

Acosta AP, Gutiérrez SJ, Bedoya MA, García DA, Moreno XE. Evaluación del efecto del plasma rico en plaquetas en diferentes tiempos y concentraciones sobre la proliferación de fibroblastos de ligamento periodontal y osteoblastos. Univ Odontol. 2017 Ene-Jun; 36(76). <https://doi.org/10.11144/Javeriana.uo36-76.eepr>

SECCIÓN: Ciencias Básicas, Biotecnología y Bioinformática
TITULILLO: Plasma rico en plaquetas y viabilidad celular

Evaluación del efecto del plasma rico en plaquetas en diferentes tiempos y concentraciones sobre la viabilidad de fibroblastos de ligamento periodontal y osteoblastos

Evaluation of Platelet-Rich Plasma Effect at different times and concentrations on periodontal ligament fibroblast and osteoblast viability

Adriana Paola Acosta Gómez

Odontóloga, especialista en Periodoncia, profesora asistente, investigadora, Centro de Investigaciones Odontológicas, Facultad de Odontología, Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.

Sandra Janeth Gutiérrez Prieto

Odontóloga, magistra en Ciencias Biológicas, doctora en Ciencias Biológicas, docente investigadora, Centro de Investigaciones Odontológicas, Facultad de Odontología, Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.

María Alexandra Bedoya Mejía

Odontóloga, especialista en Endodoncia, magistra en Ciencias Biológicas, docente instructora, Centro de Investigaciones Odontológicas, Facultad de Odontología, Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.

Dabeiba Adriana García Robayo

Bacterióloga. magistra en Microbiología, doctora en Ciencias Biológicas, profesora asistente, investigadora. Centro de Investigaciones Odontológicas, Facultad de Odontología, Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.

Ximena Edilia Moreno Serrano

Odontóloga, residente Posgrado Periodoncia, Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

Acosta AP, Gutiérrez SJ, Bedoya MA, García DA, Moreno XE. Evaluación del efecto del plasma rico en plaquetas en diferentes tiempos y concentraciones sobre la proliferación de fibroblastos de ligamento periodontal y osteoblastos. Univ Odontol. 2017 Ene-Jun; 36(76): __. <https://doi.org/10.11144/Javeriana.uo36-76.eepr>

Recibido para publicación: 30/06/2016

Aceptado para publicación: 17/06/2017

Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/universitasodontologica>

RESUMEN

Antecedentes: Los factores de crecimiento utilizados en salud se pueden obtener de una fuente autóloga de primera generación llamada plasma rico en plaquetas (PRP). La diversidad de protocolos para prepararlos genera resultados variables en cuanto al tiempo entre la activación del PRP y sus efectos sobre la proliferación y viabilidad celular. **Objetivo:** Evaluar proliferación y viabilidad celular de fibroblastos de ligamento periodontal y osteoblastos tratados con PRP en diferentes concentraciones y tiempos de aplicación. **Métodos:** Se cultivaron líneas celulares de fibroblastos y osteoblastos y se preparó el PRP de sangre venosa de un adulto sano mediante centrifugación, seguido de activación con CaCl_2 al 10 %. El efecto sobre la proliferación de las líneas celulares, tras la aplicación de PRP y plasma pobre en plaquetas al 1 %, 3 % y 5 % se evaluó a las 0, 12, 24, 48 y 72 horas después de su activación mediante MTS. El grupo control consistió en cultivos sin tratamiento. Los datos se analizaron mediante las pruebas de Chi cuadrado, Fischer y McNemar. **Resultados:** Se observó un aumento de la viabilidad en células tratadas con PRP a las 24 horas después de su activación en una concentración del 5 %. El ensayo de viabilidad celular mostró diferencias estadísticamente significativas entre el grupo experimental y el grupo control ($p = 0,05$). **Conclusión:** Los cultivos de fibroblastos y osteoblastos mostraron una tendencia a mayor viabilidad a las 24 horas posterior a la activación con PRP al 5 %.

PALABRAS CLAVE

cultivos celulares; fibroblasto de ligamento periodontal; in vitro; osteoblasto; plasma rico en plaquetas; proliferación celular; viabilidad celular

AREAS TEMÁTICAS

biología molecular; periodoncia

ABSTRACT

Background: Growth factors used in health treatments can be obtained from a first-generation source called platelet-rich plasma. The variety of protocols to prepare PRP produces variable results regarding PRP activation time and its effects on cell proliferation and viability. **Purpose:** To evaluate proliferation and cell viability of periodontal ligament fibroblasts and osteoblasts stimulated with PRP in several concentrations and times after PRP activation. **Methods:** An in vitro study was carried out using periodontal ligament fibroblast and osteoblast cell cultures. PRP from venous blood of a healthy adult was prepared through centrifugation and activated with 10 % CaCl₂. The effect on cell proliferation after application of 1 %, 3 %, and 5% PRP and platelet-poor plasma was evaluated at 0, 12, 24, 48, and 72 hours after activation through MTS. The control group consisted of culture that did not receive any treatment. Data were analyzed using Chi square, Fisher, and McNemar tests. **Results:** The cell viability assay showed statistically significant differences between the experimental and the control groups. Cell viability increased in cells treated with 5 % PRP 24 hours after activation (p=0.05). **Conclusions:** Fibroblast and osteoblast cell lines tended to be more viable 24 hours after activation with 5% PRP.

KEYWORDS

cell cultures; cell proliferation; cell viability; in vitro; osteoblast; platelet-rich plasma;
periodontal ligament fibroblast

THEMATIC FIELDS

molecular biology; periodontics

INTRODUCCIÓN

En la enfermedad periodontal, la interacción entre los diferentes microorganismos patógenos y la respuesta inmune del huésped susceptible es una de las causas principales de la afección del periodonto de protección y de inserción. Dicha interacción produce secuelas en el epitelio de unión, el ligamento periodontal, el cemento radicular y el hueso alveolar (1-3). De ahí que el objetivo fundamental del tratamiento es lograr la regeneración de estos tejidos (4-12), un proceso biológico complejo que involucra proteínas de la matriz y procesos de crecimiento, migración y diferenciación celular, en los cuales están involucrados diferentes factores de crecimiento (6-11,13). Los derivados sanguíneos que contienen plaquetas son una fuente importante de factores de crecimiento para los cuales a la fecha no existe consenso con respecto a la terminología, caracterización y clasificación (4,7-9,14-25).

Los factores de crecimiento obtenidos de las plaquetas se utilizan en diferentes áreas de la medicina y la odontología desde su primera aplicación en 1980 para el tratamiento de úlceras cutáneas (14,16,23,26-30). Estos se concentran en el plasma rico en plaquetas (PRP), un derivado sanguíneo concentrado de primera generación que se obtiene mediante centrifugación de sangre total y se caracteriza por poseer una concentración 4 a 6 veces mayor que los valores normales de las plaquetas por mililitro (8,16,30,31). Se han descrito diversas aplicaciones del PRP en oftalmología, otorrinolaringología, odontología, medicina estética y regenerativa; sin embargo, su utilidad no se ha demostrado completamente debido a la heterogeneidad en los diseños experimentales y, por ende, los resultados no son comparables (16,23,26-33). La gran cantidad de factores de crecimiento contenidos en los gránulos plaquetarios y su capacidad de síntesis de *novo* de proteínas, así como su actividad microbicida y moduladora de la inflamación, favorecen la proliferación celular y la síntesis de matriz extracelular. Así se promueve la cicatrización y la reparación de heridas y otras lesiones tisulares (3-9). Marx en 1986 fue el primero en describir el uso del PRP en la colocación de injertos óseos en cirugía maxilofacial y desde esa época se le atribuyeron propiedades fundamentadas en la capacidad que tiene de incrementar la regeneración ósea al ser utilizado junto con injertos de hueso (31). No obstante, su uso ha sido inconstante y los resultados variables, debido a la diversidad en las técnicas de preparación y utilización.

Los factores de crecimiento identificados en el PRP son el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF A y B en sus diferentes formas), el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), el factor de crecimiento semejante a la insulina, el factor de crecimiento fibroblástico, factor de crecimiento endotelial y el factor de crecimiento epidérmico (7,9,16,18,23,24,30,31,34-36). Estos se liberan al momento de su procesamiento mediante cloruro cálcico o trombina

(15,30,37-39). Aunque se ha reportado que el tiempo de aplicación del PRP debe ser antes de las 24 horas, no se conoce el tiempo ideal posterior a su procesamiento para la aplicación en el paciente, ni la concentración óptima, de tal forma que estimule la mayor proliferación en células del tejido conectivo como fibroblastos u osteoblastos. Tales células son numerosas en el periodonto y son las responsables de la producción de la matriz orgánica de los tejidos que lo constituyen (3,4,38,40). Los osteoblastos y los fibroblastos producen colágeno, el mayor componente de la matriz, y por esto están implicados en el proceso de regeneración tisular (7,13,41).

Acosta y colaboradores en investigaciones publicadas en 2006 y 2010 observaron una tendencia a un aumento en la proliferación celular hacia las 24 horas posterior a la activación de PRP en fibroblastos gingivales (42,43). Sin embargo, no se conoce la respuesta celular a diferentes tiempos después a su activación. Diversos estudios han evaluado el uso del PRP en diferentes concentraciones que fluctúan entre 0,05 % y 100 % (8,34,35,37,44,45) y sus resultados son heterogéneos.

Por otra parte, también existe el plasma pobre en plaquetas (PPP) que tiene una concentración relativamente baja de plaquetas. El PPP se obtiene a partir de una primera centrifugación a una velocidad de 280 g (1400 rpm) durante 7 minutos o 160 g (1200 rpm) por 10 minutos. Con esta primera centrifugación se consigue separar la sangre completa en una franja roja inferior de hematíes y una amarillenta superior de plasma (8).

El objetivo de este estudio fue evaluar la proliferación celular en líneas celulares de fibroblastos

de ligamento periodontal y osteoblastos tratados con PRP y PPP en concentraciones del 1 %, 3 % y 5 % a las 0, 12, 24, 48 y 72 horas después de su activación, con el propósito de conocer el tiempo y la concentración más efectivos para el uso clínico del PRP.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo celular

Se realizó un estudio experimental *in vitro*. Para el cultivo celular, se utilizaron líneas celulares de fibroblastos de ligamento periodontal (Clonetics® Human Fibroblast Cell System) y osteoblastos (Clonetics® Normal Human Osteoblast) adquiridas de la casa comercial Lonza. Los fibroblastos se adquirieron en tercer pase y se sembraron en medio de cultivo Stromal Cell Basal (Clonetics®) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 5 %, insulina al 0,1 %, factor de crecimiento fibroblástico básico al 0,1 % y gentamicina/anfotericina B al 0,1 %. Los osteoblastos se adquirieron en segundo pase y se cultivaron en medio Normal Human Osteoblast Cell (Clonetics®) suplementado con SFB al 10%, ácido ascórbico al 0,1 % y gentamicina/anfotericina B al 0,1 %. Ambos cultivos se llevaron a cabo siguiendo el protocolo de la casa fabricante. Posteriormente, al alcanzar entre 70 % y 80 % de confluencia, en cuarto pase para los fibroblastos y quinto pase para los osteoblastos, los cultivos celulares se tripsinizaron.

Obtención y activación del PRP y el PPP

El PRP y el PPP se obtuvieron de un donante voluntario hombre de edad 36 años, sistémicamente sano, que no había tomado antibióticos en los últimos 6 meses y no era fumador. El paciente aceptó hacer la donación mediante firma del consentimiento informado aprobado por el comité de ética e

investigación de la Pontificia Universidad Javeriana aceptando. Se utilizaron 6 tubos con ácido etilendiaminotetracético—EDTA con 5 ml cada uno de sangre venosa periférica extraída mediante punción de la vena cefálica en su unión con la vena mediana del codo de miembro superior. Se realizó un recuento de plaquetas electrónico de la muestra obtenida y se corroboró la fisiología sanguínea mediante tromboelastografía, con el fin de evaluar que el conteo plaquetario y la fisiología sanguínea estuvieran entre los parámetros normales y así poder aceptar el donante. La centrifugación y separación del PRP y el PPP se realizó durante 7 minutos a 1.400 rpm (8,31,36). Posteriormente, se activaron los tubos con cloruro de calcio al 10 % rotulados a diferentes tiempos posterior a la activación (0, 12, 24, 48 y 72 horas) para su utilización. Una vez activados, los concentrados de PRP y PPP se mantuvieron almacenados a -70 °C para luego ser empleados en la prueba experimental. Se prepararon concentraciones al 1 %, 3 % y 5 % mediante diluciones con medio de cultivo con SFB, tanto del PRP como del PPP.

Evaluación de la viabilidad celular

El tratamiento celular se realizó a cada una de las líneas descritas con PRP y PPP, al 1 %, 3 % y 5 % después de su obtención y activación a las 0, 12, 24, 48 y 72 horas, para cada grupo. Se realizó el conteo celular basal en cámara de Neubauer y se realizó la siembra en cajas con 150 µl (5000 células) por pozo. En cada caja se dejó un pozo de control en el cual se sembró medio con células sin tratamiento alguno y un pozo blanco con medio de cultivo exclusivamente. Para evaluar la viabilidad celular se aplicó el montaje y prueba MTS incubando por 3 horas a 37 °C, respetando los tiempos sugeridos por el proveedor y luego se hizo la lectura de absorbancia mediante ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) a 490 nm. Todas las pruebas se realizaron por triplicado.

Análisis de los datos

Los datos se recolectaron en una base de datos SPSS. El análisis de datos de absorbancia se realizó con el programa Sabiosciences®. Para el análisis de los datos se aplicaron las pruebas Chi², Fischer y McNemar (p=0,05).

RESULTADOS

Se obtuvo el cultivo de fibroblastos y osteoblastos sin signos de contaminación hasta los pases descritos durante 12 días. El recuento de plaquetas obtenido de la sangre venosa del sujeto voluntario fue de 380.000/mm³ y la curva de la tromboelastografía fue normal, lo que indica que había una fisiología normal apta para la preparación de PRP y PPP. Los resultados en el lector de ELISA se obtuvieron por triplicado y se promediaron los 3 valores correspondientes a cada uno de los tratamientos realizados. A dicho valor se le restó el valor blanco y se establecieron porcentajes.

La figura 1 ilustra la respuesta de los fibroblastos tratados con PRP y PPP a las 0, 12, 24, 48 y 72 horas, en concentraciones al 1 %, 3 % y 5 % comparadas con el control. Se observa en el eje Y que la absorbancia (nm) fue mayor para los fibroblastos estimulados con PRP al 5 % activados 24 horas después de su obtención. Con respecto al PPP, se observa mayor absorbancia en el grupo control; sin embargo, coincide con la respuesta del PRP en la que se muestra un aumento en la absorbancia para todos los grupos experimentales, en el especial para PPP al 5 % activado 24 horas después de su obtención.

FIGURA 1
 FIBROBLASTOS TRATADOS CON PRP Y PPP A LAS 0, 12, 24, 48 Y 72 HORAS, EN CONCENTRACIONES AL 1 %, 3 % Y 5 %
 COMPARADAS CON EL CONTROL

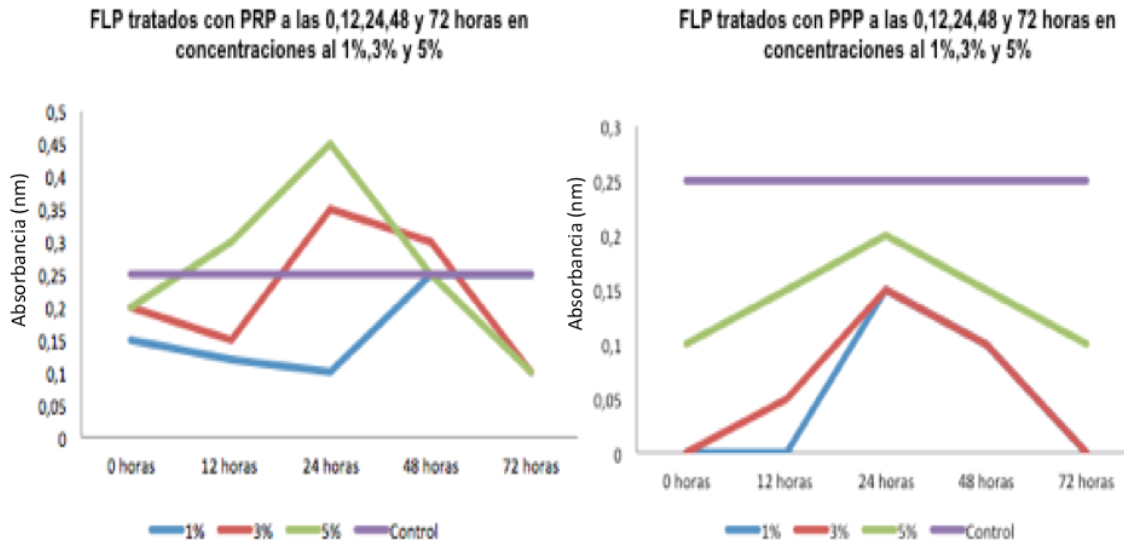
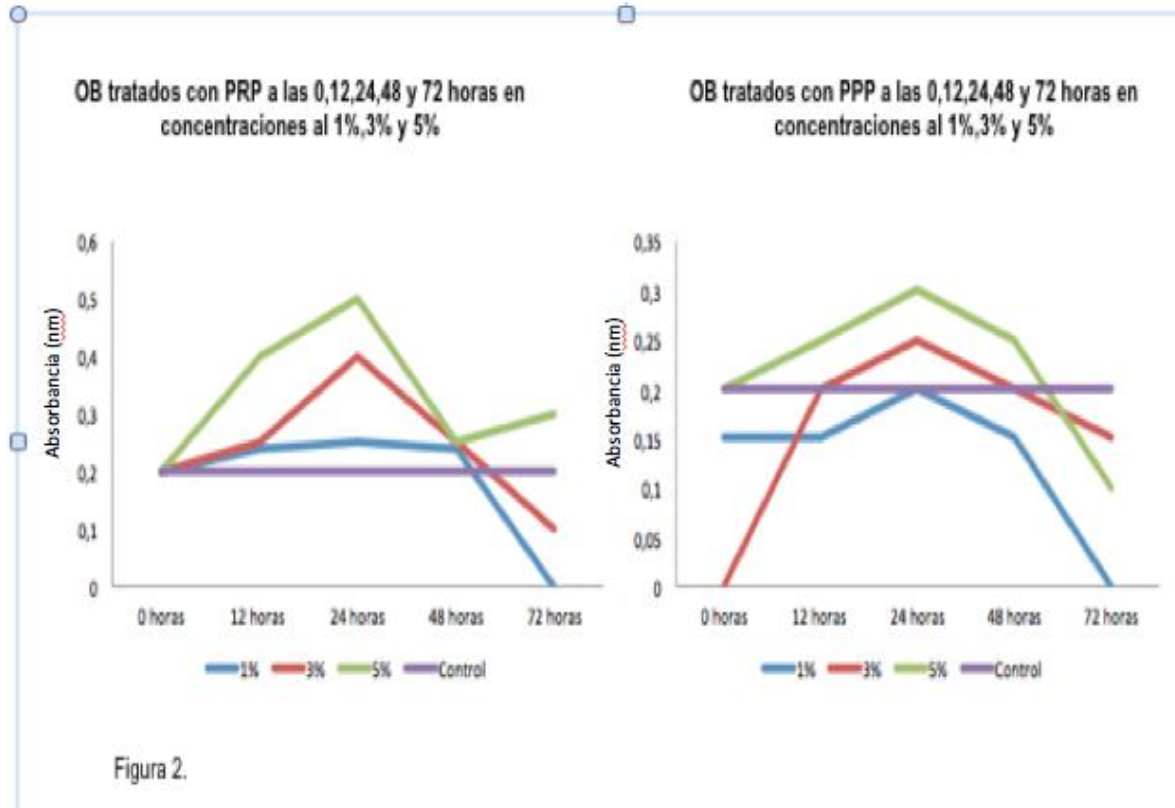


Figura 1.

La figura 2 ilustra la respuesta de los osteoblastos tratados con PRP y PPP a las 0, 12, 24, 48 y 72 horas, en concentraciones al 1 %, 3 % y 5 % comparadas con el control. Al igual que con los fibroblastos, se observa una mayor absorbancia en los osteoblastos estimulados con PRP y PPP al 5 % activados 24 horas después de su obtención.

FIGURA 2
 RESPUESTA DE LOS OSTEÓBLASTOS TRATADOS CON PRP Y PPP A LAS 0, 12, 24, 48 Y 72 HORAS, EN
 CONCENTRACIONES AL 1 %, 3 % Y 5 %, COMPARADAS CON EL CONTROL



Al aplicar las pruebas estadísticas paramétricas, se evidencia que la diferencia fue estadísticamente significativa con respecto a la obtención de una proliferación aumentada de fibroblastos con PRP al 5% al aplicarlo 24 horas después de su procesamiento y activación. Las diferencias también fueron significativas para los osteoblastos ($p=0,05$).

DISCUSIÓN

El objetivo de este estudio fue evaluar la viabilidad celular observada en fibroblastos de ligamento periodontal y osteoblastos obtenidos mediante cultivo experimental y que se trataron con PRP a las 0, 12, 24, 48 y 72 horas luego de su procesamiento, en concentraciones del 1 %, 3 % y 5 %.

Diferentes protocolos de preparación se han reportado en la literatura, después de la primera descripción del PRP como concentrado plaquetario de primera generación. Dohan y colaboradores (14) realizaron un recuento histórico desde las preparaciones que consistían en pegantes de fibrina hasta la obtención de concentrados plaquetarios de segunda generación como el plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) y plasma rico en fibrina (PRF). Observaron que las diferencias consisten en los componentes de fibrina y la presencia de leucocitos; sin embargo, no hay consenso en cuanto a la preparación de los mismos, como se corrobora en las publicaciones de Anitua y colaboradores. (18), Chang y Zhao (32), He y colaboradores (21), y Dohan y colaboradores (14,19,20,22,25). La ausencia de consenso es tal que Anitua y colaboradores (4) utilizan la sigla PRP en el título de su publicación y durante el desarrollo del texto se refieren en forma reiterada al PRGF.

Balaram y colaboradores (46) describen métodos de obtención de derivados plaquetarios más simples si se les compara con la preparación del PRP. No obstante, los estudios disponibles aún no determinan la tasa de proliferación y viabilidad celular en humanos para afirmar cuál de los diferentes derivados sanguíneos, que involucran factores de crecimiento, tiene un impacto positivo en la regeneración celular (22,25,47). He y colaboradores (21) comparan el efecto del PRF y el PRP sobre la proliferación celular y diferenciación de osteoblastos en un modelo animal en ratas y cuantifica los valores de PDGF-AB y TGF- β 1. Hallaron que el PRP libera grandes cantidades de estos factores durante el primer día, mientras que el PRF libera TGF- β 1 al día 14 y PDGF-AB al día 7. Esto parece relacionarse con un efecto gradual y más duradero en la proliferación de los osteoblastos en el modelo utilizado.

En cuanto al uso del PRP en diferentes concentraciones, Kawase y colaboradores (35) lo utilizaron entre el 0,5 % y el 2 % para evaluar la síntesis de colágeno tipo I en células de ligamento periodontal y osteoblastos. Reportaron que la preparación al 0,5 % se convertía en gel al igual que preparaciones más concentradas. Fortes-Ferreira y colaboradores (48) utilizaron concentraciones de PRP progresivamente altas a partir de 6,125 % y hasta 50 %. Observaron una mayor proliferación de osteoblastos mediante el uso de PRP al 50 %. Concentraciones similares utilizaron Slapnicka y colaboradores (37), quienes encontraron que concentraciones entre 10 % y 25 % se relacionan con mayor viabilidad celular. Beca y colaboradores (8) mencionan los estudios de Choi, en los cuales concentraciones entre el 1 % y el 5 % se relacionan con mayor viabilidad celular, lo cual coincide con lo evidenciado en el presente estudio. Mooren y colaboradores (34), después de utilizar PRP entre el 2 % y el 8 %, afirman que no hay relación directa entre el número de plaquetas y los factores de crecimiento liberados a partir de ellas y que concentraciones más altas pueden generar apoptosis. Pantou y colaboradores (44) en su protocolo siempre lo preparan al 5 % para su uso en investigación. Estos estudios corroboran la heterogeneidad en el uso del PRP en cuanto a la concentración se refiere. Por lo tanto, los resultados de investigaciones realizadas *in vitro* que relacionen la utilización de PRP y la proliferación celular hacen difícil son difíciles de comparar (21). En este estudio el proceso de preparación de los diferentes componentes utilizados y el cultivo celular fueron repetibles y predecibles sin que se presentara algún factor de sesgo en la misma. Ello minimizó el error al elaborarse por un mismo investigador. El aspecto, respuesta y crecimiento celular *in vitro* se corrobora con la respuesta de estas líneas celulares con la respuesta obtenida en diferentes investigaciones (22).

En este estudio se evidenció también una tendencia significativa a una mayor viabilidad celular de fibroblastos y osteoblastos al utilizar PRP al 5 %, 24 horas después de su procesamiento y activación. Los resultados obtenidos sugieren que el PPP también modifica la respuesta de viabilidad celular. Karp y colaboradores (49) utilizaron rellenos de fibrina como matrices en estudios de ingeniería tisular ósea en vivo. Su estudio, realizado en ratas, no mostró aumento en la invasión de tejido óseo. Esto sugiere que los factores de crecimiento podrían tener efectos diferentes de acuerdo con el derivado sanguíneo utilizado. Así se evidencia en el estudio de Thorwarth y colaboradores (50), quienes utilizaron colágeno bovino y PRP en un modelo experimental en cerdos domésticos, y describen en su análisis de inmunohistoquímica la expresión de BMP-2, osteocalcina y osteonectina. Los estudios reportados por Stapicka y colaboradores y Forbes-Ferreira y colaboradores, realizados en osteoblastos, así como el estudio de Creeper y colaboradores, realizado adicionalmente en células del ligamento periodontal, utilizaron PRP inmediatamente posterior a su activación (37,47,48). La respuesta positiva obtenida en el presente estudio sobre la viabilidad celular mediante el tratamiento con PPP se corrobora con los hallazgos de Dohan y colaboradores (22,25). Dichos autores no encontraron diferencias estadísticamente significativas al cuantificar las citoquinas contenidas en el PPP con respecto al PRP. No obstante, PDGF-BB y TGF- β 1 en el sobrenadante de PPP fueron significativamente menores que los obtenidos en el PRP. De tal forma, el PPP puede tener algún efecto menor comparado con el efecto del PRP.

En la literatura disponible actualmente no se reporta la respuesta de viabilidad de células periodontales tratadas con PRP a diferentes tiempos posterior a su activación. He y colaboradores (21) mencionan que los factores de crecimiento se liberan en las primeras 24 horas y utilizan

principalmente el PRP inmediatamente después de su activación (8,25,30,31,34-37,48,51). Los estudios de Acosta y colaboradores publicados en 2006 y 2010 evidenciaron una tendencia en la respuesta de viabilidad en fibroblastos gingivales, los cuales presentan diferencias con respecto a los fibroblastos (42,43). Este hallazgo, sumado al resultado del presente estudio sugiere que el efecto del PRP no es de tipo celular-específico y en la evidencia científica disponible no hay comparaciones del tratamiento con PRP en diferentes tiempos luego de su activación. Por ello, los resultados obtenidos son innovadores en el campo de la biotecnología. A partir de esto, el grupo investigador propone continuar la investigación del PRP y PPP *in vitro* e *in vivo*, con el fin de proporcionar un fundamento racional a su utilización y no solo basarla en la experiencia de los clínicos.

CONCLUSIONES

El efecto del PRP al 5 % sobre fibroblastos y osteoblastos mostró una tendencia a mayor viabilidad celular en el tratamiento 24 horas después de su activación, lo cual puede tener una aplicación clínica para investigaciones *in vivo*.

RECOMENDACIONES

Se sugiere realizar estudios comparados entre los diferentes protocolos de preparación, estudiar la expresión génica y estandarizar la obtención y preparación de los mismos, con el fin de promover la óptima utilización a los derivados sanguíneos de este tipo.

REFERENCIAS

1. Aljehani YA. Risk factors of periodontal disease: review of the literature. *Int J Dent*. 2014; 2014: 182513.
2. Armitage GC, Robertson PB. The biology, prevention, diagnosis and treatment of periodontal disease: scientific advances in the United States. *J Am Dent Assoc*. 2009; 140(Suppl 1): 365-435.
3. Dentino A, Lee S, Mailhat J, Hefti A. Principles of periodontology. *Periodontol 2000*. 2013 Feb; 61(1): 16-53.
4. Anitua E, Troya M, Orive G. An Autologous platelet rich plasma stimulates periodontal ligament regeneration. *J Periodontol*. 2013 Nov; 84(11): 1556-66.
5. García-Martínez O, Reyes-Botella C, Díaz-Rodríguez L, Luna-Bertos E, Ramos-Torrecillas J, Vallecillo-Capilla M, Ruiz C. Effect of platelet-rich plasma on growth and antigenic profile of human osteoblasts and its clinical impact. *J Oral Maxillofac Surg*. 2012; 70: 1558-64.
6. Rios H, Lin Z, Oh B, Park Ch, Giannobile W. Cell and gene-based therapeutic strategies for periodontal regenerative medicine. *J Periodontol*. 2011; 82: 1223-37.
7. Hallman M, Thor A. Bone substitutes and growth factors as an alternative/complement to autogenous bone for grafting in implant dentistry. *Periodontol 2000*. 2008 Jun; 47(1): 172-92.
8. Beca T, Hernández G, Morante S, Bascones A. Plasma rico en plaquetas. Una revisión bibliográfica. *Avances en Periodoncia*. 2007 Abr; 19(1): 39-52.
9. Hughes FJ, Turner W, Belibasakis G, Martuscelli G. Effects of growth factors and cytokines on osteoblast differentiation. *Periodontol 2000*. 2006 Jun; 41(1): 48-72.
10. Polimeni G, Xiropaidis AV, Wikesjö UME. Biology and principles of periodontal wound

- healing/regeneration. *Periodontol* 2000. 2006 Jun; 41(1): 30-47.
11. Cochran DL, Wozney JM. Biological mediators for periodontal regeneration. *Periodontol* 2000. 1999 Feb; 19(1): 40-58.
 12. Souren J, Van Wijk R. Fibroblastic cell cycling in collagen gels. *Cell Proliferation*. 1993 Jan; 26(1): 12-23.
 13. Acosta A. Papel del fibroblasto en salud y enfermedad periodontal. En: Gutiérrez S (editora). *Fundamentos de ciencias básicas aplicadas a la odontología*. 1a edición. Bogotá, Colombia: Pontificia Universidad Javeriana; 2006. pp. 349-68.
 14. Dohan D, Andia I, Zumstein M, Zhang Ch, Pinto N, Bielecki T. Classification of platelet concentrates (Platelet- Rich Plasma- PRP, Platelet- Rich Fibrin- PRF) for topical and infiltrative use in orthopedic and sports medicine: current consensus, clinical implications and perspectives. *Muscles, Ligaments and Tendons J*. 2014;4 (1): 3-9.
 15. Lee JW, Kwon OH, Kim TK, Cho YK, Choi KY, Chung HY, Cho BC, Yang JD, Shim JH. Platelet-rich plasma: quantitative assessment of growth factor levels and comparative analysis of activated and inactivated groups. *Arch Plast Surg*. 2013; 40: 530-5.
 16. Carrillo-Mora P, González-Villalta A, Macías-Hernández S, Pineda-Villaseñor C. Plasma rico en plaquetas. Herramienta versátil de la medicina regenerativa? *Cir Cir*. 2013; 81: 74-82.
 17. Burnouf T, Goubran H, Che TM, Ou KL, El-Ekiaby M, Radosevic M. Blood-derived biomaterials and platelet growth factors in regenerative medicine. *Blood Reviews*. 2013; 27: 77-89.
 18. Anitua E, Troya M, Orive G. Plasma rich in growth factors promote gingival tissue regeneration by stimulating fibroblast proliferation and migration and by blocking transformin growth factor β -1-induced myodifferentiation. *J Periodontol*. 2012; 83(8): 1028-37.

19. Dohan D. How to optimize the preparation of leukocyte and platelet- rich fibrin (L-PRF, Choukroun´s technique) clots and membranes: Introducing the PRF Box. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010 Sep; 110(3): 275-8.
20. Dohan D. Platelet- rich Plasma (PRP) and platelet rich fibrin (PRF) in human cell cultures: Growth factor release and contradictory results. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010; 110(4): 418-21.
21. He L, Lin Y, Hu X, Zhang Y, Wu H. A comparative study of platelet-rich fibrin (PRF) and platelet- rich plasma (PRP) on the effect of proliferation and differentiation of rat osteoblast in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009; 108(5): 707-13.
22. Dohan D, Rasmusson L, Albreksson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte and platelet-rich fibrin (LPRF). *Trends Biotechnol.* 2009; 27(3): 158-67.
23. Nikolidakis D, Jansen J. The biology of platelet- rich plasma and its application in oral surgery: Literature Review. *Tissue Eng Part B Rev.* 2008; 14(3): 249-58.
24. Han J, Meng H.X, Tang J.M, Chen Z.B. The effect of different platelet-rich plasma concentration on proliferation of human periodontal ligament cells in vitro. *Cell Proliferation.* 2007 Apr; 40(2): 241-52.
25. Dohan D, Choukroun J, Diss A. 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): e37-44.
26. Zhang N, Wu YP, Quian SJ, Teng Ch, Chen Sh, Li H. Research progress in the mechanism of effect of PRP in bone deficiency healing. *Scientific World J.* 2013: 1-7.
27. Saucedo JM, Yaffe MA, Berschback JC, Hsu WK, Kalainov DM. Platelet-rich plasma. *J Hand*

- Surg Am. 2012; 37(3): 587-9.
28. Cervelli V, Scioli M, Gentile P, Doldo E, Bonanno E, Spagnoli L, Orlandi A. Platelet-rich plasma greatly potentiates insulin-induced adipogenic differentiation of human adipose-derived stem cells through a serine threonine kinase akt-dependent mechanism and promotes clinical fat graft maintenance. *Stem Cells Transl Med.* 2012; 1(3): 206-20.
 29. Gentile P, Bottini D, Spallone D, Curcio B, Cervelli V. Application of PRP in maxillofacial surgery. *J Craniofac Surg.* 2010; 21: 900-4.
 30. Froum S, Wallace S, Tarnow D, Cho SC. Effect of PRP on bone growth in maxillary sinus grafts. Three bilateral case reports. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2002; 22: 45-53.
 31. Marx R, Carlson E, Eichstaedt R, Schimmele S, Strauss J, Georgeff K. Platelet-rich plasma-Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998; 85: 638-46.
 32. Chang YC, Zhao JH. Effects of platelet-rich fibrin on human periodontal ligament fibroblasts and application for periodontal infrabony defects. *Australian Dental J.* 2011; 56: 365-71.
 33. Plachokova A, Nikolidakis D, Mulder J, Jansen J, Creugers N. Effect of Platelet-Rich Plasma on bone regeneration in dentistry: a systematic review. *Clin Oral Impl Res.* 2008; 19: 539-45.
 34. Mooren R, Hendriks E, van den Beaken J, Merx M, Meijer G, Jansen J, Stoelinga PJ. The effect of platelet-rich plasma in vitro on primary cells rat osteoblast-like cells and human endothelial cells. *Tissue Eng Part A.* 2010; 16(10): 3159-72.
 35. Kawase T, Okuda K, Wolff L, Yoshie H. Platelet-rich plasma-derived fibrin clot formation stimulates collagen synthesis in periodontal ligament and osteoblast cells in vitro. *J Periodontol* 2003; 74: 858-64.
 36. Gonshor A. Technique for producing PRP and platelet concentrate: Background and process.

- Int J Periodontics Rest Dent. 2002; 22: 547-57.
37. Slapnicka J, Frassmann A, Strasak L, Augustin P, Vanek J. Effects of activated and nonactivated platelet-rich plasma on proliferation of human osteoblast in vitro. *J Oral Maxillofac Surg.* 2008; 66: 297-301.
 38. Reyes M, Montero S, Cifuentes J, Zarzar E. Actualización de la técnica de obtención y uso del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF). *Rev Dental Chile.* 2002; 93(2): 25-8.
 39. Sodek J, McKee M. Molecular and cellular biology of alveolar bone. *Periodontol 2000.* 2000; 24: 99-126.
 40. Demmer RT, Papapanou PN. Epidemiologic patterns of chronic and aggressive periodontitis. *Periodontol 2000.* 2010 Jun; 53(1): 28-44.
 41. Anitua E, Sanchez M, Zalduendo M, De La Fuente M, Prado R, Orive G, Andia I. Fibroblastic response to treatment with different preparations rich in growth factors. *Cell Proliferation.* 2009 Apr; 42(2): 162-70.
 42. Acosta A, González O, Pereira E, Sánchez A. Proliferación de fibroblastos gingivales humanos tratados con plasma rico en plaquetas in vitro. *Rev Fundación Juan José Carraro (Argentina).* 2006 Abr-May; (22): 8-14.
 43. Acosta A, García D, Perdomo S, Gonzalez O. Efecto del plasma rico en plaquetas sobre la proliferación de fibroblastos gingivales humanos in vitro. *Rev Fundación Juan José Carraro (Argentina).* 2010 Abr-May; (31): 4-13.
 44. Pantou AL, Markopoulo CE, Dereka XE, Vavoraki H, Mamalis A, Vrotsos IA. The effect of platelet-rich plasma (PRP) combined with a bone allograft on human periodontal ligament (PDL) cells. *Cell Tissue Bank.* 2012; 13: 81-8.
 45. Markopoulou CE, Markopoulou P, Dereka XE, Pepelass E, Vrotsos IA. Effect of homologous

- PRP on proliferation of human periodontally affected osteoblast. In vitro preliminary study. Report a case. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2009; 9(3): 167-72.
46. Balaram N, Karunakar P, Jayadev M, Marshal R. Role of platelet rich fibrin in wound healing: A critical review. *J Conserv Dent.* 2013; 16(4): 284-93.
47. Creeper F, Lichanska AM, Marshall RI, Seymour GJ, Ivanovski S. The effect of platelet-rich plasma on osteoblast and periodontal ligament cell migration, proliferation and differentiation. *J Periodont Res.* 2009; 44: 258-65.
48. Fortes-Ferreira C, Carriel M, Filho J, Granjeiro J, Oliveira C, Magini R. Platelet-rich plasma influence on human osteoblasts growth. *Clin Oral Impl Res.* 2005; 16: 456-60.
49. Karp JM, Sarraf F, Schoichet MS, Davies JE. Fibrin-filled scaffolds for bone-tissue engineering: an in vivo study. *J Biomed Mater Res A.* 2004; 71(1): 162-71.
50. Thorwarth M, Rupprecht S, Falk S, Felszeghy E, Wiltfang J, Schlegel KA. Expression of bone matrix proteins during de novo bone formation using a bovine collagen and platelet-rich plasma (PRP) an immunohistochemical analysis. *Biomaterials.* 2005; 26: 2575-84.
51. Tsay RC, Vo J, Burke A. Differential growth factor retention by platelet-rich plasma composites. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005; 63: 521-8.

CORRESPONDENCIA

Adriana Paola Acosta Gómez

adriana.acosta@javeriana.edu.co

Sandra Janeth Gutiérrez Prieto

s.gutierrez@javeriana.edu.co

Dabeiba Adriana García Robayo

garciad@javeriana.edu.co

María Alexandra Bedoya Mejía

bedoya-a@javeriana.edu.co

Ximena Edilia Moreno Serrano

ximenmoreno@gmail.com