



**MÉTODO DE DESHIDRATACIÓN PARA EL ANÁLISIS DEL PLASMA RICO EN FIBRINA
MEDIANTE MICROSCOPIA ELCTRÓNICA DE BARRIDO (MEB).**

Andreina Paredes¹, Oriana Ortega¹, Gladys Velazco², Ana Julia González², Eduvigis Solórzano².

- 1. Odontólogo Egresado. Facultad de Odontología, Universidad de Los Andes, Mérida Venezuela**
- 2. Laboratorio Integrado de Biología Molecular y Celular, Facultad de Odontología Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela**

Correspondencia: Gladys Velazco. Centro de Investigaciones Odontológicas. Facultad de Odontología. Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.

Email: gvelazco@ula.ve

RESUMEN

El Plasma Rico en Fibrina es una modificación con respecto a los tradicionales preparados de PRP, éste posee las mismas propiedades regeneradoras de tejidos. Se han utilizado varias técnicas para observar la ultraestructura de compuestos biológicos una de ellas es la microscopia electrónica de barrido (MEB), la cual requiere del tratamiento previo de los biomateriales con el fin de lograr su deshidratación. El objetivo de la investigación fue analizar tres métodos de desecación para el estudio ultraestructural del PRF por MEB. El coágulo de fibrina se seccionó en tres partes. Las muestras fueron sometidas a un proceso de deshidratación: papel absorbente (muestra 1), inmersión en acetona (muestra 2) e inmersión en etanol (muestra 3); la placa con las muestras fue introducida en un Recubridor Iónico durante 100 segundos, para hacer conductiva la superficie y aumentar la reflectividad electrónica, posteriormente se introdujeron las muestras al microscopio electrónico de barrido. El tratamiento de desecación en la muestra 1 reveló una mejor organización de las fibras sin evidencias de daño estructural comparándolo con la muestra 3 cuyas fibras adquirieron una forma aplanada que pudiera sugerir un estado de degradación del ensamble fibrilar, y muy diferente al tratamiento



de la muestra 2 en donde se observó una reducción drástica del tamaño de las fibras. Los resultados demuestran que se observa mejor estructura cuando la muestra se somete a tratamientos menos agresivos de desecación ya que se conserva en su totalidad la integridad estructural de todos los componentes celulares presentes.

PALABRAS CLAVE: Regeneración ósea, Plasma Rico en Fibrina, Plasma Rico en Plaquetas, biomateriales, microscopía electrónica de barrido.

DEHYDRATION METHOD FOR ANALYSIS BY RICH PLASMA FIBRIN SCANNING ELECTRON MICROSCOPY (SEM).

ABSTRACT

The plasma rich in fibrin (PRF) is a modification with respect to the traditional prepared of PRP, they have regenerative properties of human tissues. Several techniques have been used to observe the ultrastructure of biological compounds, one of them is the scanning electron microscopy (SEM). The objective of the research was to analyze three methods of dewatering the PRF for the ultrastructural study by SEM. The fibrin clot was sectioned in three parts and the samples were subjected to a process of dehydration in the following way: absorbent paper (sample 1), immersion in acetone (sample 2) and immersion in ethanol (sample 3), the plate with the samples was introduced into an Ion Coater for 100 seconds, because makes the surface of the fibrin conductive, after this the samples were introduced in the electronic microscope. The treatment of dewatering to the sample 1 showed a better organization of the fibres without evidence of structural damage compared to the sample 3 whose fibres acquired a flattened shape that might suggest a state of degradation and very different from the treatment to the sample 2 in where it was observed a drastic reduction of the size of the fibres. The results show that there is better structure when the sample is subjected to less aggressive treatment of dewatering and preserved in its entirety the structural integrity and all cell components present.

KEYWORDS: Bone regeneration, Rich Plasma Fibrin, Platelet Rich Plasma, biomaterials, scanning electron microscopy

INTRODUCCIÓN

Las plaquetas aisladas de sangre periférica contienen un elevado número de factores de crecimiento, que pudieran ser aplicados como coadyuvante en la curación de los tejidos duros y blandos. Una forma de conseguir concentrados plaquetarios autólogos y por ende factores de crecimiento, es el Plasma Rico en Plaquetas (PRP), que se obtiene a partir de sangre periférica, éste se añade a las heridas quirúrgicas, injertos y otras lesiones para acelerar la regeneración de los tejidos y la neoformación ósea (1).

Otro tipo de concentrado plaquetario es el Plasma Rico en Fibrina (PRF), que no es más que una mejoría con respecto a los tradicionales preparados de PRP, y que posee las mismas propiedades regenerativas y curativas que se obtienen de los factores de crecimiento (1).

Se han utilizado varias técnicas para observar la ultraestructura de compuestos biológicos en el campo de la investigación, una de ellas es la microscopía electrónica de barrido, la cual es asequible, pero requiere del sometimiento de las muestras a tratamientos previos con el fin lograr su deshidratación para así evitar distorsiones en las imágenes reales, especialmente en casos de materiales biológicos con alto contenido de humedad (2).

El estudio ultraestructural de las muestras biológicas como el PRP o el PRF, presenta una desventaja ya que dichas muestras son malas conductoras de iones lo que dificulta su análisis por microscopía electrónica (3). Una alternativa para lograr su observación es emplear un método de pretratamiento de la muestra para eliminar el

exceso de líquido, es por ello que el objetivo de este trabajo fue analizar tres métodos de desecación para el estudio ultraestructural del PRF por microscopía electrónica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se tomó una muestra de sangre periférica para la obtención del PRF, siguiendo el protocolo establecido por Choukroun y col (4). El análisis ultraestructural de las muestras de PRF se realizó en el Laboratorio de Análisis Químico y Estructural de Materiales (LAQUEM) de la Facultad de Ciencias en la Universidad de los Andes en un microscopio electrónico de barrido marca *HITACHI S 2500*. Para comenzar con la preparación de la muestra y realizar un correcto manejo de la misma, el coágulo de fibrina se seccionó en tres partes, cada una de 2mm aproximadamente. Las muestras fueron sometidas a un proceso de deshidratación, para eliminar el exceso de líquido de la forma siguiente: papel absorbente (muestra 1), inmersión en acetona (muestra 2) e inmersión en etanol (muestra 3). Posteriormente, se colocaron en una placa portadora de objetos sobre un trozo de grafito (carbón) el cual sirvió como conductor de iones (Figura 1).



Figura 1. Placa con las muestras preparadas.

La placa con las muestras fue introducida en un Recubridor Iónico (blanco de oro puro), marca SPI-MODULE Sputter Coater, durante 100 segundos para su recubrimiento con oro, logrando un grosor de 300 Åmstrong (Figura 2), éste metalizado es indispensable porque hace conductiva la superficie, elimina la actividad estática, minimiza el daño por radiación y aumenta la reflectividad electrónica (5). Finalmente, las muestras fueron introducidas en el microscopio electrónico de barrido para su análisis.



Figura 2. Placa con las muestras recubiertas en oro.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A una magnificación de 100X del coágulo de PRF desecado con papel absorbente (muestra 1) se observó una superficie lisa y bordes irregulares, en la parte central se encuentra una zona con fibrillas entrelazadas dando un aspecto de nudo (Figura 3a). Al magnificar esa zona (500X), se visualizó un haz de de la que derivan múltiples haces de menor grosor compatible con la red de fibrina (Figura 3b); mientras que a una mayor

magnificación de la zona (2500X) se evidenció una arquitectura homogénea compacta con aspecto de malla, resaltando la presencia de pequeñas partículas irregulares que pudieran ser compatibles con plaquetas (A) (Figura 3c).

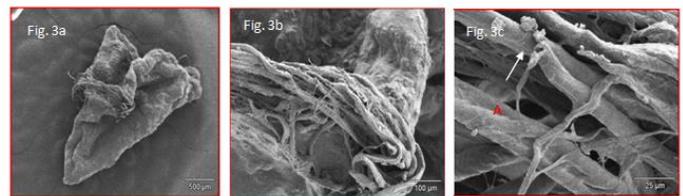


Figura 3. Coágulo de fibrina (100x); 3b) Coágulo de fibrina (500x); 3c) Coágulo de fibrina a una resolución de 2500X partículas sugestiva de plaqueta (A)

En la muestra 2 desecada con acetona, a una magnificación de 100X el coágulo de fibrina se observó con una superficie rugosa, erosionada y de bordes irregulares, en su totalidad, En el extremo superior se evidencia un conglomerado celular (Figura 4a), en la cual a mayor magnificación (500X) se distinguen estructuras celulares compatibles con: plaquetas (A), células blancas (B) y hematíes (C) (Figura 4b), por otro lado a un mayor acercamiento (2500X), en la misma zona se observaron elementos celulares parcial o totalmente deshidratados, llama la atención un elemento celular de forma regular y superficie porosa que es de tamaño mayor al resto de los componentes celulares, características que probablemente sean de una célula blanca (A), vale la pena acotar que en el borde superior de este elemento se observa una conformación similar a la de la membrana celular cuya característica principal es la bicapa lipídica (B), por otra parte se encuentran elementos redondeados de superficie

cóncava de aspecto poroso que pudieran ser compatibles con hematíes (C); todos ellos adosados a una red de fibrina (Figura 4c).

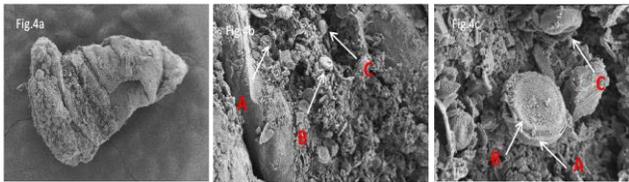


Figura 4. Microfotografía electrónica de barrido del coágulo de fibrina deshidratado con acetona. 4a) Coágulo de fibrina (100x); 4b) Coágulo de fibrina con presencia de elementos celulares compatibles con plaquetas (A), células blancas (B) y hematíes (C) (500x); 4c) Coágulo de fibrina, imágenes compatibles con: elemento celular en estado de deshidratación (A) que muestra membrana bilipídica (B) y un hematíe (C) (2500x).

En la muestra 3, el PRF tratado con etanol a una magnificación de 100X demuestra una superficie lisa de bordes irregulares dando aspecto de estructura de planos en tres dimensiones, en el borde inferior derecho se evidenciaron pequeños hilos compatibles con redes de fibrina (Figura 5a); a un mayor acercamiento (500X), en dicha zona, la MEB mostró numerosas fibras aplanadas entrelazadas dando aspecto de red (A), que se posicionan perpendicularmente sobre una superficie lisa de forma tubular (Figura 5b), por otro lado, a una magnificación de 2500X, en la misma zona se observaron las fibras de forma aplanadas entrelazadas dando aspecto de malla, en la cual se encuentran adosadas pequeñas estructuras irregulares que pudieran ser compatibles con plaquetas

sanguíneas (A) (Figura 5c), se puede deducir que las fibras se encontraron aplanadas producto del tratamiento realizado con el etanol.

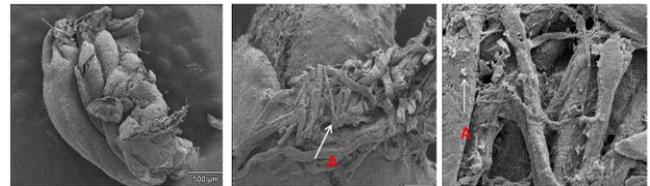


Figura 5. Microfotografía electrónica de barrido del coágulo de fibrina deshidratado con etanol. 5a) Coágulo de fibrina (100x); 5b) Coágulo de fibrina, red fibrilar (A) (500x); 5c) Coágulo de fibrina, elemento celular compatible con plaquetas (A) (2500x).

En resumen, el tratamiento de desecación con papel absorbente (muestra 1) mostró una mejor organización de las fibras sin evidencias de daño estructural comparándolo con el de etanol (muestra 3) cuyas fibras adquirieron una forma aplanada que pudiera sugerir un estado de degradación del ensamble fibrilar, y muy diferente al tratamiento con acetona en donde se observó una reducción drástica del tamaño de las fibras (6) debido al proceso de desecación al que fueron sometidas. Por otro lado, en la muestra 2 se evidenció la presencia de células sanguíneas (plaquetas, células blancas y hematíes) debido a que el corte se realizó cercano a la franja inferior del coágulo donde el concentrado celular es mayor (1).

En las muestras analizadas se evidenciaron variaciones, tanto en la arquitectura, forma y elementos celulares encontrados en el biomaterial, estos resultados presentan concordancia con el estudio de Lauricella, 2007 (6),



quien afirma que la fibrina evaluada por microscopia electrónica de barrido puede tener características ultraestructurales variables, ya que la red fibrilar no es igual en todos los casos, debido a que por diversas condiciones fisiológicas se manifiestan diferencias en la malla de fibrina, tales como la arquitectura global que puede ser homogénea o heterogénea, se pueden o no cuantificar las ramificaciones y diferenciar los componentes celulares.

En el análisis, se comprobó que las muestras sometidas a los diferentes tratamientos de desecación, se comportaron de manera distinta, sin embargo, en todas se observan características microscópicas importantes (7).

CONCLUSION

Los resultados obtenidos demuestran que para el análisis ultra estructural de la red fibrilar utilizando MEB no se requiere de ningún solvente específico, ya que su organización y forma se observaron de manera mas conservada en la muestra 1, donde solo se eliminó el exceso de líquido utilizando papel absorbente.

REFERENCIAS

1. Sunitha, V; Munirathnam, E. Plasma Rico en Fibrina. Evolución de una segunda generación de concentrados plasmáticos. Indian J Dent Res. 2008; 19:42-46.
2. Ramírez R, González A, Gómez D, Trinidad A, Ibañez A, García J, Verdaguer J, González J, San

Román J. Microscopia electrónica de barrido ambiental para la detección de biopelículas en las amígdalas. Acta Otorrinolaringol. Esp. 2008; 59 (01): 16-20

3. Arellano L, Velazco G, Ortiz R, Bustillos L. Evidencia microscópica de *candida albicans* en una resina resiliente para rebase de dentaduras. Odous científica. 2009 1 (1): 18-25.
4. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J, Gogly B. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2006; 101(3):37-44.
5. Velazco G, Ortiz R, González A. Nuevas terapéuticas para regeneración ósea a base de hidroxiapatita y quitosano. Acta Microscopica. 2011; 20 (Suplemento A): 1-4. Disponible en: <http://www.actamicroscopica.org>
6. Lauricella A. Variabilidad de la redes de fibrina. Acta Bioquím Clín Latinoam 2007; 41 (1): 7-19.
7. Lizarbe M. Sustitutos de los tejidos: de los biomateriales a la ingeniería tisular. Rev.Real.Acad.Cienc.Exact.Fis.Nat. 2007; 101 (1): 227-249.