



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

Facultad de
MEDICINA

EFEECTO DEL GLUCONATO DE CALCIO 10% EN LA ACTIVACIÓN DEL
PLASMA RICO EN PLAQUETAS OBTENIDO A DIFERENTES
CONDICIONES DE CENTRIFUGADO SOBRE LA EXPRESIÓN DEL
FACTOR DE CRECIMIENTO DERIVADO DE PLAQUETAS-BB (PDGF-BB)

EFFECT OF 10% CALCIUM GLUCONATE ON THE ACTIVATION OF
PLATELET-RICH PLASMA OBTAINED AT DIFFERENT
CENTRIFUGATION CONDITIONS ON THE EXPRESSION OF PLATELET
DERIVED GROWTH FACTOR-BB (PDGF-BB)

TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN
TECNOLOGÍA MÉDICA EN LA ESPECIALIDAD DE LABORATORIO CLÍNICO Y
ANATOMÍA PATOLÓGICA

AUTORES

LUIS ABRAHAM CONTRERAS BENITES
DANTE AMILCAR GUZMAN GUTIERREZ
SERGEY SUMMER MUÑOZ RAMOS

ASESOR

PEDRO ALBERTO ARO GUARDIA

LIMA, PERÚ

2024

JURADO

Presidente: Cleofe del Pilar Yovera Ancajima

Vocal: Belinda Morayma Arias Guzman

Secretario: Patricia Saenz Montoya

Fecha de Sustentación: 17 de diciembre del 2024

Calificación: Aprobado

ASESOR DE TESIS

ASESOR

Dr. Pedro Alberto Aro Guardia

Departamento Académico de Hemoterapia y Banco de Sangre

ORCID: 0000-0003-3343-7607

DEDICATORIA

A nuestros padres quienes nos han apoyado para poder llegar a esta instancia fundamental en nuestra vida, simbolizando el triunfo a la paciencia, colaboración y comprensión brindados a lo largo de este viaje académico. A nuestro asesor, que nos proporcionó los conocimientos y visión sobre el proyecto, guiándonos en cada sesión.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO

Nuestro estudio es autofinanciado

DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

RESULTADO DEL INFORME DE SIMILITUD



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

Facultad de
MEDICINA

EFFECTO DEL GLUCONATO DE CALCIO 10% EN LA ACTIVACIÓN DEL PLASMA RICO EN PLAQUETAS OBTENIDO A DIFERENTES CONDICIONES DE CENTRIFUGADO SOBRE LA EXPRESIÓN DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DERIVADO DE PLAQUETAS-BB (PDGF-BB)

EFFECT OF 10% CALCIUM GLUCONATE ON THE ACTIVATION OF PLATELET-RICH PLASMA OBTAINED AT DIFFERENT CENTRIFUGATION CONDITIONS ON THE EXPRESSION OF PLATELET DERIVED GROWTH FACTOR-BB (PDGF-BB)

TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN TECNOLOGÍA MÉDICA EN LA ESPECIALIDAD DE LABORATORIO CLÍNICO Y ANATOMÍA PATOLÓGICA

AUTORES

LUIS ABRAHAM CONTRERAS BENITES
DANTE AMILCAR GUZMAN GUTIERREZ
SERGEY SUMMER MUÑOZ RAMOS

ASESOR

PEDRO ALBERTO ARO GUARDIA

LIMA, PERÚ
2024



20% Similitud estándar

Filtros

Fuentes

Mostrar las fuentes solapadas 










1	Internet	 
	repositorio.upch.edu.pe	10%
	≡ 27 bloques de texto  369 palabra que coinciden	
2	Internet	 
	duict.upch.edu.pe	2%
	≡ 5 bloques de texto  74 palabra que coinciden	
3	Internet	 
	ichgcp.net	<1%
	≡ 1 bloques de bloques  33 palabra que coinciden	

TABLA DE CONTENIDOS

Resumen	
Abstract	
I. Introducción	1
II. Objetivos	4
II.1. Objetivo general	4
II.2. Objetivos específicos	4
III. Materiales y métodos	5
III.1. Diseño y población de estudio	5
III.2. Participantes	5
III.3. Obtención de la muestra de sangre	5
III.4. Preparación y activación del PRP	6
III.5. Cuantificación del PDGF-BB	6
III.6. Análisis estadístico	7
IV. Resultados	8
V. Discusión	9
VI. Conclusiones	13
VII. Referencias Bibliográficas	14
VIII. Tablas, gráficos y figuras	
IX. Anexos	

RESUMEN

Introducción: La activación del plasma rico en plaquetas (PRP) es un importante paso para desencadenar la liberación de los factores de crecimiento como el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF-BB) y puede estar influenciado por los métodos utilizados en su preparación. **Objetivo:** Evaluar el efecto del gluconato de calcio 10% (Glu.Ca 10%) en la activación del PRP obtenido a diferentes condiciones de centrifugado sobre la expresión del PDGF-BB. **Materiales y Métodos:** Estudio experimental *in vitro*. Se obtuvieron 11 muestras de donantes de sangre que acudieron al Servicio de Hemoterapia y Banco de Sangre del Hospital Cayetano Heredia en el mes de julio del 2024. Se analizaron dos tipos de PRP: centrifugación simple (CS): 900g a 7 minutos y centrifugación doble (CD): CD=900 g a 7 minutos y 1500 g a 15 minutos. De cada método de centrifugación se obtuvieron 2 alícuotas; a una se le añadió Glu.Ca 10% y otro no se usó activador. Se cuantificó el PDGF-BB por ELISA. El análisis estadístico se realizó a través de la prueba de ANOVA y se consideró un $p < 0.05$ como estadísticamente significativo. **Resultados:** se observó diferencias significativas en los valores de PDGF-BB entre los grupos estudiados (CS con Glu.Ca 10%: 842.7 ± 4.0 ; CS sin Glu.Ca 10%: 837.6 ± 4.3 ; CD sin Glu.Ca 10%: 389.3 ± 94.5 ; CD con Glu.Ca 10%: 237.9 ± 88.5 ; $p < 0.05$). **Conclusiones:** Se observó mayor liberación de PDGF-BB con el uso de centrifugación simple y usando activador. Estos hallazgos podrían ayudar a comprender y mejorar los resultados en la preparación del PRP para su uso clínico.

Palabras claves: donantes de sangre, plasma rico en plaquetas, factor de crecimiento derivado de plaquetas.

ABSTRACT

Introduction: Activation of platelet-rich plasma (PRP) is an important step in triggering the release of growth factors such as platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) and may be influenced by the methods used in its preparation.

Objective: To evaluate the effect of calcium gluconate 10% (Glu.Ca 10%) in the activation of PRP obtained at different centrifugation conditions on the expression of PDGF-BB.

Materials and Methods: Experimental in vitro study. Eleven samples were obtained from blood donors who attended the Hemotherapy and Blood Bank Service of the Cayetano Heredia Hospital in July 2024. Two types of PRP were analyzed: single centrifugation (SC): 900 g at 7 minutes and double centrifugation (DC): DC=900 g at 7 minutes and 1500 g at 15 minutes. Two aliquots were obtained from each centrifugation method; Glu.Ca10% was added to one aliquot and no activator was used in the other. PDGF-BB was quantified by ELISA.

Statistical analysis was performed by ANOVA test and a $p < 0.05$ was considered statistically significant. **Results:** significant differences in PDGF-BB values were observed between the groups studied (CS with Glu.Ca 10%: 842.7 ± 4.0 ; CS without Glu.Ca 10%: 837.6 ± 4.3 ; CD without Glu.Ca 10%: 389.3 ± 94.5 ; CD with Glu.Ca 10%: 237.9 ± 88.5 ; $p < 0.05$). **Conclusions:** Greater PDGF-BB release was observed with the use of single centrifugation and using activator. These findings could help to understand and improve the results in the preparation of PRP for clinical use.

Keywords: blood donors, platelet-rich plasma, platelet-derived growth factor

I. INTRODUCCIÓN

Las plaquetas (PQ) se originan en los megacariocitos de la médula ósea y son esenciales para mantener la integridad vascular y la hemostasia (1). Están subdivididas en la membrana, que asegura la integridad vascular, una estructura citoesquelética y una región de gránulos (alfa y densos) que contienen bioactivos como serotonina, histamina, calcio y adenosina, todos ellos participando en la inflamación, cicatrización y respuesta inmune (2-4). Estas características han llevado a que las PQ sean utilizadas en medicina regenerativa, favoreciendo la proliferación y migración celular, así como la angiogénesis (5).

El plasma rico en plaquetas (PRP), un derivado de las PQ, tiene concentraciones significativamente superiores a las de la sangre total (6). En los últimos años, el PRP se ha destacado como una terapia eficaz en medicina regenerativa, con aplicaciones en diversas áreas. En el área de medicina ortopédica, ha mostrado ser seguro y efectivo para tratar lesiones tanto agudas como crónicas, mejorando el dolor y la función articular (7,8). También ha sido utilizado con éxito en dermatología para el tratamiento de la alopecia, cicatrización de heridas crónicas donde ha acelerado la curación en comparación con métodos estándar con resultados satisfactorios (9,10).

La capacidad regenerativa del PRP se debe principalmente a la liberación de citocinas y factores de crecimiento (FC), como el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF) (11-14). El PDGF está compuesto por subunidades A y/o B; una principal

isoforma es el PDGF-BB, que tiene la capacidad de unirse a todas las isoformas de receptores, participando en el reclutamiento y maduración de los pericitos en la zona de lesión promoviendo la angiogénesis y osteogénesis (15,16).

Estudios muestran que el PDGF-BB es mayor en el PRP comparado con las PQ basales, debido a diferentes variaciones como número de centrifugado, grado de concentración de PQ, la preparación del PRP y grado de activación plaquetaria por desgranulación y escisión del fibrinógeno (16-18). En estudios de PRP han empleado para su activación distintos medios como trombina, cloruro de calcio (Clo.Ca), gluconato de calcio (Glu.Ca) y activación espontánea (18-20).

Cavallo et al. (19) evaluaron la liberación de factores de crecimiento usando trombina, cloruro de calcio (Clo.Ca) y colágeno tipo 1, mencionando que la trombina facilitaba una liberación rápida en los primeros 30 minutos, mientras que el Clo.Ca prolongaba la liberación. De manera similar, Franco et al. (32) indicaron que la combinación de trombina con Clo.Ca es más eficaz en la liberación de estos factores. Sin embargo, Lee et al. (36) y Silva et al. (23) no hallaron diferencias significativas en la liberación de PDGF-AA, PDGF-BB y TGF-B entre PRP activado y no activado con trombina y Clo.Ca. Además, Margono et al. (21) demostraron que ambos métodos permiten la expresión de VEGF en células madre de pulpa dental. Por otro lado, Mazzocca et al. (26) y Eren et al. (17) obtuvieron un incremento de PQ a una mayor velocidad de centrifugado con un solo ciclo, lo que contrasta con Amable et al. (25) quienes obtuvieron menos PQ con doble centrifugación. No obstante, Bausset et al. (28), Ogundipe et al. (29), y Jo et al. (30) sugieren que un protocolo de doble centrifugación es más eficaz para obtener un

mayor número de PQ. Estos hallazgos sugieren que la elección del activador, la variación del tiempo y la fuerza gravitatoria pueden afectar la liberación de FC.

Dado que los protocolos para la preparación de PRP varían considerablemente en sus parámetros estandarizados y con resultados contradictorios, es esencial desarrollar una metodología personalizada que se adapte fácilmente a las necesidades clínicas. Por ello, nuestro estudio se enfocó en evaluar el efecto del Glu.Ca 10% sobre la activación del PRP adquirido a diferentes condiciones de centrifugado sobre la expresión del PDGF-BB.

II. OBJETIVOS

II.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del gluconato de calcio 10% en la activación del PRP obtenido a diferentes condiciones de centrifugado sobre la expresión del PDGF-BB

II.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

II.2.1. Determinar las concentraciones de las plaquetas obtenidas antes de la preparación del PRP con centrifugación simple (CS) y doble (CD).

II.2.2. Cuantificar las concentraciones de PDGF-BB en el PRP con y sin activación con gluconato de calcio 10% obtenido con CS.

II.2.3. Cuantificar las concentraciones de PDGF-BB en el PRP con y sin activación con gluconato de calcio 10% obtenido con CD.

II.2.4. Determinar la relación entre las concentraciones de PDGF-BB en el PRP con y sin activación con gluconato de calcio 10% obtenido con CS.

II.2.5. Determinar la relación entre las concentraciones de PDGF-BB en el PRP con y sin activación con gluconato de calcio 10% obtenido con CD.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1 Diseño y población de estudio

Se realizó un estudio experimental *in vitro* para evaluar el efecto del PDGF-BB con Glu.Ca 10% en PRP activado y no activado, obtenidos de donantes atendidos en el servicio de Banco de Sangre y Hemoterapia del Hospital Cayetano Heredia durante el mes de Julio del 2024.

III.2. Participantes

Antes de realizar la ejecución del estudio se realizó el cálculo muestral mediante un muestreo aleatorio simple utilizando el programa Open Epi y se calculó por diferencia de medias utilizando el formato de Qiao et al. (26). De acuerdo con los cálculos se obtuvo un tamaño de 11 muestras (ANEXO 1). Se les brindó un consentimiento informado (ANEXO 2) a los participantes voluntarios aptos (hombres y mujeres) entre 18 y 40 años. Asimismo, no se consideró a sujetos medicados en los últimos 15 días, fumadores crónicos y con antecedentes de trastornos metabólicos (hipertensión, diabetes mellitus, hipotiroidismo y obesidad mórbida).

III.3. Obtención de la muestra de sangre

Se recolectó 7 cc de muestra de sangre obtenido de la bolsa satélite (10 cc) de la bolsa cuádruple en donde se realizó la donación, posteriormente se recolectó cada muestra del donante en dos tubos de citrato de sodio al 3.2%, este procedimiento duró menos de 5 min por participante. Posteriormente se llevaron las muestras al servicio de Hemoterapia y Banco de sangre para su análisis de conteo de plaquetas basales antes de la centrifugación en el analizador

hematológico CELL DYN de Abbott que utiliza la tecnología de impedancia eléctrica para la medición de las plaquetas y espectrometría de absorción para las mediciones de hemoglobina; además se le realiza control de calidad diario de acuerdo al protocolo habitual del Banco de Sangre. Se utilizó una centrifuga de mesa (marca HERMLE Z326), la cual muestra la velocidad en fuerza centrífuga relativa (RFC-g) y revoluciones por minuto (RPM) y cuenta con mantenimiento preventivo y calibraciones periódicas (ANEXO 3). La velocidad y la duración del proceso de centrifugación utilizado en este estudio se basaron en 2 estudios previos (31,32).

III.4. Preparación y activación del PRP

Las muestras obtenidas se rotularon de la siguiente manera: con la letra A se indicó la CS (900g a 7 min), mientras que al otro tubo se rotuló con la letra B el cual indicó CD (900g a 7 min y después 1500g a 15 min). Después de las centrifugaciones se realizó el conteo de número de PQ del sedimento de cada PRP obtenido. Posteriormente en una cámara de flujo laminar las muestras A y B fueron separadas en 2 alícuotas cada una. Para la activación del PRP se utilizó Glu.Ca al 10% en una proporción de 1/10. De la muestra A, a una alícuota 1 se agregó 50 µL de Glu.Ca y 450 µL de PRP, mientras que a la alícuota 2 solo se agregó 500 µL de PRP. De la misma forma se procedió con el tubo B. Las muestras se incubaron a 37° de 5% CO₂ por 24 horas antes de la realización de la medida del PDGF-BB (ANEXO 4).

III.5. Cuantificación del PDGF-BB

La determinación del PDGF-BB se realizó con el uso de Human PDGF-BB ELISA KIT de la marca Sigma-Aldrich bajo número de producto: RAB0397 el cual utiliza la metodología tipo sándwich (ANEXO 5). Se realizó la preparación del estándar y las diluciones seriadas según especificaciones del inserto (ANEXO 6), los valores obtenidos fueron leídos en un lector de ELISA a una absorbancia de 450nm (Eje X) vs concentración PDGF-BB (eje Y) para la obtención de la curva estándar (FIGURA 1).

III.6. Análisis estadístico

Se llevó a cabo un análisis univariado de muestras relacionadas utilizando el software estadístico STATA versión 16 para Windows 11. Las variables categóricas se expresaron en frecuencias. Las variables continuas con distribución normal se presentaron como medias \pm desviación estándar, mientras que aquellas con distribución no Gaussiana se resumieron como mediana y rango intercuartil. Para comparar el PRP activado y sin activar tanto procesado a CS como a CD, se utilizó un análisis bivariado. En caso que cumplan con los supuestos de normalidad, se aplicó la prueba de ANOVA. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p \leq 0,05$.

IV. RESULTADOS

Se obtuvieron un total de 11 muestras de 7 cc obtenidas de la bolsa satélite con tubos de citrato de sodio al 3.2%, de los cuales la edad media masculina es de 63.6 y la edad media femenina es 36.4 con una desviación estándar (SD) 33.5 ± 10.9 años; la SD de la hemoglobina fue de 14.05 ± 0.7 . La SD del PRP por centrifugación doble (CD) fue mayor que el PRP por centrifugación simple (CS) ($675.8 \pm 47.6 \times 10^3/\mu\text{L}$ vs $478.8 \pm 53.5 \times 10^3/\mu\text{L}$) y plaquetas basales ($675.8 \pm 47.6 \times 10^3/\mu\text{L}$ vs $231.9 \pm 47.0 \times 10^3/\mu\text{L}$).

La obtención de la curva estándar (figura 1) se realizó a través de diluciones seriadas según inserto del fabricante. Estas diluciones fueron realizadas por duplicado obteniéndose los valores promedio por dilución. La fórmula obtenida fue $y = 216.82x - 23.583$, la cual se usó para obtener los valores de PDGF-BB, con $R^2 = 0.9974$. El límite de detección fue de 0.1 ng/mL, con rango de la curva estándar de 0.549 a 400 ng/mL.

La concentración de PDGF-BB con CD sin el gluconato tuvo como media 389.3 ± 94.5 ng/ μL a comparación del grupo con CS sin el gluconato, el cual tuvo como media 838.3 ± 4.8 ng/ μL , que fue 2.15 veces mayor. Se confirmó la significación estadística para cada paso ($p < 0.05$) (figura 2). Adicionalmente se observó que la concentración de PDGF-BB por CS con Glu.Ca al 10% tuvo como media 842.2 ± 2.1 ng/ μL , en contraste con la concentración de PDGF-BB por CD con el activador Glu.Ca al 10% tuvo como media 237.9 ± 88.5 ng/ μL . que fue 3.54 veces mayor, mostrando una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) (figura 3).

V. DISCUSIÓN

El presente estudio demuestra que el uso Glu.Ca 10% con una CS generó una mayor liberación de PDGF-BB. Además, el análisis mostró que a pesar de que la CD generaba un PRP con mayor cantidad de plaquetas, se obtuvo una mayor liberación del FC mediante la CS. Estos resultados sugieren que no solo el Glu.Ca al 10% afectó la producción del FC en el PRP sino también el método de centrifugación, pudiendo ser de importancia para su uso en medicina regenerativa.

La activación de las plaquetas en el PRP puede afectar la liberación de los FC principalmente en su cinética y cantidad (18) y se puede llevar a cabo a través de compuestos como la trombina o las sales de calcio (cloruro o gluconato) (19). El Calcio juega un rol importante en la agregación y activación plaquetaria, formando coágulos de fibrina en el PRP (20). Algunos estudios muestran mayor eficiencia con el uso de cloruro de calcio (Clo.Ca) en comparación con el uso de trombina, siendo más seguro y altamente rentable (21,22). Silva et. al. (23) realizaron un estudio en caninos y no encontraron diferencia significativa entre la activación del PRP con Clo.Ca y Glu.Ca indicando además que ambas sales de calcio son seguras. Además, algunos reportes indican que el uso de concentraciones del 10% demostró ser mejor que otras en su efecto sobre la mayoría de tipos de células (24). Por estas razones se optó por el uso de Glu.Ca 10% como activador debido a su fácil acceso, rápido proceso y efecto sobre las plaquetas.

El efecto de la activación dependió tanto del activador como del método de centrifugación usado y eso se puede observar en nuestros resultados. Es importante distinguir el método de centrifugación simple y doble usado en este estudio, ya que

la literatura muestra resultados variables, Amable et. al. (25), encontraron que los resultados obtenidos por CS fueron mejores que el uso de CD, en contraste con Mazzocca et. al. (26), demostraron que a mayor velocidad y CD se obtiene un mayor recuento plaquetario. En este estudio se puede observar una mayor concentración de plaquetas con una CD, pero esto no necesariamente permitiría una mayor liberación del FC. Es conocido que la mayoría de protocolos de obtención del PRP se basa en aumentar la cantidad de plaquetas, pero estudios mencionan que las variaciones del FC no se correlacionan con la variación en el recuento de plaquetas, pudiendo no ser un indicador apropiado para predecir su actividad biológica (27,28), esto podría ser explicado debido a que las plaquetas son células frágiles las cuales a mayor fuerza de centrifugación existe un riesgo de alteración y su ineficacia manifestándose en la cantidad de FC liberado por lo cual se recomienda velocidades bajas y una sola centrifugación (29).

Nuestros resultados muestran que una CS añadiendo Glu.Ca 10% es superior a los otros métodos utilizados mostrando una mayor liberación de PDGF-BB. La literatura es variable con respecto al uso del método de activación del PRP. Margono et. al. (21), demostraron que el uso de activación con calcio es superior al sin activador usando una CS en la expresión de VEGF, esto fue observado de la misma manera por Fukuda et. al. (33), los cuales mostraron que la adición de Ca^{+2} generó una liberación mayor de PDGF-BB. Otros estudios utilizando Glu.Ca al 10% mencionan que se puede mejorar la liberación de FC y la calidad del PRP (34,35). Estos estudios mostrados junto con nuestros resultados resaltan la importancia de la activación en el proceso de preparación del PRP ya que el Ca^{+2} es vital para la desgranulación de las plaquetas para liberar FC de los gránulos alfa

y permite la escisión del fibrinógeno lo cual es importante para la formación del gel plaquetario (36), por lo tanto, la adición de Glu.Ca podría ser una buena alternativa para la producción del PRP en el ámbito de la medicina regenerativa.

Es importante señalar que diversos factores pueden afectar el proceso de preparación del PRP y esto fue observado en nuestros hallazgos. La centrifugación es un factor importante ya que el aumento excesivo de la fuerza centrífuga daña las membranas de las plaquetas afectando la liberación de los FC (37). La CD también podría estar asociada a una sobreactivación plaquetaria pudiendo generar la pérdida de la integridad de la plaqueta (38). La liberación de los FC es multifactorial, dependiendo de diferentes factores como la variabilidad de las proteínas contenidas en las plaquetas, el grado de concentración, el tiempo, la velocidad y la activación, por lo que deben considerarse al momento de la preparación del PRP (25).

El PDGF es un FC liberado por las plaquetas e interviene en los procesos de cicatrización y reparación de tejidos, siendo su principal isoforma el BB la cual tiene como función principal la reparación y proliferación celular estimulando el proceso de angiogénesis y formación de colágeno jugando un papel importante en la curación de heridas (39). La Administración de Alimentos y medicamentos (FDA) menciona que este FC puede ser usado con seguridad aprobando sus formulaciones para el uso en el tratamiento de úlceras en pie y regeneración ósea (40), siendo este el motivo por el cual se utilizó su valoración para este estudio.

Nuestro estudio presenta limitaciones. En primer lugar, solo evaluamos las concentraciones de PDGF-BB en un momento puntual después de la activación, lo que no permite observar posibles variaciones a lo largo del tiempo por lo que es

posible que la liberación de PDGF-BB aumente o disminuya en etapas posteriores. En segundo lugar, no consideró otros factores de crecimiento relevantes que podrían haber sido liberados junto con el PDGF-BB durante la activación, lo cual podría ofrecer una visión más amplia del efecto del Glu.Ca 10%. En tercer lugar, no se realizaron análisis adicionales para evaluar si otros factores, como la degradación o el agotamiento del PDGF-BB debido a procesos oxidativos o proteolíticos, podrían haber afectado la concentración final. Por último, los tubos de ensayo de centrifugado se movilizaron del laboratorio del hospital hacia el laboratorio de investigación donde se procedió a hacer la cuantificación del PDGF-BB, este tiempo de espera para la separación podría haber disminuido la cantidad de PDGF-BB del PRP. A pesar de las limitaciones mencionadas, la fortaleza de este estudio radica en que es uno de los primeros en investigar el impacto del Glu.Ca 10% en la liberación de PDGF-BB en PRP en nuestro medio, ofreciendo una base sólida para futuras investigaciones sobre la optimización de protocolos para mejorar la funcionalidad del PRP en aplicaciones clínicas.

VI. CONCLUSIONES

- Nuestro estudio muestra que el Glu.Ca al 10% y el método de centrifugado utilizado afecta la liberación PDGF-BB en donantes de sangre.
- El método de CS con Glu.Ca 10% demostró mayor liberación de PDGF-BB con respecto al que no uso activador.
- El método de CD sin Glu.Ca 10% demostró mayor liberación de PDGF-BB con respecto al que se agregó activador.
- Al comparar los diferentes métodos se observó que la CS y el uso de Glu.Ca 10% mostró valores más elevados de PDGF-BB ($p < 0.05$)

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Van der Meijden, P, Heemskerk, J. Platelet biology and functions: new concepts and clinical perspectives. *Nat Rev Cardiol.*2019;16:166–179. <https://doi.org/10.1038/s41569-018-0110-0>
2. Arora S, Doda V, Kotwal U, Dogra M. Quantification of platelets and platelet derived growth factors from platelet-rich-plasma (PRP) prepared at different centrifugal force (g) and time. *Transfus Apher Sci Off J World Apher Assoc Off J Eur Soc Haemapheresis.* 2016; 54(1):103-10. doi: 10.1016/j.transci.2016.01.028
3. 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/>
4. Flaumenhaft R R.“Molecular basis of platelet granule secretion,” *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 2003;23(7):1152–1160.
5. 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
6. Popescu MN, Iliescu MG, Beiu C, Popa LG, Mihai MM, Berceanu M, Ionescu AM. Autologous Platelet-Rich Plasma Efficacy in the Field of Regenerative Medicine: Product and Quality Control. *Biomed Res Int.* 2021;2021:4672959. doi: 10.1155/2021/4672959.
7. Rodriguez A, Gisbert S, Palazón A, Alio J. Quantification of Growth Factors and Fibronectin in Diverse Preparations of Platelet-Rich Plasma for the

- Treatment of Ocular Surface Disorders (E-PRP). *Trans. Vis. Sci. Tech.* 2020;9(6):22. <https://doi.org/10.1167/tvst.9.6.22>.
8. Kon E, Buda R, Filardo G, Di Martino A, Timoncini A, Cenacchi A, Fornasari PM, Giannini S, Marcacci M. Platelet-rich plasma: intra-articular knee injections produced favorable results on degenerative cartilage lesions. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2010;18:472–479. doi: 10.1007/s00167-009-0940-8.
 9. Khatu SS, More YE, Gokhale NR, Chavhan DC, Bendsure N. Platelet-rich plasma in androgenic alopecia: myth or an effective tool. *J Cutan Aesthet Surg.* 2014 Apr;7(2):107-10. doi: 10.4103/0974-2077.138352.
 10. Pietrzak WS, Eppley BL. Platelet rich plasma: biology and new technology. *J Craniofac Surg.* 2005;16:1043–1054.
 11. Ogundipe OK, Ugboko VI, Owotade FJ, Paul-Odo B, Afariogun AB. Preparation of platelet-rich plasma from small volume of whole blood - a simplified approach. *Niger Postgrad Med J.* 2012;19(3):133–6
 12. Pavlovic V, Ciric M, Jovanovic V, Stojanovic P. Platelet Rich Plasma: a short overview of certain bioactive components. *Open Med (Wars).* 2016;11(1):242-247. doi: 10.1515/med-2016-0048.
 13. Nikolidakis D., Jansen J.A.. The biology of platelet-rich plasma and its application in oral surgery: literature review. *Tissue Eng. Part B Rev.* 2008;14:249–258.
 14. 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.

15. Marques L.F., Stessuk T., Camargo I.C., Sabeh Junior N., dos Santos L., Ribeiro-Paes J.T.. Platelet-rich plasma (PRP): methodological aspects and clinical applications. *Platelets*. 2015;26:101–113.
16. Kobayashi E, Flückiger L, Fujioka-Kobayashi M, et al. Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF. *Clin Oral Investig* 2016;20:2353–2360.
17. Eren G, Gürkan A, Atmaca H, Dönmez A, Atilla G. Effect of centrifugation time on growth factor and MMP release of an experimental platelet-rich fibrin-type product. *Platelets*. 2016 Feb 1;1–6
18. Smith OJ, Talaat S, Tomouk T, Jell G, Mosahebi A. An Evaluation of the Effect of Activation Methods on the Release of Growth Factors from Platelet-Rich Plasma. *Plast Reconstr Surg*. 2022;149(2):404-411. doi: 10.1097/PRS.00000000000008772.
19. Cavallo C, Roffi A, Grigolo B, Mariani E, Pratelli L, Merli G, Kon E, Marcacci M, Filardo G. Platelet-Rich Plasma: The Choice of Activation Method Affects the Release of Bioactive Molecules. *Biomed Res Int*. 2016;2016:6591717. doi: 10.1155/2016/6591717
20. Horgos MS, Pop OL, Sandor M, Borza IL, Negrean RA, Cote A, Neamtu A-A, Grierosu C, Sachelarie L, Huniadi A. Platelets Rich Plasma (PRP) Procedure in the Healing of Atonic Wounds. *Journal of Clinical Medicine*. 2023; 12(12):3890. <https://doi.org/10.3390/jcm12123890>.
21. 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.* 2022 May;16(2):424-429. doi: 10.1055/s-0041-1735930.
22. Masuki H, Okudera T, Watanebe T et al. Contenido de factores de crecimiento y citocinas proinflamatorias en plasma rico en plaquetas (PRP), plasma rico en factores de crecimiento (PRGF), fibrina rica en plaquetas avanzada (A-PRF) y factores de crecimiento concentrados (CGF) *Int J Implant Dent.* 2016; 2 (01):19.
23. Silva R, Santana G, Leme F, Carmona J, Rezende C. Release of transforming growth factor beta 1 and platelet derived growth factor type AB from canine platelet gels obtained by the tube method and activated with calcium salts. *Arch Med Vet.* 2013;4: 159-165.
24. Gentile P, Garcovich S. Systematic review-the potential implications of different platelet-rich plasma (PRP) concentrations in regenerative medicine for tissue repair. *Int J Mol Sci.* 2020;21(16):5702
25. Amable PR, Carias RB, Teixeira MV, da Cruz Pacheco I, Corrêa do Amaral RJ, Granjeiro JM, Borojevic R. Platelet-rich plasma preparation for regenerative medicine: optimization and quantification of cytokines and growth factors. *Stem Cell Res Ther.* 2013 Jun 7;4(3):67. doi: 10.1186/scrt218
26. Mazzocca AD, McCarthy MBR, Chowaniec DM, Cote MP, Romeo AA, Bradley JP, et al. Platelet-rich plasma differs according to preparation method and human variability. *J Bone Joint Surg Am.* 2012 Feb 15;94(4):308–16.
27. Weibrich G, Kleis WK, Buch R, et al. The Harvest Smart PRePTM system versus the Friadent-Schutze platelet-rich plasma kit. *Clin Oral Implants Res.* 2003;14:233–239.

28. Bausset O, Giraudo L, Veran J, Magalon J, Coudreuse J-M, Magalon G, et al. Formulation and storage of platelet-rich plasma homemade product. *BioResearch Open Access*. 2012 ;1(3):115–23.
29. Croisé B, Paré A, Joly A, Louisy A, Laure B, Goga D. Optimized centrifugation preparation of the platelet rich plasma: Literature review. *J Stomatol Oral Maxillofac Surg*. 2020 Apr;121(2):150-154
30. Jo CH, Roh YH, Kim JE, Shin S, Yoon KS. Optimizing platelet-rich plasma gel formation by varying time and gravitational forces during centrifugation. *J Oral Implantol*. 2013 ;39(5):525–32
31. Aro P, Peralta A, Nisi A, Lezama C, Palomino C, Bocangel W et al. Kinetics of the release of platelet-derived growth factor (PDGF-BB) derived from human umbilical cord platelet-rich plasma. *Revista de la Facultad de Medicina Humana*. 2024; 24(3):19-26
32. Lazo B. 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 de Postgrado para la obtención del título de Magister en Inmunología. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2022. Recuperado a partir: <https://repositorio.upch.edu.pe/handle/20.500.12866/12206>
33. Fukuda K, Kuroda T, Tamura N, Mita H, Kasashima Y. Optimal activation methods for maximizing the concentrations of platelet-derived growth factor-BB and transforming growth factor- β 1 in equine platelet-rich plasma. *J Vet Med Sci*. 2020 Oct 20;82(10):1472-1479

34. Franco D, Franco T, Schettino A M, Filho J M, Vendramin F S. Protocol for obtaining platelet-rich plasma (PRP), platelet-poor plasma (PPP), and thrombin for autologous use. *Aesthetic Plast Surg.* 2012;36(05):1254–1259.
35. Straum O K. The optimal platelet concentration in platelet-rich plasma for proliferation of human cells in vitro-diversity, biases, and possible basic experimental principles for further research in the field: a review. *PeerJ.* 2020;8:e10303
36. Wasterlain A. S., Braun H. J., Dragoo J. L. Contents and formulations of platelet-rich plasma. *Operative Techniques in Orthopaedics.* 2012;22(1):33–42.
37. Quach, M. E., Chen, W. & Li, R. Mechanisms of platelet clearance and translation to improve platelet storage. *Blood.*2018;131:1512–152
38. Lee JW, Kwon OH, Kim TK, Cho YK, Choi KY, Chung HY, Cho BC, Yang JD, Shin JH. Platelet-rich plasma: quantitative assessment of growth factor levels and comparative analysis of activated and inactivated groups. *Arch Plast Surg.* 2013;40(5):530-5. doi: 10.5999/aps.2013.40.5.530.
39. Calleja-Blanco S, Abaroa C, Molina C, Trincado M. Detection and Quantification of Platelet-Derived Growth Factor in Circulating Blood Concentrates vs Platelet-Rich Fibrin. *Journal of oral and Maxillofacial Surgery.* 2020;78(10):E96.
40. Borena BM, Martens A, Broeckx SY, Meyer E, Chiers K, Duchateau L, et al. Regenerative skin wound healing in mammals: state-of-the-art on growth factor and stem cell-based treatments. *Cell Physiol Biochem.* 2015; 36:1-23. doi: 10.1159/000374049.

41. Millpore. Sigma Aldrich. Certificate of Analysis/ Protocol Human PDGF-BB E LISA Kit; 20
42. Munawirah A, Esa T, Bahrin U. Analysis of Platelet Counts and Platelet-Derived Growth Factor-Bb Levels in Platelet Rich Plasma Produced with EDTA as Anticoagulant in Three Different Centrifugation Methods. Indian Journal of Public Health Research & Development. 2020; 11(6): 1204-1209. doi: 10.37506/ijphrd.v11i6.9964.

VIII. TABLAS, GRÁFICOS Y FIGURAS

FIGURA 1. Curva de calibración del estándar

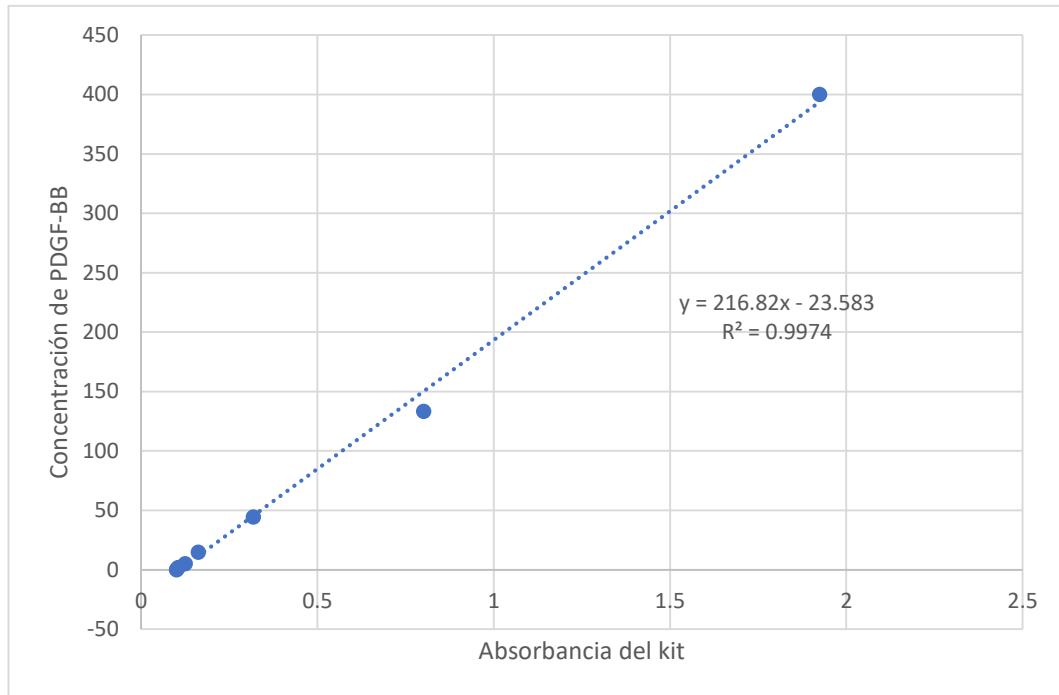


TABLA 1. Características sociodemográficas y de laboratorio del PRP obtenido a diferentes condiciones de centrifugado sobre la expresión del PDGF-BB

Características sociodemográficas	N (%)
Sexo	
Femenino	4 (36.4)
Masculino	7 (63.6)
Edad (años)*	33.5 ± 10.9
Hemoglobina (g/dL) *	14.5 ± 0.7
Plaquetas (10 ³ /μL) *	231.9 ± 47.0
Plaquetas PRP 1 (10 ³ /μL) *	478.8 ± 53.5
Plaquetas PRP 2 (10 ³ /μL) *	675.8 ± 47.6
PDGF-BB sin Gluconato de Calcio con CS (ng/mL) *	837.6 ± 4.3
PDGF-BB con Gluconato de Calcio con CS (ng/mL) *	842.7 ± 4.0
PDGF-BB sin Gluconato de Calcio con CD (ng/mL) *	389.3 ± 94.5
PDGF-BB con Gluconato de Calcio con CD (ng/mL) *	237.9 ± 88.5
*Media + Desviación estándar	

FIGURA 2. Concentración de PDGF-BB obtenido del PRP por CS sin y con Gluconato de calcio al 10%

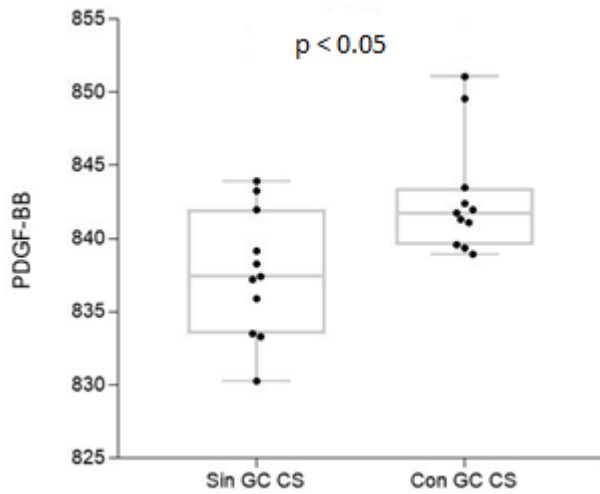


FIGURA 3. Concentración de PDGF-BB obtenido del PRP por CD sin y con Gluconato de calcio al 10%

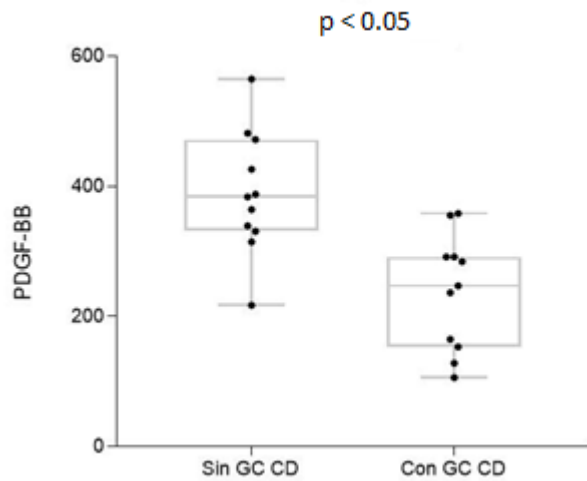
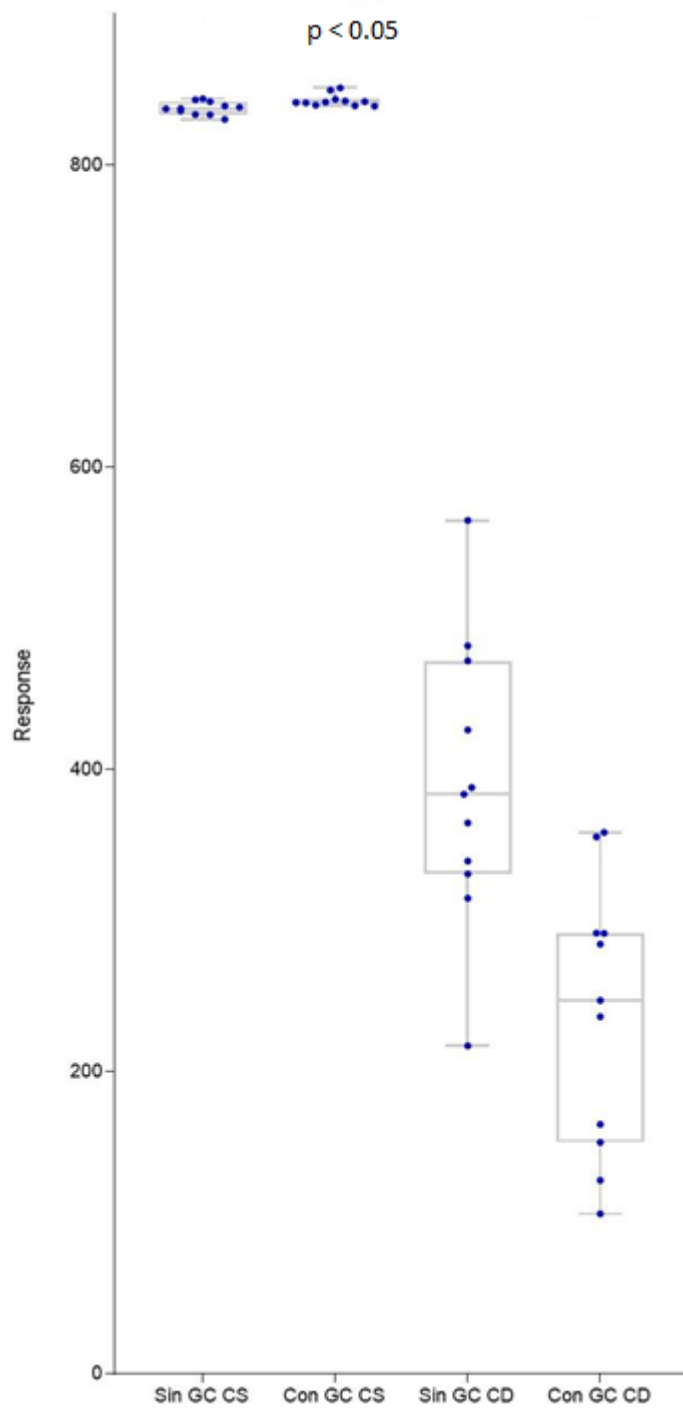


FIGURA 4. Relación entre la cantidad de PDGF-BB y el tipo de centrifugación usado



1. ANEXOS

ANEXO 1: CÁLCULO MUESTRAL

Tamaño de la muestra para comparar dos medias

Información de entrada

Intervalo de confianza (2 lados)	95%
Potencia	80%
Razón del tamaño de la muestra (Grupo2/ Grupo 1)	1

	Grupo 1	Grupo 2	Diferencia *
Media	155.2	54.4	100.8
Desviación estándar	57.67	28.95	
Varianza	3325.83	838.10	

Tamaño de muestra del grupo 1	4
Tamaño de muestra del grupo 2	4
Tamaño total de la muestra	8

ANEXO 2: CONSENTIMIENTO INFORMADO DE LOS DONANTES DE SANGRE

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN

(Adultos)	
Título del estudio:	Efecto del gluconato de calcio 10% en la activación del plasma rico en plaquetas obtenido a diferentes condiciones de centrifugado sobre la expresión del Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas-BB (PDGF-BB)
Investigador (a):	Contreras L, Guzman D, Muñoz S.
Institución:	Universidad Peruana Cayetano Heredia

Propósito del estudio:

Estimado participante, lo invitamos cordialmente a participar en un estudio de investigación que tiene como objetivo comparar el plasma rico en plaquetas (PRP) en dos velocidades diferentes para evaluar su efectividad en la cicatrización de heridas. Este estudio es desarrollado por investigadores de la Universidad Peruana Cayetano Heredia y del Servicio de Banco de Sangre del Hospital Cayetano Heredia.

El plasma rico en plaquetas (PRP) es una muestra de sangre que contiene una concentración aumentada de plaquetas y factores de crecimiento. Se ha demostrado que el PRP puede tener propiedades regenerativas y acelerar el proceso de

cicatrización en ciertos contextos clínicos. Además, a estas pruebas se le añadirá un compuesto químico llamado gluconato de calcio al 10% para ver el comportamiento del plasma rico en plaquetas y poder observar la liberación de estos factores de crecimiento. En este estudio, compararemos dos velocidades de preparación del PRP para determinar si existe alguna diferencia significativa, por lo cual es importante realizar este estudio.

Procedimientos:

Si decide participar en este estudio se realizará lo siguiente:

1. Se medirá la talla y peso del participante
2. Se obtendrá una muestra de sangre equivalente a 7 cc (media cucharada de sopa la cual será extraída de la bolsa de donación de sangre), para evaluar su hemograma y de allí procesar el PRP.
3. Se le entregará una ficha de recolección que tiene una duración aproximada de 10 minutos, dónde se deberá completar o marcar con un aspa según se indique

Riesgos:

La extracción de la muestra de sangre puede ocasionar una leve molestia y existe un riesgo muy bajo de infección si no se mantiene una higiene adecuada. Además, la toma de muestra en el antebrazo puede resultar en un pequeño hematoma (moretón) que desaparecerá en aproximadamente cinco días. Si se presentara alguna complicación en el área de extracción, se le proporcionará atención médica, orientación y seguimiento en caso de que sea necesario un tratamiento.

Algunos datos solicitados en la ficha de recolección podrían resultar incómodos para usted. Sin embargo, tenga en cuenta que tiene total libertad para decidir si desea responder o no a estas preguntas. Su privacidad y comodidad son de suma importancia para nosotros.

Beneficios:

Se le hará de conocimiento los valores de su hemograma, así como su explicación y/o absorber cualquier duda que presente. La información recolectada será de forma confidencial.

Costos y compensación

El costo del hemograma será cubierto por el estudio, por lo que no deberá de pagar nada. Igualmente, no recibirá ningún incentivo económico ni de otra índole, solo un refrigerio (una botella de agua y galleta) por el tiempo brindado.

Confidencialidad:

La información será guardada mediante códigos en lugar de nombres, de esta manera sus datos solo serán visibles para los investigadores. En caso de que sean publicados, no se mostrará ninguna información que permita su identificación al participar en este estudio.

USO FUTURO DE INFORMACIÓN

Deseamos almacenar los datos recaudados en esta investigación por 10 años. Estos datos podrán ser usados para investigaciones futuras. Esto lo pretenderíamos usar para comparar otras velocidades de centrifugación o diferentes activadores como el

gluconato, así como realizar comparaciones con otros hospitales de Lima Metropolitana o del interior del país.

Los datos almacenados no tendrán nombres ni otro dato personal, sólo serán identificables con códigos.


Si no desea que los datos recaudados en esta investigación permanezcan almacenados ni utilizados posteriormente, aún puede seguir participando del estudio. En ese caso, terminada la investigación sus datos serán eliminados.

Previamente al uso de sus datos en un futuro proyecto de investigación, este proyecto contará con el permiso de un Comité Institucional de Ética en Investigación.

Autorizo a tener mis datos almacenados por 10 años para un uso futuro en otras investigaciones. (Después de este periodo de tiempo se eliminarán).

SI () NO ()

Derechos del participante:

Si decide participar en el estudio, puede retirarse de este en cualquier momento, o no participar en una parte del estudio sin daño alguno. Si tiene alguna duda adicional, por favor pregunte al personal del estudio o llame al investigador *Luis Abraham Contreras Benites* al teléfono .

Si tiene preguntas sobre los aspectos éticos del estudio, o cree que ha sido tratado injustamente puede contactar al Dr. Manuel Raúl Pérez Martinot, presidente del Comité Institucional de Ética en Investigación de la Universidad Peruana Cayetano

Heredia al teléfono 01-3190000 anexo 201355 o al correo electrónico:
orvei.ciei@oficinas-upch.pe

Una copia de este consentimiento informado le será entregada.

DECLARACIÓN Y/O CONSENTIMIENTO

Acepto voluntariamente participar en este estudio, comprendo las actividades en las que participaré si decido ingresar al estudio, también entiendo que puedo decidir no participar y que puedo retirarme del estudio en cualquier momento.

Nombres y Apellidos

Fecha y Hora

Participante

Nombres y Apellidos

Fecha y Hora

**Testigo (si el
participante es
analfabeto)**


Nombres y Apellidos

Fecha y Hora

Investigador

ANEXO 3: MANTENIMIENTO PREVENTIVO CENTRIFUGA

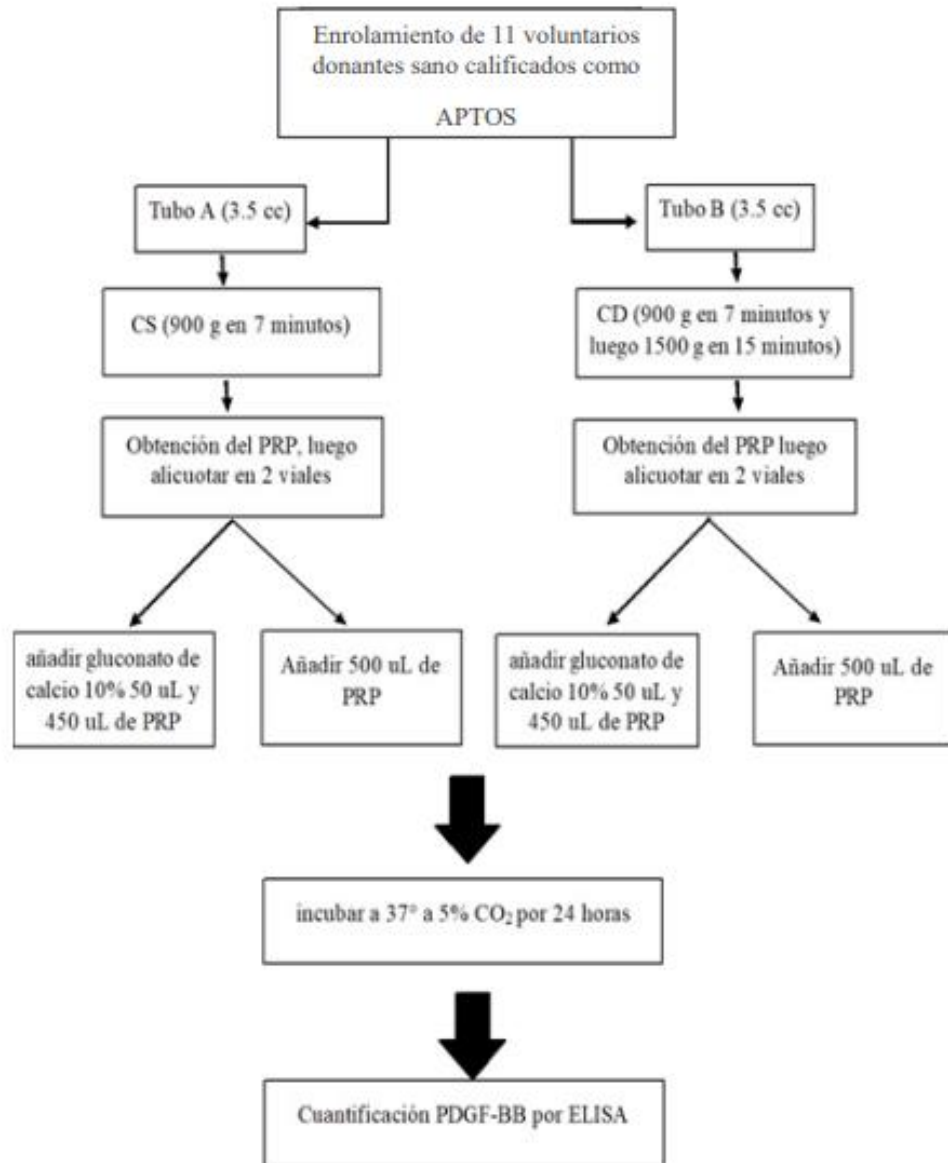
PLAN DE MANTENIMIENTO PARA EL SERVICIO DE HEMOTERAPIA Y BANCO DE SANGRE															
NOMBRE DEL EQUIPO	MARCA	SERIE	PATRIMONIO	ENERO	FEBRERO	MARZO	ABRIL	MAYO	JUNIO	JULIO	AGOSTO	SEPTIEMBRE	OCTUBRE	NOVIEMBRE	DICIEMBRE
MICROSCOPIO BINOCULAR	GREEMED	20150115GT116-201	S/N				X					X			
CENTRIFUGA DE MESA X 28 TUBOS	HERMLE Z326	65110079	P030637					X					X		
MICROCENTRIFUGA	CENTURION SCIENTIFIC	C2012-213304-3	P033826				X					X			
CENTRIFUGA DE MESA X 28 TUBOS	HERMLE Z326	7681900149	P042390						X					X	
CONSERVADOR DE PLAQUETAS	HELMER	PF960	P024863					X					X		


MINISTERIO DE SALUD
 HOSPITAL CAJETANO HEREDIA

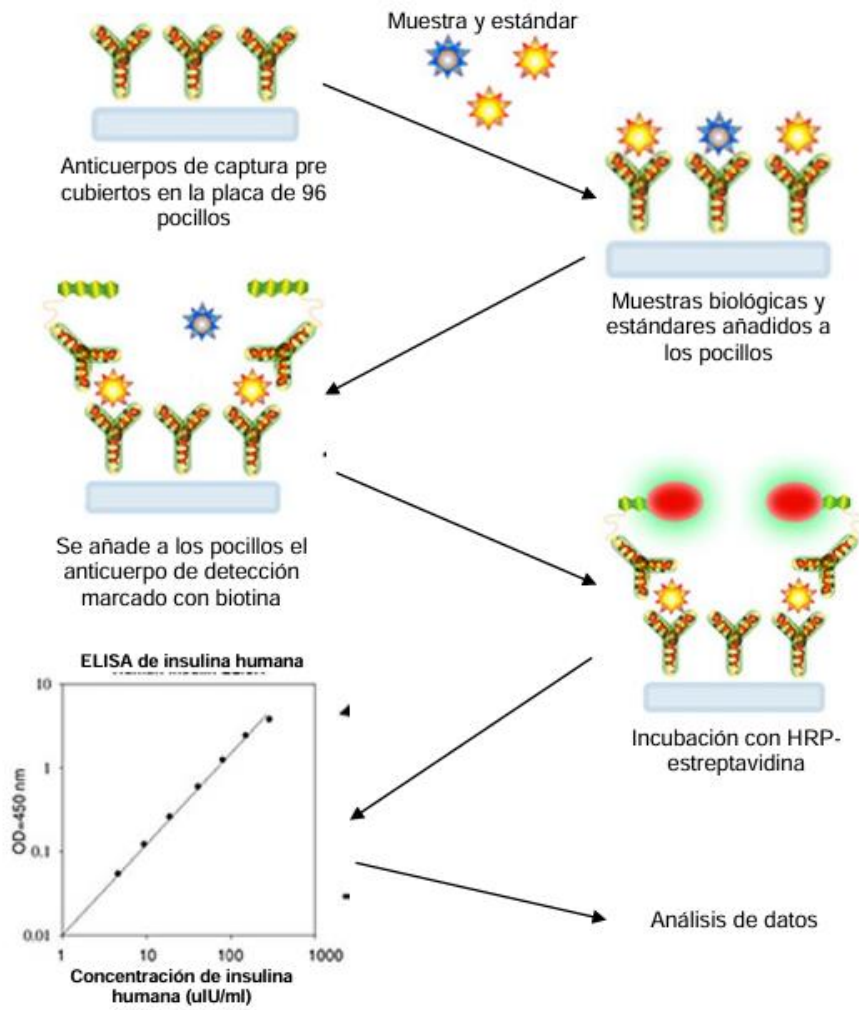
.....
MARGO VARGAS
 INGENIERO ELECTRONICO
 CIP. 252414
 UNIDAD DE SOPORTE BIOMEDICO



ANEXO 4: FLUJOGRAMA DE OBTENCIÓN DE PRP Y CUANTIFICACIÓN DE PDGF-BB



ANEXO 5: PRINCIPIOS DEL MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DEL PDGF-BB HUMAN KIT ELISA



Fuente: Imagen procedente de MILLPORE-SIGMA ALDRICH (35)

ANEXO 6: INSERTO DEL CERTIFICADO DE ANÁLISIS/PROTOCOLO

Kit ELISA de PDGF-BB humano para suero, plasma y sobrenadantes de cultivos celulares – Millipore (34)

Almacenamiento:

- Almacenar el kit -20°C, permanece activo hasta por un año,

Componentes:

1. Placa ELISA recubierta con anticuerpo PDGF-BB humano (Ítem A) - 96 pocillos (12 tiras x 8 pocillos) recubiertos con anti-PDGF-BB humano.
2. Buffer de lavado 20x (Ítem B)
3. Estándar de proteína PDGF-BB humana liofilizada (Ítem C)
4. Anticuerpo de detección de PDGF-BB humano biotinilado (Ítem F)
5. HRP-Estreptavidina (Ítem G)
6. Reactivo TMB colorimétrico ELISA (Sustrato HRP, ítem H)
7. Solución de parada ELISA (Ítem I)
8. ELISA 1x ensayo/muestra diluyente buffer A (Ítem D1) – 30 mL.
9. ELISA 5x ensayo/muestra diluyente buffer B (Ítem E1) - 30 mL.

PASO 1: Dilución del buffer

- El buffer diluyente de Ítem B debe diluirse 5 veces con agua destilada antes de su uso.

Volumen del Buffer: 25 mL

$$C_i * V_i = C_f * V_f$$

$$20x * 25 \text{ mL} = 1x * V_f$$

$$500 \text{ mL} = V_f$$

$$500 \text{ mL} - 25 \text{ mL} = 475 \text{ mL de agua destilada}$$

Paso 2: Dilución de muestra

- El buffer diluyente de ensayo-muestra A (Ítem D1), que se usa para muestras de suero y plasma, debe ser diluido 5 veces.

- 20 mL de Buffer A (Ítem D1)
- 80 mL de agua destilada

Volumen final: 100 mL

Paso 3: Preparación del standard

- Agregar 280 μl del diluyente de ensayo A al vial del Ítem C, para la preparación de un estándar a una concentración de 50 ng/mL.
- Disolver el polvo mezclando suavemente.
- Agregar 4 μL de estándar de PDGF-BB del vial Ítem C a un tubo con 496 μl de diluyente de ensayo A.
- Pipetear 400 μl de diluyente de ensayo A en cada tubo.

- Utilizar la solución Standard para producir una serie de diluciones como la Figura 5.
- Mezclar bien cada tubo antes de la próxima transferencia,
- El diluyente del ensayo A, sirve como estándar cero (0 pg/mL)

Figura 5. Gráfica de diluciones para preparación del estándar

Fuente: Imagen procedente de Millpore-Sigma Aldrich(35)

Paso 4: Preparación de detección biotinilada de anticuerpo

- Girar brevemente el vial de detección de anticuerpos (Ítem F) antes de usarlo
- Agregar 100 μ l de 1x de diluyente Buffer B (Ítem E1) en el vial para preparar un concentrado de anticuerpos de detección.
- Mezclar suavemente el concentrado con ayuda de la pipeta.
- Diluir 80 veces el concentrado de anticuerpos de detección con 1x de Buffer diluyente B (Ítem E1).

60 μ l de Ítem F

4740 μ l de Buffer B (Ítem E1)

Volumen final: 4800 μ l

Paso 5: Dilución del concentrado de Estreptavidina HRP

- Con ayuda de la pipeta mezclar el concentrado de Estreptavidina - HRP (Ítem G) ya que se pueden formar precipitados durante el almacenamiento.
- Diluir el concentrado 800 veces con 1 x de Diluyente Buffer (Ítem E1) (Agregar 20 µl de concentrado de estreptavidina -HrP en un tubo con 16 ml de 1 x Diluyente B).

Paso 6: Procedimiento de ensayo de sándwich

1. Llevar todos los reactivos y muestras a temperatura ambiente (18-25°C) antes de su uso, Se recomienda un análisis por duplicado.
2. Agregue 100 µl de cada estándar y muestrear en los pozos apropiados. cubrir los pocillos e incubar durante 2,5 horas a temperatura ambiente.
3. Desechar la solución y lavar 4 veces con 1x Wash solution. Lavar llenando cada pocillo con tampón de lavado (300 µl) usando una pipeta multicanal o un autolavado. La eliminación completa de líquido en cada paso es esencial para un buen rendimiento. Después del último lavado, eliminar cualquier resto de buffer de lavado aspirando o decantando. Invertir la placa y secarla con papel limpio.
4. Agregar 100 µl del anticuerpo de detección preparado 1x a cada pocillo. Cubrir los pocillos e incubar durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación suave.
5. Desechar la solución. Repetir el lavado con el paso 3.
6. Agregar 100 µl de solución de estreptavidina preparada a cada pocillo. Cubrir los pocillos e incubar durante 45 minutos a temperatura ambiente con agitación suave.

7. Desechar la solución. Repetir el lavado como en el paso 3.
8. Agregar 100 μ l de reactivo de sustrato de un solo paso TMB (Ítem H) a cada pocillo. Cubrir los pocillos e incubar 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad con agitación suave.
9. Agregar 50 μ l de solución de parada (Ítem H) a cada pocillo. Leer la absorbancia a 450 nm inmediatamente.

ANEXO 7. FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Código:			
Edad:		Sexo: masculino () femenino ()	
Numero de plaquetas			
Pre-centrifugación			
Post- CS			
Post- CD			
PDGF-BB			
CS		CD	
Sin activador	Con activador	Sin activador	Con activador

ANEXO 8. APROBACIÓN DEL COMITÉ DE ÉTICA DEL HOSPITAL CAYETANO HEREDIA.



PERÚ

Ministerio
de Salud

Viceministerio
de Prestaciones y
Aseguramiento en Salud

Hospital Nacional
Cayetano Heredia

"Año del Bicentenario, de la consolidación de nuestra Independencia, y de la conmemoración de las heroicas batallas de Junín y Ayacucho".

CONSTANCIA N° 077-2024

EL PRESIDENTE DEL COMITÉ INSTITUCIONAL DE ÉTICA EN LA INVESTIGACIÓN
DEL HOSPITAL NACIONAL CAYETANO HEREDIA,

CERTIFICA:

Que el Trabajo de Investigación de la REF: "Efecto del gluconato de calcio 10% en la activación del plasma rico en plaquetas obtenido a diferentes condiciones de centrifugado sobre la expresión del Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas-BB (PDGF-BB)". Inscrito con Código 027-2024. Presentado por el Sr. Luis Abraham Contreras Benites Investigador Principal ha sido revisado y APROBADO por este Comité, en sesión de fecha 04 de abril de 2024.

Esta aprobación tendrá vigencia hasta el 03 de abril de 2025. Los trámites para su renovación deberán iniciarse por lo menos 30 días antes de su vencimiento.

Participaron en la sesión los siguientes miembros, quienes no presentan conflictos de interés (Según Reglamento del CIEI HNCH año 2023 versión 20 de octubre 2022 - Art. 64, mínimo de participantes para quorum: 05 miembros titulares):

- Dr. Juan Carlos Ismodes Aguilar
- Q.F. Mercedes Jacqueline Portocarrero Reátegui
- Dr. Javier Renato Puma Medina
- Dr. Luis Eduardo Cano Jon
- Psic. Liliانا Isabel Cuya Cayo
- Bach. Der. Roberto Hugo Sedano Sedano
- Ing. Ruth Damariz Benito Matias
- Sr. José Leónidas Orcón Bernal

Lima, 04 de abril del 2024

MINISTERIO DE SALUD
HOSPITAL CAYETANO HEREDIA
Dr. JUAN CARLOS ISMODES AGUILAR
PRESIDENTE
COMITÉ INSTITUCIONAL DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN



BICENTENARIO
DEL PERÚ
2021 - 2024

www.hospitalcayetano.gob.pe

Av. Honorio N° 262
Urb. Ingeniería
San Martín de Porres
Lima 31, PERU
Telf.: 482-0402
481-9502

ANEXO 9. APROBACIÓN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA.



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

CONSTANCIA-CIEI-116-11-24

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, bajo la categoría de revisión **EXPEDITA**.

Título del Proyecto : "Efecto del gluconato de calcio 10% en la activación del plasma rico en plaquetas obtenido a diferentes condiciones de centrifugado sobre la expresión del Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas-BB (PDGF-BB)"

Código SIDISI : 212408

Investigador(a) principal(es) : Contreras Benites Luis Abraham
Guzman Gutierrez Dante Amilcar
Muñoz Ramos Sergey Summer

La **aprobación** incluyó los documentos finales descritos a continuación:

1. **Protocolo de investigación, versión 3 de fecha 03 de Marzo del 2024.**
2. **Consentimiento informado, versión 3 de fecha 03 de Marzo del 2024.**

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 el **Viernes 07 de marzo del 2025**.

El presente proyecto de investigación sólo podrá iniciarse después de haber obtenido la(s) autorización(es) de la(s) institución(es) donde se ejecutará.

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

Lima, 07 de marzo del 2024



Manuel Raul Perez Martinot
Presidente
Comité Institucional de Ética en Investigación
Universidad Peruana Cayetano Heredia

ANEXO 10. Operacionalización de variables

Variables	Definición conceptual	Definición operacional	Indicador	Tipo de variable	Escala de medición
PDGF-BB	Factor de crecimiento que estimula la migración de fibroblastos y síntesis de colágeno			Dependiente	De razón
Gluconato de calcio al 10%	Sustancia que contiene calcio el cual es usado en la activación plaquetaria	Se definirá basado según uso de gluconato de calcio al 10%	0=sin activador 1= activador	Independiente	Dicotómica
Edad	Tiempo cronológico de vida que ha vivido una persona	Años	Años	Cuantitativa	De razón
Sexo	Característica biológica que divide al ser humano en hombre y mujer	Definido como masculino y femenino	0=Masculino 1=Femenino	Categorica	Dicotómica
Número de plaquetas	Cantidad de plaquetas obtenidas en una muestra de sangre.	Se definirá según la medida número de plaquetas obtenido luego de cada proceso de centrifugación	0=pre-centrifugación 1= 1ra centrifugación 2= 2da centrifugación	Cuantitativo	De razón
Centrifugación	Técnica que se utiliza para separación celular utilizando diferentes velocidades		0= 1ra centrifugación 1= 2da centrifugación	Categorica	Dicotómica