofosfatasa e histamina<sup>17,18</sup> y tiene la función de facilitar la agregación y adherencia plaquetaria<sup>17</sup>. Los gránulos  $\alpha$  contienen factores de crecimiento, tromboplastina, fibronectina, factores de coagulación, entre otros, y son los responsables de la reparación del vaso sanguíneo de la agregación y adherencia plaquetaria<sup>17</sup>. Los gránulos lambda (también llamados lisosomas) contienen enzimas hidrolíticas y desempeñan la función de ayudar a la resorción del coágulo<sup>17</sup>.

Las plaquetas también cumplen la función de participar en el proceso de la inflamación, el crecimiento de tejidos y la respuesta inmune; todo esto gracias a la liberación de compuestos procedentes de los gránulos  $\alpha$  y delta, dentro de ellos se tienen a los factores de crecimiento y a componentes del sistema de complemento<sup>19</sup>.

Las plaquetas son fundamentales para mediar los efectos anabólicos del PRP, ello debido a la liberación de factores de crecimiento almacenados en sus gránulos  $\alpha^3$ .

Durante las fases iniciales de la reparación de la herida, las plaquetas activadas atraen y fomentan la migración celular a la herida al agregarse y formar una matriz de fibrina <sup>3</sup>. Esta matriz luego sirve como un andamio tisular para la liberación sostenida de factores de crecimiento plaquetario y citocinas, que estimulan el reclutamiento, la diferenciación y la comunicación celular <sup>3</sup>.



**Figura 1:** Estructura de la plaqueta, en ella se pueden apreciar, mitocondrias, lisosomas, gránulos  $\alpha$  y los gránulos densos <sup>20</sup>.

En relación a los leucocitos, se trata de células con núcleo y que entre sus funciones se encuentran el actuar como mediadores esenciales de la respuesta inflamatoria, la defensa del hospedero contra agentes infecciosos y la cicatrización de heridas <sup>3</sup>. Un adulto sano presenta entre 6500 y 10 000 leucocitos/mm<sup>3</sup> de sangre<sup>17</sup>. Se clasifican en granulocitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos) y agranulocitos (linfocitos y monocitos)<sup>17</sup>. Los neutrófilos son la mayor parte de leucocitos y sus funciones principales son fagocitar y destruir a las bacterias con el uso del contenido de sus diversos gránulos; los eosinófilos tienen la función de ayudar a eliminar los complejos antígeno-anticuerpo y también se encargan de destruir a los gusanos que

actúan como parásitos; los basófilos tienen la función de inducir el proceso inflamatorio; los linfocitos se encargan de la inmunidad humoral y celular; finalmente, los monocitos son los fagocitos por excelencia y se encargan de fagocitar las partículas indeseables y produce citoquinas para el desempeño de las reacciones inflamatorias<sup>17</sup>.

Con todo lo descrito, se resumen que el contenido del PRP predominan las plaquetas y leucocitos. El contenido de glóbulos rojos (GR) suele estar ausente o muy reducido debido al proceso de centrifugación al que fue sometida la sangre<sup>3</sup>.

#### **II.1.2. Historia del PRP y factores de crecimiento en medicina regenerativa**

En la literatura se encuentra otras formas de mencionar al PRP, entre ellas como plasma rico en factores de crecimiento, plasma rico en fibrinógeno y concentrado de plaquetas. Los hematólogos crearon este término en 1970 y fue utilizado en el contexto de una transfusión para tratar pacientes con trombocitopenia<sup>21,22</sup>. Con el paso del tiempo, el PRP empezó a usarse en otras ramas de la medicina como cirugía maxilofacial<sup>21,23</sup>, traumatología y deporte<sup>3,21,23</sup>, cirugía cardíaca<sup>21,24</sup>, cirugía pediátrica<sup>21,25</sup>, ginecología<sup>21,25-27</sup>, cirugía plástica<sup>21,25,28</sup>, oftalmología<sup>21,23,25</sup>, urología<sup>21,25,29</sup>, dermatología cosmética<sup>21,23,25,30</sup>, entre otras.

El PRP es un concentrado rico en plaquetas, cuyos niveles son superiores a los niveles basales de plaquetas en sangre total<sup>31,32</sup>. Los valores referenciales normales

de plaquetas en sangre total se encuentran en el rango de 150 000 – 350 000 plaquetas/ $\mu$ L, con un promedio de  $200\ 000 \pm 75\ 000$  plaquetas/ $\mu$ L<sup>33,34</sup>. Se ha observado que concentraciones superiores a 1 millón de plaquetas/ $\mu$ L producen beneficios clínicos como la estimulación de la cicatrización de heridas, angiogénesis, entre otros<sup>31,33,34</sup>.

Como ya se ha mencionado, las plaquetas contienen dos gránulos básicos: los gránulos  $\alpha$  y los gránulos densos, los cuales presentan componentes que pueden estimular el proceso de cicatrización<sup>31,35</sup>. Los gránulos  $\alpha$  tienen un diámetro de 200-500 nm y existe un aproximado de 50 a 80 de estos gránulos por plaqueta<sup>34</sup>. Los gránulos densos presentan un diámetro de 200-300 nm y existe un aproximado de 2 a 7 de estos por plaqueta<sup>16</sup>. Los gránulos  $\alpha$  contienen un gran número de proteínas, dentro de las cuales sobresalen los factores de crecimiento plaquetarios (**tabla 1**) por su función de estimular la proliferación celular, ser angiogénicos y quimiotácticos<sup>16</sup>. Los gránulos densos también contienen factores bioactivos como la serotonina, histamina, dopamina, calcio y adenosina; quienes también participan en la curación de heridas al formar parte del proceso de la inflamación<sup>34,36</sup>. Las plaquetas también presentan un tercer tipo de gránulos (gránulos lisosomales) quienes juegan un rol importante en la degradación proteica<sup>37</sup>. Todos estos factores y proteínas de los diferentes gránulos serán usados a favor del PRP.

**Tabla 1.** Factores de crecimiento y sus respectivas funciones

<b>Factores de crecimiento</b>	<b>Funciones</b>
Factor de crecimiento de origen plaquetario tipo A, B y C (PDGF A, PDGF B y PDGF C)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- La función principal es promover la angiogénesis a través de los macrófagos.</li> <li>- Activa los macrófagos.</li> <li>- Facilita la formación de colágeno tipo 1.</li> <li>- Actividad mitógena en las células mesenquimales, neuronales y microglía.</li> </ul>
Factor de crecimiento de transformación $\beta 1$ y $\beta 2$ (TGF- $\beta 1$ y TGF- $\beta 2$ )	<ul style="list-style-type: none"> <li>- La función principal es la quimiotaxis.</li> <li>- Proliferación y diferenciación de células mesenquimales.</li> <li>- Promueve síntesis de colágeno por osteoclastos.</li> <li>- Induce la diferenciación de células madre troncales neuronales.</li> </ul>
Factor de crecimiento fibroblástico (FGF)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Activa proliferación y diferenciación de osteoclastos, fibroblastos e inducción de fibronectina por estos y por células madre troncales neuronales.</li> <li>- Actividad proangiogénica.</li> </ul>
Factor de crecimiento insulínico tipo 1 y 2 (IGF-1 e IGF-2)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Induce proliferación y diferenciación de células mesenquimales y de revestimiento.</li> <li>- Efecto mitótico en la celularidad progenitora troncal neuronal.</li> <li>- Facilita que los osteoblastos sintetizen fosfatasa alcalina, osteocalcina y colágeno tipo 1.</li> </ul>

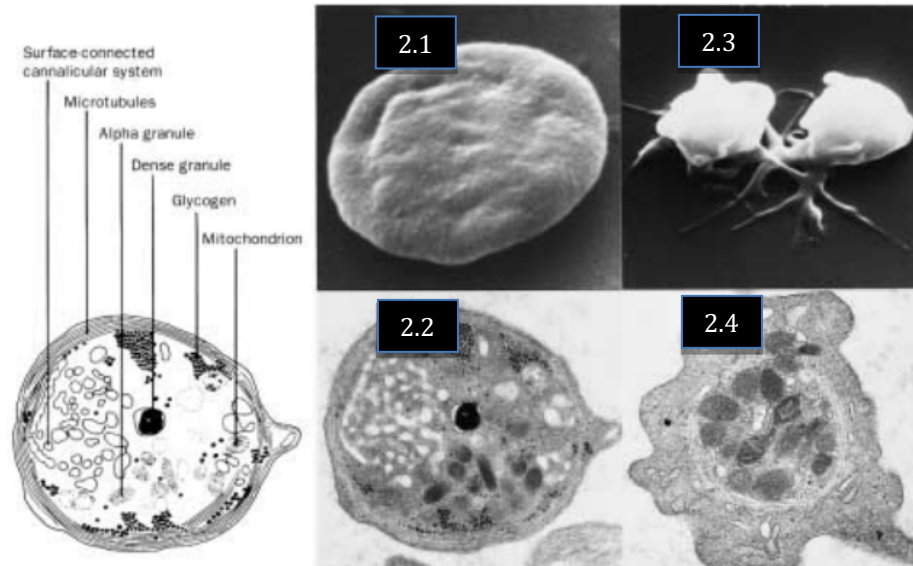
Familia del factor de crecimiento endotelial vascular (Familia VEGF)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Activa quimiotaxis y diferenciación de células endoteliales</li> <li>- Promueve permeabilidad de los vasos sanguíneos.</li> </ul>
Factor de crecimiento epitelial (EGF)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Capacidad pro-apoptótica, quimiotaxis y diferenciación de células epiteliales, renales, neuronales, gliales y fibroblastos.</li> </ul>
Factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Proliferación, diferenciación y quimiotaxis de células neuronales, microgliales y oligodendrocitos. Remielinización.</li> </ul>
Factor de crecimiento de hepatocitos (HGF)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Proliferación y diferenciación celular, quimiotaxis, angiogénesis y síntesis de matriz extracelular.</li> </ul>

**Fuente:** Alcaraz-Rubio J, et al.<sup>38</sup>; Lia H, et al.<sup>34</sup>; Marx RE, et al.<sup>33</sup>

La activación de las plaquetas genera la degranulación de los gránulos  $\alpha$ , proceso que involucra la fusión de estos gránulos con la membrana celular plaquetaria<sup>33,39</sup>. Posterior a ello, los factores de crecimiento completan su estado bioactivo con la adición de histonas y cadenas laterales de carbohidratos en su estructura molecular<sup>33</sup>. Este proceso de activación plaquetaria se ha podido evidenciar con el uso de microscopía electrónica<sup>39,40</sup>, procedimiento en el que se evidencia el cambio morfológico que presenta una plaqueta activada y el crecimiento de sus gránulos intracitoplasmáticos (**Figura 2**). Los factores de crecimiento secretados entran en contacto con los receptores de membrana de las células del tejido diana, los cuales



son proteínas que inducen la activación de señales intracelulares para la proliferación celular, formación de matriz, síntesis de colágeno, entre otros<sup>33</sup>.



**Figura 2.** Microscopía electrónica de la morfología plaquetaria en reposo (2.1 y 2.2) y activada (2.3 y 2.4). Adaptado de Stein et al.<sup>40</sup>.

Los factores de crecimiento son un grupo de polipéptidos biológicamente activos producidos por el cuerpo que pueden estimular la división, crecimiento, diferenciación celular, e incluso la apoptosis<sup>16</sup>. En relación a las heridas y procedimientos quirúrgicos, los factores de crecimiento favorecen su cicatrización y reparación<sup>38</sup>. Estimulan a las células madre mesenquimales adultas, células epidérmicas, fibroblastos, osteoblastos y células endoteliales; todo esto debido a que todas estas células expresan receptores transmembrana que tienen afinidad a los factores de crecimiento del PRP<sup>33,41</sup>.

La Familia VEGF (**tabla 2**) está formada por cinco factores de crecimiento de glicoproteínas secretada por los mamíferos: VEGF (VEGF-A), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y factor de crecimiento placentario (PLGF)<sup>42</sup>. El VEGF es el principal regulador de angiogénesis y actúa estimulando el desarrollo de los vasos sanguíneos<sup>42</sup>. El proceso de empalme alternativo identifica 7 isoformas del VEGF: VEGF-A<sub>121</sub>, VEGF-A<sub>145</sub>, VEGF-A<sub>165</sub>, VEGF-A<sub>165b</sub>, VEGF-A<sub>183</sub>, VEGF-A<sub>189</sub> y VEGF-A<sub>206</sub><sup>42</sup>.

**Tabla 2.** Familia VEGF y sus respectivas características

Familia VEGF	Características
VEGF (o VEGF-A)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Miembro principal de la Familia VEGF</li> <li>- Codificado por 8 exones<sup>42</sup></li> <li>- Glicoproteína homodímera de 45 kDa<sup>42</sup>.</li> <li>- Presenta distintas isoformas, siendo la más abundante el VEGF-A<sub>165</sub><sup>42</sup>.</li> <li>- Tiene la función de inducir la proliferación de células endoteliales, promover la migración celular e inhibir la apoptosis<sup>43,44</sup>. También estimular la permeabilidad vascular<sup>44,45</sup> y regula la vasculogénesis<sup>44,46</sup>.</li> </ul>
IVEGF-B	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Codificado por 7 exones<sup>42</sup></li> <li>- Cumple un papel importante en captación de ácidos grasos en las células endoteliales, lo cual vital en órganos con alto estrés metabólico como el corazón<sup>47,48</sup></li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Presenta la isoforma VEGF-B<sub>167</sub> y VEGF-B<sub>186</sub><sup>42</sup>.</li> </ul>
VEGF-C	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Codificado por 7 exones<sup>42</sup></li> <li>- Su forma inmadura es un dímero de 61 kDa, mientras que su forma madura es un homodímero de 21 kDa<sup>44</sup>.</li> <li>- Trabaja sinérgicamente con VEGF-A, aunque es 4-5 veces menos potente que este<sup>44,49</sup>.</li> <li>- Induce la angiogénesis e incrementa la permeabilidad vascular<sup>50,51</sup>.</li> <li>- Está muy ligado a la formación de endotelio linfático<sup>42,50,51</sup>.</li> </ul>
VEGF-D (o factor de crecimiento inducido por c-Fos [FIGF, por sus siglas en inglés])	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Codificado por 7 exones<sup>42</sup></li> <li>- Péptido de 53 kDa</li> <li>- Compuesto linfangiogénico, pero de menor potencia que VEGF-C<sup>44,52</sup>.</li> <li>Induce la angiogénesis y aumentan permeabilidad vascular<sup>51,53</sup>.</li> </ul>
PLGF	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Codificado por 7 exones del cromosoma 14<sup>54,55</sup>.</li> <li>- Potencia la acción del VEGF, mejorando así la capacidad de las células endoteliales a los estímulos angiogénicos<sup>42,56</sup>.</li> <li>- Recluta monocitos y macrófagos, los cuales desempeñan un papel esencial en la angiogénesis<sup>54,57</sup>.</li> <li>- Induce la secreción de VEGF desde los monocitos<sup>54,55</sup>.</li> <li>- Cuenta con 4 isoformas: PLGF1, PLGF2, PLGF3 y PLGF4<sup>42,54</sup>.</li> </ul>

**Fuente:** Holmes DIR, et al.<sup>42</sup>; D’Arcangelo D, et al.<sup>43</sup>; Partanen TA, et al.<sup>44</sup>; Roberts WG, et al.<sup>45</sup>; Millauer B, et al.<sup>46</sup>; Koch S, et al.<sup>47</sup>; Hagberg CE, et al.<sup>48</sup>; Jouko V, et al.<sup>49</sup>;

Cao R, et al.<sup>50</sup>; Dvorak HF, et al.<sup>51</sup>; Mäkinen T, et al.<sup>52</sup>; Rissanen TT, et al.<sup>53</sup>; Alcaine MJ, et al.<sup>54</sup>; Maglione D, et al.<sup>55</sup>; Autiero M, et al.<sup>56</sup> y Fischer C, et al.<sup>57</sup>

Por tanto, el VEGF juega un rol importante en la proliferación, migración y activación de las células endoteliales, así como en la promoción de la permeabilidad de los vasos sanguíneos. El VEGF tiene una serie de receptores expresados en las células endoteliales para mediar la angiogénesis y vasculogénesis. Este factor de crecimiento es regulado por varios factores, incluyendo factores de crecimiento y transcripción, hormonas y estímulos mecánicos <sup>58</sup>. VEGF es esencial para el desarrollo vascular así como regula la supervivencia de la célula endotelial, también es un potente inductor de la permeabilidad vascular y de inflamación <sup>59</sup>.

Por otro lado, la hipoxia es considerada como el mayor conductor de la expresión de VEGF, especialmente en tumores tisulares y huesos. Una serie de factores de crecimiento que juegan un rol crítico en el desarrollo óseo y reparación ósea posnatal también regulan la expresión de VEGF, particularmente en las células osteoblásticas. Por otro lado, bajo estrés mecánico, los osteoblastos liberan VEGF y este VEGF estimula respuestas biológicas. Todos estos factores reguladores de VEGF juegan roles críticos en el desarrollo óseo y homeostasis, sugiriendo que la modulación de los niveles de VEGF en osteoblastos puede proveer bases para estrategias con el objetivo de controlar la reparación y regeneración ósea. También hay inductores eficientes de la expresión de VEGF en las células inflamatorias, así como osteoblásticos. VEGF es un factor quimiotáctico para macrófagos/monocitos. Dado que los macrófagos liberan factores angiogénicos, VEGF puede estimular la

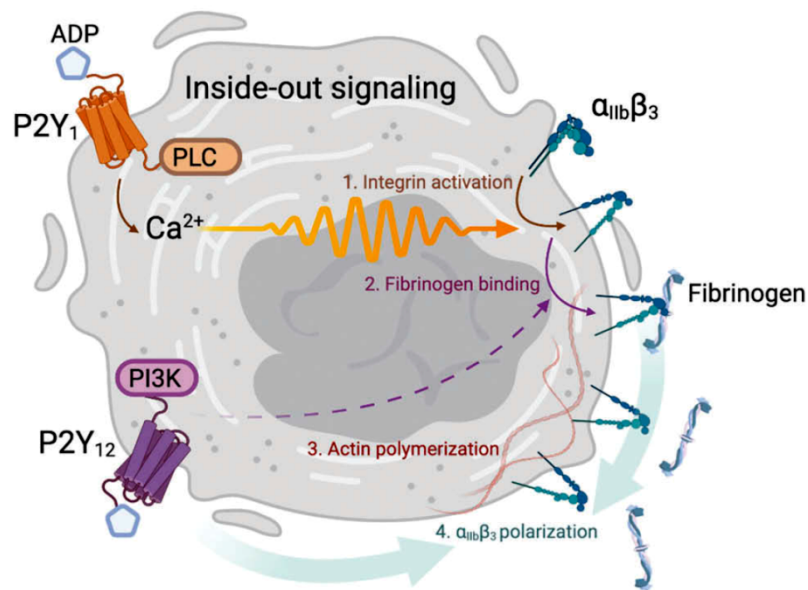
angiogénesis tanto por vía indirecta mediante los macrófagos así como vía directa actuando en las células endoteliales <sup>58</sup>.

Con respecto a los mecanismos moleculares de la activación plaquetaria durante la hemostasis y la formación de trombos, es un mecanismo dinámico, que incluye receptores de membrana plaquetaria, señales intracelulares y extracelulares así como la liberación de proteínas. Cuando se daña el endotelio de un vaso sanguíneo, la estimulación neural provoca una vasoconstricción transitoria del vaso afectado. Además, las células dañadas liberan endotelina, lo que promueve aún más la constricción de los vasos en un intento por limitar la pérdida de sangre. El colágeno subendotelial queda expuesto en el sitio de la lesión. La glicoproteína plasmática factor de von Willebrand (vWF), liberada de los cuerpos de las células endoteliales, se une al colágeno expuesto y sirve como sitio de adhesión de las plaquetas a la superficie del vaso dañado. Las plaquetas se unen al vWF utilizando su receptor GPIIb. Esta unión da como resultado un cambio conformacional y la activación de las plaquetas, lo que provoca la liberación de mediadores hemostáticos de los gránulos de las plaquetas, incluido vWF que se encuentra en los gránulos alfa para potenciar la acumulación de plaquetas<sup>60</sup>. A medida que las plaquetas continúan degranulándose y su activación continúa a lo largo de un ciclo de retroalimentación positiva, el difosfato de adenosina (ADP) liberado de los gránulos densos se une a los receptores P2Y1 y P2Y12 ubicados en la membrana de las plaquetas, induciendo la expresión del receptor GPIIb/IIIa. Este receptor plaquetario es la integrina más abundante en la superficie plaquetaria que junto con el tromboxano

A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) producido por la enzima ciclooxigenasa plaquetaria, permite la agregación plaquetaria. Aunque actualmente se está investigando su papel en la hemostasia, la serotonina liberada a partir de gránulos densos parece funcionar como otro mediador de la agregación plaquetaria al mismo tiempo que promueve una mayor vasoconstricción. El fibrinógeno de los gránulos alfa actúa como enlace entre los receptores GPIIb/IIIa en diferentes plaquetas. Una vez que las plaquetas se han unido, se ha formado un tapón plaquetario temporal, que luego se fortalece mediante la cascada de coagulación de la hemostasia secundaria<sup>60</sup>.

Con respecto al rol del Ca<sup>2+</sup> en la activación de las plaquetas, GPIIbIIIa forma un complejo con el Ca<sup>2+</sup> a su vez dependiente de la asociación con las subunidades de las integrinas  $\alpha$  y  $\beta$ . Las señales de adentro hacia afuera en las plaquetas, pueden ser estimuladas por agonistas plaquetarios que incluyen a la adenosin difosfato (ADP), trombina, o proteínas de la matriz extracelular, que van desde los constituyentes principales hasta los secundarios como el colágeno y laminina, estos agonistas dirigen el flujo citosólico del Ca<sup>2+</sup>, resultando en cambios conformacionales de GPIIbIIIa de un estado de baja afinidad a uno de alta afinidad, requisito importante para ligar proteínas adhesivas incluyendo fibrinógeno y fibronectina. Después de la unión de GPIIbIIIa a estas proteínas, se generan eventos de señalización celular de afuera hacia adentro, en el que intervienen proteínas G, metabolismo del fosfoinositol a IP<sub>3</sub>, para mantener y promover aun más la activación plaquetaria. En la fase de propagación de formación del tapón plaquetario, la movilización de Ca<sup>2+</sup>, secreción acompañada de ADP y tromboxano A<sub>2</sub> forman una coalición mediada por receptores de prostanoïdes

P2Y1, P2Y12 y tromboxano para reclutar, activar y formar agregados con otras plaquetas<sup>61</sup>. El incremento intracelular de los niveles de  $Ca^{2+}$  mediado por IP3, está directamente relacionado con la activación plaquetaria, dado que muchas de las enzimas comprometidas en los mecanismos de transducción de señales, tales como PLA2, PLC y la quinasa de la cadena liviana de la miosina son dependientes de  $Ca^{2+}$ <sup>62</sup>



**Figura 3.** Importancia del  $Ca^{2+}$  en la activación plaquetaria orquestando las rutas de señales extracelulares e intracelulares durante la hemostasis. Para ello se requiere sinergia entre P2Y1 y P2Y12 para activar la integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (GPIIb/IIIa) de unión al fibrinógeno, mediado por PLC (Fosfolipasa C),  $Ca^{2+}$  y PI3K (Fosfatidil inositol 3 quinasa), luego de la unión de GPIIb/IIIa al fibrinógeno se produce la polarización de GPIIb/IIIa, mas integrinas se van uniendo con el fibrinógeno, activando la polimerización de la actina, para la formación de pseudópodos. Las

oleadas de  $Ca^{+2}$  dictan el grado de activación de GPIIbIIIa y su correspondiente unión al fibrinógeno. <sup>61</sup>

La liberación de los factores de crecimiento (FC), de los gránulos alfa, luego de la activación plaquetaria, pueden mejorar la reparación tisular mediante diversos mecanismos incluyendo la regulación de la inflamación, angiogénesis, síntesis y remodelación de nuevos tejidos, por estas razones, el PRP ha sido utilizado en diferentes áreas médicas como odontología, cirugía plástica, ortopedia, cicatrización de heridas y estética con resultados prometedores <sup>63</sup>.

Una vez que el PRP es mezclado con una sustancia de activación plaquetaria (por ejemplo, sales de calcio o trombina) o tiene contacto con el colágeno tisular, éste cambia a una forma en gel de fibrina que libera gradualmente los FC <sup>64</sup>.

En Latinoamérica, uno de los países que ha documentado referencias del tema es Argentina, siendo presentada la primera experiencia en 1990 con la “criolisis plaquetaria” y su aplicación en curación de heridas, ya que más adelante los estudios de investigación dieron un sustento a esta forma para obtener FC de origen plaquetario <sup>65</sup>. Más adelante, la FDA aprobó en 1998 una formulación basada en un isómero de un FC, en base a estudios en pacientes diabéticos, con todos estos fundamentos y publicaciones internacionales se inició el aval de las posibles indicaciones del PRP en curación de heridas en pacientes diabéticos. Llegando a un consenso en el año 2008 por la Sociedad Argentina de Dermatología en el que se expresan los fundamentos para la indicación de PRP <sup>65</sup>.

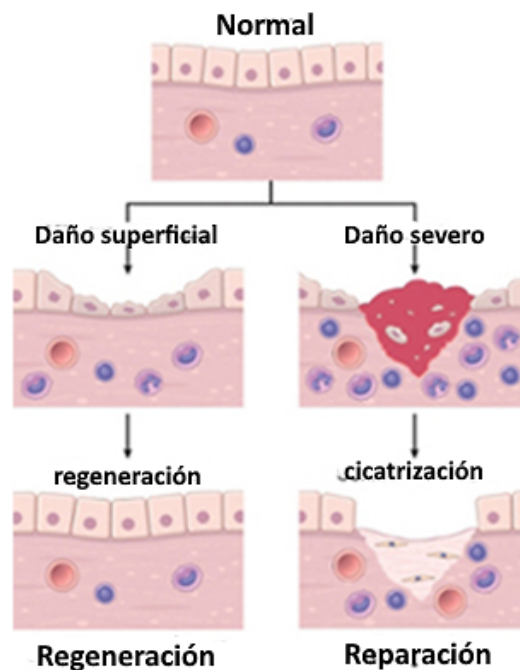


La reparación de heridas es un proceso dinámico y fisiológico para la regeneración de tejidos dañados (**figura 3**)<sup>66</sup>. La cicatrización de heridas fisiológica puede ser interrumpida por factores locales (cuerpos extraños en el sitio de la herida, maceración del tejido, isquemia o infección) o factores intrínsecos (edad, enfermedades inflamatorias, drogas o malnutrición) resultandos en una serie de complicaciones clínicas, incluyendo cicatrización anormal, dolor, prurito, hemorragia, ulceración, infección y amputación <sup>65</sup>. Estas complicaciones afectan la tasa de morbilidad y mortalidad, por lo tanto, la cicatrización de heridas en la actualidad es un desafío médico <sup>67</sup>. Dado este desafío, para poder ayudar a la regeneración de tejidos disminuyendo el periodo de cicatrización se buscó el uso de biomateriales regenerativos, en esta búsqueda se encontró el PRP como una alternativa <sup>68</sup>.

Académicamente, se podrían explicar los términos durante la reparación tisular en regeneración tisular, la cual ocurre cuando se produce la sustitución del tejido dañado por un nuevo tejido celular; mientras que la reparación tisular o cicatrización se basa en el tejido formado en la fase anterior cuando es reemplazado por tejido fibroso, el cual da origen a una cicatriz que en muchos casos no es funcional (**figura 4**).

Durante el proceso de cicatrización, una de las fases más importantes es la de proliferación, caracterizada por la formación de tejido de granulación y el inicio de

la angiogénesis <sup>69</sup>. La angiogénesis es el crecimiento o expansión de la red capilar microvascular a partir de los vasos pre-existentes <sup>70</sup>. Este proceso tiene como mediador fundamental el VEGF <sup>71</sup>. El VEGF representa un FC con una actividad pro-angiogénica importante, teniendo un efecto mitótico y anti-apoptótico en las células endoteliales, incrementando la permeabilidad vascular y promoviendo la migración celular <sup>72</sup>.



**Figura 4.** Regeneración y reparación tisular. En esta imagen se ejemplifica las fases de ambos procesos <sup>73</sup>.

El proceso de curación de heridas es complejo y está influenciado por una variedad de factores. Durante la cicatrización normal de las heridas, las fases de inflamación, proliferación y remodelación ocurren secuencialmente una a continuación de otra y en ocasiones se superponen.

La investigación referente a curación de heridas mediante los FC, siendo el VEGF unos de los FC más importantes por su capacidad angiogénica, ha recibido atención especial de las últimas décadas, por el impacto que puede tener, ya que según Han G y colaboradores <sup>74</sup>, cuando la curación de una herida no progresa normalmente, esto puede resultar en una herida crónica y esto se ve en pacientes especialmente diabéticos; que según estadísticas, se ha estimado en EE. UU. que una sola úlcera diabética puede conllevar un gasto aproximado de \$50,000 y la úlceras crónicas en general en total ocasionan un gasto al sistema de salud por encima de \$25 mil millones de dólares al año <sup>74</sup>.

En la actualidad, los principales usos y aplicaciones médicas del PRP se pueden resumir en la **tabla 3**.

**Tabla 3.** Usos y aplicaciones del PRP en medicina

Especialidad	Aplicaciones
Manejo de heridas	Mejorar la cicatrización, reducir amputaciones, prevenir riesgo de infecciones y mejorar la calidad de vida) <sup>75</sup> .
Ortopedia y medicina del deporte	Acelerar la cicatrización, mejorar la calidad tisular, evitar las recaídas, retomar el entrenamiento competitivo por completo, reducir el dolor, mejorar la funcionalidad y detener la progresión de condiciones degenerativas) <sup>75</sup> .
Dermatología	Estimular el crecimiento del pelo, evitar cicatrices

	fibróticas y recuperar sensibilidad) <sup>75</sup> .
Cirugía maxilofacial y oral	Mejorar la calidad y cantidad de hueso regenerado, mejorar la densidad ósea, prevenir pérdida sanguínea y reducir el dolor post-operatorio) <sup>75</sup> .
Cirugía plástica	Mejorar la supervivencia de los injertos de grasa, reducir complicaciones y reducir el número de intervenciones) <sup>75</sup> .
Ginecología	Mejorar el grosor endometrial mediante inyecciones endometriales y mejorar la función ovárica mediante inyecciones intra ováricas) <sup>75</sup> .
Otorrinolaringología	Cicatrización de la membrana timpánica) <sup>76</sup> .
Urología	Función eréctil) <sup>77</sup> .
Oftalmología	Mejorar la lubricación mediante aplicación tópica, evitar cicatrices fibróticas y reducir complicaciones <sup>75</sup> .

### II.1.3. Métodos de obtención y cuantificación de factores de crecimiento

En la literatura se encuentran una gran variedad de conceptos en cuanto a la cantidad de plaquetas requeridas para calificar como PRP, existen diferentes protocolos para la obtención de PRP, de acuerdo a cada sistema y cada autor, así mismo existen, incluso, kits para este propósito. Algunos autores presentan

metodologías que implican dos centrifugados en su procesamiento, otros simplemente uno, y existe una amplia variación en cuanto a los tiempos de centrifugado, como lo expresan diferentes investigaciones <sup>78</sup>.

A pesar de la creciente popularidad de los tratamientos con PRP, en la actualidad, existe una gran variedad de opciones tanto de kits comerciales, así como de preparaciones manuales, sin embargo, al comparar los resultados obtenidos, como conteo plaquetario o liberación de factores de crecimiento son variables, siendo hasta la fecha un reto indicar cuál es la metodología óptima para su preparación <sup>6</sup>.

La variabilidad en la composición celular en las preparaciones del PRP puede crear un desafío metodológico para los investigadores, dado que los resultados obtenidos en los estudios previos pueden ser difíciles de interpretar si las preparaciones del PRP son inconsistentes <sup>21,79</sup>.

Por lo tanto, la preparación adecuada del PRP puede ayudar a que este secrete muchos FC en concentraciones altas, por este motivo, la estandarización de la preparación del PRP es muy importante, ya que variaciones en la concentración de PRP usualmente conlleva a una disminución y poca sostenibilidad en el efecto reparador en la regeneración tisular.

En esta orientación la investigación tiene como propósito brindar información y comparar la liberación del Factor de VEGF del PRP según diferentes concentraciones de Gluconato de Calcio al 10 % (Glu.Ca) variando el tiempo y fuerza gravitacional de centrifugación ya que el desconocimiento del proceso de obtención o la falta de información puede conllevar a equívocos sobre la cantidad de VEGF obtenido para los diferentes procedimientos médicos.

Finalmente, para lograr la cuantificación del factor de crecimiento VEGF un método utilizado es el “Enzyme-linked immunosorbent assay” (ELISA), que por estudios previos, tanto los autores Kobayashi et al. como Qiao et al. concuerdan que los valores de VEGF de PRP cuantificados mediante ELISA se ha identificado que pueden encontrarse en rangos de 31.20-2,000 pg/mL.<sup>80,81</sup>

## **II.2.Justificación del estudio**

La existencia de muchos métodos de obtención de PRP y su activación con Ca<sup>+2</sup> para la liberación de factores de crecimiento es muy variable, no existe un método estandarizado, demanda tiempo y trabajo, el estudio busca comparar la liberación del VEGF del PRP según diferentes concentraciones de Glu.Ca variando el tiempo y fuerza gravitacional de centrifugación, con la finalidad de buscar una estandarización del método de obtención PRP y liberación de VEGF, permitiendo así el uso correcto del preparado. Así mismo los resultados encontrados sumarán a las bases teóricas

existentes respecto al PRP y la liberación VEGF, de utilidad en medicina regenerativa y cosmética. Cabe señalar que en el Perú no existe un protocolo estandarizado, ni mucho menos se controla y se mide los FC, liberados a partir de PRP, generando incertidumbre en los tratamientos regenerativos aplicados, afectando directamente al paciente en cuanto a tiempo y dinero, durante el tratamiento. A pesar de ello, ya está aceptado el uso de Plasma Rico en Plaquetas por el Ministerio de Salud del Perú, mediante la Resolución Directoral N° 208 2016-SA-DG-INR mediante el Ministerio de Gestión de Servicios de Salud y el Instituto Nacional de Rehabilitación.<sup>82</sup> A nivel mundial se están proponiendo posibles estandarización, aún así hasta la fecha de emisión de este informe no hay un protocolo oficial estandarizado.<sup>4</sup>

Por estas razones, se tomó como referencia los tiempos y fuerza gravitacional del estudio por Roh y colaboradores para la obtención del Plasma Rico en Plaquetas (PRP), mediante dos métodos de centrifugado; Centrifugación Simple (CS) (900 g x 5 min) y Centrifugación Doble (CD) (900 g x 5 min, seguido de 1500 g x 15 min). En relación a la activación de PRP, se tomó como referencia al Gluconato de Calcio (Glu.Ca) al 10%, en dilución que se ha sido propuesta por Roh et al. así como Gkini et al. y Giraldo et al. a una dilución 1/10 de Glu.Ca (0.01 g/mL) en PRP.<sup>9,83,84</sup> Para optimizar la liberación de VEGF, mediante la activación de Glu.Ca sobre PRP, se planteó evaluar las siguientes diluciones de Glu.Ca: 1/5 (0.02 g/mL), 1/10 (0.01 g/mL y 1/20 (0.005 g/mL) en PRP obtenido mediante CS y CD.

### **II.3.Hipótesis**

El tratamiento de PRP con Glu.Ca 10% (peso/volumen) a diferentes diluciones y concentraciones; 1/5 (0.02 g/mL), 1/10 (0.01 g/mL y 1/20 (0.005 g/mL) permitirá optimizar la liberación del VEGF en PRP obtenido por los métodos de Centrifugación Simple (CS) y Centrifugación Doble (CD).

### **II.4.Objetivos**

#### **II.4.1. Objetivo general**

Comparar las cantidades liberadas de VEGF en PRP activado con diferentes diluciones Glu.Ca, en PRP obtenido por los métodos de Centrifugación simple (CS) y Centrifugación doble (CD).

#### **II.4.2. Objetivos específicos**

- Obtener PRP mediante dos métodos diferentes de centrifugado; Centrifugación Simple (CS) y Centrifugación Doble (CD).
- Cuantificar el VEGF en PRP, liberado mediante activación con diferentes diluciones y concentraciones de Glu.Ca. 10%; 1/5 (0.02 g/mL), 1/10 (0.01 g/mL y 1/20 (0.005 g/mL).
- Evaluar y comparar estadísticamente la cantidad liberada del VEGF, en PRP obtenido en la etapa pre-centrífuga, CS y CD, y sometido a la activación respectiva con diferentes diluciones y concentraciones de Glu.Ca 10%; 1/5 (0.02 g/mL), 1/10 (0.01 g/mL y 1/20 (0.005 g/mL).



### III. METODOLOGÍA

#### III.1. Diseño del estudio

Se trata de un estudio con **enfoque cuantitativo** porque la realidad estudiada es una situación independiente a la realidad del investigador y no está modificada por las observaciones realizadas, se busca ser lo más objetivo posible, se aplica la lógica deductiva, la posición del investigador es neutral al fenómeno estudiado, los antecedentes son cruciales para las etapas del proceso de la investigación, porque se realizó una búsqueda sistemática de la literatura que permitió encontrar variables susceptibles a ser medidas, las hipótesis planteadas fueron antes de ejecutar el estudio y porque los datos recolectados se presentan en forma de números es que son analizados estadísticamente<sup>85</sup>.

Es de **tipo experimental** porque se realizó una acción determinada sobre los participantes y se esperó observar las consecuencias de dicha acción, en otras palabras, existe manipulación intencional de las variables independientes para analizar las consecuencias sobre la variable dependiente<sup>85</sup>. La técnica de experimentación es **ex vivo** dado que se ha extraído de los organismos vivos sustancias que serán incluidas en el proceso de investigación<sup>86</sup>; para el caso del presente estudios, la sustancia extraída es el plasma sanguíneo. Realizar un estudio experimental implica realizar un **análisis comparativo** con el objetivo de buscar diferencias entre grupos o momentos de experimentación.

El protocolo de la presente investigación fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH) (**anexo 1**) (CONSTANCIA 2070-07-17; código de inscripción: 100568), así como su respectiva enmienda (**anexo 2**). Se garantizó la confidencialidad de los datos recolectados, los cuales se encuentran codificados imposibilitando el futuro reconocimiento de los participantes de quienes se obtuvo la muestra; de esta forma se cumple con las pautas éticas estipuladas en la Declaración de Helsinki. Todos los participantes fueron voluntarios que aceptaron participar mediante la firma del consentimiento informado (**anexo 3**).

### **III.2. Población de estudio y muestra**

El tamaño de muestra se obtuvo con el uso del programa estadístico Epidat versión 4.2. Se utilizó el módulo de contraste de hipótesis para la comparación de medias independientes y con varianzas distintas. Se usó como referencia el estudio de Kushida S et al, 2014<sup>87</sup> y se consideró los siguientes parámetros, los cuales fueron solicitados por el mismo programa estadístico:

- Desviación estándar de la población 1: Se consideró como población 1 a aquella en la que se empleó el método de CD. El estudio de Kushida S et al. estudió 4 metodologías de CD para obtención de PRP. Se eligió las metodologías de Magellan® y Kyocera® como aquellas en quienes la fuerza y tiempo de centrifugación ([610 x g en 4 min + 1240 x g en 6 min] y [600 x g en 7 min + 2000 x g en 5 min], respectivamente) fueron similares a la fuerza y tiempo de centrifugación de la CD de la presente investigación:

900 x g en 5 min + 1500 x g en 15 min. La media del VEGF de Magellan® fue 48, mientras que la de Kyocera® fue de 43. Dado que los autores de Kushida, et al. no reportaron el valor de VEGF de cada sujeto de estudio por cada metodología, no fue posible obtener la desviación estándar de forma directa. Es así que se optó por considerar la media de cada metodología como si tratara del valor puntual de un solo sujeto de investigación; por lo tanto: la media obtenida a partir de 48 y 43 fue 45.5 y la desviación estándar fue 3.535. Esta desviación estándar se registró en la opción que el EPIDAT solicitaba como **desviación estándar de la población 1**.

- Desviación estándar de la población 2: Se consideró como población 2 a aquella en la que se empleó el método de CS. El estudio de Kushida S et al. estudió 3 metodologías de CS para obtención de PRP (Selphyl®, MyCells®, Dr. Shin's System®). Se eligió las metodologías de MyCells® y Dr. Shin's System® como aquellas en quienes la fuerza y tiempo de centrifugación ([2054 x g en 7 min] y [1720 x g en 8 min], respectivamente) fueron similares a la fuerza y tiempo de centrifugación de la CS de la presente investigación: 900 x g en 5 min + 1500 x g en 15 min. La media del VEGF de MyCells® fue 39, mientras que la de Dr. Shin's System® fue de 30. Dado que los autores de Kushida, et al. no reportaron el valor de VEGF de cada sujeto de estudio por cada metodología, no fue posible obtener la desviación estándar de forma directa. Es así que se optó por considerar la media de cada metodología como si tratara del valor puntual

de un solo sujeto de investigación; por lo tanto: la media obtenida a partir de 39 y 30 fue 34.5 y la desviación estándar fue 6.36. Esta desviación estándar se registró en la opción que el EPIDAT solicitaba como **desviación estándar de la población 2**.

- Diferencia de medias: Calculado a partir de las medias descritas previamente: 45.5 y 34.5. El resultado ingresado en la opción que el EPIDAT solicitaba como diferencia de medias a detectar fue de 10.

Se utilizó un nivel de confianza al 95 % y una razón de tamaños muestrales igual a 1. Con todo ello, el tamaño de muestra calculado fue de 12 participantes (**figura 4**), a lo que se agregó un 66 % de penalización por pérdidas, por lo que el número objetivo a reclutar fue de 20 participantes.

**[2] Tamaños de muestra. Comparación de medias independientes:**

**Datos:**

Varianzas:	Distintas
Diferencia de medias a detectar:	10,000
Desviación estándar esperada:	
Población 1:	3,535
Población 2:	6,360
Razón entre tamaños muestrales:	1,00
Nivel de confianza:	95,0%

**Resultados:**

Potencia (%)	Tamaño de la muestra		
	Población 1	Población 2	Total
80,0	6	6	12

**Figura 4.** Cálculo del tamaño de muestra

Los criterios de inclusión fueron el dar la aceptación de participación mediante la firma

del consentimiento informado y tener una edad entre los 18-40 años. Los criterios de exclusión fueron: presencia de antecedentes de trastornos sanguíneos (alteraciones en la coagulación), fumador, trastornos metabólicos (diabetes mellitus, obesidad), medicación concomitante de antiagregantes plaquetarios, proceso inflamatorio o infeccioso concomitante. Para garantizar que se cumplan los criterios de inclusión y exclusión, se revisó las fichas y registros de cada voluntario que participó en el estudio.

### **III.3. Procedimientos**

El estudio se llevó a cabo en el Banco de Sangre del Hospital Cayetano Heredia (BS-HCH), hospital ubicado en la ciudad de Lima (Perú). Este servicio, para el proceso de donación de sangre y de forma rutinaria, entrevista a todas las personas que tienen la intención de donar sangre y registra la información en una ficha para uso propio del servicio. El promedio de donaciones diarias es de 60 personas.

El investigador principal del presente estudio, luego de solicitar los permisos pertinentes, acudió al BS-HCH y solicitó las fichas de los donantes que en dicho momento se encontraban en proceso de donación de sangre. Se seleccionó las fichas de los donantes que cumplieron con los criterios de elegibilidad del estudio, se les consultó si deseaban participar de la investigación y, los que aceptaron, se les hizo firmar el consentimiento informado. Es así que se logró reclutar a 20 voluntarios.

Al personal del BS-HCH se le entregó 8 tubos de ensayo de marca Vacutainer™ por cada uno de los 20 voluntarios reclutados, luego se les indicó que cada tubo lo llenen

con 3 mL de la sangre proveniente del capuchón anexo a la bolsa colectora durante el proceso de donación de sangre de cada uno de los donantes seleccionados (**figura 5**). Es así que el total de tubos de ensayo disponibles para el proceso de experimentación fueron de 160. Cada tubo de ensayo presentó citrato de sodio como anticoagulante.

La recolección de sangre de los 20 voluntarios se realizó en un solo día (conforme iban llegando los donantes a BS-HCH). De manera inmediata (no más de 5 minutos) a la recolección de sangre de cada voluntario, se procedió a realizar el conteo basal de parámetros hematológicos (GR, GB y plaquetas) seleccionando uno de los 8 tubos de ensayo que le correspondió a cada voluntario que brindó la muestra de sangre. Se realizó este proceso con un total de 20 tubos (uno por cada voluntario) y se utilizó el analizador hematológico del hospital (**figura 5**), el cual fue manipulado por personal de BS-HCH que se encontraba en actividad laboral en dicho momento. Culminado este proceso, se rotuló los 160 tubos (**figura 5**) con los números del 1 al 20 y con las letras A o B de la siguiente forma:

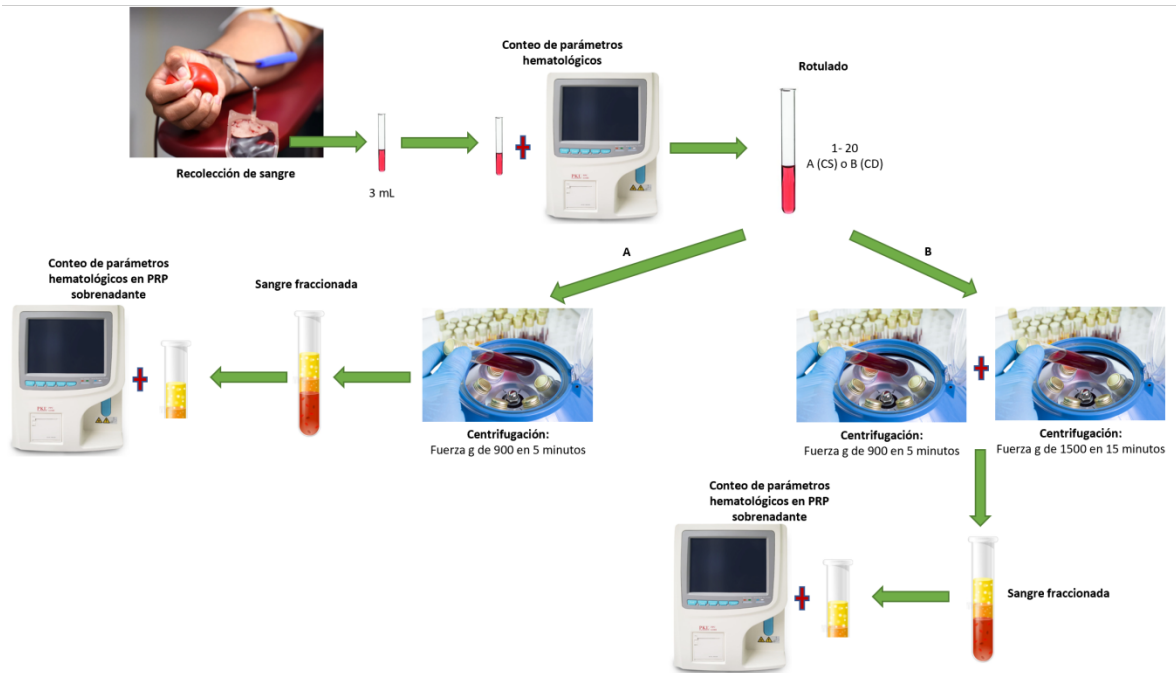
- A cada voluntario le correspondieron 8 tubos de ensayo, por lo que cuatro de ellos se rotuló con la letra A (lo cual significó que serían procesados con CS) y los cuatro restantes se rotuló con la letra B (lo cual significó que serían procesado con CD).
- El total de voluntarios fueron 20 personas, por lo que los grupos de 8 tubos de cada voluntario se rotuló con el número de orden del voluntario seleccionado.

- Por ejemplo: El voluntario número 1 brindó muestras de sangre para 8 tubos de ensayo. Cuatro tubos fueron rotulados con la letra A y los cuatro restantes con la letra B. Los ocho tubos se rotularon con el número 1 dado que este era el número de orden del voluntario.

Finalizado el conteo basal de parámetros hematológicos, en otro ambiente se realizó la centrifugación de los 160 tubos de ensayo (**figura 5**) de la siguiente forma:

- Los 4 tubos rotulados con la letra A se sometió a CS con una fuerza de 900 g en 5 minutos.
- Los 4 tubos rotulados con la letra B se sometió a CD con una fuerza de 900 g en 5 minutos y luego una fuerza de 1500 g los siguientes 15 minutos.

El centrifugado fue realizado por el tecnólogo médico que se encontraba en actividad laboral en dicho momento. Finalizada la centrifugación, los tubos de ensayo se derivaron nuevamente a realizar el conteo de parámetros hematológicos, pero esta vez se los cuantificó en el PRP sobrenadante, es así que se obtuvo el registro del conteo plaquetario post CS y post CD (**figura 5**). Mayores detalles del conteo plaquetario pre y post centrifugación se detallan en el **punto 5.4.** de la presente investigación.



**Figura 5.** Etapas experimentales desde la recolección de sangre hasta el conteo de parámetros hematológicos (GR, GB y plaquetas) post centrifugación

**A:** Centrifugación simple, **B:** Centrifugación doble

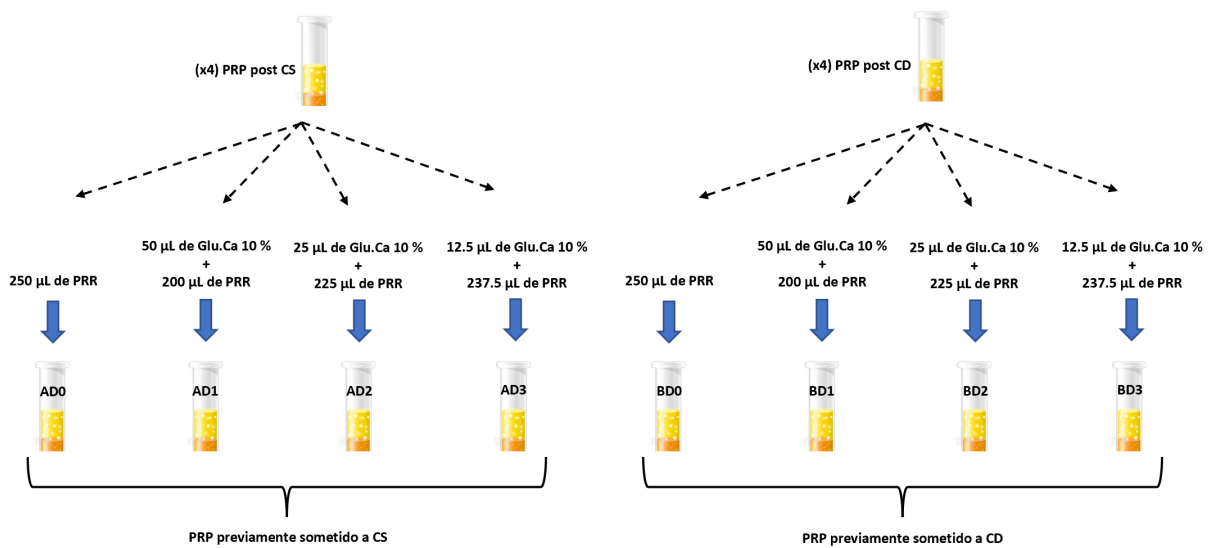
Como última etapa, los tubos de ensayo se derivaron a un último ambiente en donde se procesó añadiendo Glu.Ca al 10 % (Laboratorios Unidos S.A. Cada ampolla de 10mL contiene: Gluconato de Calcio H<sub>2</sub>O - 0.993g. Excipientes: Calcio sacarato, agua para inyección c.s.p. – Calcio: 0.465 mEq/mL) sobre el PRP, obteniéndose las siguientes diluciones del Glu.Ca en el PRP: 1/5, 1/10 y 1/20; manteniendo un volumen final de 250 uL. Esto se realizó de acuerdo a lo especificado a continuación para grupo de 8 tubos (**figura 6**).

Para la liberación del VEGF, todas las diluciones de Glu.Ca en PRP fueron incubadas por 30 min. a temperatura ambiente.



- A 2 tubos sólo se le añadió 250 uL de PRP: A estos tubos no se les añadió Glu.Ca. Un tubo estuvo previamente rotulado con la letra A (con PRP obtenido por CS) y el otro, con la letra B (con PRP obtenido por CD). Debido a que el PRP de estos tubos carecían de activación con dilución con Glu.Ca, se les agregó el rotulado de D0.
- A 2 tubos se añadió 50 uL de Glu.Ca + 200 uL de PRP (dilución 1/5): A estos tubos sí se les añadió Glu.Ca. Un tubo estuvo previamente rotulado con la letra A (con PRP obtenido por CS) y el otro, con la letra B (con PRP obtenido por CD). Debido a que estos tubos sí presentaban activación con Glu.Ca, se les agregó a cada uno el rotulado de D1, lo cual significaba que presentaron una dilución 1/5 de Glu.Ca al 10 %, concentración de 0.02 g/mL de Glu.Ca en PRP.
- A 2 tubos se añadió 25 uL de Glu.Ca + 225 uL de PRP (dilución 1/10): A estos tubos sí se les añadió Glu.Ca. Un tubo estuvo previamente rotulado con la letra A (con PRP obtenido por CS) y el otro, con la letra B (con PRP obtenido por CD). Debido a que el PRP de estos tubos sí presentaban activación con Glu.Ca, se les agregó a cada uno el rotulado de D2, lo cual significaba que presentaron una dilución 1/10 de Glu.Ca al 10 %, concentración de 0.01 g/mL de Glu.Ca en PRP.
- A 2 tubos se añadió 12.5 uL de Glu.Ca + 237.5 uL de PRP (dilución 1/20): A estos tubos sí se les añadió Glu.Ca. Un tubo estuvo

previamente rotulado con la letra A (con PRP obtenido por CS) y el otro, con la letra B (con PRP obtenido por CD). Debido a que el PRP de estos tubos sí presentaban activación con presentaba Glu.Ca, se les agregó el rotulado de D3, lo cual significaba que presentaron una dilución 1/20 de Glu.Ca al 10 %, concentración de 0.005 g/mL de Glu.Ca en PRP.



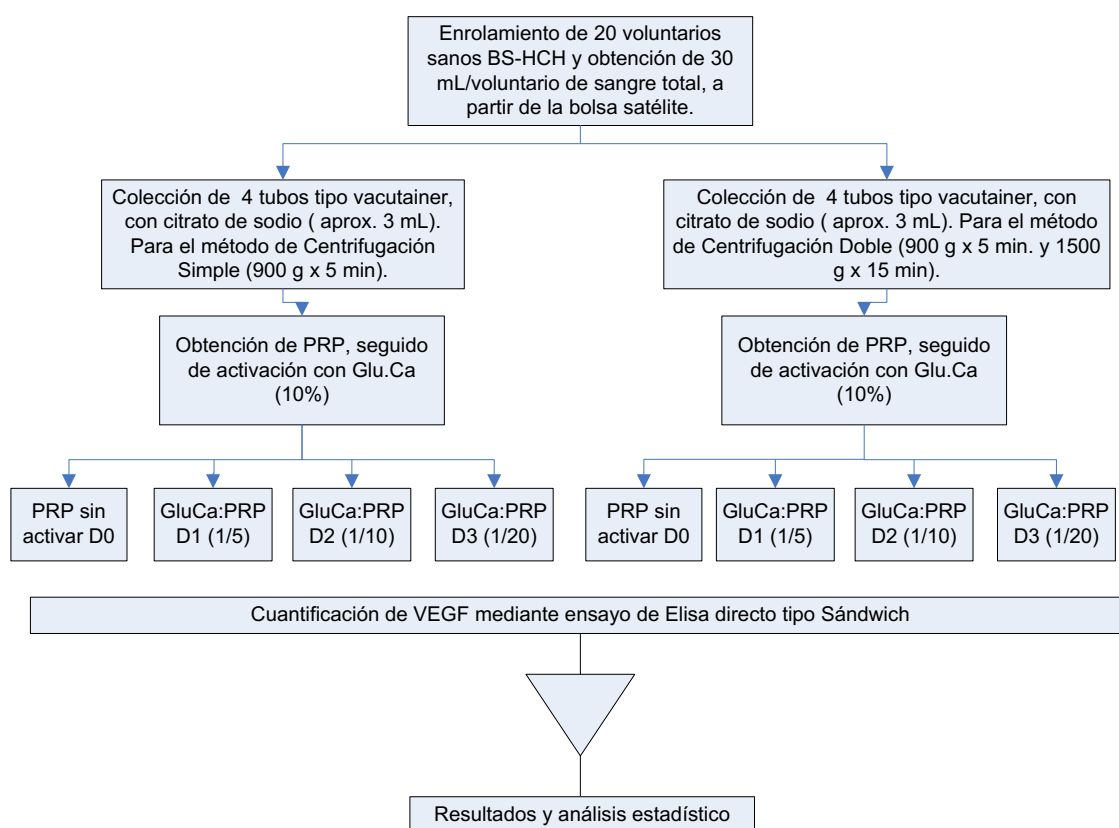
**Figura 6.** Etapas experimentales post centrifugación

**A/CS:** Centrifugación simple; **B/CD:** Centrifugación doble; **D0:** sin dilución de Glu.Ca al 10 % en PRP; **D1:** dilución de Glu.Ca al 10 % en 1/5 (0.02 g/mL); **D2:** dilución de Glu.Ca al 10 % en 1/10 (0.01 g/mL); **D3:** dilución de Glu.Ca al 10 % en 1/20 (0.005 g/mL).

Una vez cada obtenido los 8 tubos de ensayos con las diferentes diluciones de Glu.Ca al 10 % en PRP por cada voluntario, estas diluciones fueron incubadas por 30 minutos

a temperatura ambiente para la liberación de VEGF, paso siguiente fue realizar la cuantificación del VEGF a través del ensayo ELISA. En el **punto 5.5** de la presente investigación se brindan mayores detalles de la estrategia en la placa de ELISA de 96 pozos.

En la **figura 7** se presenta un flujograma del procedimiento de experimentación desde la toma de muestra hasta la cuantificación del VEGF.



**Figura 7.** Flujograma donde se muestra las condiciones de centrifugación para obtener plasma rico en plaquetas, así como su activación con Glu.Ca al 10 % a diferentes diluciones. para la liberación del VEGF.

**PRP:** Plasma rico en plaquetas; **D0:** sin dilución de Glu.Ca al 10 % en PRP; **D1:** dilución de Glu.Ca al 10 % en 1/5 (0.02 g/mL); **D2:** dilución de Glu.Ca al 10 % en 1/10 (0.01 g/mL); **D3:** dilución de Glu.Ca al 10 % en 1/20 (0.005 g/mL).

#### **III.4.      Conteo de plaquetas y parámetros hematológicos**

Las muestras de sangre fueron analizadas para obtener los parámetros hematológicos celulares (recuento de plaquetas, GR y GB), mediante el uso del analizador hematológico CELL-DYN Emerald del Laboratorio Abbott. Estos parámetros fueron medidos en tres momentos: basal, post CS y post CD.

La medición basal se realizó de manera indistinta eligiendo uno de los 8 tubos de cada uno de los 20 voluntarios. La medición post CS se realizó del PRP extraído de uno de los 4 tubos sometidos a CS de cada uno de los 20 voluntarios. La medición post CD se realizó del PRP extraído de uno de los 4 tubos sometidos a CD de cada uno de los 20 voluntarios.

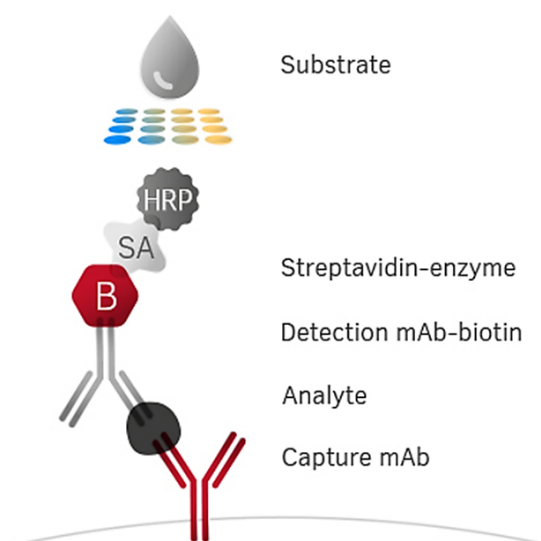
Para garantizar el adecuado recuento de los componentes celulares de las muestras, el analizador hematológico se encontraba al día en su cronograma de calibración programado por el BS-HCH.

Las mediciones de los parámetros hematológicos por cada voluntario fueron registradas en una hoja Excel, para ello, se clasificó estas mediciones en 3 momentos: pre-centrífuga, post CS y post CD.

#### **III.5.      Ensayo de ELISA**

La determinación de VEGF fue realizado con el “Human VEGF ELISA Kit” de la marca Invitrogen®, Thermo Fisher Scientific, número de referencia KHG0111 (ahora en adelante: kit ELISA). El kit de ELISA presenta una sensibilidad analítica de < 5 pg/mL y un rango de ensayo de 0 - 1500 pg/mL<sup>88</sup>. Además, según el proveedor en relación a la especificidad del Kit, analizando el VEGF, no presenta reacción cruzada como las siguientes moléculas: Human IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IL-15, EGF, FGF basic, FGF acidic, G-CSF, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , RANTES, SCF, TGF- $\alpha$ , and TNF- $\alpha$ ; mouse IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, G-CSF, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , y TNF- $\alpha$ ; rat IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , y TNF- $\alpha$ .<sup>88</sup>

Este kit ELISA tiene como finalidad reconocer y cuantificar de la familia VEGF (VEGF-A, -B, -C, -D, -E, -F), solo al VEGF-A y sus seis principales isoformas (VEGF-A<sub>121, 145, 165, 183, 189 y 206</sub>), para ello realiza una captura tipo “sándwich” por intermedio de un anticuerpo monoclonal con especificidad para VEGF A, fijado en la fase sólida de la placa de ELISA<sup>88</sup>. Esta interacción es revelada mediante un complejo formado por un anticuerpo secundario anti-VEGF biotinilado + la enzima *Horseradish Peroxidase* (HRP) unida a la proteína estreptavidina (SA); el sustrato cromógeno tetrametilbencidina (TMB) da una coloración azulada al ser oxidado por la enzima HRP y como paso final la adición de la solución de Stop en cada pocillo de la placa de ELISA, cambiando la coloración azulada a amarilla por ser analizada la placa finalmente a una absorbancia de 450nm.<sup>88</sup> **(figura 8).**



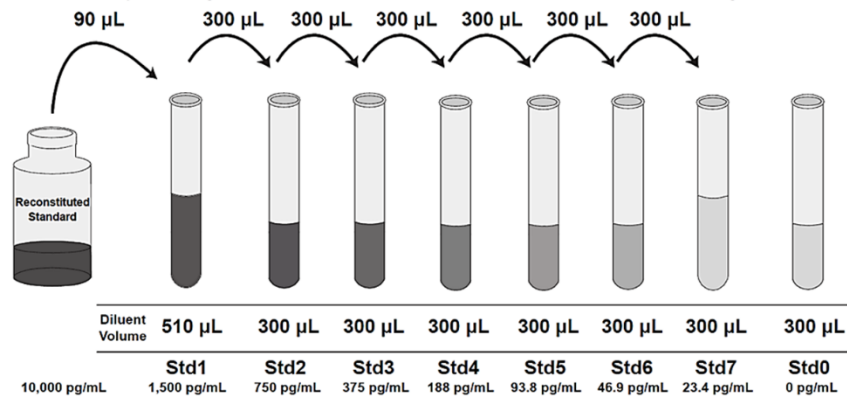
**Figura 8.** Principio del método de cuantificación del VEGF con el kit ELISA.

**mAb:** anticuerpo monoclonal de captura anti-VEGF; **Analyte:** VEGF; **mAb-biotin:** anticuerpo monoclonal anti-VEGF unido a biotina; **Streptavidine-enzyme:** enzima HRP unida a SA; **Susbtrate:** TMB. **Fuente:** Imagen procedente de Mabtech<sup>89</sup>

Para la cuantificación del VEGF, según las recomendaciones del fabricante (**figura 9**), se confeccionó una curva de estándar, para la cual se reconstituyó el vial conteniendo HuVEGF (Human VEGF) a una concentración de 10 000 pg/mL, luego mediante dilución seriada de logró obtener los siguientes puntos para la curva estándar:

- Std1: 1,500 pg/mL
- Std2: 750 pg/mL
- Std3: 375 pg/mL
- Std4: 188 pg/mL
- Std5: 93.8 pg/mL

- Std6: 46.9 pg/mL
- Std7: 23.4 pg/mL
- Std0: 0 pg/mL,



**Figura 9.** Elaboración de la curva estándar HuVEGF mediante dilución seriada.

Todas las muestras fueron incubadas por 30 min, a temperatura ambiente luego del tratamiento con Glu.Ca al 10%.

### 5.5.1. Experimentación con el kit ELISA para las muestras de la 1 a la 5

Se utilizó una **primera placa de ELISA** para cuantificar la liberación del VEGF, a partir del PRP tratado con diferentes diluciones de Glu.Ca, de las 5 primeras muestras de sangre de los voluntarios (**figura 10**). Para cada muestra se estableció 2 columnas de la placa ELISA con el objetivo de realizar la medición de la absorbancia por duplicado. Las últimas 2 columnas de la placa de ELISA correspondieron al lugar de medición de la absorbancia para la curva estándar.

	Muestra 1		Muestra 2		Muestra 3		Muestra 4		Muestra 5		Curva Estandar	
<b>A</b>	1AD0	1AD0	2AD0	2AD0	3AD0	3AD0	4AD0	4AD0	5AD0	5AD0	St1	St1
<b>B</b>	1AD1	1AD1	2AD1	2AD1	3AD1	3AD1	4AD1	4AD1	5AD1	5AD1	St2	St2
<b>C</b>	1AD2	1AD2	2AD2	2AD2	3AD2	3AD2	4AD2	4AD2	5AD2	5AD2	St3	St3
<b>D</b>	1AD3	1AD3	2AD3	2AD3	3AD3	3AD3	4AD3	4AD3	5AD3	5AD3	St4	St4
<b>E</b>	1BD0	1BD0	2BD0	2BD0	3BD0	3BD0	4BD0	4BD0	5BD0	5BD0	St5	St5
<b>F</b>	1BD1	1BD1	2BD1	2BD1	3BD1	3BD1	4BD1	4BD1	5BD1	5BD1	St6	St6
<b>G</b>	1BD2	1BD2	2BD2	2BD2	3BD2	3BD2	4BD2	4BD2	5BD2	5BD2	St7	St7
<b>H</b>	1BD3	1BD3	2BD3	2BD3	3BD3	3BD3	4BD3	4BD3	5BD3	5BD3	St0	Blk

**Figura 10.** Diseño de la placa de ELISA de 96 pozos para las muestras de la 1 a la 5.

**A:** método CS; **B:** método CD; **D0:** sin dilución de Glu.Ca al 10 % en PRP; **D1:** dilución de Glu.Ca al 10 % en 1/5 (0.02 g/mL); **D2:** dilución de Glu.Ca al 10 % en 1/10 (0.01 g/mL); **D3:** dilución de Glu.Ca al 10 % en 1/20 (0.005 g/mL).

El resultado de la absorbancia de cada uno de los pozos se restó con el resultado de absorbancia del pozo St0 (Abs. 0.072), el cual será utilizado como “ruido de fondo” (**figura 11A**). Es así que ahora se obtienen los resultados de absorbancias más reales (**figura 11B**), los cuales se procedieron a promediar con su respectivo duplicado obteniendo las absorbancias promedio para cada muestra (**figura 11C**).

**Figura 11A.** Resultado crudo de absorbancias

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	0.071	0.074	0.067	0.065	0.081	0.077	0.065	0.066	0.067	0.071	1.245	1.204
<b>B</b>	0.111	0.112	0.086	0.081	0.132	0.134	0.078	0.083	0.074	0.075	0.878	0.862
<b>C</b>	0.126	0.126	0.085	0.090	0.162	0.163	0.094	0.099	0.076	0.074	0.576	0.571
<b>D</b>	0.090	0.095	0.069	0.075	0.100	0.095	0.072	0.078	0.071	0.067	0.332	0.342
<b>E</b>	0.066	0.068	0.065	0.064	0.075	0.075	0.068	0.068	0.067	0.068	0.213	0.213
<b>F</b>	0.069	0.071	0.068	0.069	0.084	0.079	0.070	0.073	0.074	0.071	0.151	0.157
<b>G</b>	0.071	0.074	0.068	0.068	0.083	0.081	0.070	0.070	0.077	0.074	0.115	0.114
<b>H</b>	0.074	0.071	0.070	0.069	0.083	0.084	0.072	0.079	0.076	0.075	0.072	0.048



**Figura 11B.** Resultado ajustado de absorbancias

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-0.001	0.002	-0.005	-0.007	0.009	0.005	-0.007	-0.006	-0.005	-0.001	1.173	1.132
B	0.039	0.040	0.014	0.009	0.060	0.062	0.006	0.011	0.002	0.003	0.806	0.790
C	0.054	0.054	0.013	0.018	0.090	0.091	0.022	0.027	0.004	0.002	0.504	0.499
D	0.018	0.023	-0.003	0.003	0.028	0.023	0.000	0.006	-0.001	-0.005	0.260	0.270
E	-0.006	-0.004	-0.007	-0.008	0.003	0.003	-0.004	-0.004	-0.005	-0.004	0.141	0.141
F	-0.003	-0.001	-0.004	-0.003	0.012	0.007	-0.002	0.001	0.002	-0.001	0.079	0.085
G	-0.001	0.002	-0.004	-0.004	0.011	0.009	-0.002	-0.002	0.005	0.002	0.043	0.042
H	0.002	-0.001	-0.002	-0.003	0.011	0.012	0.000	0.007	0.004	0.003	0.000	

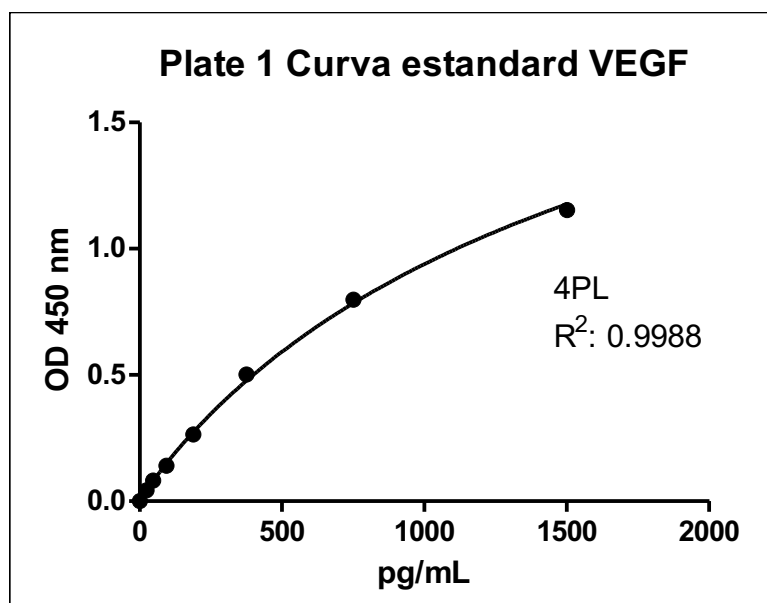
**Figura 11C.** Promedio de absorbancias

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5	Curva Estandar
A	0.001	-0.006	0.007	-0.006	-0.003	1.153
B	0.040	0.012	0.061	0.009	0.003	0.798
C	0.054	0.016	0.091	0.025	0.003	0.502
D	0.021	0.000	0.026	0.003	-0.003	0.265
E	-0.005	-0.007	0.003	-0.004	-0.004	0.141
F	-0.002	-0.003	0.010	0.000	0.001	0.082
G	0.001	-0.004	0.010	-0.002	0.004	0.043
H	0.001	-0.002	0.012	0.004	0.004	0.000

**Figura 11.** Estrategias para el análisis de absorbancias. **Figura 11A:** datos crudos de absorbancia a 450nm; **Figura 11B:** Absorbancias corregidas sin ruido de fondo; **Figura 11C:** Promedio de absorbancias de muestras del 1 al 5 y promedio de absorbancias de la curva estándar para VEGF.

**A:** método centrifugación simple; **B:** método centrifugación doble

Los resultados de absorbancia de cada muestra fueron analizados con el uso del programa GraphPad Prism Versión 5.01 mediante un análisis de regresión de lineal de 4 parámetros (4PL), con el objetivo de lograr una curva (**figura 12**) con un mejor ajuste a través de los diferentes puntos<sup>90</sup>.



**Figura 12.** Curva estándar 4PL, utilizada para la obtención del VEGF de las muestras 1 a la 5.

A partir de la curva estándar se obtuvo los valores finales del VEGF en pg/mL, según cada muestra (**figura 13A**), los cuales se multiplicaron por 2 dado que el preparado inicial fue diluido 1/2 (**figura 13B**).

**Figura 13A.** Resultado de VEGF

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5	Curva Estandar	
A	0.439	0.000	3.453	0.000	0.000		pg/mL
B	22.179	6.124	34.987	4.510	1.405		pg/mL
C	30.659	8.320	54.129	13.398	1.405		pg/mL
D	11.120	0.000	13.972	1.405	0.000		pg/mL
E	0.000	0.000	1.405	0.000	0.000		pg/mL
F	0.000	0.000	5.045	0.000	0.439		pg/mL
G	0.439	0.000	5.045	0.000	1.907		pg/mL
H	0.439	0.000	6.124	1.907	1.907		pg/mL

**Figura 13B.** Resultado de VEGF ajustado por factor de dilución = 2

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5	Curva Estandar	
<b>A</b>	0.877	0.000	6.906	0.000	0.000		pg/mL
<b>B</b>	44.359	12.249	69.973	9.020	2.810		pg/mL
<b>C</b>	61.317	16.639	108.259	26.795	2.810		pg/mL
<b>D</b>	22.240	0.000	27.943	2.810	0.000		pg/mL
<b>E</b>	0.000	0.000	2.810	0.000	0.000		pg/mL
<b>F</b>	0.000	0.000	10.089	0.000	0.877		pg/mL
<b>G</b>	0.877	0.000	10.089	0.000	3.813		pg/mL
<b>H</b>	0.877	0.000	12.249	3.813	3.813		pg/mL

**Figura 13.** Resultados de VEGF (pg/mL); **figura 13A:** resultados de VEGF obtenidos luego de la extrapolación de los valores de absorbancia con la curva estándar obtenido mediante análisis de regresión de 4 parámetros; **figura 13B** resultados finales luego de multiplicar por 2 (factor de dilución de la muestra en el ensayo de ELISA).

**A:** método centrifugación simple; **B:** método centrifugación doble

La cantidad de PRP utilizado en los tubos con D0 fue de 250  $\mu$ L, sin embargo, en el resto de tubos se utilizó una menor cantidad de PRP (D1: 200  $\mu$ L, D2:225  $\mu$ L, D3: 237.5  $\mu$ L). Por lo tanto, fue necesario aplicar un factor de corrección a los tubos diluidos con Glu.Ca con el objetivo de semejarlo las proporciones de liberación de VEGF. Se consideró que la cantidad de PRP de los tubos con D0 fue como 1, por lo que la cantidad de VEGF obtenido en los tubos con D1 se ajustaron a 1.20, el VEGF obtenidos de los tubos con D2 se ajustaron a 1.10 y el VEGF obtenidos en los tubos con D3 se ajustaron a 1.05.

### 5.5.2. Experimentación con el kit ELISA para las muestras de la 6 a la 9

Se utilizó una **segunda placa de ELISA** para cuantificar la liberación del VEGF, a partir del PRP tratado con diferentes diluciones de Glu.Ca, de las muestras de sangre

de los voluntarios del 6 al 9 (**figura 14**). Para cada muestra se estableció 2 columnas de la placa ELISA con el objetivo de realizar la medición de la absorbancia por duplicado. Las últimas 2 columnas de la placa de ELISA correspondieron al lugar de medición de la absorbancia para la curva estándar.

	Muestra 6		Muestra 7		Muestra 8		Muestra 9		Curva Estandar			
A	6AD0	6AD0	7AD0	7AD0	8AD0	8AD0	9AD0	9AD0	St1	St1		
B	6AD1	6AD1	7AD1	7AD1	8AD1	8AD1	9AD1	9AD1	St2	St2		
C	6AD2	6AD2	7AD2	7AD2	8AD2	8AD2	9AD2	9AD2	St3	St3		
D	6AD3	6AD3	7AD3	7AD3	8AD3	8AD3	9AD3	9AD3	St4	St4		
E	6BD0	6BD0	7BD0	7BD0	8BD0	8BD0	9BD0	9BD0	St5	St5		
F	6BD1	6BD1	7BD1	7BD1	8BD1	8BD1	9BD1	9BD1	St6	St6		
G	6BD2	6BD2	7BD2	7BD2	8BD2	8BD2	9BD2	9BD2	St7	St7		
H	6BD3	6BD3	7BD3	7BD3	8BD3	8BD3	9BD3	9BD3	St0	Blk		

**Figura 14.** Diseño de la placa de ELISA de 96 pozos para las muestras de la 6 a la 9 (los espacios en blanco no se colocaron las tiras de ELISA, por falta de muestras en el ensayo).

**A:** método CS; **B:** método CD; **D0:** sin dilución de Glu.Ca al 10 % en PRP; **D1:** dilución de Glu.Ca al 10 % en 1/5 (0.02 g/mL); **D2:** dilución de Glu.Ca al 10 % en 1/10 (0.01 g/mL); **D3:** dilución de Glu.Ca al 10 % en 1/20 (0.005 g/mL).

El resultado de la absorbancia de cada uno de los pozos se restó con el resultado de absorbancia del pozo St0 (Abs. 0.076), el cual será utilizado como “ruido de fondo” (**figura 15A**). Es así que ahora se obtienen los resultados de absorbancias más reales (**figura 15B**), los cuales se procedieron a promediar con su respectivo duplicado de control obteniendo las absorbancias promedio para cada muestra (**figura 15C**).

**Figura 15A.** Resultado crudo de absorbancias

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0.076	0.08	0.081	0.078	0.077	0.077	0.083	0.084	1.277	1.305			450
B	0.096	0.088	0.076	0.08	0.081	0.081	0.109	0.112	0.931	0.921			450
C	0.092	0.09	0.082	0.081	0.088	0.084	0.107	0.118	0.575	0.591			450
D	0.089	0.088	0.074	0.076	0.084	0.085	0.117	0.115	0.347	0.353			450
E	0.073	0.074	0.074	0.072	0.073	0.072	0.083	0.084	0.222	0.221			450
F	0.075	0.077	0.074	0.074	0.074	0.076	0.084	0.086	0.157	0.158			450
G	0.074	0.077	0.072	0.076	0.074	0.074	0.083	0.085	0.113	0.112			450
H	0.078	0.075	0.077	0.08	0.078	0.076	0.088	0.088	0.076	0.049			450

**Figura 15B.** Resultado ajustado de absorbancias

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0.000	0.004	0.005	0.002	0.001	0.001	0.007	0.008	1.201	1.229			450
B	0.020	0.012	0.000	0.004	0.005	0.005	0.033	0.036	0.855	0.845			450
C	0.016	0.014	0.006	0.005	0.012	0.008	0.031	0.042	0.499	0.515			450
D	0.013	0.012	-0.002	0.000	0.008	0.009	0.041	0.039	0.271	0.277			450
E	-0.003	-0.002	-0.002	-0.004	-0.003	-0.004	0.007	0.008	0.146	0.145			450
F	-0.001	0.001	-0.002	-0.002	-0.002	0.000	0.008	0.01	0.081	0.082			450
G	-0.002	0.001	-0.004	0.000	-0.002	-0.002	0.007	0.009	0.037	0.036			450
H	0.002	-0.001	0.001	0.004	0.002	0.000	0.012	0.012	0.000				450

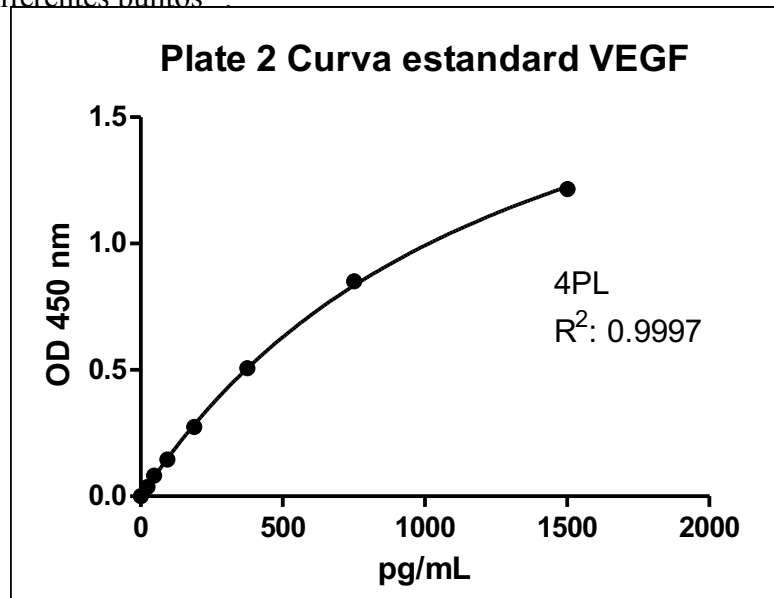
**Figura 15C.** Promedio de absorbancias

	Muestra 6	Muestra 7	Muestra 8	Muestra 9	Curva Estandar	
A	0.0020	0.0035	0.0010	0.0075	1.2150	450
B	0.0160	0.0020	0.0050	0.0345	0.8500	450
C	0.0150	0.0055	0.0100	0.0365	0.5070	450
D	0.0125	-0.0010	0.0085	0.0400	0.2740	450
E	-0.0025	-0.0030	-0.0035	0.0075	0.1455	450
F	0.0000	-0.0020	-0.0010	0.0090	0.0815	450
G	-0.0005	-0.0020	-0.0020	0.0080	0.0365	450
H	0.0005	0.0025	0.0010	0.0120	0.0000	450

**Figura 15.** Estrategias para el análisis de absorbancias. **Figura 15A:** datos crudos de absorbancia a 450nm); **Figura 15B:** Absorbancias corregidas sin ruido de fondo; **Figura 15C:** Promedio de absorbancias de muestras del 6 al 9 y promedio de absorbancias de la curva estándar para VEGF.

**A:** método centrifugación simple; **B:** método centrifugación doble

Los resultados de absorbancia de cada muestra fueron analizados con el uso del programa GraphPad Prism Versión 5.01 mediante un análisis de regresión de lineal de 4 parámetros (4PL), con el objetivo de lograr una curva (**figura 16**) con un mejor ajuste a través de los diferentes puntos<sup>90</sup>.



**Figura 16.** Curva estándar 4PL, utilizada para la obtención del VEGF de las muestras 6 a la 9.

A partir de la curva estándar se obtuvo los valores finales del VEGF en pg/mL, según cada muestra (**figura 17A**), los cuales se multiplicaron por 2 dado que la muestra inicial fue diluido 1/2 en el ensayo (**figura 17B**).

**Figura 17A.** Resultado de VEGF

	Muestra 6	Muestra 7	Muestra 8	Muestra 9	Curva Estandar	
<b>A</b>	1.285	2.538	0.651	5.017		pg/mL
<b>B</b>	9.936	1.285	3.160	21.590		pg/mL
<b>C</b>	9.323	3.781	6.250	22.819		pg/mL
<b>D</b>	8.095	0.000	5.634	24.665		pg/mL
<b>E</b>	0.000	0.000	0.000	5.017		pg/mL
<b>F</b>	0.000	0.000	0.000	5.634		pg/mL
<b>G</b>	0.000	0.000	0.000	5.017		pg/mL
<b>H</b>	0.651	1.913	0.651	7.480		pg/mL

**Figura 17B.** Resultado de VEGF ajustado por factor de dilución = 2

	Muestra 6	Muestra 7	Muestra 8	Muestra 9	Curva Estandar	
<b>A</b>	2.570	5.076	1.302	10.034		pg/mL
<b>B</b>	19.872	2.570	6.320	43.179		pg/mL
<b>C</b>	18.645	7.561	12.500	45.638		pg/mL
<b>D</b>	16.190	0.000	11.268	49.330		pg/mL
<b>E</b>	0.000	0.000	0.000	10.034		pg/mL
<b>F</b>	0.000	0.000	0.000	11.268		pg/mL
<b>G</b>	0.000	0.000	0.000	10.034		pg/mL
<b>H</b>	1.302	3.826	1.302	14.961		pg/mL

**Figura 17.** Resultados de VEGF (pg/mL); **figura 17A:** resultados de VEGF obtenidos luego de la extrapolación de los valores de absorbancia con la curva estándar obtenido mediante análisis de regresión de 4 parámetros; **figura 17B** resultados finales luego de multiplicar por 2 (factor de dilución de la muestra en el ensayo de ELISA).

**A:** método centrifugación simple; **B:** método centrifugación doble

La cantidad de PRP utilizado en los tubos con D0 fue de 250  $\mu$ L, sin embargo, en el resto de tubos se utilizó una menor cantidad de PRP (D1: 200  $\mu$ L, D2:225  $\mu$ L, D3: 237.5  $\mu$ L). Por lo tanto, fue necesario aplicar un factor de corrección a los tubos diluidos con Glu.Ca con el objetivo de semejarlo las proporciones de liberación de VEGF. Se consideró que la cantidad de PRP de los tubos con D0 fue como 1, por lo que la cantidad de VEGF obtenido en los tubos con D1 se ajustaron a 1.20, el VEGF obtenidos de los tubos con D2 se ajustaron a 1.10 y el VEGF obtenidos en los tubos con D3 se ajustaron a 1.05.

### 5.5.3. Experimentación con el kit ELISA para las muestras de la 10 a la 14

Se utilizó una **tercera placa de ELISA** para cuantificar la liberación del VEGF, a partir del PRP tratado con diferentes diluciones de Glu.Ca, de las muestras de sangre de los voluntarios del 10 al 14 (**figura 18**). Para cada muestra se estableció 2 columnas de la placa ELISA con el objetivo de realizar la medición de la absorbancia por duplicado. Las últimas 2 columnas de la placa de ELISA correspondieron al lugar de medición de la absorbancia para la curva estándar.

	Muestra 10		Muestra 11		Muestra 12		Muestra 13		Muestra 14		Curva Estandar	
<b>A</b>	10AD0	10AD0	11AD0	11AD0	12AD0	12AD0	13AD0	13AD0	14AD0	14AD0	St1	St1
<b>B</b>	10AD1	10AD1	11AD1	11AD1	12AD1	12AD1	13AD1	13AD1	14AD1	14AD1	St2	St2
<b>C</b>	10AD2	10AD2	11AD2	11AD2	12AD2	12AD2	13AD2	13AD2	14AD2	14AD2	St3	St3
<b>D</b>	10AD3	10AD3	11AD3	11AD3	12AD3	12AD3	13AD3	13AD3	14AD3	14AD3	St4	St4
<b>E</b>	10BD0	10BD0	11BD0	11BD0	12BD0	12BD0	13BD0	13BD0	14BD0	14BD0	St5	St5
<b>F</b>	10BD1	10BD1	11BD1	11BD1	12BD1	12BD1	13BD1	13BD1	14BD1	14BD1	St6	St6
<b>G</b>	10BD2	10BD2	11BD2	11BD2	12BD2	12BD2	13BD2	13BD2	14BD2	14BD2	St7	St7
<b>H</b>	10BD3	10BD3	11BD3	11BD3	12BD3	12BD3	13BD3	13BD3	14BD3	14BD3	St0	Blk

**Figura 18.** Diseño de la placa de ELISA de 96 pozos para las muestras de la 10 a la 14.

**A:** método CS; **B:** método CD; **D0:** sin dilución de Glu.Ca al 10 % en PRP; **D1:** dilución de Glu.Ca al 10 % en 1/5 (0.02 g/mL); **D2:** dilución de Glu.Ca al 10 % en 1/10 (0.01 g/mL); **D3:** dilución de Glu.Ca al 10 % en 1/20 (0.005 g/mL).

El resultado de la absorbancia de cada uno de los pozos se restó con el resultado de absorbancia del pozo St0 (Abs. 0.078), el cual será utilizado como “ruido de fondo” (**figura 19A**). Es así que ahora se obtienen los resultados de absorbancias más reales



(figura 19B), los cuales se procedieron a promediar con su respectivo duplicado de control obteniendo las absorbancias promedio para cada muestra (figura 19C).

**Figura 19A.** Resultado crudo de absorbancias

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0.076	0.076	0.081	0.082	0.073	0.076	0.074	0.075	0.084	0.086	1.307	1.303	450
B	0.179	0.179	0.098	0.098	0.086	0.085	0.075	0.074	0.125	0.124	0.943	0.87	450
C	0.174	0.158	0.095	0.099	0.084	0.09	0.076	0.077	0.137	0.137	0.586	0.599	450
D	0.077	0.078	0.081	0.083	0.075	0.078	0.075	0.075	0.097	0.102	0.354	0.353	450
E	0.077	0.075	0.078	0.078	0.069	0.071	0.076	0.075	0.081	0.081	0.231	0.224	450
F	0.077	0.076	0.081	0.079	0.071	0.072	0.077	0.083	0.087	0.086	0.158	0.162	450
G	0.081	0.081	0.081	0.082	0.071	0.075	0.077	0.08	0.085	0.089	0.122	0.123	450
H	0.082	0.085	0.082	0.084	0.075	0.074	0.084	0.082	0.089	0.087	0.078	0.05	450

**Figura 19B.** Resultado ajustado de absorbancias

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	-0.002	-0.002	0.003	0.004	-0.005	-0.002	-0.004	-0.003	0.006	0.008	1.229	1.225	450
B	0.101	0.101	0.02	0.02	0.008	0.007	-0.003	-0.004	0.047	0.046	0.865	0.792	450
C	0.096	0.08	0.017	0.021	0.006	0.012	-0.002	-0.001	0.059	0.059	0.508	0.521	450
D	-0.001	0.000	0.003	0.005	-0.003	0.000	-0.003	-0.003	0.019	0.024	0.276	0.275	450
E	-0.001	-0.003	0.000	0.000	-0.009	-0.007	-0.002	-0.003	0.003	0.003	0.153	0.146	450
F	-0.001	-0.002	0.003	0.001	-0.007	-0.006	-0.001	0.005	0.009	0.008	0.08	0.084	450
G	0.003	0.003	0.003	0.004	-0.007	-0.003	-0.001	0.002	0.007	0.011	0.044	0.045	450
H	0.004	0.007	0.004	0.006	-0.003	-0.004	0.006	0.004	0.011	0.009	0.000		450

**Figura 19C.** Promedio de absorbancias

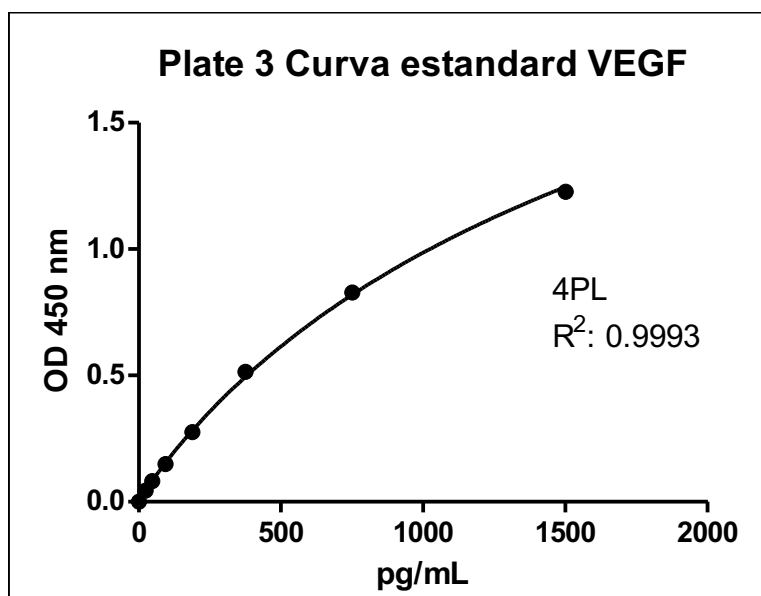
	Muestra 10	Muestra 11	Muestra 12	Muestra 13	Muestra 14	Curva Estandar	
A	-0.0020	0.0035	-0.0035	-0.0035	0.0070	1.2270	450
B	0.1010	0.0200	0.0075	-0.0035	0.0465	0.8285	450
C	0.0880	0.0190	0.0090	-0.0015	0.0590	0.5145	450
D	-0.0005	0.0040	-0.0015	-0.0030	0.0215	0.2755	450
E	-0.0020	0.0000	-0.0080	-0.0025	0.0030	0.1495	450
F	-0.0015	0.0020	-0.0065	0.0020	0.0085	0.0820	450
G	0.0030	0.0035	-0.0050	0.0005	0.0090	0.0445	450
H	0.0055	0.0050	-0.0035	0.0050	0.0100	0.0000	450

**Figura 19.** Estrategias para el análisis de absorbancias. **Figura 19A:** datos crudos de absorbancia a 450nm); **Figura 19B:** Absorbancias corregidas sin ruido de fondo;

**Figura 19C:** Promedio de absorbancias de muestras del 10 al 14 y promedio de absorbancias de la curva estándar para VEGF.

**A:** método centrifugación simple; **B:** método centrifugación doble

Los resultados de absorbancia de cada muestra fueron analizados con el uso del programa GraphPad Prism Versión 5.01 mediante un análisis de regresión de lineal de 4 parámetros (4PL), con el objetivo de lograr una curva (**figura 20**) con un mejor ajuste a través de los diferentes puntos<sup>90</sup>.



**Figura 20.** Curva estándar 4PL, utilizada para la obtención del VEGF de las muestras 10 a la 14.

A partir de la curva estándar se obtuvo los valores finales del VEGF en pg/mL, según cada muestra (**figura 21A**), los cuales se multiplicaron por 2 dado que en el preparado inicial fue diluido 1/2 en el ensayo (**figura 21B**).

**Figura 21A.** Resultado de VEGF

	Muestra 10	Muestra 11	Muestra 12	Muestra 13	Muestra 14	Curva Estandar	
<b>A</b>	0.000	1.808	0.000	0.000	3.287		pg/mL
<b>B</b>	58.606	10.114	3.791	0.000	25.402		pg/mL
<b>C</b>	50.349	9.572	4.300	0.000	32.517		pg/mL
<b>D</b>	0.000	1.808	0.000	0.000	11.203		pg/mL
<b>E</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	1.330		pg/mL
<b>F</b>	0.000	0.863	0.000	0.863	3.791		pg/mL
<b>G</b>	1.330	1.808	0.000	0.412	4.300		pg/mL
<b>H</b>	2.787	2.294	0.000	2.294	4.812		pg/mL

**Figura 21B.** Resultado de VEGF ajustado por factor de dilución = 2

	Muestra 10	Muestra 11	Muestra 12	Muestra 13	Muestra 14	Curva Estandar	
<b>A</b>	0.000	3.616	0.000	0.000	6.573		pg/mL
<b>B</b>	117.212	20.227	7.582	0.000	50.805		pg/mL
<b>C</b>	100.699	19.144	8.599	0.000	65.035		pg/mL
<b>D</b>	0.000	3.616	0.000	0.000	22.407		pg/mL
<b>E</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	2.660		pg/mL
<b>F</b>	0.000	1.726	0.000	1.726	7.582		pg/mL
<b>G</b>	2.660	3.616	0.000	0.824	8.599		pg/mL
<b>H</b>	5.575	4.588	0.000	4.588	9.625		pg/mL

**Figura 21.** Resultados de VEGF (pg/mL); **figura 21A:** resultados de VEGF obtenidos luego de la extrapolación de los valores de absorbancia con la curva estándar obtenido mediante análisis de regresión de 4 parámetros; **figura 21B** resultados finales luego de multiplicar por 2 (factor de dilución de la muestra en el ensayo de ELISA).

**A:** método centrifugación simple; **B:** método centrifugación doble

La cantidad de PRP utilizado en los tubos con D0 fue de 250 µL, sin embargo, en el resto de tubos se utilizó una menor cantidad de PRP (D1: 200 µL, D2:225 µL, D3: 237.5 µL). Por lo tanto, fue necesario aplicar un factor de corrección a los tubos diluidos con Glu.Ca con el objetivo de semejarlo las proporciones de liberación de VEGF. Se consideró que la cantidad de PRP de los tubos con D0 fue como 1, por lo que la cantidad de VEGF obtenido en los tubos con D1 se ajustaron a 1.20, el VEGF obtenidos de los tubos con D2 se ajustaron a 1.10 y el VEGF obtenidos en los tubos

con D3 se ajustaron a 1.05.

#### 5.5.4. Experimentación con el kit ELISA para las muestras de la 15 a la 20

Se utilizó una **cuarta placa de ELISA** para cuantificar la liberación del VEGF, a partir del PRP tratado con diferentes diluciones de Glu.Ca, de las muestras de sangre de los voluntarios del 15 al 20 (**figura 22**). Para cada muestra se estableció 2 columnas de la placa ELISA con el objetivo de realizar la medición de la absorbancia por duplicado. Las últimas 2 columnas de la placa de ELISA correspondieron al lugar de medición de la absorbancia para la curva estándar.

	Muestra 15		Muestra 16		Muestra 17		Muestra 18		Muestra 19		Curva Estandar		Muestra 20	
<b>A</b>	15AD0	15AD0	16AD0	16AD0	17AD0	17AD0	18AD0	18AD0	19AD0	19AD0	St1	St1	20AD0	20AD0
<b>B</b>	15AD1	15AD1	16AD1	16AD1	17AD1	17AD1	18AD1	18AD1	19AD1	19AD1	St2	St2	20AD1	20AD1
<b>C</b>	15AD2	15AD2	16AD2	16AD2	17AD2	17AD2	18AD2	18AD2	19AD2	19AD2	St3	St3	20AD2	20AD2
<b>D</b>	15AD3	15AD3	16AD3	16AD3	17AD3	17AD3	18AD3	18AD3	19AD3	19AD3	St4	St4	20AD3	20AD3
<b>E</b>	15BD0	15BD0	16BD0	16BD0	17BD0	17BD0	18BD0	18BD0	19BD0	19BD0	St5	St5	20BD0	20BD0
<b>F</b>	15BD1	15BD1	16BD1	16BD1	17BD1	17BD1	18BD1	18BD1	19BD1	19BD1	St6	St6	20BD1	20BD1
<b>G</b>	15BD2	15BD2	16BD2	16BD2	17BD2	17BD2	18BD2	18BD2	19BD2	19BD2	St7	St7	20BD2	20BD2
<b>H</b>	15BD3	15BD3	16BD3	16BD3	17BD3	17BD3	18BD3	18BD3	19BD3	19BD3	St0	Blk	20BD3	20BD3

**Figura 22.** Diseño de la placa de ELISA de 96 pozos para las muestras de la 15 a la

19. La muestra 20 fue evaluada en paralelo utilizando un soporte adicional.

**A:** método CS; **B:** método CD; **D0:** sin dilución de Glu.Ca al 10 % en PRP; **D1:** dilución de Glu.Ca al 10 % en 1/5 (0.02 g/mL); **D2:** dilución de Glu.Ca al 10 % en 1/10 (0.01 g/mL); **D3:** dilución de Glu.Ca al 10 % en 1/20 (0.005 g/mL).

El resultado de la absorbancia de cada uno de los pozos se restó con el resultado de absorbancia del pozo St0 (Abs. 0.078), el cual será utilizado como “ruido de fondo”

(figura 23A). Es así que ahora se obtienen los resultados de absorbancias más reales (figura 23B), los cuales se procedieron a promediar con su respectivo duplicado de control obteniendo las absorbancias promedio para cada muestra (figura 23C).

**Figura 23A.** Resultado crudo de absorbancias

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2
A	0.083	0.083	0.077	0.078	0.085	0.087	0.078	0.079	0.086	0.085	1.439	1.44	0.095	0.095
B	0.088	0.087	0.125	0.123	0.158	0.16	0.121	0.12	0.169	0.167	1.005	0.966	0.234	0.227
C	0.09	0.091	0.139	0.143	0.085	0.085	0.132	0.126	0.182	0.183	0.635	0.621	0.213	0.222
D	0.09	0.09	0.13	0.132	0.104	0.101	0.118	0.114	0.139	0.144	0.387	0.383	0.17	0.159
E	0.076	0.075	0.084	0.081	0.085	0.086	0.077	0.073	0.08	0.135	0.246	0.238	0.091	0.088
F	0.084	0.079	0.084	0.082	0.085	0.085	0.076	0.075	0.084	0.083	0.164	0.166	0.091	0.091
G	0.075	0.075	0.081	0.081	0.084	0.083	0.077	0.075	0.083	0.083	0.12	0.122	0.09	0.086
H	0.079	0.077	0.083	0.087	0.086	0.088	0.078	0.075	0.083	0.083	0.078	0.055	0.095	0.095

**Figura 23B.** Resultado ajustado de absorbancias

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2
A	0.005	0.005	-0.001	0	0.007	0.009	0	0.001	0.008	0.007	1.361	1.362	0.017	0.017
B	0.01	0.009	0.047	0.045	0.08	0.082	0.043	0.042	0.091	0.089	0.927	0.888	0.156	0.149
C	0.012	0.013	0.061	0.065	0.007	0.007	0.054	0.048	0.104	0.105	0.557	0.543	0.135	0.144
D	0.012	0.012	0.052	0.054	0.026	0.023	0.04	0.036	0.061	0.066	0.309	0.305	0.092	0.081
E	-0.002	-0.003	0.006	0.003	0.007	0.008	-0.001	-0.005	0.002	0.057	0.168	0.16	0.013	0.01
F	0.006	0.001	0.006	0.004	0.007	0.007	-0.002	-0.003	0.006	0.005	0.086	0.088	0.013	0.013
G	-0.003	-0.003	0.003	0.003	0.006	0.005	-0.001	-0.003	0.005	0.005	0.042	0.044	0.012	0.008
H	0.001	-0.001	0.005	0.009	0.008	0.01	0	-0.003	0.005	0.005	0		0.017	0.017

**Figura 23C.** Promedio de absorbancias

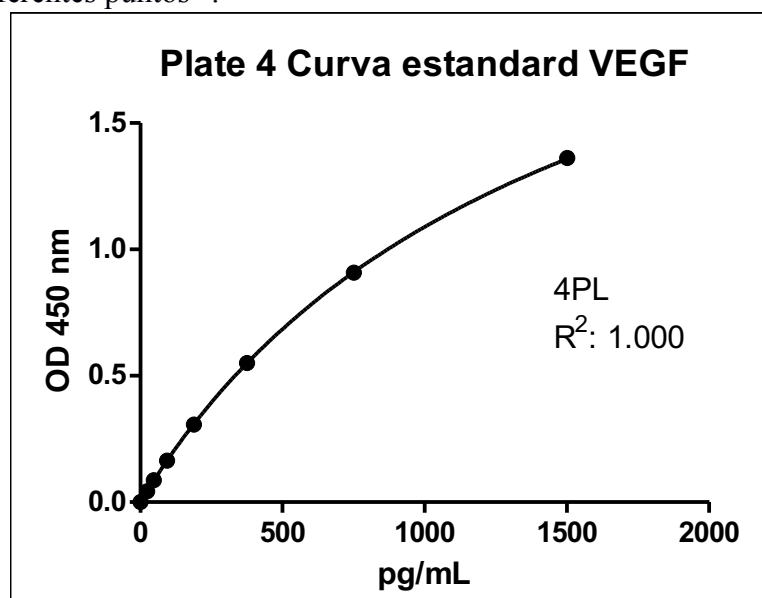
	Muestra 15	Muestra 16	Muestra 17	Muestra 18	Muestra 19	Curva Estandar	Muestra 20
A	0.0050	-0.0005	0.0080	0.0005	0.0075	1.3615	0.0170
B	0.0095	0.0460	0.0810	0.0425	0.0900	0.9075	0.1525
C	0.0125	0.0630	0.0070	0.0510	0.1045	0.5500	0.1395
D	0.0120	0.0530	0.0245	0.0380	0.0635	0.3070	0.0865
E	-0.0025	0.0045	0.0075	-0.0030	0.0295	0.1640	0.0115
F	0.0035	0.0050	0.0070	-0.0025	0.0055	0.0870	0.0130
G	-0.0030	0.0030	0.0055	-0.0020	0.0050	0.0430	0.0100
H	0.0000	0.0070	0.0090	-0.0015	0.0050	0.0000	0.0170

**Figura 23.** Estrategias para el análisis de absorbancias. **Figura 23A:** datos crudos de absorbancia a 450nm; **Figura 23B:** Absorbancias corregidas sin ruido de fondo;

**Figura 23C:** Promedio de absorbancias de muestras del 15 al 20 y promedio de absorbancias de la curva estándar para VEGF.

**A:** método centrifugación simple; **B:** método centrifugación doble

Los resultados de absorbancia de cada muestra fueron analizados con el uso del programa GraphPad Prism Versión 5.01 mediante un análisis de regresión de lineal de 4 parámetros (4PL), con el objetivo de lograr una curva (**figura 24**) con un mejor ajuste a través de los diferentes puntos<sup>90</sup>.



**Figura 24.** Curva estándar 4PL utilizada para la obtención del VEGF de las muestras 15 a la 20.

A partir de la curva estándar se obtuvo los valores finales del VEGF en pg/mL, según cada muestra (**figura 25A**), los cuales se multiplicaron por 2 dado que el preparado inicial fue diluido 1/2 en el ensayo (**figura 25B**).

**Figura 25A.** Resultado de VEGF

	Muestra 15	Muestra 16	Muestra 17	Muestra 18	Muestra 19	Curva Estandar	Muestra 20	
<b>A</b>	2.591	0.000	4.171	0.253	3.907		8.960	pg/mL
<b>B</b>	4.964	24.759	44.436	22.827	49.597		86.571	pg/mL
<b>C</b>	6.557	34.237	3.643	27.531	57.998		78.717	pg/mL
<b>D</b>	6.291	28.643	12.998	20.352	34.518		47.585	pg/mL
<b>E</b>	0.000	2.329	3.907	0.0000	15.709		6.025	pg/mL
<b>F</b>	1.806	2.591	3.643	0.0000	2.854		6.823	pg/mL
<b>G</b>	0.000	1.546	2.854	0.0000	2.591		5.229	pg/mL
<b>H</b>	0.000	3.643	4.699	0.0000	2.591		8.960	pg/mL

**Figura 25B.** Resultado de VEGF ajustado por factor de dilución = 2

	Muestra 15	Muestra 16	Muestra 17	Muestra 18	Muestra 19	Curva Estandar	Muestra 20	
<b>A</b>	5.183	0.000	8.341	0.506	7.813		17.921	pg/mL
<b>B</b>	9.928	49.518	88.872	45.653	99.194		173.143	pg/mL
<b>C</b>	13.114	68.474	7.286	55.062	115.997		157.433	pg/mL
<b>D</b>	12.582	57.287	25.995	40.704	69.036		95.170	pg/mL
<b>E</b>	0.000	4.659	7.813	0.000	31.418		12.050	pg/mL
<b>F</b>	3.613	5.183	7.286	0.000	5.708		13.647	pg/mL
<b>G</b>	0.000	3.091	5.708	0.000	5.183		10.458	pg/mL
<b>H</b>	0.000	7.286	9.399	0.000	5.183		17.921	pg/mL

**Figura 25.** Resultados de VEGF (pg/mL); **figura 25A:** resultados de VEGF obtenidos luego de la extrapolación de los valores de absorbancia con la curva estándar obtenido mediante análisis de regresión de 4 parámetros; **figura 25B** resultados finales luego de multiplicar por 2 (factor de dilución de la muestra en el ensayo de ELISA).

**A:** método centrifugación simple; **B:** método centrifugación doble

La cantidad de PRP utilizado en los tubos con D0 fue de 250  $\mu$ L, sin embargo, en el resto de tubos se utilizó una menor cantidad de PRP (D1: 200  $\mu$ L, D2:225  $\mu$ L, D3: 237.5  $\mu$ L). Por lo tanto, fue necesario aplicar un factor de corrección a los tubos diluidos con Glu.Ca con el objetivo de semejarlo las proporciones de liberación de VEGF. Se consideró que la cantidad de PRP de los tubos con D0 fue como 1, por lo que la cantidad de VEGF obtenido en los tubos con D1 se ajustaron a 1.20, el VEGF obtenidos de los tubos con D2 se ajustaron a 1.10 y el VEGF obtenidos en los tubos con D3 se ajustaron a 1.05.

### III.6. Análisis estadístico

Para evaluar las diferencias entre los diferentes procedimientos, el análisis se dividió en dos momentos:

- Análisis estadístico del conteo de plaquetas pre-centrífuga vs. el conteo obtenido mediante métodos de CS y CD: Para evaluar la distribución de los datos numéricos del conteo de plaquetas se utilizó histogramas y estadísticas de normalidad (Shapiro test), estas evidenciaron una distribución no normal. También se evaluó la homogeneidad de varianzas (Levene test) lo que evidenció varianzas desiguales. Consecuencia a estas evaluaciones, la prueba estadística más idónea a la no normalidad y heterocedasticidad (diferencia de varianzas) entre los 3 grupos (pre-centrífuga, CS y CD) es *Welch's heteroscedastic F test and Welch's heteroscedastic F test with trimmed means and Winsorized variances* ( $F_{wt}$ ). Luego, se usó el test de *Pairwise Wilcoxon* con el objetivo de identificar cuál de los 3 grupos son los diferentes<sup>91</sup>.
- Análisis estadístico de los valores cuantificados de VEGF teniendo en consideración las diferentes modalidades de centrifugación y las diferentes diluciones de Glu.Ca: El objetivo fue realizar la comparación de la cuantificación del VEGF según 2 factores: presencia de Glu.Ca (D0: sin dilución, D1: dilución 1/5 [0.02 g/mL], D2: dilución 1/10 [0.01 g/mL] y D3: dilución 1/20 [0.005 g/mL] y método de centrifugación



(CS y CD). Para evaluar la distribución de los datos numéricos de las cuantificaciones del VEGF se utilizó histogramas y estadísticas de normalidad (Shapiro test), estas evidenciaron una distribución no normal. También se evaluó la homogeneidad de varianzas (Levene test) lo que evidenció varianzas desiguales. Por todo esto, inicialmente se intentó usar  $F_{wt}$ ; sin embargo, esto no fue factible debido a la existencia y repetición de subgrupos por cada factor: diferentes diluciones de Glu.Ca (D0, D1, D2, D3) y diferentes opciones de centrifuga (CS y CD). Es por ello que se optó por realizar un análisis por separado de la siguiente forma:

- Análisis de cuantificación de VEGF en las muestras de PRP con diferentes opciones de centrifugación (CS y CD).
- Análisis de cuantificación de VEGF en las muestras de PRP con diferentes diluciones de Glu.Ca (D0, D1, D2 y D3), con CS.
- Análisis de cuantificación de VEGF en las muestras de PRP con diferentes diluciones de Glu.Ca (D0, D1, D2 y D3), con CD.

Para cada uno de estos análisis fue posible el cumplimiento de los supuestos para el uso de  $F_{wt}$  (*Welch's heteroscedastic F test with trimmed means and Winsorized variances*) y su respectivo análisis comparativo con el test de *Pairwise Wilcoxon*.

Para todos los análisis se utilizó el programa estadístico R, V.4.1.2 y se consideró un intervalo de confianza al 95 % y un valor alfa de 0.05.

## **IV. RESULTADOS**

### **IV.1. Datos epidemiológicos de los donantes enrolados**

Se enrolaron 20 donantes voluntarios, el 75 % de ellos fue del sexo masculino, la mediana de la edad fue de 33.5 años (rango: 18-40), la mediana del peso fue de 70.5 kg (rango: 55-100), la talla promedio fue de 1.67 metros (DE:  $\pm 0.08$ ) y el índice de masa corporal (IMC) mediana fue de 25.89 kg/m<sup>2</sup> (rango: 20.29-29.82). En el **anexo 4** se detallan los datos puntuales de cada uno de los voluntarios.

### **IV.2. Parámetros hematológicos y análisis de los métodos de concentración de plaquetas**

El conteo plaquetario, GB y GR de las 20 muestras de sangre de los voluntarios sanos durante el periodo basal (pre-centrífuga), post CS y post CD se muestran en la tabla 4. Se aprecia que la presencia de GR como agente contaminante fue eliminado en la CS y CD. Con respecto a la mediana de la presencia de GB en comparación con la mediana del control pre-centrífuga ( $6.90 \times 10^3$ ), en el método de CS ( $0.80 \times 10^3$ ) disminuyó en 88.41 %, mientras que en el método de CD ( $21.65 \times 10^3$ ) se triplicó (313.77 %). Con respecto a la mediana de la concentración de plaquetas en comparación con la mediana del control pre-centrífuga ( $250.0 \times 10^3$  plaquetas/uL), con los métodos de CS y CD se concentró 1.63 ( $408.50 \times 10^3$  plaquetas/uL) y 2.13 ( $532.50 \times 10^3$  plaquetas/uL) veces, respectivamente.

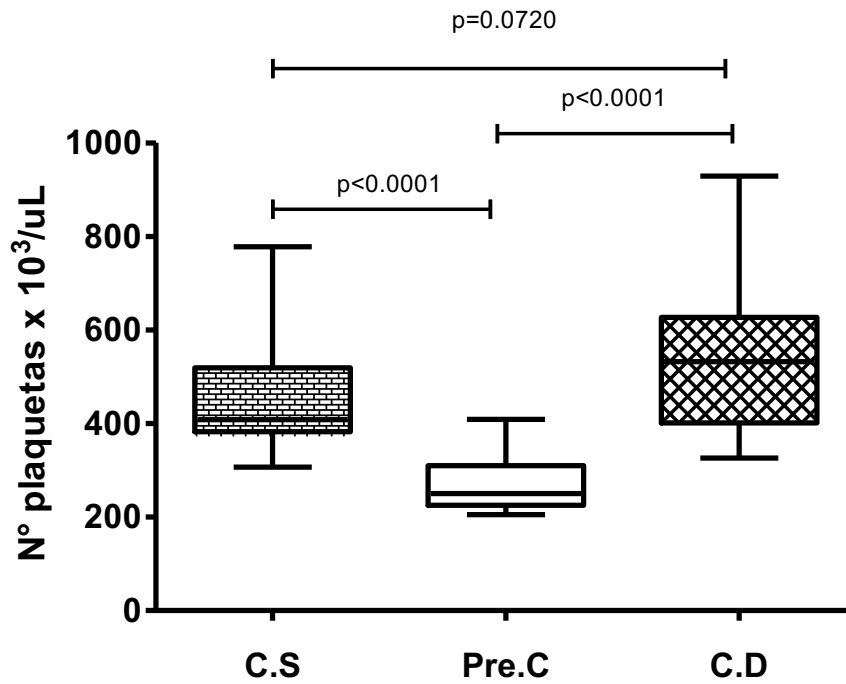
**Tabla 4.** Recuento de parámetros hematológicos según momento de centrifugación

Donante	GB (x 10 <sup>3</sup> /uL)			GR (x 10 <sup>6</sup> /uL)			Plaquetas (x 10 <sup>3</sup> /uL)		
	Pre-C	Post CS	Post CD	Pre-C	Post CS	Post CD	Pre-C	Post CS	Post CD
<b>1</b>	6.3	0.7	24.6	5.28	0.02	0	250	307	521
<b>2</b>	5.3	0.5	12.9	4.55	0.01	0	223	341	326
<b>3</b>	7.2	0.8	22.3	5.54	0.01	0	250	396	563
<b>4</b>	7.9	0.9	46.5	4.44	0.01	0	267	446	710
<b>5</b>	8.6	0.9	30.2	5.56	0.03	0	333	734	634
<b>6</b>	7	2	21.7	4.68	0.03	0	313	778	436
<b>7</b>	4.8	0.7	17.3	5.12	0.02	0	290	542	582
<b>8</b>	7.8	0.6	14.1	4.81	0.02	0	313	450	397
<b>9</b>	7.3	0.5	26.7	4.36	0.02	0	409	371	701
<b>10</b>	6.6	0.8	24.7	4.29	0.03	0	243	422	606
<b>11</b>	6.8	0.4	47.1	4.92	0.02	0	208	329	713
<b>12</b>	7.6	0.5	20.2	4.82	0.03	0	215	383	441
<b>13</b>	7.8	1.4	21.6	4.95	0.03	0	208	397	415
<b>14</b>	6.7	0.5	9.4	4.78	0.01	0	232	426	366
<b>15</b>	5.6	0.4	13.3	4.76	0.02	0	334	619	929
<b>16</b>	6.7	0.9	25.6	4.46	0.01	0	300	385	535
<b>17</b>	6.2	1.3	20.9	5.02	0.04	0	265	562	566
<b>18</b>	7.8	0.8	13.4	4.8	0.01	0	246	382	388
<b>19</b>	9.9	1.8	29.9	5.06	0.05	0	205	413	530
<b>20</b>	5	1.1	16.9	4.93	0.02	0	234	404	383
<b>Mediana</b>	6.90	0.80	21.65	4.82	0.02	0.0	250	408.5	532.50

<b>Rango</b>	4.8-9.9	0.4-2	9.4-47.1	4.29-5.56	0.01-0.05	0.0	205-409	307-778	326-929
--------------	---------	-------	----------	-----------	-----------	-----	---------	---------	---------

**GB:** glóbulos blancos, **GR:** glóbulos rojos, **Pre-C:** Pre-centrifugación, **CS:** centrifugación simple, **CD:** centrifugación doble.

Respecto al conteo de plaquetas, la mediana del conteo plaquetario en el grupo pre-centrífuga fue de  $250.0 \times 10^3$  plaquetas/uL (rango: 229.75-303.25), en el grupo CS fue de  $408.5 \times 10^3$  plaquetas/uL (rango: 382.75-473.0) y en el grupo CD fue de  $532.5 \times 10^3$  plaquetas/uL (rango: 410.5-613.0). Se encontró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos pre-centrífuga, CS y CD ( $F_{wt}$ :  $p < 0.0001$ ). Como consecuencia del resultado anterior, se evidenció diferencias estadísticamente significativas en el conteo plaquetario entre los grupos de pre-centrífuga vs CS (*Test Pairwise Wilcoxon*:  $p < 0.0001$ ) y entre los grupos pre-centrífuga vs CD (*Test Pairwise Wilcoxon*:  $p < 0.0001$ ). No se encontró diferencias estadísticas significativas en el conteo plaquetario entre ambos métodos de concentración plaquetaria (CS vs CD, *Test Pairwise Wilcoxon*:  $p = 0.072$ ). En la **figura 26**, se muestra un gráfico del conteo plaquetario según tipo de centrífuga.



**Figura 26.** Diagrama de caja y bigotes “Boxplot” se muestra la mediana del conteo plaquetario entre los diferentes métodos de concentración plaquetario, así como sus respectivos cuartiles inferior y superior.

**Plaquetas:** unidades cuantificadas en  $10^3/\mu\text{L}$ , **CS:** centrífuga simple, **CD:** centrífuga doble.

### IV.3. Cuantificación y análisis de VEGF mediante el ensayo de ELISA

La cuantificación del VEGF de las 20 muestras de sangre de los voluntarios sanos con cada método de centrifugación y con cada tipo de dilución de Glu.Ca se muestra en la **tabla 5**. Cada uno de estos resultados

**Tabla 5.** Cuantificación del VEGF según método de centrifuga y dilución de Glu.Ca

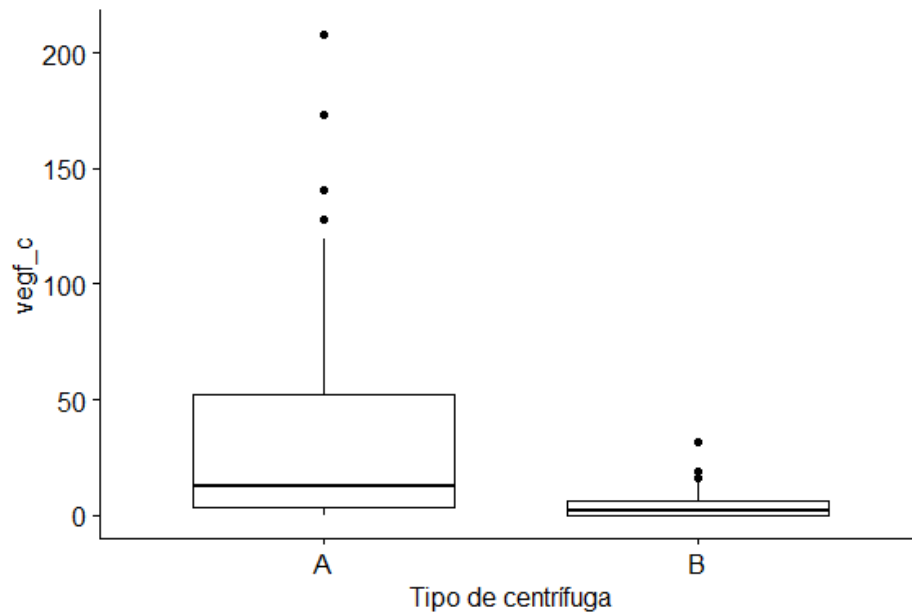
Muestra	CS				CD			
	VEGF (pg/mL)				VEGF (pg/mL)			
	D0	D1	D2	D3	D0	D1	D2	D3
1	0.88	44.36	61.32	22.24	0.00	0.00	0.88	0.88
2	0.00	12.25	16.64	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3	6.91	69.97	108.26	27.94	2.81	10.09	10.09	12.25
4	0.00	9.02	26.80	2.81	0.00	0.00	0.00	3.81
5	0.00	2.81	2.81	0.00	0.00	0.88	3.81	3.81
6	2.57	19.87	18.65	16.19	0.00	0.00	0.00	1.30
7	5.08	2.57	7.56	0.00	0.00	0.00	0.00	3.83
8	1.30	6.32	12.50	11.27	0.00	0.00	0.00	1.30
9	10.03	43.18	45.64	49.33	10.03	11.27	10.03	14.96
10	0.00	117.21	100.70	0.00	0.00	0.00	2.66	5.57
11	3.62	20.23	19.14	3.62	0.00	1.73	3.62	4.59
12	0.00	7.58	8.60	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
13	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.73	0.82	4.59
14	6.57	50.80	65.03	22.41	2.66	7.58	8.60	9.62
15	5.18	9.93	13.11	12.58	0.00	3.61	0.00	0.00
16	0.00	49.52	68.47	57.29	4.66	5.18	3.09	7.29
17	8.34	88.87	7.29	26.00	7.81	7.29	5.71	9.40
18	0.51	45.65	55.06	40.70	0.00	0.00	0.00	0.00
19	7.81	99.19	116.00	69.04	31.42	5.71	5.18	5.18

<b>20</b>	17.92	173.14	157.43	95.17	12.05	13.65	10.46	17.92
<b>Mediana</b>	1.94	31.70	22.97	14.39	0.00	1.30	1.77	4.21
<b>Rango</b>	0.0-17.92	0.0-173.14	0.0-157.43	0.0-95.17	0.0-31.42	0.0-13.65	0.0-10.46	0.0-17.92
<b>Rango IQ</b>	(0.0-6.82)	(8.66-55.6)	(9.57-67.61)	(0.0-37.51)	(0.0-4.2)	(0.0-6.1)	(0.0-5.58)	(0.98-8.87)
<b>Media</b>	3.84	43.62	45.55	22.83	3.57	3.44	3.25	5.32
<b>DE</b>	4.72	46.16	45.09	26.94	7.52	4.41	3.84	5.19

CS: Centrifugación simple; CD: Centrifugación doble; D0: sin dilución de Glu.Ca en PRP; D1: dilución 1/5 (0.02 g/mL); D2: dilución 1/10 (0.01 g/mL); D3: dilución 1/20 (0.005 g/mL).

#### IV.3.1. Análisis de cuantificación de VEGF de acuerdo a las diferentes modalidades de centrifugación (CS y CD).

Respecto a la cuantificación del VEGF, la mediana de cuantificación del VEGF en el grupo con CS fue de 12.56 pg/mL (rango: 0.0-207.77) y en el grupo CD fue de 4.21 pg/mL (rango: 0.0-31.42). Se encontró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos CS y CD ( $F_{wt}$ :  $p < 0.0001$ ). Posterior a ello, en un análisis post hoc se evidenció que hubo mayor liberación del VEGF con el uso del método de CS (*Test Pairwise Wilcoxon*:  $p < 0.0001$ ) (**figura 27**).



**Figura 27.** Diagrama de cajas y bigotes “Boxplot” se muestra la mediana de la cuantificación de VEGF (pg/mL) entre los diferentes métodos de concentración plaquetaria, así como sus respectivos cuartiles inferior y superior.

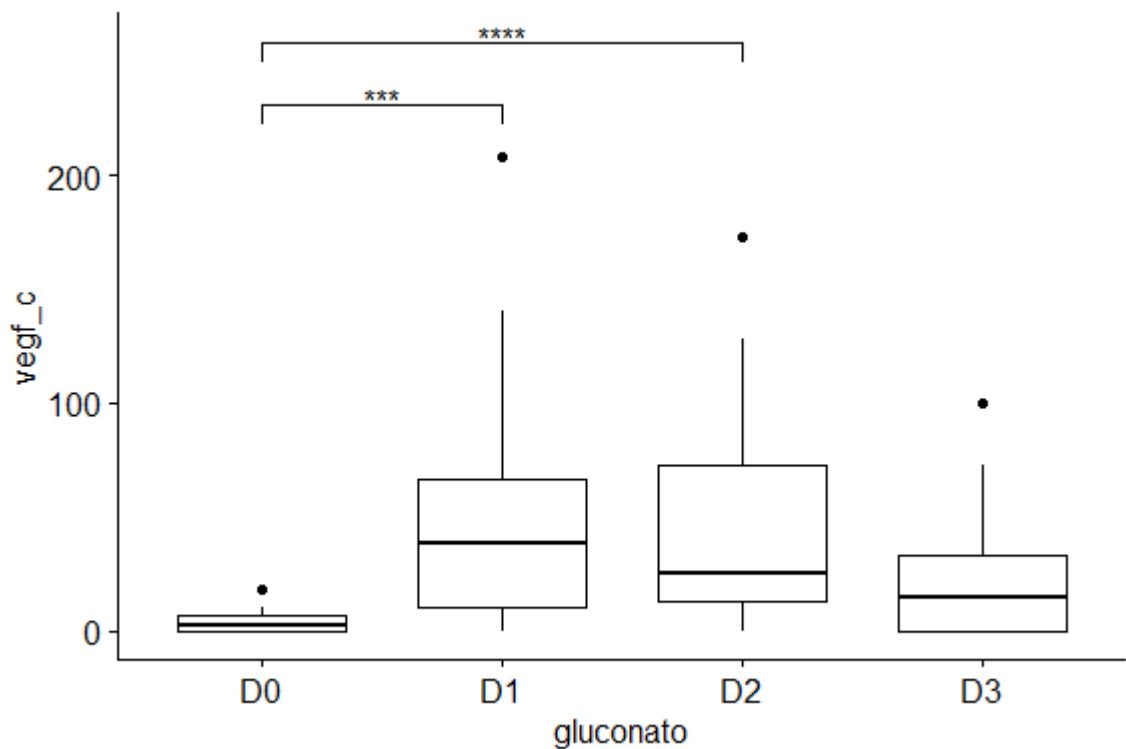
**VEGF:** Factor de crecimiento endotelial vascular (pg/mL), **CS:** centrifuga simple, **CD:** centrifuga doble.

#### **IV.3.2. Análisis de Cuantificación de VEGF de acuerdo a las diferentes diluciones de Glu.Ca en CS.**

Respecto a la cuantificación del VEGF con el método de CS, la mediana de cuantificación del VEGF en el grupo D0 fue de 1.93 pg/mL (rango: 0.0-17.92), en el grupo D1 fue de 38.04 pg/mL (rango: 0.0-207.77), en el grupo D2 fue de 25.27 pg/mL (rango: 0.0-173.18) y en el grupo D3 fue de 15.11 pg/mL (rango: 0.0-99.93). Se encontró diferencias estadísticamente significativas en la cuantificación del VEGF al



usar diferentes tipos de dilución con Glu.Ca ( $F_{wt}$ :  $p < 0.001$ ). Posterior a ello, en un análisis post hoc se evidenció diferencias estadísticamente significativas en la cuantificación del VEGF entre los grupos D0 vs D1 (*Test Pairwise Wilcoxon*:  $p < 0.0001$ ) y D0 vs D2 (*Test Pairwise Wilcoxon*:  $p < 0.0001$ ) y (*Test Pairwise Wilcoxon*:  $p = 0.0277$ ). No se encontró diferencias estadísticamente significativas en la cuantificación del VEGF entre los grupos D1 vs D2 (*Test Pairwise Wilcoxon*:  $p = 0.776$ ), D1 vs D3 (*Test Pairwise Wilcoxon*:  $p = 0.116$ ), D2 vs D3 (*Test Pairwise Wilcoxon*:  $p = 0.0734$ ) y D0 vs D3 (*Test Pairwise Wilcoxon*:  $p = 0.107$ ) (**figura 28**).



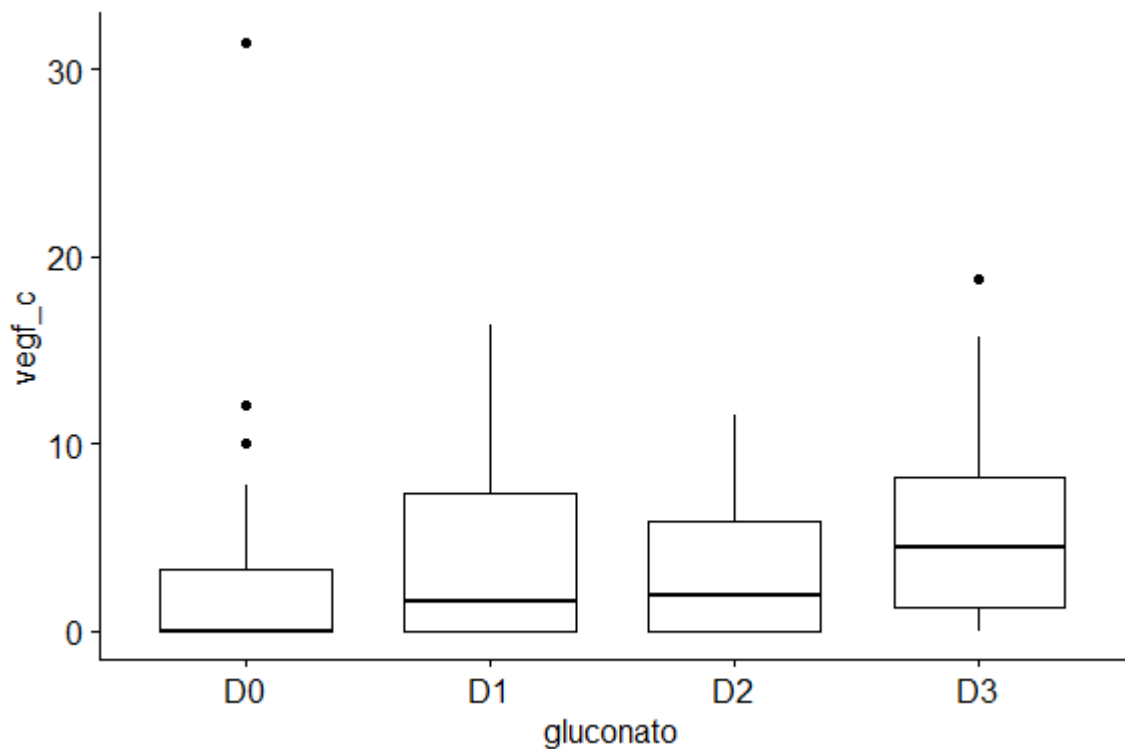
**Figura 28:** Diagrama de caja y bigotes “Boxplot” que muestra la mediana de la cuantificación de VEGF (pg/mL) según la dilución de Glu.Ca en PRP, obtenido mediante el método de CS.

**VEGF:** Factor de crecimiento endotelial vascular (pg/mL); **D0:** sin Glu.Ca en PRP

(control); **D1**: dilución 1/5 (0.02 g/mL); **D2**: dilución 1/10 (0.01 g/mL); **D3**: dilución 1/20 (0.005 g/mL).

#### **IV.3.3. Análisis de cuantificación de VEGF de acuerdo a las diferentes diluciones de Glu.Ca en CD.**

Respecto a la cuantificación del VEGF con el método de CD, la mediana de cuantificación del VEGF en el grupo D0 fue de 0.0 pg/mL (rango: 0.0-31.42), en el grupo D1 fue de 1.56 pg/mL (rango: 0.0-16.38), en el grupo D2 fue de 1.95 pg/mL (rango: 0.0-11.50) y en el grupo D3 fue de 4.41 pg/mL (rango: 0.0-18.82). No se encontró diferencias estadísticamente significativas en la cuantificación del VEGF al usar diferentes tipos de dilución con gluconato de calcio ( $F_{wt}$ :  $p > 0.05$ ). En la **figura 29** se presenta la cuantificación del VEGF según las diferentes diluciones de gluconato de calcio en las muestras sometidas a centrifugación doble.



**Figura 29.** Diagrama de caja y bigotes “Boxplot” que muestra la mediana de la cuantificación del VEGF (pg/mL) según la dilución de Glu.Ca en PRP, obtenido mediante el método de CD **VEGF**: Factor de crecimiento endotelial vascular (pg/mL); **D0**: sin Glu.Ca en PRP (control); **D1**: dilución 1/5 (0.02 g/mL); **D2**: dilución 1/10 (0.01 g/mL); **D3**: dilución 1/20 (0.005 g/mL).

## V. DISCUSION

### V.1. Obtención de PRP

Existen muchos métodos tanto manuales como kits comerciales que son utilizados para concentrar plaquetas a partir de sangre total periférica, convirtiéndolos en PRP<sup>5-7</sup> en el presente estudio se utilizó dos protocolos de centrifugado para concentrar plaquetas, CS

900 g x 5 min y CD 900 g x 5 min seguido de 1500 g x 15 min<sup>9</sup>. PRP debe contener una buena cantidad plaquetaria superior a  $200 \times 10^3$  plaquetas/uL para tener un efecto terapéutico, así como estar libre de otros componentes celulares como glóbulos rojos y glóbulos blancos, sin embargo, este último es variado ya que algunos kits comerciales y procedimientos manuales, obtienen PRP con presencia de leucocitos<sup>6,92</sup>. Con respecto a la presencia de hemocomponentes celulares presentes en el PRP, se encontró que los métodos CS y CD redujeron significativamente la cantidad de glóbulos rojos en el PRP en un  $99.9\% \pm 0.01$  y  $100\%$  respectivamente (**tabla N°4**). Con respecto a la mediana de la presencia de GB en comparación con la mediana del control pre-centrífuga ( $6.90 \times 10^3$ ), en el método de CS ( $0.80 \times 10^3$ ) disminuyó en  $88.41\%$ , mientras que en el método de CD ( $21.65 \times 10^3$ ) se triplicó ( $313.77\%$ ) (**tabla N°4**), esto es un punto muy importante ya que el papel biológico de los leucocitos en PRP aún no está claro, en algunos estudios la presencia de glóbulos blancos en el PRP, tendría un efecto negativo ya que promueve procesos inflamatorios<sup>6,92</sup>, mientras que otros estudios muestran que los leucocitos tienen propiedades antimicrobianas lo que favorece la liberación de factores de crecimiento promoviendo la regeneración tisular<sup>6,92</sup>. Con respecto a la mediana de la concentración de plaquetas en comparación con la mediana del control pre-centrífuga ( $250.0 \times 10^3$  plaquetas/uL), con los métodos de CS y CD se concentró  $1.63$  ( $408.50 \times 10^3$  plaquetas/uL) y  $2.13$  ( $532.50 \times 10^3$  plaquetas/uL) veces, respectivamente (**tabla N°4**). Los resultados obtenidos en la concentración de plaquetas en ambos métodos no mostraron diferencia significativa ( $p > 0.05$ ), se esperaba encontrar una mayor cantidad de plaquetas en PRP, sobre todo en el método de CD tal como es descrito en la literatura científica<sup>6,9</sup>. Utilizando kits comerciales concentradores de

plaquetas lograron una concentración plaquetaria de 1.5 a 6 veces con respecto al control, así mismo lograron reducir significativamente la cantidad de glóbulos rojos en PRP, mientras que los glóbulos blancos lograron una reducción de 5-22 veces, sin embargo en el mismo estudio otros kits comerciales lograron incrementar la concentración de glóbulos blancos en el PRP entre 3 a 5 veces con respecto al control <sup>7</sup>, Por otro lado, los métodos manuales concentradores de plaquetas de centrifugación doble, logran obtener una concentración de plaquetas de 7.8 veces más ( $1145 \pm 244 \times 10^3$  plaquetas/ $\mu\text{L}$ ) con respecto al control ( $147 \pm 59 \times 10^3$  plaquetas/ $\mu\text{L}$ ) <sup>9</sup> y 4.8 veces más ( $1251 \pm 589 \times 10^3$  plaquetas/ $\mu\text{L}$ ) con respecto al control ( $258 \pm 47.4 \times 10^3$  plaquetas/ $\mu\text{L}$ ) <sup>6</sup>, sin embargo, nuestro porcentaje de enriquecimiento de plaquetas (%PE), no fue el esperado, ya que se obtuvo con los métodos CS y CD un porcentaje de enriquecimiento (%PE) de 163.4% y 213% respectivamente, lo que equivale a decir que solo logramos concentrar plaquetas con los métodos de CS y CD en 1.634 y 2.13 veces más con respecto al control (**tabla N°4**). Con respecto al método de CS los resultados obtenidos se encontraron dentro de lo esperado, ya que reportan para este método un poder concentrador de plaquetas de 2 veces con respecto al control<sup>9</sup>. Una posible explicación a los resultados menos esperados en el método de CD, podría estar asociado, a que no se separó el plasma luego de la primera centrifugación de 900 g x 5 min, por el contrario se continuo con la segunda centrifugación de 1500 g x 15 min, otra explicación podría estar relacionado con el tiempo en la segunda centrifugación fue de 15 min, a mayor velocidad y tiempo de centrifugación se produce la aglomeración o desintegración de plaquetas<sup>5</sup>, otra posible explicación podría deberse al tiempo en el conteo de plaquetas, al tratarse de 20 muestras, podría ocurrir un retraso en el conteo de plaquetas, es posible

que las fases generadas luego del proceso de CD, de PRP y plasma pobre en plaquetas (PPP) se vayan homogeneizando en el tiempo, lo que pudo haber conducido a una pobre acción concentradora de plaquetas.

## **V.2. Evaluación de los métodos de centrifugado y diluciones de Glu.Ca**

La liberación de factores de crecimiento del PRP, es muy importante para el desarrollo de manera garantizada de muchos tratamientos tanto en medicina regenerativa como en medicina cosmética, la activación plaquetaria, y la liberación de factores de crecimiento se produce por la acción sola o combinada de  $\text{Ca}^{+2}$ , trombina<sup>9</sup>, ciclos repetidos de congelamiento y descongelamiento, así como incubación a 37°C, sin embargo las condiciones óptimas para la liberación de factores de crecimiento de derivado plaquetarios aún permanecen sin resolver <sup>93</sup>. El  $\text{Ca}^{+2}$  juega un rol importante en la activación y agregación plaquetaria, formando coágulos de fibrina en el PRP, el cual contiene los factores de crecimiento <sup>9</sup>.

En el estudio utilizamos dos métodos de centrifugado (CS y CD) para concentrar plaquetas en PRP, se obtuvieron los siguientes resultados con respecto a la cuantificación de VEGF; Respecto a la cuantificación del VEGF: La mediana de cuantificación del VEGF en el grupo con CS fue de 12.56 pg/mL, rango 0.0-207.77 y en el grupo CD fue de 4.21 pg/mL, rango 0.0-31.42. Se encontró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos CS y CD, **figura N°27**, los resultados muestran que el método de CS más diluciones de Glu.Ca permiten una mayor liberación de VEGF, por otro lado, no se encontró diferencias significativas entre los diferentes grupos de CS activados con diferentes diluciones de Glu.Ca ( $p > 0.05$ ) (**figura N°28**),

asimismo se evidenció un mayor incremento en la liberación de VEGF en el método de CS, cuando el PRP fue activado con Glu.Ca en las diluciones D1 1/5 (0.02 g/mL) y D2 1/10 (0.01 g/mL), liberando una mediana de 38.04 pg/mL, rango (0.0-207.77) y una mediana de 25.27 mg/dL, rango (0.0-173.18) VEGF respectivamente, con respecto al método de CD y tratamiento del PRP con diferentes diluciones de Glu.Ca no se encontró diferencias significativas con respecto al control D0 (sin adición de Glu.Ca) ( $p > 0.05$ ) **(figuras N°28 y N°29).**

Sin embargo, las cantidades de VEGF obtenidas en nuestra investigación están muy por debajo de los valores encontrados en otras investigaciones como en el estudio de Steller y colaboradores<sup>93</sup>, donde cada voluntario donó 10 mL de sangre total (PRP fue obtenido mediante centrifugación doble), para cada metodología obteniéndose los siguientes valores de VEGF; PRP no activado a temperatura ambiente (PRP-RT) ( $109.75 \pm 19.37$  pg/mL), PRP activado con  $Ca^{+2}$  a temperatura ambiente (PRP-Ca-RT) ( $118.96 \pm 13.01$  pg/mL), PRP-Ca-incubación a  $37^{\circ}C$  (PRP-Ca-Inc) ( $412.30 \pm 75.7$  pg/mL), PRP-Ca-congelado seguido de descongelamiento (PRP-Ca-FTF) ( $630.27 \pm 43.96$  pg/mL), donde la liberación de VEGF en el método de PRP tratado con  $Ca^{+2}$  seguido de procesos de congelamiento y descongelamiento mostró ser mejor con respecto a los otros métodos <sup>93</sup>. Los bajos resultados de VEGF obtenidos en el presente estudio podrían estar asociado al poco volumen (aprox. 200-250 uL) de PRP activado con Glu.Ca a diferencia de los 3 mL de PRP, utilizados en el estudio de Steller y colaboradores<sup>93</sup>, la cantidad de plaquetas obtenidas, así como la no disrupción de los coágulos de fibrina generados luego del tratamiento con Glu.Ca, para la liberación de VEGF, existiendo las evidencias que mediante métodos enzimáticos y físicos como; trombina, ciclos de

congelado/descongelado, incubación a 37°C y centrifugaciones adicionales, se logra una mayor liberación de VEGF a partir de los coágulos de fibrina<sup>8,93</sup>.

Quedando como recomendación, que para lograr una mayor liberación de factores de crecimiento (FC), se tiene que tratar el PRP con el activador de Ca<sup>+2</sup>, siendo el Gluconato de Calcio la mejor sustancia para inducir la activación del PRP e inducir la liberación de los factores de crecimiento y es menos irritante para las plaquetas que el cloruro de Calcio.<sup>94,95</sup>

El Glu.Ca al 10% en solución tiene un 99.3% de Glu.Ca y 0.7% de excipientes, en comparación del producto Gluconato de Calcio grado reactivo en polvo, que presenta un > 99.0 % de Glu.Ca de pureza, no habiendo diferencias importantes en cuanto a la pureza entre ambos productos, por lo que el Glu.Ca al 10% sería más económico y más estable debido a que su presentación se encuentra en solución a diferencia del producto grado reactivo que se encuentra en polvo, teniendo el problema de tener cierto grado de higroscopia (**Anexo 5**).

Luego de la formación del coagulo de fibrina este podría romperse con ciclos de congelado/descongelado para ayudar a liberar los factores de crecimiento. Esto podría ser de mucha importancia para los diferentes tratamientos en la cual se requiera de una buena cantidad de FC, para medicina regenerativa o cosmética, así como en investigación en ingeniería de tejidos, donde la triada funcional es la interacción de estructuras de andamiaje, células madre y factores de crecimiento.

### **V.3.Limitaciones**



Como limitaciones del estudio durante el proceso experimental, no se separó el PRP de forma inmediata terminado el proceso de centrifugación: los tubos de ensayo centrifugados se movilizaron al laboratorio del biólogo encargado de la cuantificación del VEGF, y fue éste quien procedió a separar el PRP y luego realizar la determinación del VEGF. Esta demora de separación podría haber influido en disminuir la cantidad de VEGF esperado en el PRP. El volumen de PRP activado con Glu.Ca fue muy pequeño (200-250 uL), otra limitante es que el coágulo de fibrina no se estimuló mecánicamente durante la activación del PRP con Glu.Ca, por lo que existió VEGF que quedó atrapado en este coágulo y que no fue cuantificado.

Los valores obtenidos en la cuantificación de VEGF (pg/mL) fueron bajos en comparación con lo reportado en la literatura científica, por lo que se debe tener cuidado en la interpretación de los resultados que se encuentran por debajo de 23.4 pg/mL, considerado como uno de los puntos más bajos detectable en la curva estándar, a pesar que el límite de detección del kit indicado en el inserto muestra una sensibilidad de < 5pg/mL.

## VI. CONCLUSIONES

- a) El método de CS como concentrador de plaquetas en PRP en el presente estudio, logro un factor concentrador de 1.634 con respecto al control, muy cerca del rango de 2.0 de acuerdo a otras publicaciones.
- b) El método de CS, mostro mayor liberación de VEGF con respecto al método de CD con una mediana de 12.56 pg/mL, rango (0.0-207.77) vs 4.21 pg/mL, rango (0.0-31.42) respectivamente a pesar de que los valores de VEGF estuvieron por debajo de los valores reportados en otras publicaciones.
- c) Las diluciones de Glu.Ca 1/5 (0.02 g/mL) y 1/10 (0.01 g/mL), fueron las que produjeron mayor liberación de VEGF en el método de CS con una mediana de 38.04 pg/mL, rango (0.0-207.77) y una mediana de 25.27 mg/dL, rango (0.0-173.18) respectivamente.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Aydin O, Karaca G, Pehlivanli F, Altunkaya C, Uzun H, Özden H, et al. Platelet-Rich Plasma May Offer a New Hope in Suppressed Wound Healing When Compared to Mesenchymal Stem Cells. *J Clin Med*. 8 de junio de 2018;7(6).
2. Villaseñor-Moreno, Julio César, Sánchez-Ortiz, Ángel Óscar, Herrera-Flores, Rebeca. Platelet-rich plasma and tendinopathies. *Rev Esp Méd Quir*. 2014;19:316-25.
3. Wu PI-K, Diaz R, Borg-Stein J. Platelet-Rich Plasma. *Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America*. noviembre de 2016;27(4):825-53.
4. Dashore S, Chouhan K, Nanda S, Sharma A. Preparation of platelet-rich plasma: National IADVL PRP taskforce recommendations. *Indian Dermatol Online J*. 2021;12(7):12.
5. Sabarish R, Lavu V, Rao SR. A Comparison of Platelet Count and Enrichment Percentages in the Platelet Rich Plasma (PRP) Obtained Following Preparation by Three Different Methods. *J Clin Diagn Res*. febrero de 2015;9(2):ZC10-12.
6. Gupta V, Parihar AS, Pathak M, Sharma VK. Comparison of Platelet-Rich Plasma Prepared Using Two Methods: Manual Double Spin Method versus a Commercially Available Automated Device. *Indian Dermatol Online J*. agosto de 2020;11(4):575-9.
7. Fitzpatrick J, Bulsara MK, McCrory PR, Richardson MD, Zheng MH. Analysis of Platelet-Rich Plasma Extraction: Variations in Platelet and Blood Components Between 4 Common Commercial Kits. *Orthop J Sports Med*. enero de

2017;5(1):2325967116675272.

8. Hosny N, Goubran F, BadrEldin Hasan B, Kamel N. Assessment of Vascular Endothelial Growth Factor in Fresh versus Frozen Platelet Rich Plasma. *J Blood Transfus.* 2015;2015:706903.
9. Roh YH, Kim W, Park KU, Oh JH. Cytokine-release kinetics of platelet-rich plasma according to various activation protocols. *Bone Joint Res.* febrero de 2016;5(2):37-45.
10. Mathew J, Varacallo M. Physiology, Blood Plasma. En: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2019 [citado 31 de marzo de 2019]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK531504/>
11. Gartner L, Hiatt J. Tejido Sanguíneo y Hematopoyesis. En: Atlas Color de Histología. 4a ed. Ed. Médica Panamericana; 2007.
12. Davis VL, Abukabda AB, Radio NM, Witt-Enderby PA, Clafshenkel WP, Cairone JV, et al. Platelet-rich preparations to improve healing. Part I: workable options for every size practice. *J Oral Implantol.* agosto de 2014;40(4):500-10.
13. Benjamin RJ, McLaughlin LS. Plasma components: properties, differences, and uses. *Transfusion.* mayo de 2012;52 Suppl 1:9S-19S.
14. Thon JN, Italiano JE. Platelets: Production, Morphology and Ultrastructure. En: Gresele P, Born GVR, Patrono C, Page CP, editores. *Antiplatelet Agents* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2012 [citado 2 de abril de 2019]. p. 3-22. Disponible en: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-29423-5\\_1](http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-29423-5_1)
15. López Farré A, Macaya C. Plaqueta: fisiología de la activación y la inhibición. *Revista Española de Cardiología Suplementos.* enero de 2013;13:2-7.

16. Bermejo E. Plaquetas. *Hematología*. 2017;21(Extraordinario):10-8.
17. Gartner L, Hiatt J. Sangre y Hematopoyesis. En: *Texto Atlas de Histología*. 3a ed. McGraw Hill Interamericana; 2008.
18. García Mesa M, Coma Alfonso C. Características estructurales y funcionales de las plaquetas. *Rev Cubana Angiol y Circ Vasc*. 2000;1(2):132-42.
19. Fountain JH, Lappin SL. Physiology, Platelet. En: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2019 [citado 31 de marzo de 2019]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470328/>
20. Ruiz Gil W. Anomalías Plaquetarias [Internet]. Disponible en: <http://sph-peru.org/wp-content/uploads/2016/01/PRESENTACION-PTI.pdf>
21. Alves R, Grimalt R. A Review of Platelet-Rich Plasma: History, Biology, Mechanism of Action, and Classification. *Skin Appendage Disord*. enero de 2018;4(1):18-24.
22. Andia I. Platelet-rich plasma biology. *Clinical Indications and Treatment Protocols with Platelet-Rich Plasma in Dermatology* Barcelona, Ediciones. 2016;3-15.
23. Conde Montero E, Fernández Santos ME, Suárez Fernández R. Platelet-rich plasma: applications in dermatology. *Actas Dermosifiliogr*. marzo de 2015;106(2):104-11.
24. Ferrari M, Zia S, Valbonesi M, Henriquet F, Venere G, Spagnolo S, et al. A new technique for hemodilution, preparation of autologous platelet-rich plasma and intraoperative blood salvage in cardiac surgery. *Int J Artif Organs*. enero de 1987;10(1):47-50.

25. Andia I, Rubio-Azpeitia E, Martin JI, Abate M. Current Concepts and Translational Uses of Platelet Rich Plasma Biotechnology [Internet]. Biotechnology. IntechOpen; 2015 [citado 13 de junio de 2021]. Disponible en: <https://www.intechopen.com/books/biotechnology/current-concepts-and-translational-uses-of-platelet-rich-plasma-biotechnology>
26. Gorlero F, Glorio M, Lorenzi P, Bruno-Franco M, Mazzei C. New approach in vaginal prolapse repair: mini-invasive surgery associated with application of platelet-rich fibrin. *Int Urogynecol J.* junio de 2012;23(6):715-22.
27. Einarsson JI, Jonsdottir K, Mandle R. Use of autologous platelet gel in female pelvic organ prolapse surgery: a feasibility study. *J Minim Invasive Gynecol.* abril de 2009;16(2):204-7.
28. Sommeling CE, Heyneman A, Hoeksema H, Verbelen J, Stillaert FB, Monstrey S. The use of platelet-rich plasma in plastic surgery: a systematic review. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* marzo de 2013;66(3):301-11.
29. Shirvan MK, Alamdari DH, Ghoreifi A. A novel method for iatrogenic vesicovaginal fistula treatment: autologous platelet rich plasma injection and platelet rich fibrin glue interposition. *J Urol.* junio de 2013;189(6):2125-9.
30. Zhu J-T, Xuan M, Zhang Y-N, Liu H-W, Cai J-H, Wu Y-H, et al. The efficacy of autologous platelet-rich plasma combined with erbium fractional laser therapy for facial acne scars or acne. *Mol Med Rep.* julio de 2013;8(1):233-7.
31. Malanga GA, Goldin M. PRP: review of the current evidence for musculoskeletal conditions. *Curr Phys Med Rehabil Rep.* 1 de marzo de 2014;2(1):1-15.

32. Wu PI-K, Diaz R, Borg-Stein J. Platelet-Rich Plasma. *Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America*. noviembre de 2016;27(4):825-53.
33. Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg*. abril de 2004;62(4):489-96.
34. Liao H-T, Marra KG, Rubin JP. Application of platelet-rich plasma and platelet-rich fibrin in fat grafting: basic science and literature review. *Tissue Eng Part B Rev*. agosto de 2014;20(4):267-76.
35. Anitua E, Andia I, Ardanza B, Nurden P, Nurden AT. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost*. enero de 2004;91(1):4-15.
36. Foster TE, Puskas BL, Mandelbaum BR, Gerhardt MB, Rodeo SA. Platelet-rich plasma: from basic science to clinical applications. *Am J Sports Med*. noviembre de 2009;37(11):2259-72.
37. Holinstat M. Normal platelet function. *Cancer Metastasis Rev*. 2017;36(2):195-8.
38. Alcaraz-Rubio J O-IA, Sánchez-López JM. Plasma rico en factores de crecimiento plaquetario. Una nueva puerta a la Medicina regenerativa. 2015;16(Rev Hematol Mex):128-42.
39. George JN. Platelets. *Lancet*. 29 de abril de 2000;355(9214):1531-9.
40. Stein JH, Hutton JJ, Klippel JH, Reynolds HY, Kohler PO, LaRusso NF, et al. *Internal Medicine*. Mosby; 1998. 2612 p.
41. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral*

Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. junio de 1998;85(6):638-46.

42. Holmes DI, Zachary I. The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: angiogenic factors in health and disease. *Genome Biol.* 2005;6(2):209.

43. D'Arcangelo D, Facchiano F, Barlucchi LM, Melillo G, Illi B, Testolin L, et al. Acidosis inhibits endothelial cell apoptosis and function and induces basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor expression. *Circ Res.* 18 de febrero de 2000;86(3):312-8.

44. Partanen TA, Paavonen K. Lymphatic versus blood vascular endothelial growth factors and receptors in humans. *Microsc Res Tech.* 15 de octubre de 2001;55(2):108-21.

45. Roberts WG, Palade GE. Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *J Cell Sci.* junio de 1995;108 ( Pt 6):2369-79.

46. Millauer B, Wizigmann-Voos S, Schnürch H, Martinez R, Møller NP, Risau W, et al. High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell.* 26 de marzo de 1993;72(6):835-46.

47. Koch S, Claesson-Welsh L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Cold Spring Harb Perspect Med.* julio de 2012;2(7):a006502.

48. Hagberg CE, Falkevall A, Wang X, Larsson E, Huusko J, Nilsson I, et al. Vascular endothelial growth factor B controls endothelial fatty acid uptake. *Nature.* 8 de abril de 2010;464(7290):917-21.

49. Joukov V, Sorsa T, Kumar V, Jeltsch M, Claesson-Welsh L, Cao Y, et al.



Proteolytic processing regulates receptor specificity and activity of VEGF-C. *EMBO J.* 1 de julio de 1997;16(13):3898-911.

50. Cao R, Eriksson A, Kubo H, Alitalo K, Cao Y, Thyberg J. Comparative evaluation of FGF-2-, VEGF-A-, and VEGF-C-induced angiogenesis, lymphangiogenesis, vascular fenestrations, and permeability. *Circ Res.* 19 de marzo de 2004;94(5):664-70.

51. Dvorak HF. Angiogenesis: update 2005. *J Thromb Haemost.* agosto de 2005;3(8):1835-42.

52. Mäkinen T, Jussila L, Veikkola T, Karpanen T, Kettunen MI, Pulkkanen KJ, et al. Inhibition of lymphangiogenesis with resulting lymphedema in transgenic mice expressing soluble VEGF receptor-3. *Nat Med.* febrero de 2001;7(2):199-205.

53. Rissanen TT, Markkanen JE, Gruchala M, Heikura T, Puranen A, Kettunen MI, et al. VEGF-D is the strongest angiogenic and lymphangiogenic effector among VEGFs delivered into skeletal muscle via adenoviruses. *Circ Res.* 30 de mayo de 2003;92(10):1098-106.

54. Alcaine Villarroja M a J, Barrenechea Iparraguirre EM, Casals E, González Rodríguez C, Martín Navas I, Macher Manzano H, et al. Utilidad de los marcadores bioquímicos de preeclampsia. *Revista del Laboratorio Clínico.* 1 de julio de 2019;12(3):e9-24.

55. Maglione D, Guerriero V, Viglietto G, Ferraro MG, Aprelikova O, Alitalo K, et al. Two alternative mRNAs coding for the angiogenic factor, placenta growth factor (PlGF), are transcribed from a single gene of chromosome 14. *Oncogene.* abril de 1993;8(4):925-31.

56. Autiero M, Luttun A, Tjwa M, Carmeliet P. Placental growth factor and its receptor, vascular endothelial growth factor receptor-1: novel targets for stimulation of ischemic tissue revascularization and inhibition of angiogenic and inflammatory disorders. *J Thromb Haemost.* julio de 2003;1(7):1356-70.
57. Fischer C, Mazzone M, Jonckx B, Carmeliet P. FLT1 and its ligands VEGFB and PlGF: drug targets for anti-angiogenic therapy? *Nat Rev Cancer.* diciembre de 2008;8(12):942-56.
58. Hu K, Olsen BR. The roles of vascular endothelial growth factor in bone repair and regeneration. *Bone.* 2016;91:30-8.
59. Bry M, Kivelä R, Leppänen V-M, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor-B in physiology and disease. *Physiol Rev.* julio de 2014;94(3):779-94.
60. Saad J, Asuka E, Schoenberger L. Physiology, Platelet Activation. En: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 [citado 13 de marzo de 2022]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482478/>
61. Ngo ATP, Jongen M, Shatzel JJ, McCarty OJT. Platelet integrin activation surfs the calcium waves. *Platelets.* 19 de mayo de 2021;32(4):437-9.
62. Bermejo E. Hematología. agosto de 2017;21(Extraordinario):10-8.
63. Huber SC, Cunha Júnior JLR, Montalvão S, da Silva LQ, Paffaro AU, da Silva FAR, et al. In vitro study of the role of thrombin in platelet rich plasma (PRP) preparation: utility for gel formation and impact in growth factors release. *J Stem Cells Regen Med.* 2016;12(1):2-9.
64. Gutiérrez CM, López C, Giraldo CE, Carmona JU. Study of a Two-Step Centrifugation Protocol for Concentrating Cells and Growth Factors in Bovine

Platelet-Rich Plasma. *Vet Med Int.* 2017;2017:1950401.

65. Órgano de Difusión de la Sociedad Argentina de Hematología. *Hematología.* septiembre de 2016;20(Número Extraordinario XII Congreso del Grupo CAHT):104-9.

66. Valencia Basto, Carlos. Cicatrización: Proceso de reparación tisular. *Aproximaciones terapéuticas.* 20. 2010;12:100.

67. Etulain J, Mena HA, Meiss RP, Frechtel G, Gutt S, Negrotto S, et al. An optimised protocol for platelet-rich plasma preparation to improve its angiogenic and regenerative properties. *Sci Rep.* 24 de 2018;8(1):1513.

68. Quincho Rosales, Dilmer Armando. Efecto del plasma rico en plaquetas en la regeneración ósea postexodoncia del tercer molar impactado [Internet]. [Lima, Perú]: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2017. Disponible en: [http://cybertesis.unmsm.edu.pe/xmlui/bitstream/handle/cybertesis/6286/Quincho\\_rd.pdf?sequence=2](http://cybertesis.unmsm.edu.pe/xmlui/bitstream/handle/cybertesis/6286/Quincho_rd.pdf?sequence=2)

69. Park JW, Hwang SR, Yoon I-S. Advanced Growth Factor Delivery Systems in Wound Management and Skin Regeneration. *Molecules.* 27 de julio de 2017;22(8).

70. Uccelli A, Wolff T, Valente P, Di Maggio N, Pellegrino M, Gürke L, et al. Vascular endothelial growth factor biology for regenerative angiogenesis. *Swiss Med Wkly.* 14 de enero de 2019;149:w20011.

71. Rud'ko AS, Efendieva MK, Budzinskaya MV, Karpilova MA. [Influence of vascular endothelial growth factor on angiogenesis and neurogenesis]. *Vestn Oftalmol.* 2017;133(3):75-81.

72. Melincovici CS, Boşca AB, Şuşman S, Mărginean M, Mişu C, Istrate M,

- et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis. *Rom J Morphol Embryol.* 2018;59(2):455-67.
73. Unknown. Reparación tisular [Internet]. Agentes físicos de la fisioterapia. 2018. Disponible en:  
<https://agentesfisicosenfisioterapia.blogspot.com/2018/07/reparacion-tisular.html>
74. Han G, Ceilley R. Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments. *Adv Ther.* 2017;34(3):599-610.
75. Andia I, Maffulli N. A contemporary view of platelet-rich plasma therapies: moving toward refined clinical protocols and precise indications. *Regen Med.* 2018;13(6):717-28.
76. Saeedi M, Ajalloueian M, Zare E, Taheri A, Yousefi J, Mirlohi SMJ, et al. The Effect of PRP-enriched Gelfoam on Chronic Tympanic Membrane Perforation: A Double-blind Randomized Clinical Trial. *Int Tinnitus J.* 1 de diciembre de 2017;21(2):108-11.
77. Matz EL, Pearlman AM, Terlecki RP. Safety and feasibility of platelet rich fibrin matrix injections for treatment of common urologic conditions. *Investig Clin Urol.* 2018;59(1):61-5.
78. Brossi PM, Moreira JJ, Machado TSL, Baccarin RYA. Platelet-rich plasma in orthopedic therapy: a comparative systematic review of clinical and experimental data in equine and human musculoskeletal lesions. *BMC Vet Res.* 22 de abril de 2015;11:98.
79. Castro Sierra, Rubén, Pérez Soto, Wilder, Monge, Alberto, Hernández, Ivan, Rossani, Germán, Suárez, Catherine. Beneficios de la aplicación del plasma rico en

plaquetas en zonas donantes de injertos de piel parcial. *Cosmetic Surgery Times*. febrero de 2012;24-9.

80. Kobayashi E, Flückiger L, Fujioka-Kobayashi M, Sawada K, Sculean A, Schaller B, et al. Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF. *Clin Oral Invest*. diciembre de 2016;20(9):2353-60.

81. Qiao J, An N, Ouyang X. Quantification of growth factors in different platelet concentrates. *Platelets*. diciembre de 2017;28(8):774-8.

82. N° 208 2016-SA-DG-INR. Resolución Directoral [Internet]. Chorrillos; 2016.

Disponible en:

<https://www.inr.gob.pe/transparencia/transparencia%20inr/resoluciones/2016/RD%20208-2016-SA-DG-INR.pdf>

83. Gkini M-A, Kouskoukis A-E, Tripsianis G, Rigopoulos D, Kouskoukis K. Study of platelet-rich plasma injections in the treatment of androgenetic alopecia through an one-year period. *Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery*. 2014;7(4):213.

84. Giraldo CE, Álvarez ME, Carmona JU. Effects of sodium citrate and acid citrate dextrose solutions on cell counts and growth factor release from equine pure-platelet rich plasma and pure-platelet rich gel. *BMC Vet Res*. 14 de marzo de 2015;11:60.

85. Hernández Sampieri R, Fernández Collado C, Baptista Lucio P. Metodología de la investigación [Internet]. Quinta edición. México: McGraw Hill; 2010.

Disponible en: <https://www.icmujeres.gob.mx/wp-content/uploads/2020/05/Sampieri.Met.Inv.pdf>

86. NIH. Definición de ex vivo - Diccionario de cáncer del NCI - Instituto Nacional del Cáncer [Internet]. 2011 [citado 10 de julio de 2021]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/ex-vivo>
87. Kushida S, Kakudo N, Morimoto N, Hara T, Ogawa T, Mitsui T, et al. Platelet and growth factor concentrations in activated platelet-rich plasma: a comparison of seven commercial separation systems. *Journal of Artificial Organs*. junio de 2014;17(2):186-92.
88. Invitrogen. Human VEGF ELISA Kit [Internet]. 2021. Disponible en: [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0003960\\_KHG0111\\_Human\\_VEGF\\_ELISA\\_PI.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0003960_KHG0111_Human_VEGF_ELISA_PI.pdf)
89. Mabtech. Capture the right analyte with ELISA [Internet]. 2019. Disponible en: <https://www.mabtech.com/sites/default/files/elisa-brochure.pdf>
90. Plikaytis BD, Turner SH, Gheesling LL, Carlone GM. Comparisons of standard curve-fitting methods to quantitate *Neisseria meningitidis* group A polysaccharide antibody levels by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol*. julio de 1991;29(7):1439-46.
91. Dietrichson, Aleksander. Métodos Cuantitativos. En Perú; 2019. Disponible en: <https://bookdown.org/dietrichson/metodos-cuantitativos/>
92. Fortier LA, Barker JU, Strauss EJ, McCarrel TM, Cole BJ. The role of growth factors in cartilage repair. *Clin Orthop Relat Res*. octubre de 2011;469(10):2706-15.
93. Steller D, Herbst N, Pries R, Juhl D, Hakim SG. Impact of incubation method on the release of growth factors in non-Ca<sup>2+</sup>-activated PRP, Ca<sup>2+</sup>-activated PRP,

PRF and A-PRF. *J Craniomaxillofac Surg.* febrero de 2019;47(2):365-72.

94. Giraldo CE, Álvarez ME, Carmona JU. Influence of calcium salts and bovine thrombin on growth factor release from equine platelet-rich gel supernatants. *Vet Comp Orthop Traumatol.* 16 de enero de 2017;30(1):1-7.

95. Margono A, Bagio DA, Julianto I, Suprastiwi E. The Effect of Calcium Gluconate on Platelet Rich Plasma Activation for VEGF-A Expression of Human Dental Pulp Stem Cells. *Eur J Dent.* 22 de diciembre de 2021;

# ANEXOS

## Anexo 1: Aprobación del protocolo de investigación



UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**  
Vicerrectorado de Investigación  
Dirección Universitaria de Investigación,  
Ciencia y Tecnología (DUICT)

### CONSTANCIA 270 -07-17

El Presidente del Comité Institucional de Ética en Investigación (CIEI) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia hace constar que el proyecto de investigación señalado a continuación fue **APROBADO** por el Comité Institucional de Ética en Investigación.

Título del Proyecto : "Liberación de factores de crecimiento de plasma rico en plaquetas según diferentes concentraciones de gluconato de calcio variando el tiempo y fuerza gravitacional de centrifugación"

Código de inscripción : 100568

Investigador principal : Lazo Betetta, Marie Angélique Gabriela

La aprobación incluyó los documentos finales descritos a continuación:

1. **Protocolo de investigación**, versión recibida en fecha 03 de mayo del 2017.
2. **Consentimiento informado**, versión recibida en fecha 03 de mayo del 2017.

La **APROBACIÓN** considera el cumplimiento de los estándares de la Universidad, los lineamientos Científicos y éticos, el balance riesgo/beneficio, la calificación del equipo investigador y la Confidencialidad de los datos, entre otros.

Cualquier **enmienda**, desviaciones, eventualidad deberá ser reportada de acuerdo a los plazos y normas establecidas. El investigador reportará cada seis meses el progreso del estudio y alcanzará un informe al término de éste. La aprobación tiene vigencia desde la emisión del presente documento hasta **03 de mayo del 2018**.

Si aplica, los trámites para su renovación deberán iniciarse por lo menos 30 días previos a su vencimiento.

Lima, 04 de mayo del 2017.

  
Dra. Frine Samalvides Cuba  
Presidenta  
Comité Institucional de Ética en Investigación





## Anexo 2: Enmienda al protocolo de investigación



UNIVERSIDAD PERUANA  
CAYETANO HEREDIA

Dirección Universitaria de  
INVESTIGACIÓN, CIENCIA Y  
TECNOLOGÍA (DUICT)

### CONSTANCIA

El Presidente del Comité Institucional de Ética en Investigación (CIEI) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia hace constar que el comité institucional de ética en investigación aprobó la ENMIENDA/MODIFICACIÓN del proyecto de investigación señalado a continuación.

Título del Proyecto : "Medición de factor de crecimiento endotelial vascular del plasma rico en plaquetas según diferentes Concentraciones de gluconato de calcio variando el tiempo y fuerza gravitacional de centrifugación".

Código de inscripción : 100568

Investigador principal : Lazo Betetta, Marie Angélique

La enmienda/modificación corresponde a los siguientes documentos:

1. Protocolo de investigación, versión de fecha 01 de octubre del 2020.

Lima, 13 de octubre del 2020.



Dra. Frine Samalvides Cuba  
Presidenta  
Comité Institucional de Ética en Investigación



Av. Honorio Delgado 430, SMP 15102  
Apartado postal 4314  
(511) 319-0000 anexo 201352  
duict@oficinas-upch.pe  
[www.cayetano.edu.pe](http://www.cayetano.edu.pe)

## Anexo 3: Consentimiento informado

### Consentimiento para participar en un estudio de investigación - ADULTOS -

---

Institución : Universidad Peruana Cayetano Heredia – UPCH.  
Investigador : Lazo Betetta, Marie Angélique Gabriela  
Título : Liberación de factores de crecimiento del Plasma Rico en Plaquetas según diferentes concentraciones de Gluconato de Calcio variando el tiempo y fuerza gravitacional de centrifugación

---

#### Propósito del Estudio:

Lo estamos invitando a participar en un estudio llamado: "Liberación de factores de crecimiento del Plasma Rico en Plaquetas según diferentes concentraciones de Gluconato de Calcio variando el tiempo y fuerza gravitacional de centrifugación". Este es un estudio desarrollado por investigadores de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Estamos realizando este estudio para comparar la liberación de Factores de crecimiento del Plasma Rico en Plaquetas (PRP), ya que los factores de crecimiento poseen gran potencial para uso en varias ramas de la salud como en el tratamiento de "pie diabético", tratamiento de fracturas, úlceras, "ojo seco", en trasplante de córnea, reparación de heridas corneales, cirugía laser, en Artritis Reumatoide, manejo de resequedad vaginal, reparación de heridas, uso en caída del cabello, uso en artrosis para terapia del dolor, infiltraciones en articulaciones, injertos de piel y regeneración de la piel, implantes dentales, rejuvenecimiento facial, trasplante de piel por quemaduras, lesiones de los tendones, entre otros.

El Plasma Rico en Plaquetas en la actualidad es muy utilizado y se desea obtener más información en realización a la metodología para poder obtener la mejor calidad en el procesamiento y así poder brindar mejores opciones de tratamientos a los pacientes.

#### Procedimientos:

Si usted acepta participar en este estudio se le harán los siguientes exámenes:

1. El paciente durante la donación de sangre habitual, se le tomará una muestra a partir de la bolsa satélite (bolsa que no contiene ningún preservante y se saca las muestras para el tamizaje de donantes), de la bolsita se extraerá aprox. 25 mL (aprox. 2 cucharadas de sopa) para estudiar los factores de crecimiento que posee.

#### Riesgos:

No se prevén riesgos por participar en esta fase del estudio, ya que la muestra de sangre será obtenida a partir de la bolsita anexa a la bolsa de donación sanguínea habitual, sin hacer ninguna punción adicional.

#### Beneficios:

Usted se beneficiará con una evaluación clínica (tamizaje habitual para donación de sangre) para el despistaje de enfermedades transmisibles. Se le informará de manera personal y confidencial los resultados del hemograma completo y cuantificación de plaquetas que se obtengan de los exámenes realizados. Los costos de todos los exámenes serán cubiertos por el estudio y no le ocasionará gasto alguno.

#### Costos e incentivos:

Usted no deberá pagar nada por participar en el estudio del hemograma y plaquetas así como otras pruebas usadas en el estudio no tiene costo alguno. Igualmente, no recibirá ningún

incentivo económico ni de otra índole, únicamente la satisfacción de colaborar a un mejor entendimiento de los Factores de Crecimiento del Plasma Rico en Plaquetas.

**Confidencialidad:**

Se guardará su información con códigos y no con nombres, es decir, la información será anonimizada. Si los resultados de este seguimiento son publicados, no se mostrará ninguna información que permita la identificación de las personas que participan en este estudio. Sus archivos no serán mostrados a ninguna persona ajena al estudio sin su consentimiento.

**Derechos del paciente:**

Si usted decide participar en el estudio, puede retirarse de éste en cualquier momento, o no participar en una parte del estudio sin perjuicio alguno. Si tiene alguna duda adicional, por favor pregunte al personal del estudio, o llamar a la Dra. Marie Angelique Lazo Betetta al tel. [REDACTED]

Si usted tiene preguntas sobre los aspectos éticos del estudio, o cree que ha sido tratado injustamente puede contactar al Comité Institucional de Ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, la Dra. Frine Samalvides Cuba, al teléfono 01-3190000 anexo 2271

**CONSENTIMIENTO**

Acepto voluntariamente participar en este estudio, comprendo que cosas me van a pasar si participo en el proyecto, también entiendo que puedo decidir no participar y que puedo retirarme del estudio en cualquier momento.

-----  
Participante  
Nombre:  
DNI:

-----  
Fecha:

-----  
Testigo  
Nombre:  
DNI:

-----  
Fecha:

-----  
Investigador  
Nombre:  
DNI:

-----  
Fecha:



**APROBADO**

F. APROBACIÓN: 01/05/13

#### Anexo 4: Datos epidemiológicos de los voluntarios

	<b>Edad</b>	<b>Sexo</b>	<b>Peso</b>	<b>Talla</b>	<b>IMC</b>
<b>Voluntario 1</b>	38	Masculino	85	1.75	27.75
<b>Voluntario 2</b>	36	Masculino	74	1.75	24.16
<b>Voluntario 3</b>	37	Masculino	80	1.65	29.38
<b>Voluntario 4</b>	20	Femenino	67	1.67	24.02
<b>Voluntario 5</b>	36	Masculino	70	1.60	27.34
<b>Voluntario 6</b>	19	Masculino	71	1.71	24.28
<b>Voluntario 7</b>	21	Masculino	65	1.79	20.28
<b>Voluntario 8</b>	40	Masculino	75	1.69	26.25
<b>Voluntario 9</b>	30	Femenino	67	1.62	25.50
<b>Voluntario 10</b>	22	Masculino	60	1.60	23.43
<b>Voluntario 11</b>	35	Femenino	77	1.61	29.70
<b>Voluntario 12</b>	18	Masculino	66	1.66	23.95
<b>Voluntario 13</b>	28	Femenino	55	1.63	20.70
<b>Voluntario 14</b>	36	Masculino	78	1.65	28.65
<b>Voluntario 15</b>	32	Masculino	68	1.51	29.82
<b>Voluntario 16</b>	24	Femenino	70	1.56	28.76
<b>Voluntario 17</b>	40	Masculino	65	1.68	23.03
<b>Voluntario 18</b>	40	Masculino	83	1.69	29.06
<b>Voluntario 19</b>	39	Masculino	100	1.85	29.20
<b>Voluntario 20</b>	31	Masculino	71	1.70	24.56



**Anexo 5: Insertos de Gluconato de Calcio**

**GLUCONATO DE CALCIO 10%**  
*Solución Inyectable*

**COMPOSICIÓN**  
Cada ampolla por 10 mL contiene:  
Gluconato de Calcio H<sub>2</sub>O.....0.993g  
Excipientes: Calcio sacarato, agua para inyección c.s.p.  
-Calcio: 0.465 mEq/mL

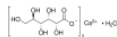
**MANTÉNGASE FUERA DEL ALCANCE DE LOS NIÑOS**  
**VENTA CON RECETA MÉDICA**

Fabricado por: **LABORATORIOS UNIDOS S.A.**  
Para: **DISTRIBUIDORA DANY S.A.C.**  
Calle Hermanos Catari N° 175 – 1er piso, Urb. Maranga- San Miguel. Lima- Perú  
Teléfono: (51-1) 578-0808

## Product Specification

Product Name:  
Calcium D-gluconate monohydrate - ≥98%

Product Number: **G4625**  
CAS Number: 66905-23-5  
MDL: MFCD00150787  
Formula: C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>CaO<sub>14</sub> · H<sub>2</sub>O  
Formula Weight: 448.39 g/mol



TEST	Specification
Appearance (Color)	White to Faint Yellow
Appearance (Form)	Powder
Solubility (Color)	Colorless
Solubility (Turbidity)	Clear
50 mg/mL, H <sub>2</sub> O	
Loss on Drying	≤ 3.0 %
Titration with EDTA	98 - 102 %
Purity (HPLC)	≥ 99 %

Specification: PRD.1.ZQ5.10000033909

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at [Sigma-Aldrich.com](http://Sigma-Aldrich.com). For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.