

Evaluación del efecto del plasma rico en plaquetas (PRP) en diferentes tiempos y concentraciones posterior a su procesamiento sobre la proliferación de fibroblastos de ligamento periodontal y osteoblastos

Evaluation of the effect of platelet-rich plasma (PRP) at different times and concentrations subsequent processing on the proliferation of periodontal ligament fibroblasts and osteoblasts

Autores:

Ximena Moreno *

Adriana Acosta †

Adriana García ‡

Sandra Gutiérrez §

María Alexandra Bedoya **

Esta propuesta hace parte de un proyecto institucional que tiene el aval del Comité de Investigación y ética de la Facultad de Odontología, cuyo nombre es:

Evaluación del efecto del plasma rico en plaquetas sobre el ciclo celular de osteoblastos y fibroblastos de ligamento periodontal.

Se anexa copia de la certificación del aval del Comité de Investigación y Ética.

* Odontóloga. Residente Posgrado Periodoncia. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá

† Especialista en Periodoncia. Facultad de Odontología. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá

‡ Doctora en Ciencias Biológicas. Centro de Investigaciones Odontológicas CIO. Facultad de Odontología. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá

§ Doctora en Ciencias Biológicas. Centro de Investigaciones Odontológicas CIO. Facultad de Odontología. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá

** Magister en Ciencias Básicas. Facultad de Odontología. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá

Resumen

Antecedentes: En diferentes áreas de la salud se han utilizado los factores de crecimiento obtenidos de las plaquetas desde su primera aplicación en 1980; éstos se encuentran concentrados en el plasma rico en plaquetas (PRP), fuente autóloga de primera generación. Robert Marx en 1986 fue el primero en describir el uso del PRP para la colocación de injertos óseos en cirugía maxilofacial y desde esa época se atribuyeron propiedades fundamentadas en la capacidad que tiene de incrementar la regeneración ósea al ser utilizado junto con injertos de hueso. Sin embargo, la diversidad de protocolos para su preparación ha generado resultados variables y la ausencia de consenso en terminología, caracterización y clasificación, han hecho difícil la comparación entre ellos. Los estudios de investigación son heterogéneos y el tiempo que transcurre entre la activación del PRP y el impacto de su aplicación en cuanto a efectos biológicos sobre la proliferación celular, ciclo celular y osteogénesis no se entiende por completo.

Objetivo: Evaluar proliferación y viabilidad celular en fibroblastos de ligamento periodontal (FLP) y osteoblastos (OB) tratados con PRP en diferentes concentraciones y tiempos de aplicación después de su activación.

Métodos: Estudio experimental in vitro utilizando líneas celulares de FLP y OB (Clonetics™) cultivados siguiendo las recomendaciones de Lonza. Previo consentimiento informado aprobado por el comité de ética de la Pontificia Universidad Javeriana, se preparó el PRP utilizando muestra de sangre venosa de un adulto voluntario sano mediante un procedimiento de centrifugación en dos etapas, seguido de activación con CaCl_2 al 10%, almacenado a -70°C hasta su uso. El efecto sobre la proliferación celular tras la aplicación de PRP y PPP al 1, 3 y 5% se evaluó en diferentes tiempos mediante MTS (CellTiter 96®, Promega) para las células tratadas a las 0,12,24,48 y 72 horas posterior a su activación. El grupo control se analizó en condiciones de cultivo sin tratamiento. El análisis de datos se realizó utilizando el

programa Sabiosciences aplicando χ^2 , Prueba de Fischer y Test de MacNemar.

Resultados: El ensayo de viabilidad celular evidenció diferencias estadísticamente significativas entre el grupo experimental y el grupo control, observando una tendencia a un aumento de viabilidad en las células tratadas con PRP a las 24 horas posterior a su activación en una concentración del 5% ($p= 0.05$)

Conclusión: El efecto del PRP al 5% sobre FLP y OB mostró una tendencia a mayor viabilidad celular mediante el tratamiento 24 horas posterior a su activación lo cual puede tener una aplicación clínica para investigar in vivo.

Palabras clave: *Plasma rico en plaquetas, periodonto, proliferación celular, viabilidad celular, in vitro*

Abstract

Background: Different areas of health have used growth factors derived from platelets since its first application in 1980; these are concentrated in a first-generation autologous source called platelet rich plasma (PRP). In 1986 Robert Marx was the first to describe the use of PRP for bone grafting in maxillofacial surgery and since then, properties founded on the ability to increase bone regeneration when used in conjunction with bone grafts were attributed. However, the diversity of protocols for their preparation has generated variable results, and the lack of consensus on terminology, characterization and classification, have made it difficult to compare them. Research studies are heterogeneous and the time between the activation of the PRP and the impact of its application in terms of biological effects on cell proliferation, cell cycle and osteogenesis is not completely understood.

Objective: To evaluate proliferation and cell viability on periodontal ligament fibroblasts (PLF) and osteoblasts (OB) treated with PRP in different concentrations and at different times after its activation.

Methods: An experimental in vitro study was performed using PLF and OB (Clonetics™) cell cultures following Lonza recommendations. Prior informed consent approved by the ethical committee of the Pontificia Universidad Javeriana, the PRP was prepared using venous blood sample of one healthy adult volunteer using a centrifugation process in two stages, followed by activation with 10% CaCl₂, stored at -70 ° C until use. The effect on cell proliferation after application of PRP and PPP 1,3 and 5% at different times was assessed using MTS (CellTiter 96 ®, Promega) to the cells treated at 0,12,24,48 and 72 hours after activation. The control group was analyzed in culture conditions without treatment Data analysis for cell proliferation was done using Chi², Fisher and Mac Nemar's test .

Results: The cell proliferation assay showed statistically significant differences between the experimental group and the control group, observed a tendency towards an

increase in viability in cells treated with PRP at 24 hours post-activation in a concentration of 5% ($p = 0.05$)

Conclusion: The effect of 5% PRP on FLP and OB tended to increased cell viability by 24 hours after activation treatment which may be applied clinically to investigate in vivo.

Keywords: *Platelet-rich Plasma, periodontium, cell proliferation, cell viability, in vitro*

Introducción

La enfermedad periodontal, en su interacción entre los diferentes microorganismos patógenos y la respuesta inmune del huésped susceptible, afecta el periodonto de protección y el periodonto de inserción, dejando secuelas en el epitelio de unión, ligamento periodontal, cemento radicular y hueso alveolar (1,2,3). El objetivo fundamental del tratamiento es lograr la regeneración de éstos tejidos (4,5,6,7,8,9,10,11,12), considerando ésta como un proceso biológico complejo que involucra crecimiento, migración, diferenciación celular y proteínas de la matriz; respuestas en las cuales están involucrados diferentes factores de crecimiento (6,7,8,9,11,13). Los derivados sanguíneos que contienen plaquetas son fuente importante de factores de crecimiento, para los cuales a la fecha no existe consenso en la terminología, caracterización y clasificación. (4,7,8,9,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23, 24,25,26)

En diferentes áreas de la medicina y la odontología se han utilizado los factores de crecimiento obtenidos de las plaquetas desde su primera aplicación en 1980 para el tratamiento de úlceras cutáneas (14,16,23,27,28,29,30,31), éstos se encuentran concentrados en el PRP, el cual es un derivado sanguíneo concentrado, de primera generación, obtenido mediante centrifugación de la sangre total que se caracteriza por poseer 4 a 6 veces los valores normales de plaquetas por mililitro (8,16,31,32). Se han descrito diversas aplicaciones en oftalmología, otorrinolaringología, odontología, medicina estética y regenerativa, sin embargo pocas son las indicaciones en las que se encuentra plenamente demostrada su utilidad debido a la heterogeneidad de los estudios de investigación y por tanto a resultados no comparables (16,23,27,28,29,30,31,32,33,34). La gran cantidad de factores de crecimiento contenidos en los gránulos plaquetarios, la 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, promoviendo la cicatrización, la reparación de heridas y otras lesiones tisulares (3,4,5,6,7,8,9). Robert Marx en 1986 fue el primero en describir el uso del PRP para la colocación de injertos óseos en

cirugía maxilofacial y desde esa época se atribuyeron propiedades fundamentadas en la capacidad que tiene de incrementar la regeneración ósea al ser utilizado junto con injertos de hueso (14,32). Sin embargo su uso ha sido inconstante con resultados variables debido a la diversidad en cuanto a su técnica 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), factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF), factor de crecimiento fibroblástico (FGF), factor de crecimiento endotelial (VEGF) y factor de crecimiento epidérmico (EGF) (7,8,9,15,16,18,23,25,31,32,35,36,37). Estos se liberan al momento de su procesamiento mediante el uso de cloruro cálcico o trombina (15,31,38,39,40). Aunque se ha reportado que el tiempo de aplicación del PRP debe ser antes de 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, las cuales son numerosas en el periodonto y responsables de la producción de la matriz orgánica de los tejidos que lo constituyen (3,4,39,41). Los osteoblastos y los fibroblastos producen colágeno, el mayor componente de la matriz y por esto están implicados en el proceso de regeneración tisular (7,13,42).

Acosta et al en una investigación previa observaron una tendencia a un aumento en la proliferación celular hacia las 24 horas posterior a la activación de PRP en fibroblastos gingivales (43,44); sin embargo en la actualidad no se conoce la respuesta celular a diferentes tiempos posterior a su activación. Diversos estudios han evaluado el uso de PRP a diferentes concentraciones; sin embargo éstas presentan rangos de variabilidad amplios que fluctúan entre 0,05% y 100% (8,36,38,45,35,46) con resultados heterogéneos.

El objetivo de la investigación es evaluar la proliferación celular observada en una población de fibroblastos de ligamento periodontal y osteoblastos obtenida mediante cultivo experimental, tratados con PRP y PPP en concentraciones del 1%, 3% y 5% a

las 0, 12, 24, 48 y 72 horas posterior a su activación.

Materiales y Métodos

Se realizó un estudio experimental in vitro, en cultivo de fibroblastos de ligamento periodontal (FLP) y osteoblastos (OB). Los FLP Lonza Clonetics™ Human Fibroblast Cell System se obtuvieron de la casa comercial en tercer pase y fueron sembrados en medio de cultivo Stromal Cell Basal (SCBM) Clonetics™ suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 5%, insulina al 0.1%, factor de crecimiento fibroblástico básico (hFGF-B) al 0.1 % y Gentamicina/Anfotericina B al 0.1% de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Se realizaron subcultivos al alcanzar entre el 70 al 80% de confluencia y observar figuras mitóticas bajo visión microscópica. Los cultivos celulares fueron tripsinizados hasta quinto pase. Los osteoblastos Lonza Clonetics™ Normal Human Osteoblast se obtuvieron de la casa comercial 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% de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Se realizaron subcultivos cuando se cumplieron las características descritas para FLP hasta cuarto pase.

Para la obtención del PRP se obtuvo consentimiento informado aprobado por el comité de ética e investigación de la PUJ, de un donante sano voluntario, en quien se extrajeron 6 tubos de 5 ml cada uno, de sangre venosa periférica mediante venopunción de la vena cefálica en su unión con la vena mediana del codo de miembro superior; en los cuales se utilizó anticoagulante. Se realizó un recuento de plaquetas electrónico en la muestra obtenida y se corroboró la fisiología sanguínea mediante tromboelastografía. La doble centrifugación y separación del PRP y plasma pobre en plaquetas (PPP) se realizó durante 7 minutos a 1400 rpm (8,32,37). Posteriormente se activaron los tubos con cloruro de calcio al 10% rotulando respectivamente diferentes tiempos posterior a la activación 0 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas y 72 horas para su utilización. Una vez activados los concentrados de PRP y PPP se mantuvieron

almacenados a -70°C para posteriormente ser utilizados en la prueba experimental. Se prepararon concentraciones al 1%, 3% y 5% mediante diluciones con medio de cultivo tanto de PRP como de PPP.

El tratamiento celular se realizó a cada una de las líneas descritas con PRP y PPP, al 1,3 y 5% respectivamente posterior a su obtención y activación a las 0,12,24,48 y 72 horas para cada grupo. Se realizó el conteo celular basal mediante la cámara de Neubauer y se procedió a realizar la siembra en cajas con 150 μl por pozo. En cada caja se dejó un pozo control en el cual se sembró medio con células sin tratamiento alguno y un pozo blanco con medio de cultivo exclusivamente. Para la evaluación de proliferación celular se aplicó el montaje y prueba MTS incubando 3 horas a 37°C y se hizo la lectura de absorbancia mediante ELISA a 490 nm. Los datos de absorbancia se recolectaron en una base de datos para hacer el análisis estadístico de los resultados mediante las pruebas de Chi^2 , Prueba de Fischer y Test de MacNemar.

Resultados

Se obtuvo el cultivo de FLP y OB sin signos de contaminación hasta los pases descritos durante 12 días. El recuento de plaquetas en la sangre venosa del sujeto voluntario obtenido fue $380.000/\text{mm}^3$ y la curva de la tromboelastografía fue normal. La cantidad obtenida de PRP y PPP fue suficiente para el experimento. La siembra de las células y el montaje de la prueba MTS se llevó a cabo respetando los tiempos sugeridos por el proveedor. Los resultados en el lector ELISA se obtuvieron por triplicado y se promediaron los 3 valores correspondientes a cada uno de los tratamientos realizados, A éste valor se le restó el valor blanco y se graficaron los resultados en porcentaje. La Figura 1 ilustra la respuesta de los FLP 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. La Figura 2 ilustra la respuesta de los OB 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 aplicaron pruebas estadísticas evidenciando una tendencia significativa a la

obtención de una proliferación aumentada de FLP con PRP al 5% aplicándolo 24 horas posterior a su procesamiento y activación; así como de los osteoblastos con un valor $p= 0.05$

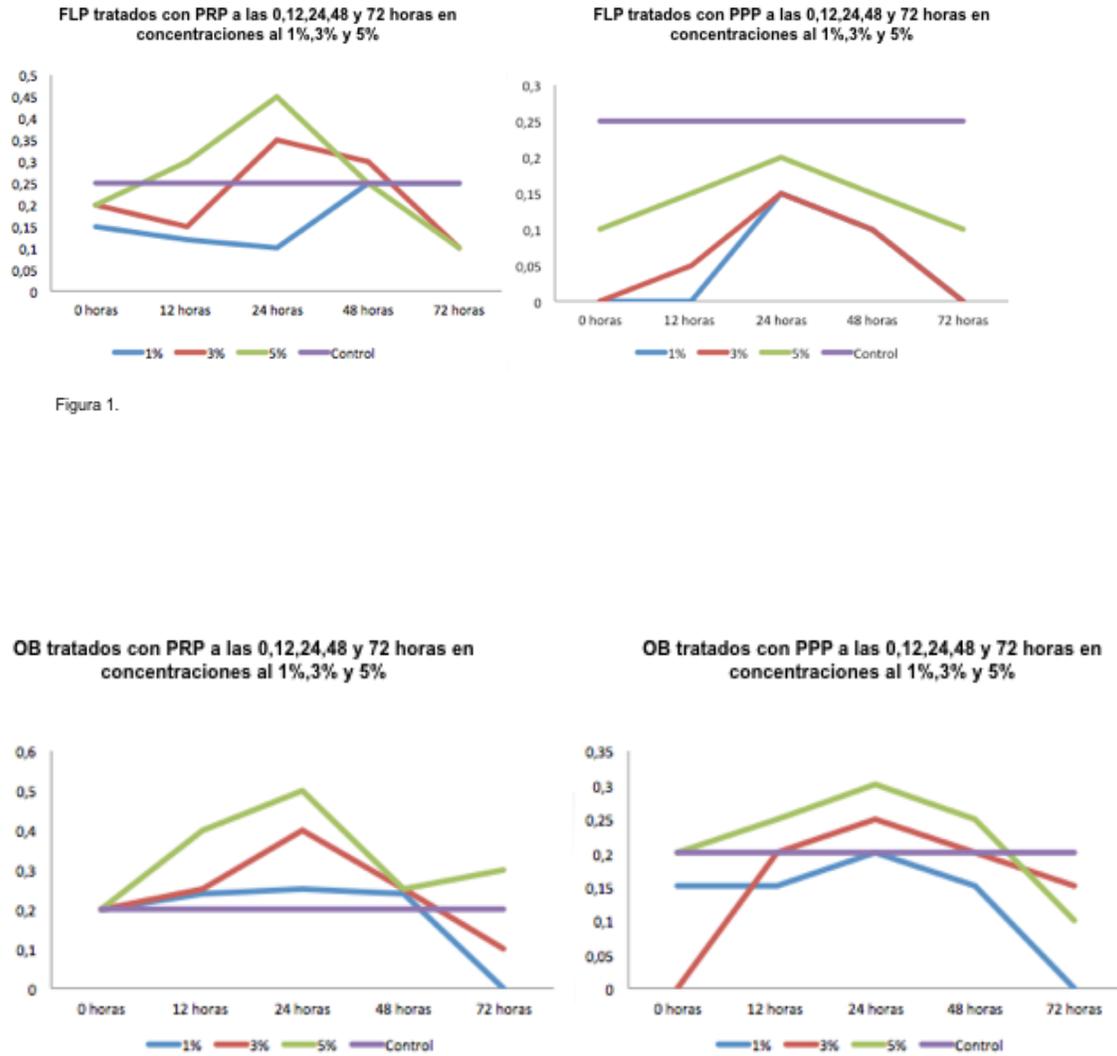


Figura 1.

Figura 2.

Discusión

El objetivo de la investigación fue evaluar la proliferación celular observada en una población de fibroblastos de ligamento periodontal y osteoblastos obtenida mediante cultivo experimental, tratados con PRP a las 0, 12, 24, 48 y 72 horas posterior a su procesamiento a concentraciones del 1%, 3% y 5%; la cual pudo ser evaluada con el diseño y la metodología propuesta. El proceso de preparación de los diferentes componentes utilizados y cultivo celular fue repetible y predecible sin que se presentara algún factor de riesgo de sesgo en la misma, minimizando el error al ser elaborado por un mismo investigador. El aspecto, respuesta y crecimiento celular in vitro se corrobora con la respuesta de éstas líneas celulares con respecto al fabricante, así como la respuesta obtenida en diferentes investigaciones (22).

Se han reportado diferentes protocolos de preparación posterior a la descripción original del PRP como concentrado plaquetario de primera generación. Dohan et al (14) realizan 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) resaltando que las diferencias consisten en los componentes de fibrina y la presencia de leucocitos; sin embargo no hay consenso en la preparación de los mismos como se corrobora en las publicaciones de Anitua et al (18), Chang y Zhao (33), He et al (21), Dohan et al (22,25,26). La ausencia de consenso es tal que Anitua et al (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 et al (49) describen métodos de obtención de derivados plaquetarios más simples si se les compara con la preparación del PRP, sin embargo los estudios disponibles aún no determinan la tasa de proliferación celular en humanos para afirmar cuál de los diferentes derivados sanguíneos que involucran factores de crecimiento interviene con un impacto positivo en la regeneración celular (22,26,50). He et al (21), comparan el efecto del PRF y el PRP sobre la proliferación celular y diferenciación de OB en un modelo animal en ratas, cuantificando los valores de PDGF-AB y TGF- β 1 evidenciando que el PRP libera grandes cantidades de éstos

factores durante el primer día, mientras que el PRP libera TGF- β 1 al día 14 y PDGF-Ab al día 7; lo cual parece relacionarse con un efecto gradual y más duradero en la proliferación de los OB en el modelo utilizado.

En cuanto al uso del PRP a diferentes concentraciones, Kawase en el 2003 (36) lo utilizó entre el 0.5% al 2% para evaluar la síntesis de colágeno tipo I en células de ligamento periodontal (PDL) y OB, reportando que la preparación al 0.5% se convertía en gel al igual que preparaciones más concentradas. Fortes-Ferreira et al (48) utilizaron concentraciones de PRP progresivamente altas a partir de 6,125% hasta 50% evidenciando mayor proliferación de OB mediante el uso de PRP al 50%. Concentraciones similares utilizan Slapnicka et al (38), mencionando que concentraciones entre 10% y 25% se relacionan con mayor viabilidad celular. Becat et al (8) mencionan los estudios de Choi, en los cuales concentraciones entre el 1 y el 5% se relacionan con mayor viabilidad celular. Mooren et al en el año 2010 (35) utilizando 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 esas plaquetas y que concentraciones más altas pueden generar apoptosis. Pantou et al (45) 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 concentración se refiere, por tanto los resultados de investigaciones realizadas in vitro que relacionen la utilización de PRP y la proliferación celular hacen difícil su comparación con base en la literatura disponible (21).

En la presente investigación se evidencia in vitro una tendencia significativa a la obtención de una mayor respuesta celular proliferativa de FLP y OB utilizando PRP al 5%, 24 horas posterior a su procesamiento y activación. Los resultados obtenidos sugieren que el PPP también contiene factores de crecimiento que modifican la respuesta celular proliferativa. Karp et al (51) utilizaron rellenos de fibrina como scaffolds en estudios de ingeniería tisular ósea en vivo, el estudio fue realizado en ratas y no demostró aumento en la invasión de tejido óseo. Esto sugiere que los factores de crecimiento podrían tener efectos diferentes de acuerdo al derivado sanguíneo utilizado

como se evidencia en el estudio de Thorwarth et al (52) que utiliza 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 et al y Forbes-Ferreira et al realizados en osteoblastos, así como el estudio de Creeper et al realizado adicionalmente en células del ligamento periodontal, utilizaron PRP inmediatamente posterior a su activación (38, 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 et al (25), quienes no encontraron diferencias estadísticamente significativa al cuantificar las citoquinas contenidas en el PPP con respecto al PRP, pero PDGF-BB y TGF- β 1 en el sobrenadante de PPP son significativamente menores que los obtenidos en el PRP; de tal forma que el PPP puede tener algún efecto menor comparado con el efecto del PRP.

La evidencia científica disponible no reporta la respuesta proliferativa de células periodontales tratadas con PRP a diferentes tiempos posterior a su activación. He et al (21) mencionan que los factores de crecimiento se liberan en las primeras 24 horas y la mayoría de estudio utilizan el PRP inmediatamente posterior a su activación (8,25,31,32,35,36,37,38,47,46,48). Los estudios de Acosta et al publicados en el año 2006 y 2010 evidenciaron una tendencia en la respuesta proliferativa en fibroblastos gingivales, los cuales presentan diferencias con respecto a los fibroblastos del ligamento periodontal (43,44). Este hallazgo sumado al resultado del presente estudio sugiere que el efecto del PRP no es de tipo celular-específico sobre células del periodonto y la evidencia científica disponible no compara tratamiento con PRP a diferentes tiempos posterior a su activación por lo cual los resultados obtenidos son innovadores en el campo de la ciencia.

A partir de esto, el grupo investigador propone continuar la investigación del PRP y PPP in vitro e in vivo con el fin de dar un fundamento racional a su utilización y no solo basarla en la experiencia de los clínicos. Se sugiere realizar estudios comparativos 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 éste tipo.

Conclusión

El efecto del PRP al 5% sobre FLP y OB mostró una tendencia a mayor viabilidad celular mediante el tratamiento 24 horas posterior a su activación lo cual puede tener una aplicación clínica para investigar in vivo.

Bibliografía

1. Aljehani YA, Risk factors of periodontal disease: review of the literatura. Int J Dent 2014. Epub May
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. Feb 2013; 61 (1): 16-53
4. Anitua E, Troya M, Orive G. An Autologous platelet Rich Plasma stimulates Periodontal Ligament Regeneration. J Periodontol. 2013; 0(0): 1-12.
5. García-Martínez O, Reyes-Botella C, Díaz-Rodríguez L, Luna-Bertos E, Ramos-Torrecillas J, Vallecillo-Capilla M et al. Effects of platelet- rich plasma on growth and antigenic profile of human osteoblast 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; 47(1): 172-192.
8. Beca T, Hernández G, Morante S, Bascones A. Plasma rico en plaquetas. Una revisión bibliográfica. *Av Periodon Implantol*. 2007; 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; 41(1): 48-72.
10. Polimeni G, Xiropaidis AV, Wikesjö UME. Biology and principles of periodontal wound healing/regeneration. *Periodontol 2000*. 2006; 41(1):30-47.
11. Cochran DL, Wozney JM. Biological mediators for periodontal regeneration. *Periodontol 2000*. 1999;19(1):40-58.
12. Souren J, Van Wijk R. Fibroblastic cell cycling in collagen gels. *Cell Proliferation*. Jan 1993; 26(1): 12-23
13. Acosta A. Papel del fibroblasto en salud y enfermedad periodontal. En: Guterrez S, Pontificia Universidad Javeriana. *Fundamentos de ciencias básicas aplicadas a la odontología*. 1a ed. Bogotá 2006.P.349-368
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 J, Kwon O, Kim T, Cho Y, Choi K, Chung H et al. Platelet- rich Plasma: Quantitative assessment of growth factor levels and comparative analysis of activated and inactivated groups. *Arch Plast Surg*. 2013; 40: 530-35
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, Radosovic 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 -1induced 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. *Letters of editors*. OOOOE. 2010; 110(3): 275 – 8
20. Dohan D. Platelet- rich Plasma (PRP) and platelet rich fibrin (PRF) in human cell cultures: Growth factor releaseand contradictory results. *Letters to the Editors*. OOOOE. 2010; 110(4): 418-421
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: 107 – 713

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 engineering.* 2008; 14(3): 249 – 58
24. 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
25. 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.* April 2007; 40(2): 241-52
26. 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): e 37 – 44
27. 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. *The Cientific Wordl J.* 2013: 1-7
28. Saucedo J, Yaffe M, Berschaback J, Hsu W, Kalainov D. Platelet – Rich Plasma. *ASSH.* 2012: 587-589
29. Cervelli V, Scioli M, Gentile P, Doldo E, Bonanno E, Spagnoli L et al. Cervelli y cols. 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 Translational Medicine.* 2012; 1:206-220

30. Gentile P, Bottini D, Spallone D, Curcio B, Cervelli V. Application of PRP in maxillofacial surgery. *J Craniofac Surg.* 2010; 21:900-904
31. 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
32. 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
33. 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
34. 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
35. Mooren R, Hendriks E, Van den Beaken J, Merckx M, Meijer G, Jansen J et al. The effect of platelet-rich plasma in vitro on primary cells rat osteoblast-like cells and human endothelial cells. *Tissue Engineering* 2010; 16(10); 3159-72
36. 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
37. Gonshor A. Technique for producing PRP and platelet concentrate: Background and process. *Int J Periodontics Rest Dent* 2002; 22:547-57

38. 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
39. Reyes M, Montero S, Cifuentes J, Zarzar E. Actualización de la técnica de obtención y uso del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF). *Revista Dental de Chile.* 2002; 93 (2) : 25-28
40. Sodek J, McKee M. Molecular and cellular biology of alveolar bone. *Periodontol* 2000. 2000; 24: 99-126
41. Demmer RT, Papapanou PN. Epidemiologic patterns of chronic and aggressive periodontitis. *Periodontol* 2000. June 2010; 53 (1): 28-44
42. 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.* April 2009; 42(2): 162-70
43. Acosta A, González O, Pereira E, Sánchez A. Proliferación de fibroblastos gingivales humanos tratados con plasma rico en plaquetas in vitro. *Revista de la Fundación Juan José Carraro (Argentina).* 2006 Abril – Mayo (22): 8-14
44. Acosta A, García D, Perdomo S, Gonzalez O. Efecto del plasma rico en plaquetas sobre la proliferación de fibroblastos gingivales humanos in vitro. *Revista de la Fundación Juan José Carraro (Argentina).* 2010 Abril-Mayo (31): 4-13.
45. 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: 81-88

46. 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
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: 456-460
49. 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): 284-293
50. Tsay RC, Vo J, Burke A. Differential growth factor retention by platelet-rich plasma composites. *J Oral Maxillofac Surg*. 2005; 63: 521 -8
51. Karp JM, Sarraf F, Schoichet MS, Davies JE. Fibrin-filled scaffolds for bone-tissue engineering: an in vivo study. *J Biomed Mater res*. 2004; 71^a: 162-71
52. Thorwarth M, Rupprecht S, Falk S. 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
53. Shanaman R, Filstein M, Danesh-Meyer M, Localized ridge augmentation using GBR and Platelet-Rich Plasma: Case Reports. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2001; 21: 345-355

54. Soman C, Yang X, Jiang H, Giardina S, Vyas V, Mitra G, et al. MTS dye based colorimetric CTLL-2 cell proliferation assay for product release and stability monitoring of Interleukin-15: Assay qualification, standardization and statistical analysis. *J Immunol Methods*. Aug 2009; 348(1-2): 83-94.
55. Kim S, Zhou J, Solomon Ch, Zheng Y, Suzuki T, Chen Mo, Sang S, Jiang N, Cho S, Mao J. Effects of growth factors on dental stem/progenitor cells. *Dent Clin N Am*. 2012; 56: 563-575
56. Lacoste E, Martineau L, Gagnon G. Platelet concentrates: effect of calcium and thrombin on endothelial cell proliferation and growth factor release. *J Periodontol* 2003; 74: 1498-507
57. Schelegel KA, Donath K, Rupprecht S. De novo bone formation using bovine collagen and platelet- rich plasma. *Biomaterials* 2004; 25: 5387 – 93