

Efecto del plasma rico en plaquetas en células del ligamento periodontal in vitro

In vitro effect of platelet rich plasma on periodontal ligament cells

Gail M. CLAVIJO¹, Paola A. PINILLOS¹, Oscar GUTIÉRREZ² M.D., M.Sc.

1. Periodoncista Universidad del Valle, 2. Profesor Asistente, Jefe Sección de Farmacología, Escuela de Ciencias Básicas - Facultad de Salud Universidad del Valle.

RESUMEN

Introducción: La Gingivitis y la Periodontitis son entidades inflamatorias crónicas frecuentes en nuestra población. La respuesta de los tejidos periodontales ante estas entidades, son el resultado de la respuesta del huésped frente a la biopelícula formada sobre la superficie dental, adyacente al tejido gingival.

La severidad con la que puedan presentarse, es producto de la composición del biofilm, junto a la presencia de factores que puedan modificar la respuesta del hospedero, factores locales que predispongan la colonización bacteriana, hábitos, y stres entre otros.

La interacción entre mecanismos de defensa del huésped y la liberación de factores de virulencia y mecanismos de evasión por parte de periodontopáticos, provocan una destrucción no controlada de hueso alveolar y migración del epitelio de unión; por lo tanto es importante dirigir estrategias terapéuticas a nivel celular y molecular para obtener la regeneración de los tejidos perdidos. La terapia periodontal se ha enfocado en detener la progresión de la enfermedad; Recientemente se busca mayor éxito en regeneración periodontal, al usar PRP, el cual tiene factores de crecimiento.

Objetivo: Este estudio determinó el efecto sobre la proliferación en FP, al ser expuestos a diferentes concentraciones de PRP

obtenido de un Banco de Sangre.

Metodología: Se trabajó con cultivos celulares (FP) de la Asociación Banco y Centro para la Investigación de Cultivos Celulares In Vitro, Facultad de Salud, de la Universidad del Valle, y con el apoyo del Hemocentro de la Cruz Roja para obtener PRP. Se utilizó el Kit XTT® para determinar la actividad metabólica de los FP, frente al PRP a concentraciones de 10, 15 y 20%.

Resultados: La actividad celular en todas las concentraciones fue significativa hasta las 72 horas, mayor que los controles SFB y FGF.

Conclusión: El PRP obtenido en banco de sangre local tiene efectos positivos en FP in vitro.

Palabras Clave: Factores de crecimiento, factor de crecimiento derivado de plaquetas, ligamento periodontal, fibroblastos, regeneración tisular guiada, plasma rico en plaquetas, cicatrización.

SUMMARY

Introduction: Gingivitis and Periodontitis are the common inflammatory diseases in our community. The reaction of the periodontal tissues results of the interaction of the hosp defense at the biofilm formed around the teeth and the gingival tissue.

The severity of this entity depend of the composition of biofilm and local or systemic factors can promote the bacterial colonization or behavioral components like tobacco and stress can be modified the individual response.

Interaction between defense response by hosp and evasion mechanism by periodontopathogens plays an important role

in the pathological process of alveolar bone destroy and migration the junction epithelium.

The periodontal therapy purpose is arrest the disease progression. Recently in an attempt to increase the succes rate in regenerative procedures, it has incorporated the use of platelet-rich plasma. It involves the growth factors that are proposed as enhancers of tissue regeneration of the periodontal tissues.

Purpose: The purpose of the study was to evaluate the response of periodontal fibroblasts (PF) at different concentration of platelet rich plasma in vitro.

Methodology: Cellular cultures of PF were obtained from In Vitro Research Center and PRP was get from the Hemocentro of the Red Cross, and dilutions were made to obtain concentrations to 10, 15 and 20%. They were compared with 2 controls of 5% bovine fetal serum (BFS) and fibroblastic growth factor (FGF). In order to determine the metabolic activity of the FP stimulated by PRP, Kit XTT® was used.

Results: Findings suggest that a higher concentration of PRP results in positive effects on cellular growth and significantly increase in proliferation of FP at concentration of 20%.

Conclusions: PRP resulted in positive effects on periodontal fibroblasts.

Key words: Growth factor, platelet-derived growth factor, periodontal ligament, fibroblasts, guided tissue regeneration, platelet rich plasma, healing.

INTRODUCCIÓN

La regeneración tisular guiada (RTG) se

Recibido para publicación: Enero 31 de 2007.

Aceptado para publicación: Mayo 16 de 2007.

Correspondencia:

P. A. Pinillos, Universidad del Valle.

Facultad de Salud.

(e-mail: paopinillos@hotmail.com)

basa en el aislamiento total de los tejidos gingivales conectivo y epitelial del área periodontal en cicatrización, con el fin de facilitar la repoblación in situ de células tanto del ligamento periodontal como del hueso alveolar. Estos principios se consiguieron mediante la utilización de barreras físicas, como las clásicas membranas de Politetrafluoretileno expandido (ePTFE). Recientemente se ha comprendido mucho mejor la regulación celular mediante factores de crecimiento y esto aporta nuevas opciones para el tratamiento regenerativo del tejido periodontal perdido (1,2).

Después de una herida en el periodonto, las células que se originan tanto a partir del ligamento periodontal como del tejido conectivo gingival pueden repoblar el área adyacente a la herida e incluso, la superficie radicular expuesta. Estudios in Vitro realizados previamente, sugieren que los fibroblastos gingivales tienen una ventaja competitiva para repoblar la zona ya que migran más rápidamente que las células del ligamento periodontal (3).

Isidor *et al.* en 1985 y Karring *et al.* en 1986 (4,5), observaron que las células del ligamento periodontal, son las responsables de la regeneración del periodonto. Se ha encontrado que durante la cicatrización periodontal, si las células del tejido conectivo gingival migran sobre la raíz tratada, pueden producir resorción radicular, mientras que cuando son las células del ligamento periodontal las que migran selectivamente sobre la superficie radicular se ha observado una regeneración periodontal funcional e histológica.

Gamal y Mailhot en 2000 y Mac Culloch *et al.* en 2000 (6,7), han enfocado el papel de los factores de crecimiento en la regulación de los eventos celulares críticos para la cicatrización.

Los factores de crecimiento controlan proteínas reguladoras del ciclo vital de las células. En todas y cada una de las células del organismo se encuentra presente un sistema más o menos complejo de proteínas reguladoras que controlan su ciclo vital

(crecimiento, reproducción y muerte). Las funciones de los factores de crecimiento ha sido estudiada sobre varios tipos celulares, pero los fibroblastos del ligamento periodontal son el único tipo celular del tejido conectivo con características importantes en la regeneración tisular, entre ellas:

- a. Tienen aumentada la tasa de polarización celular con organelas bien organizadas, las cuales proveen una actividad sintética eficiente de los componentes de la matriz extracelular (7,8).
- b. Alta rata de síntesis de colágeno y la más eficiente polimerización de moléculas colágenas nuevamente formadas.
- c. Propiedades osteoblásticas.
- d. Capacidad de involucrarse en cementogénesis (1,8).

La comprensión de la secuencia de los eventos y de tipos celulares específicos constituye una parte importante para el desarrollo de técnicas para la regeneración de tejido periodontal perdido.

Esta investigación busca evaluar la proliferación de las células del ligamento periodontal *in Vitro* mediante el uso de plasma rico en plaquetas, ya que su contenido en factores de crecimiento, aumenta la tasa de proliferación de células del ligamento periodontal, para lograr un efecto sinérgico en la regeneración periodontal.

Este estudio recibió la aprobación, del Comité de Ética Humana, considerando según la categoría de riesgo como mayor al mínimo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección y preparación de las muestras

Se escogieron 4 pacientes adultos saludables, para toma de muestras de sangre en el Hemocentro de la Cruz Roja. Posteriormente por medio de plasmaféresis discontinua, siguiendo los protocolos establecidos por el laboratorio, se obtienen hemoderivados, entre ellos el concentrado de plasma rico en plaquetas.

Cultivos celulares

Para nuestro estudio se emplearon cultivos de fibroblastos periodontales (FP) de la Asociación Banco y Centro para la Investigación de Cultivos Celulares *in Vitro*, Facultad de Salud, de la Universidad del Valle que los había almacenado después del pase 6 de crecimiento en termos con nitrógeno líquido. Para realizar el análisis, previa descongelación de las células, se utilizaron fibroblastos periodontales en fase 7 de crecimiento.

Descongelación de los Fibroblastos Periodontales

En un baño María y a 37 grados centígrados se descongeló un criovial de pase 6 que contenía 6×10^6 células.

Las células se recuperaron por centrifugación a 1500 rpm durante diez minutos; en seguida se determinó el número de células descongeladas por el método de exclusión con azul tripam y se sembraron a una concentración de 20.000 células por cm^2 en botellas de cultivo T-25 (FALCON) con medio de crecimiento (Medio Modificado Eagle's Dulbecco (DMEM), suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (FBS), 2 mM de L-glutamina, estreptomina (100 mg/L), la penicilina (100.000 U/L) y 0,25 mg del amphotericin B.

Las células dentro de las botellas de cultivo fueron puestas a crecer en Incubadora con CO_2 a 37°C. Después del segundo o tercer día *in vitro* (2-3 DIV) se les realizó cambio del medio de crecimiento (previamente descrito). Los cultivos fueron observados diariamente hasta obtener una confluencia total del 100%.

Una vez obtenida la confluencia de las células (7 DIV), se lavaron 3 veces con PBS por 5 minutos, posteriormente a cada botella de cultivo se le adicionaron 2 mL de solución de tripsina/EDTA al 0,25% y se incubaron por 5 minutos a 37°C. Terminado el tiempo de incubación las células fueron observadas al microscopio para verificar

el desprendimiento celular. Cuando las células se desprendieron se les adicionaron 5 mL. del medio de crecimiento para inhibir la acción de la tripsina, el volumen total del medio con los Fibroblasto Gingivales fue transferido a un tubo para centrifuga de 10 mL. a través de una pipeta serológica de 5 mL., las células fueron centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos, el sobrenadante se descartó y el pellet de células se resuspendió en 10 mL. del medio de crecimiento y a continuación se determino el número de células por método de exclusión con azul de tripam.

Se ajusto el número de células a una concentración final de 20.000 células por cada 200 µL. y se depositaron en cada uno de los pozos de la placa de cultivos de 96 pozos.

La placa de 96 pozos en las que se sembraron las células fue incubada a 37°C en incubadora con CO₂ durante toda la noche.

Conteo celular

La determinación del número de células tanto para la siembra, como para los pases se realizó por el método de exclusión con azul tripam. Este método consiste en realizar una dilución 1:10 de las células aisladas (se diluye 0.1 mL. de células en 0.9 mL. de azul de tripam) . La dilución se coloca en una cámara de conteo celular y bajo microscopio se determina el numero de células vivas y muertas.

El método de exclusión con azul de tripam permite diferenciar las células vivas (son aquellas que durante la observación al microscopio se ven normales porque por su membrana celular impermeable no adquieren el colorante) de las células muertas que durante la observación al microscopio se ven azules, por que en ellas si hay permeabilidad de la membrana.

Condiciones Óptimas de los Cultivos

Incubación a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂, con cambio del medio de crecimiento celular cada 2 a

3 días hasta que se observe la confluencia de la monocapa celular.

CARACTERÍSTICAS DE LOS FIBROBLASTOS EN CULTIVO

Los fibroblastos periodontales (FP) in Vitro, presentan una velocidad de crecimiento semejante a todas las células mesenquimales, es decir; cuando inicialmente las células son aisladas del tejido, tienen un promedio de 25 días para generar la monocapa celular, al realizar pases, tienen un promedio de formación de monocapa celular de aproximadamente 4 días .

La morfología de los Fibroblastos Periodontales presenta un citoplasma alargado, delgado con núcleos grandes, muestran una alineación en forma de paquetes o de remolinos característicos de su función de soporte, debido a los subsecuentes pases realizados durante el proceso de aislamiento de estas células, se ha visto que tienen la propiedad de ser muy homogéneas en el tiempo post cultivo in vitro.

Ensayo de Proliferación Celular con el Kit de XTT ® ROCHE

Este ensayo se basa en el cambio de las sales del tetrazolium del XTT a un color anaranjado del formazan por la actividad metabólica de las células. Esta conversión ocurre solamente en células viables. La coloración del formazan formado es soluble en soluciones acuosas y se cuantifica directamente usando un espectrofotómetro de multiplicación (lector de ELISA).

Se indujo el crecimiento celular, en una placa de cultivo de tejido de 96 pozos, se incuban con la solución amarilla de XTT (concentración final 0.3 mg/mL.) por 4-24 h y durante el procedimiento de análisis. Después de este período de incubación, se genera la solución de formazan de color anaranjado, que se cuantifica espectro fotometricamente usando un lector de placas de ELISA.

Un aumento en el número de células vivas da lugar a un aumento en la actividad

total de dehidrogenasa mitocondrial en la muestra. Este aumento se correlaciona directamente con la cantidad de formazan que se ha formado (color anaranjado).

El análisis fue diseñado para la cuantificación espectrofotométrica del crecimiento y de la viabilidad de las células sin el uso de isótopos radiactivos. Se utiliza para la medida de proliferación de las células en respuesta a diferentes factores, como citoquinas y factores de crecimiento, entre otros.

Metodología del la prueba de XTT, para proliferación celular

Los FG se crecen en las microplacas de cultivo celular, de 96 pozos, con fondo plano, con un volumen final de 200 µl de medio de cultivo fresco, según las necesidades de los FG por el medio de crecimiento, se debe realizar en una atmósfera humidificada (37°C, 5% CO₂).

Después del período de incubación inicial se retira todo el medio y se lavan las células con solución de PBS 3 veces por 5 minutos, posteriormente se adiciona a cada pozo 50 µl de la mezcla de XTT, se adiciona 100 µl del medio de crecimiento, generando una concentración final de 0.3 mg/mL de XTT. La placas se incuban de 24 a 96 h en atmósfera humidificada (37°C, 5% CO₂). Las mediciones de la absorción se realizan cada 24 horas usando el lector de microplacas para verificar la proliferación celular de los FG en presencia de la resina con los respectivos controles de crecimiento, un control alto de crecimiento, donde los fibroblastos son activados con factor de crecimiento básico para fibroblastos y un control bajo, al cual se le disminuye la concentración de Suero Fetal Bovino del 10% al 5%, adicionalmente se toma un control blanco, que solo contiene medio de crecimiento, pero son células.

RESULTADOS

Las pruebas estadísticas utilizadas para comparar los diferentes medios y con-

centraciones fueron: Análisis de Varianza paramétrico de un factor con un nivel de significancia < 0.05 , para aquellas variables que tuvieron una distribución normal; y en el caso del PRP que su distribución fue diferente a la normal se utilizó el Análisis de Varianza no paramétrico de Kruskal Wallis, se utilizó también como pruebas complementarias POSANOVA de Bonferroni y Sheffé.

Proliferación de fibroblastos

Para el análisis estadístico, como primera medida, se realizó una prueba de normalidad para determinar si los datos obtenidos en cuanto a proliferación celular tuvieron una distribución normal; la anterior prueba mostró que los resultados de Plasma sin plaquetas (PSP), y los controles negativos suero fetal bovino (SFB) y factor de crecimiento fibroblástico (FGF) tienen una distribución normal, los resultados de Plasma rico en plaquetas (PRP) tienen una distribución diferente a la normal.

Proliferación celular en respuesta a PRP

Se evaluó la proliferación de fibroblastos periodontales en 3 muestras de plasma rico en plaquetas a concentraciones de 10%, 15% y 20%, y se comparó con la respuesta celular a SFB y FGF al 10% y 5% como controles alto y bajo respectivamente. Se realizaron lecturas a las 6, 24, 48, 72, 96, 120 y 144 horas.

Respuesta celular dependiente de tiempo y concentración

Se comparó si existieron diferencias en la proliferación celular a diferentes tiempos 6, 24, 48, 72, 96, 120 y 144 horas. Al comparar PRP y los controles negativos (SFB, FGF) se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre las 6 y 24 horas que muestra una mayor proliferación celular al adicionar PRP. En las lecturas realizadas posteriormente no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

La proliferación celular en respuesta a una concentración relativamente elevada de PRP al 20% fue evaluada a las 6, 24, 48, 72, 96, 120 y 144 horas, y se observó el pico de proliferación celular a las 24 horas. Esta tendencia se mantuvo a lo largo del periodo de observación. Sin embargo al comparar la tasa de proliferación entre los controles SFB y FGF se observó una respuesta celular poco significativa (Figura 1).

Cuando las células fueron expuestas a PRP a una concentración del 15% se observó un comportamiento similar en todas las muestras incluyendo el control de FGF; la proliferación se mantiene hasta la última lectura (Figura 2).

La mayor tasa de proliferación se observó al exponer los FP a una concentración de 20% de PRP. Al compararlo con los controles y las otras concentraciones se observó una diferencia significativa. El máximo incremento en proliferación celular se obtuvo en el día 5 (Figura 3).

Al hacer una comparación intergrupar en la lectura realizada a las 6 horas se observó una proliferación celular marcada al adicionar PRP a las diferentes concentraciones (20%, 15%, 10%) comparado con el grupo sin PRP (SFB, FGF), sin embargo las diferencias más representativas se observaron al adicionar PRP al 20%.

En la Figura 4, el eje Y muestra la densidad óptica y el X los días en la cual se observan las diferencias entre las muestras. Las de mayor proliferación celular fueron estimuladas con PRP, las siguientes 3 muestras son las estimuladas con plasma sin plaquetas y las dos con menor proliferación fueron las estimuladas con FCF y SFB respectivamente.

Cuando se realizó la lectura a las 48 horas, aunque se observa una tendencia de crecimiento celular, ésta no es tan marcada como la lectura anterior. La respuesta proliferativa encontrada revela un ligero incremento que no es tan significativo como en las primeras 24 horas. Este comportamiento se mantiene hasta las 72 horas lo

cual demuestra que el PRP tiene un efecto positivo en la proliferación celular, aun a las 72 horas (Figura 4).

A partir de las lecturas siguientes 96, 120 y 144 horas se observó una tendencia a la estabilización de la población celular, lo cual puede sugerir que la proliferación de fibroblastos periodontales se detiene al establecerse la monocapa (Figura 4).

DISCUSIÓN

En los eventos de regeneración periodontal interactúan diferentes grupos celulares, por lo tanto, es importante la investigación de métodos que tengan influencia directa en la velocidad de cicatrización. Los fibroblastos periodontales son las células necesarias para la regeneración periodontal. Varias investigaciones se han enfocado en la evaluación de los factores de crecimiento que actúan como proteínas reguladoras en el proceso de cicatrización en diferentes líneas celulares humanas *in Vitro* (8-10). Estos mediadores biológicos naturales ejercen su efecto en la migración, diferenciación y síntesis de matriz celular. Los resultados han sido contradictorios ya que algunos estudios *in vitro* no encuentran una respuesta positiva dependiente de la dosis del PRP, al ser comparado con los controles (11).

Annunziata *et al.* en 2005 (12) realizaron un estudio para observar las interacciones biológicas entre el plasma rico en plaquetas y las células periodontales (del ligamento periodontal, fibroblastos gingivales y queratinocitos). Los resultados presentaron diferencias en el crecimiento siendo mayor la proliferación en las células del ligamento periodontal, moderado en fibroblastos gingivales y mínimo en queratinocitos. Concluyen la importancia del uso del PRP en las cirugías periodontales para acelerar la cicatrización de los tejidos blandos.

Kawase *et al.* en 2005 (13) observaron la expresión del colágeno tipo 1 de las células del ligamento periodontal es estimulada por el fibrinógeno que se encuentra dentro del PRP, este incrementa la actividad de la fosfatasa alcalina y provee un número

PROLIFERACIÓN CELULAR 20%

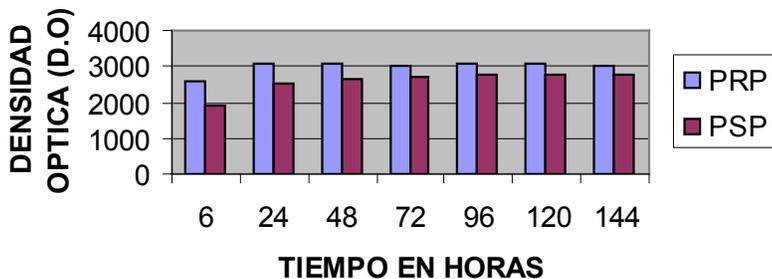


Figura 1. Muestra momento máximo de proliferación celular y estabilización

PROLIFERACIÓN CELULAR 15%

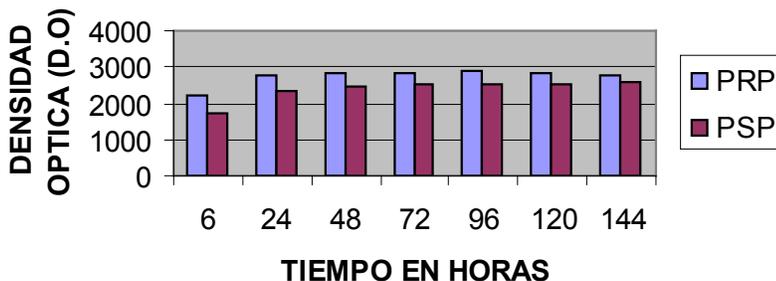


Figura 2. Muestra un comportamiento similar al exponer FP a una concentración de PRP al 20%, comparado con los controles negativos

PROLIFERACIÓN CELULAR 72 A 144 HORAS

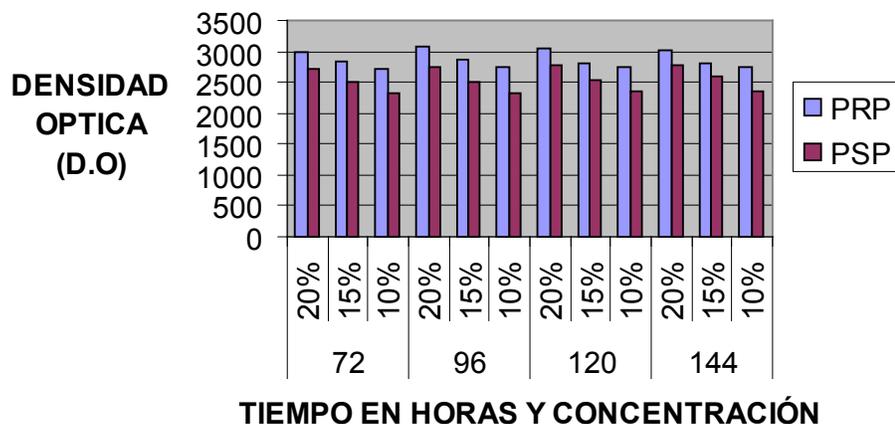


Figura 3. Se observa estabilización de la proliferación de fibroblastos periodontales FP a partir de las 72 horas

de efectos potentes sobre las células del ligamento periodontal.

Es racional pensar que a mayor concentración de plaquetas hay mayor cantidad de factores de crecimiento pero no es muy claro la cantidad precisa de cada factor liberado por plaquetas, como una medida estándar. Un estudio experimental (14) reportó que la cantidad de plaquetas viables, difiere según el protocolo utilizado para su obtención y así mismo varía el contenido de factores de crecimiento.

Existen varios reportes de la aplicación clínica de PRP al combinarlo con injertos óseos para obtener regeneración. Al interactuar una fuente celular autógena, plaquetas concentradas que aseguran los factores de crecimiento e injertos o sustitutos óseos, los cuales sirven como andamiaje para la migración celular; facilitan el proceso de cicatrización en un menor tiempo (15-18). El PRP también ha resultado exitoso en el tratamiento de defectos infraóseos, en los cuales se encontraron cambios estadísticamente significativos a los seis meses en relación a la profundidad de la bolsa, recesión y nivel clínico de inserción (19). Otro estudio similar evaluó el efecto a las 12 semanas y además de datos clínicos y radiográficos, se realizó evaluación histológica mediante biopsias obtenidas en la cirugía de reentrada, en las cuales se observó neoformación ósea. Las diferencias fueron estadísticamente significativas al compararlas con el grupo control (17).

El efecto del FCDP en la proliferación y quimiotaxis de los fibroblastos periodontales se ha estudiado ampliamente, sin determinar la concentración necesaria para obtener una máxima respuesta celular. Se realizó un estudio in Vitro en células stem estromales (SSC), estudio en el cual los autores determinaron que la concentración mínima requerida para obtener una marcada proliferación y diferenciación celular era PRP al 10%. Una vez retirado el estímulo las células retornan a una velocidad de proliferación regular, pero las células mantienen la información para diferenciación hacia diferentes linajes. Lo anterior

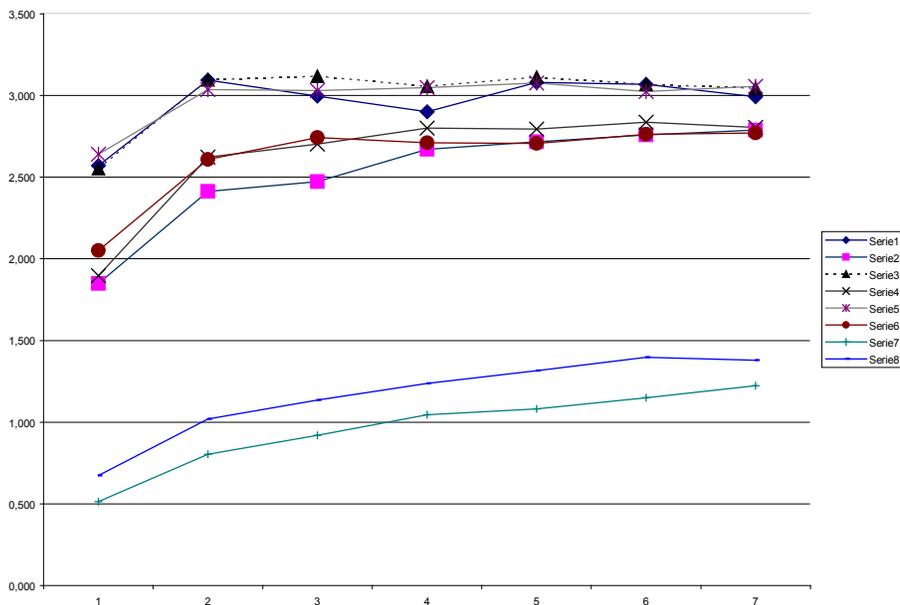


Figura 4. El eje Y muestra la densidad óptica y el X los días , aquí se observan las diferencias entre las muestras. Las de mayor proliferación celular fueron estimuladas con PRP, las siguientes 3 muestras son las estimuladas con plasma sin plaquetas y las dos con menor proliferación fueron las estimuladas con FCF y SFB respectivamente

indica que el efecto mitótico del PRP es transitorio, lo cual es clínicamente deseable para disminuir la aparición de efectos secundarios (10). Dentro de las limitaciones del estudio los autores no evaluaron los efectos biológicos del PRP a concentraciones más elevadas, pero en nuestro estudio se evaluó el efecto del PRP hasta un 20%, cuando se obtuvo una respuesta positiva dosis-dependiente y, por lo tanto, una mayor proliferación celular.

Mediante análisis enzimático y PCR se realizó una investigación in vitro para evaluar el contenido de factores de crecimiento y su efecto biológico y molecular, cuyo resultado sugiere que el TGF- β , puede favorecer la diferenciación de osteoblastos y cementoblastos, además de la producción de fibronectina, una molécula involucrada tanto en la adhesión de fibroblastos a la superficie radicular como en el proceso de angiogénesis (9,10).

Acción biológica de fibroblastos periodontales in vitro en respuesta al PRP

El diseño de esta investigación permitió evaluar la respuesta de los fibroblastos

periodontales (FP) a diferentes concentraciones de PRP, medio en el cual las células se mantuvieron en continua actividad, en comparación con SFB y FCF.

En otro estudio in vitro donde se compara el efecto de PRP en población celular de fibroblastos gingivales y periodontales con respecto a la proliferación, se observó una significativa respuesta de los FP mientras que en los FG hubo una ligera tendencia a la inhibición en la actividad proliferativa cuando se incrementaron las concentraciones de PRP (20).

El presente estudio mostró una respuesta celular altamente proliferativa al exponer los FP al PRP, con una concentración del 10% y un mayor incremento en la proliferación celular. Estos hallazgos contradicen los obtenidos en un estudio reciente (17) ya que en este no encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a crecimiento, proliferación, o función celular, en fibroblastos gingivales, ni osteoblastos, al realizar lecturas hasta las 72 horas y 21 días respectivamente.

En el estudio que aquí se reporta la actividad metabólica de las células frente a las diferentes concentraciones (10%, 15% y 20%) fueron significativas hasta las 72 horas cuando se comparó con los controles negativos de SFB y FGF; a partir de éste momento se inicia un periodo de estabilización en la población celular, el cual se puede deber a que, una vez establecida la monocapa, la proliferación celular se detiene. No sabemos si después de transcurrir las 72 horas hubiera mayor proliferación, por lo tanto se sugiere realizar estudios con una menor población celular como base.

CONCLUSIONES

Nuestro estudio demuestra que el plasma rico en plaquetas (PRP) obtenido de Bancos de sangre local, es una alternativa de tratamiento en la regeneración periodontal, ya que además de modular la proliferación celular de manera selectiva para Fibroblastos Periodontales como se reporta en otra investigación (11) tiene la capacidad de suprimir la proliferación celular epitelial, lo cual es una gran ventaja cuando buscamos la regeneración periodontal, por lo tanto su aplicación clínica es una practica segura para obtener resultados positivos.

1. Los hallazgos de éste estudio sugieren que el PRP a una concentración al 20% aumenta significativamente la proliferación de FP.
2. La actividad celular frente a concentraciones de 10%, 15% y 20% fueron significativas hasta las 72 horas, mayor que los controles SFB y FGF.
3. No hubo un incremento significativo después de las 72 horas, momento a partir del cual se observa una tendencia a la estabilización de la población celular.
4. La estabilización de la población celular puede deberse a que una vez establecida la monocapa la proliferación celular se detiene. Sería interesante en futuros trabajos sembrar en pozos de mayor tamaño para determinar si ésta proliferación se continúa más allá de las 72 horas.
5. La máxima concentración utilizada

en este estudio fue al 20% y fue en la que se obtuvo una mayor proliferación celular, se sugiere realizar futuros estudios con mayores concentraciones para determinar si el efecto en cuanto a proliferación celular es directamente proporcional a la concentración.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecemos la valiosa colaboración de la Asociación Banco y Centro para la Investigación de Cultivos Celulares In Vitro, Facultad de Salud, Universidad del Valle y al Bacteriólogo Dr. William Criollo por su incondicional acompañamiento y asesoría para la ejecución de ésta investigación.

REFERENCIAS

- Oates TW, Rouse CA, Cochran DL. Mitogenic Effects of Growth Factors on Human Periodontal Ligament Cells In Vitro. *J Periodontol* 1993; 64:142-148.
- Dennison DK, Vallone DR, Pinero GJ. Differential Effect of TGF- β 1 and PDGF on Proliferation of Periodontal Ligament Cells and Gingival Fibroblasts. *J Periodontol* 1994; 65:641-648.
- Mariotti A, Cochran DL. Characterization of Fibroblasts Derived From Human Periodontal Ligament and Gingiva. *J Periodontol* 1990; 61:103-111.
- Isidor F, Karring T, Nyman S, Lindhe J. The significance of coronal growth of periodontal ligament tissue for new attachment. *J Clin Periodontol* 1986; 13:145-150.
- Karring T, Isidor F, Nyman S, Lindhe J. New attachment formation on teeth with a reduced but healthy periodontal ligament. *J Clin Periodontol* 1985; 12:51-60.
- Gamal AY, Mailhot JM. The effect of local delivery of PDGF_{BB} on attachment of human periodontal ligament fibroblasts to periodontitis-affected root surfaces- in vitro. *J Clin Periodontol* 2000; 27:347-353.
- Mc. Culloch C, Lekic P, McKee M. Role of physical forces in regulating the form and function of the periodontal ligament. *Periodontology* 2000; 24:56-72.
- Sammartino G, Tia M, Marenzi G, Espedito di Lauro A. Use of autologous platelet-rich plasma (PRP) in periodontal defect treatment after extraction of impacted mandibular third molars. *J Oral Maxillofac Surg* 2005; 63:766-770.
- Kanno T, Takahashi T, Tsujisawa T, Ariyoshi W, Nishihara T. Platelet-rich plasma enhances humanosteoblast-like cell proliferation and differentiation. *J Oral Maxillofac Surg* 2005; 63:362-369.
- Lucarellia E, Beccheronia A, Davide DA, Sangiorgia L, Cenacchid A, Del Ventor AM, Meottid C, Zambon BA, Giardinoe R, Fornasari PM, Mercurio M, Piccia P. Platelet-derived growth factors enhance proliferation of human stromal stem cells. *Biomaterials* 2003; 24:3095-3100.
- Cenni E, Ciapetti G, Pagani S, Perut F, Giunti A, Baldini N. Effects of activated platelet concentrates on human primary cultures of fibroblast and osteoblast. *J Periodontol* 2005; 76:323-328.
- Annunziata M, Iva A, Buonaiuto C, Di Feo A, Pasquale R, Passaro I. In vitro cell-type specific biological response of human periodontally related cells to platelet-rich plasma. *J Periodontal Res* 2005; 40(6):489-95.
- Kawase T, Okuda K, Saito Y, Yoshie H. In vitro evidence that the biological effects of platelet-rich plasma on periodontal ligament cells is not mediated solely by constituent transforming-growth factor-beta or platelet-derived growth factor. *J Periodontol* 2005;76(5):760-7.
- Barry LE, Woodell JE, Higgins JB. Platelet Quantification and Growth Factor Analysis from Platelet-Rich Plasma: Implications for Wound Healing. *American Society of Plastic Surgeons* 2004; 14(6):1502-1508.
- Oyama T, Nishimoto S, Tsugawa T, Shimizu F. Efficacy of platelet-rich plasma in alveolar bone grafting. *J Oral Maxillofac Surg* 2004; 62:555-558.
- Choi BH, I CJ, Huh JY, Suh JJ, Lee S. Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in autogenous bone graft. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004; 33:56-59.
- Fortes C, Carriel MC, Scarso FJ, Granjeiro JM, Oliveira CM, De Souza MR. Platelet-rich plasma influence on human osteoblasts growth. *Clin. Oral Impl. Res.* 2005; 16:456-460.
- Raghoobar GM, Schortinghuis JRS, Liem B, Jan LR, van der Wal JE, Vissink A. Does platelet-rich plasma promote remodeling of autologous bone grafts used for augmentation of the maxillary sinus floor? *Clin Oral Impl Res* 2005; 16: 349-356.
- Hanna R, Trejo PM, Weltman RL. Treatment of intrabony defects with bovine - derived xenograft alone an combination with Platelet - rich plasma : A randomized clinical trial. *J Periodontol* 2004; 75:1668-1677.
- Mumford JH, Carnes DL, Cochran DL, Oates TW. The Effects of Platelet-Derived Growth Factor-BB on Periodontal Cells in an In Vitro Wound Model. *J Periodontol* 2001; 72:331-340.