

Daniele Savina

L-PRP, L-PRF, A-PRF. Impacto biológico e cirúrgico de Leucócitos e fibrina na evolução dos concentrados plaquetários.

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade Ciências da Saúde

Porto, 2018

Daniele Savina

L-PRP, L-PRF, A-PRF. Impacto biológico e cirúrgico de Leucócitos e fibrina na evolução dos concentrados plaquetários.

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade Ciências da Saúde

Porto, 2018

Autor: Daniele Savina

Título do trabalho: “L-PRP, L-PRF, A-PRF. Impacto biológico e cirúrgico de Leucócitos e fibrina na evolução dos concentrados plaquetários.”

Assinatura: _____

Trabalho apresentado à Universidade
Fernando Pessoa como parte dos requisitos
para obtenção do grau de Mestrado em
Medicina Dentária

RESUMO

No âmbito da cirurgia regeneradora os concentrados plaquetários estão relacionados com numerosos procedimentos cirúrgicos.

O potencial terapêutico baseia-se na libertação de fatores de crescimento plaquetários, todavia outras componentes como leucócitos e fibrina parecem ter importância no processo de cura.

O objetivo deste trabalho foi o de analisar os protocolos que tentam incluir, cada vez mais, leucócitos e fibrina (L-PRP, L-PRF, A-PRF) para comparar a maior eficácia biológica e cirúrgica entre os preparados de primeira e segunda geração

A análise comparativa foi focada no potencial antimicrobiano, na regeneração tecidual e na prática cirúrgica diária, tendo sido analisados estudos *in vitro* e *in vivo*.

Resultados heterogêneos foram evidenciados no impacto produzido pelos leucócitos, por outro lado, parece esclarecido que a membrana de fibrina presente nos novos concentrados melhora as propriedades biológicas e facilita a aplicação clínica do biomaterial. São necessários, futuramente, mais estudos clínicos *in vivo*.

Palavras-Chave: “PRP contra L-PRP”, “L-PRP - L-PRF” “A-PRF”, “concentrados plaquetários”, “concentrados plaquetários cirurgia oral”, “processo cura concentrados plaquetários”, “ leucócitos regeneração óssea”, “comparação L-PRF PRP”

ABSTRACT

Platelet concentrates are related to numerous surgical procedures in regenerative surgery.

The therapeutic potential is based on the release of platelet growth factors, but other components such as leukocytes and fibrin appear to be important in the healing process.

The objective of this study was to analyze the protocols that tried to include more leukocytes and fibrin (L-PRP, L-PRF, A-PRF) to compare the greater biological and surgical efficacy between the preparations of the first and second generation

Comparative analysis was focused on antimicrobial potential, tissue regeneration and daily surgical practice, analyzing studies *in vitro* and *in vivo*

Heterogeneous results were showed in the impact produced by the leukocytes, on the other hand, it seems clear that the fibrin membrane present in the new concentrates improves the biological properties and facilitates the clinical application of the biomaterial. In the future more clinical studies are needed.

KeyWords: “PRP vs L-PRP”, “L-PRP - L-PRF” “A-PRF”, “platelet concentrates”, “platelet concentrate oral surgery”, “platelet concentrate healing process”, Leukocyte and bone regeneration “comparative L-PRF PRP”

DEDICATORIAS

Dedico este meu percurso de estudos e a realização deste trabalho a minha família por acreditarem em mim, por todo o apoio que me foi dado, e sobre todo pela paciência nos momentos mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

Ao Magnífico Reitor da Universidade Fernando Pessoa, Professor. Doutor Salvato Trigo

Ao excelentíssimo Professor, Doutor José Paulo Macedo, meu orientador agradeço pela disponibilidade, atenção e grande confiança que me foi prestada na elaboração deste trabalho

Á excelentíssima Professora Sandra Soares, sou imensamente grato pela máxima paciência, disponibilidade e apoio.

Á excelentíssima Professora Rita Nobrega que me mostrou um possível caminho a percorrer.

Á minha namorada Marta por ser a minha Estrela Polar e por ter ficado ao meu lado em todas as situações, sempre. Obrigado.

Ao meu amigo, colega e binómio Andrea pela paciência na box como no campo de futebol.

Um grande agradecimento a Salvo, Davide, Andrea, Shayan, Enrico, Melania, Gianfranco, Vanda, Alessia e Noemi. A todos os colegas que me acompanharam nesta aventura e acabaram comigo este percurso. Á Giulia, com a qual começou todo, pela coragem e pela força demonstrada ao longo do tempo.

Á Universidade Fernando Pessoa e a todo o seu corpo docente por me ter acolhido em Portugal e por me ter transmitido todos os valores necessários para poder ser futuramente um excelente Médico Dentista

INDICE

I.	Introdução.....	1
II.	Materiais e métodos.....	2
III.	Desenvolvimento.....	3
	1. L-PRP. A inclusão dos leucócitos no protocolo de centrifugação.....	3
	2. Potencial antimicrobiano e osteogénico do L-PRP.....	3
	3. L-PRF. A segunda geração de concentrados plaquetários.....	6
	4. Análise dos leucócitos na regulação do processo inflamatório.....	7
	5. L PRF e PRP na regeneração tecidual.....	8
	6. PRP e Guided bone regeneration (GBR), L-PRF e natural bone regeneration (NBR).....	9
	7. A-PRF. Um biomaterial baseado nas células brancas.....	11
IV.	Discussão.....	13
V.	Conclusão.....	15

INDICE DE FIGURAS

Figura 1-Protocolo manual clássico de dois passos do PRP.....	2
Figura 2A-Ilustração esquemática da arquitetura da matriz e das células retidas	9
Figura 2B-Micrografia do coágulo de L-PRF	9
Figura 3-Regeneração de tecido mole apos avulsão. com L- PRF	11
Figura 4-comparação entre estrutura da membrana de fibrina no L-PRF e no A-PRF.....	12

INDICE DE ABREVIATURAS

PRP.....	Platelet rich plasma
P-PRP.....	Pure platelet-rich plasma
PPP.....	platelet poor plasma
L-PRP.....	Leukocyte and platelet-rich plasma
PRF.....	Platelet-rich fibrin
L-PRF.....	Leukocyte and platelet-rich fibrin
A-PRF.....	Advanced platelet-rich fibrin
PDGF.....	Platelet-derived growth factor
TGF.....	Transforming growth factor
VEGF.....	Vascular endothelial growth factor
IGF.....	Insulin like growth factor
EGF.....	Epidermal growth factor
FDP.....	produtos de degradação do fibrinogénio
BMP.....	bone morphogenic protein
RPM.....	rotações por minutos
PBS.....	phosphate buffered saline
MSSA.....	Methicillin-resistant Staphylococcus aureus
MRSA.....	Multiple resistance Staphylococcus aureus

ESBL..... Extended-spectrum beta-lactamases

MSCs..... mesenchymal stem cell

HBMSCsHuman Bone Marrow Stromal Osteoprogenitor Cells

GBR.....guided bone regeneration

NBR.....natural bone regeneration

I. INTRODUÇÃO

No âmbito da cirurgia regeneradora a contínua e crescente necessidade de encontrar soluções rápidas e eficazes na reabilitação dos doentes, levou, nos últimos anos, a um desafio na pesquisa de produtos e técnicas capazes de promover e estimular a regeneração tecidual assim como controlar o processo inflamatório e produzir um pós-operatório cada vez menos traumático e mais previsível. (Martin 2017).

Neste contexto os derivados sanguíneos platelet-rich plasma (PRP) and platelet-rich fibrin (PRF) na própria utilização tópica, parecem ter um papel relevante, encontrando-se relacionados com numerosos procedimentos cirúrgicos em muitas áreas médicas, nomeadamente em cirurgia maxilo-facial (Del Corso 2012, Simonpieri 2012) cirurgia plástica (Cieslik-Bielecka 2012) e medicina do desporto (Dohan Ehrenfest 2014, Zumstein 2011).

O potencial terapêutico baseia-se na produção de fatores de crescimento pelos grânulos α das plaquetas como platelet-derived growth factor (PDGF), transforming growth factor (TGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), insulin like growth factor (IGF) and epidermal growth factor (EGF) (Alsousou 2009, Mishra 2009). Além disso as plaquetas libertam uma multitude de proteínas bioativas como a stromal derived factor 1 (SDF-1) que tem uma forte capacidade quimiotática pelas células mesenquimais, macrófagos e fibroblastos, assim como sintetizam matriz extracelular (ECM) e promovem angiogenese. (De Mos 2008).

O objetivo dos primeiros preparados foi separar as componentes plasmáticas de maneira a obter um concentrado rico em plaquetas capaz de induzir e estimular o processo de regeneração tecidual no doente. Posteriormente observou-se que, além das plaquetas, a inclusão de outras componentes plasmáticas como fibrina e leucócitos poderia ter algum papel no processo de cura, sendo que foi demonstrado que a ativação alternativa dos monócitos/macrófagos está envolvida no controlo da resposta inflamatória assim como na regulação do gene Runx2 associado à diferenciação osteoblástica e consequentemente responsável pela primeira linha de formação óssea. (Takeshi Kawazoe 2012, Dohan, 2010,2009)

Neste trabalho vamos analisar e comparar a maior ou menor eficácia dos diferentes protocolos clínicos que progressivamente modificaram as componentes biológicas presentes em cada um dos preparados (L-PRP/ L-PRF/ A-PRF), focalizando a atenção no impacto da fibrina e da maior inclusão de leucocitos, na prática cirúrgica, nos efeitos antimicrobianos e na regeneração tecidual.

II. MATERIAIS E MEDODOS

Foram analisados 76 artigos entre revisões sistemáticas, revisões narrativas, ensaios clínicos e estudos *in vitro* e *in vivo*. A escassa presença de meta análise foi um fator importante na impossibilidade de elaborar conclusões objetivas.

A grande abundância de marcas comerciais e de protocolos desenvolvidos no mercado tornou o trabalho de seleção complicado evidenciando erros intrínsecos em vários estudos analisados.

A pesquisa foi realizada nas principais plataformas PubMed e B-on com palavras chaves: “PRP vs L-PRP”, “L-PRP - L-PRF” “A-PRF”, “Leukocyte - platelet concentrates”, “platelet concentrate oral surgery”, “platelet concentrate healing proces”, *Leukocyte and bone regeneration*”. “comparative L-PRF PRP” num arco temporal que abrangeu os últimos 20 anos.

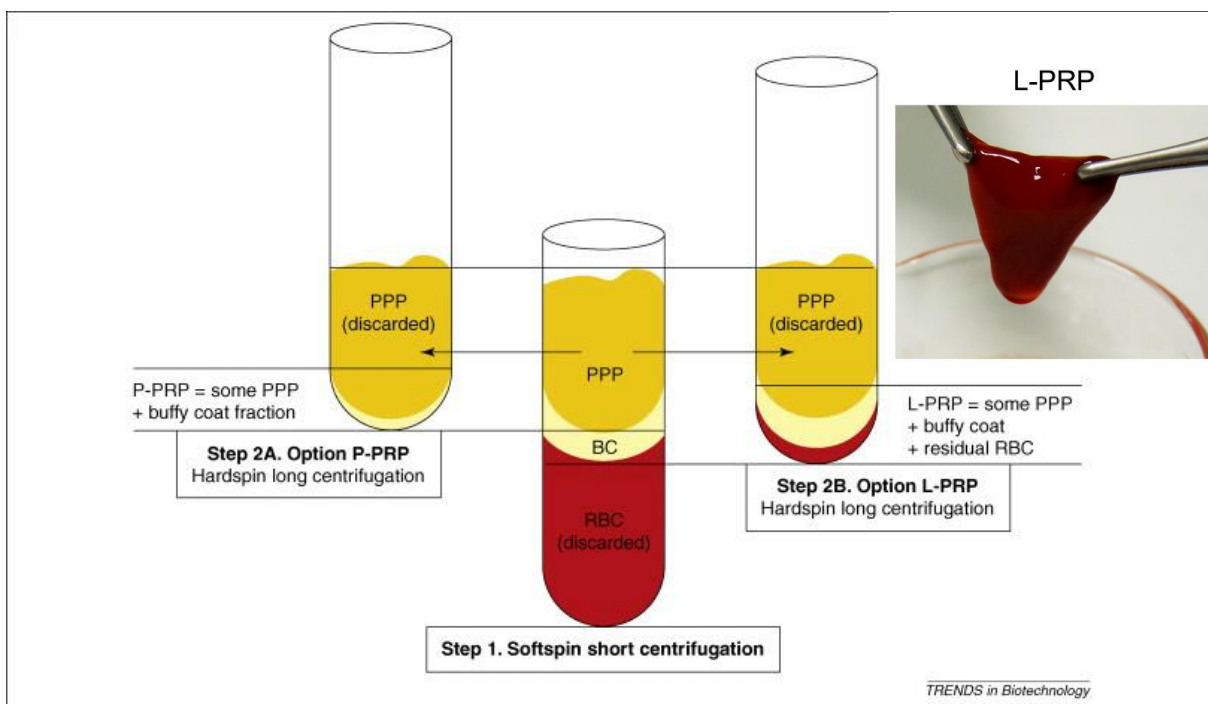


Fig 1- Protocolo manual clássico de dois passos do PRP. (adaptado de Dohan 2009)

III. DESENVOLVIMENTO

1. L-PRP. A inclusão dos leucócitos no protocolo de centrifugação.

O uso corrente do termo Plasma rico em plaquetas começou com um artigo de Marx et al. em 1998. Os autores estudaram o efeito do PRP numa reconstrução óssea maxilar ativando o centrifugado com trombina bovina que se tornou em gel. Posteriormente surgiram mais de 10 protocolos diferentes o que impossibilita uma meta-análise, tornando ainda mais necessário um esclarecimento da classificação. (Mautner 2015)

No estudo de Dohan Ehrenfest et al. em 2009, os concentrados plaquetários foram classificados na base da concentração de plaquetas, da concentração dos leucócitos e na presença ou ausência de fibrina. Neste sentido o PRP foi dividido em duas categorias: o P-PRP (pure platelet rich plasma) e L-PRP (leukocyte platelet rich plasma). Várias tentativas foram realizadas para incluir mais leucócitos na preparação de PRP, nomeadamente protocolos manuais e automáticos de centrifugação (Weibrich 2003). Cada método utiliza um procedimento de dois passos de centrifugação nas quais no primeiro passo se separam as componentes sanguíneas em 3 camadas RBCs, ‘buffy coat’ and PPP. O PPP e as camadas de “buffy coat” depois são recolhidas com cuidado de maneira a evitar uma contaminação e transferidas para um outro tubo, onde são centrifugadas pela segunda vez a alta velocidade de rotação, para separar a amostra ainda nas suas componentes. Depois da segunda passagem a maioria do PPP são descartados e o PRP resultante está rico em plaquetas, leucócitos e fibrinogénio circulante além de restos de células vermelhas. A aplicação precisa de trombina bovina ou cloreto de cálcio (Leitner 2006). (Fig 1)

2. Potencial antimicrobiano e osteogénico do L-PRP

A nomenclatura que define o L-PRP como um concentrado sanguíneo com uma maior inclusão de leucócitos, baseia-se numa análise da população leucocitária presente nos diferentes centrifugados obtidos nos diferentes protocolos disponíveis no mercado.

Num estudo em ratos com citometria de fluxo, no protocolo manual e automático de dupla centrifugação usada, foram identificadas diferentes famílias de leucócitos, nomeadamente linfócitos T; linfócitos B; células NK; monócitos e granulócitos. (Cieslik-Bielecka 2010, Bielecki 2009) No entanto, parece evidente que como os métodos de preparação são consideravelmente diferentes entre si, assim como a manipulação do biomaterial, produzem significativas variações nas

quantidades de componentes hemáticas em cada um dos centrifugados revelando um intervalo bastante significativo. Nenhum estudo efetuado mostra uma diferença nos números totais de células brancas, assim a percentagem em cada um dos protocolos de L-PRP é desconhecida. (D'asta 2017)

O impacto dos leucócitos no processo de cura foi analisado pela primeira vez num trabalho do Bielecki et al. 2007. Os autores conduziram um estudo *in vitro* recolhendo sangue de voluntários saudáveis para analisar a atividade microbiana do L-PRP ativado com trombina bovina em solução de cloreto de cálcio a 10% contra as bactéria mais frequentemente envolvidas nos processos infecciosos: MSSA, MRSA, *E.coli*, ESBL (extended spectrum beta lactamase), *K. pneumniae*, *E. faecalis*, e *P. aeruginosa* . Os resultados mostraram uma grande atividade antimicrobiana contra MSSA, MRSA e *E.coli* e nenhuma atividade contra *E. faecalis*, *K. pneumoniae*, and *P. aeruginosa*. Além disso parece que o crescimento do *P. aeruginosa* aumentava ao adicionar L-PRP. Portanto, não foi possível identificar uma correlação entre atividade antibacteriana e a maior presença de leucócitos.

O estudo conduzido por Moojen et al, 2008, foi a primeira tentativa de reconhecer uma contribuição específica dos leucócitos nas preparações do L-PRP. Os autores utilizaram uma centrifuga quase automática para obter PRP, obtendo altas concentrações de plaquetas e leucócitos. o L-PRP resultante foi ativado pela trombina autóloga ou bovina e a comparação foi efetuada com PPP (platelet-poor plasma), PRP e PBS (phosphate buffered saline), este último utilizado como controlo. Nas diferentes preparações foi testada a atividade bactericida contra MSSA e, embora todas mostrassem uma atividade antimicrobiana, o L-PRP ativado com trombina autóloga mostrou ter o maior poder antimicrobiano e maior duração dos efeitos (24h).

Desde então, muitos autores referiram resultados heterogêneos na atividade antimicrobiana do L-PRP. A maioria dos estudos analisados, evidenciaram a capacidade antimicrobiana do gel PRP contra as principais bactérias de referência. Contudo, as conclusões não são uniformes sobre um maior potencial antimicrobiano do L-PRP, tal, por causa da variedade de protocolos utilizados. (Mariani 2015, Intravia 2014, Lopez 2014)

O que é recorrente na avaliação dos resultados, é a grande relevância atribuída aos ativadores das preparações como o cloreto de cálcio e a trombina bovina. Uma das hipóteses seria que a utilização de ativadores externos pode interferir na eficácia e até inibir o *surplus* de atividade antibacteriana nas preparações L-PRP. (Anitua 2012; Burnouf 2013; Chen 2013).

Da mesma maneira resultados heterogêneos foram obtidos na comparação do potencial osteogénico entre PRP e L-PRP.

Como foi referido a nível biológico as altas concentrações plaquetárias têm poder para sintetizar fatores de crescimento nomeadamente o TGF- β . A superfamília TGF- β inclui mais de quarenta elementos entre os quais bone morphogenetic proteins (BMPs), uma importante citocina que pode ajudar no processo de formação óssea com a capacidade de contribuir para a mitose e quimiotaxia das células progenitoras do perioste e do enxerto autógeno. (Dohan 2009).

Na base desta hipótese surgiram vários estudos *in vitro* nos quais ao adicionar o derivado sanguíneo numa cultura aumentava a proliferação e diferenciação de células mesenquimatosas (MSCs) (El Backly 2013).

Apesar disso, ainda não há concordância acerca dos efeitos clínicos do PRP na osteogénese, quer isoladamente, quer combinados com outros biomateriais com potencial osteocondutivo. Tal deve-se, às variações nas preparações do PRP que alteram a qualidade e quantidade de plaquetas e por consequência dos fatores de crescimento (Roffi 2016). Além do mais a maioria dos autores que mencionam o PRP nos próprios trabalhos na secção de materiais e métodos utilizam um protocolo de dois passos de centrifugação o que supostamente inclui mais quantidade de leucócitos, porém, não especificam a remoção intencional de leucócitos nos preparados finais.

No trabalho de Wenjing Yin et al (2016) os autores tentaram de facto separar os resultados *in vitro* dos resultados *in vivo* das duas diferentes preparações P-PRP e L-PRP, mostrando que nos preparados com maior concentração de leucócitos havia mais presença de IL-1 β e TNF- α ou seja, mais presença de citocinas pro-inflamatórias e que o P-PRP promove a proliferação, viabilidade e migração de HBMSCs e em geral o processo de cura de maneira mais efetiva do L-PRP.

Resultados parecidos foram encontrados também nos ensaios de Portela et al, (2014), sobre calvárias. O estudo evidenciou que a utilização de L-PRP como adjuvante a um enxerto autógeno diminui a deposição óssea em comparação à utilização única do enxerto autógeno.

Nos trabalhos de Giovannini et al. (2014) surgiram evidências do facto de o TGF- β poder inibir as fases finais de diferenciação dos osteoblastos, suprimindo a expressão do BMP2 ou pode interagir com a osteoproteína Wnt-10b que impede a via clássica de maturação das células ósseas diminuindo assim a formação de nova matriz.

Para concluir desde que o estudo de Mooren et al, (2010), demonstrou que o valor total de fatores de crescimento em altas ou baixas concentrações plaquetárias de PRP resulta ser estatisticamente semelhante, e que foi observado que a formulação heterogénea das fabricações do PRP pode incluir mais o menos leucócitos no produto final (Arnoczky 2013), podemos concluir que as células brancas podem ser responsáveis pela discrepância de resultados encontrados na literatura acerca da utilização de PRP .

3. L-PRF. A segunda geração de concentrados plaquetários

Por causa de restrições legais no manuseamento do sangue, nasceu em França pelo trabalho do professor Choukroun uma nova família de concentrados plaquetários específica para cirurgia oral e maxilofacial chamada PRF (Platelet rich fibrin). Este novo biomaterial foi descrito no trabalho de Dohan et al (2006) como uma matriz cicatricial autóloga. A técnica não requiere anticoagulantes, trombina bovina ou outros agentes. Trata-se de nada mais do que de uma coleta de sangue centrifugado numa máquina de centrifugação específica e guardada depois num kit.

O protocolo do PRF é muito simples: 10 ml de sangue periférico do paciente recolhido sem anticoagulantes e imediatamente centrifugado a 3000 RPM durante 10 minutos. A ausência de anticoagulantes implica a ativação em poucos minutos da maioria das plaquetas em contacto com as paredes dos tubos e o início da cascata da coagulação. O fibrinogénio inicialmente encontra-se na parte mais alta do tubo, antes que a trombina circulante o transforme em fibrina. A membrana de fibrina aparece no meio do tubo entre os glóbulos vermelhos no fundo e o plasma acelular no topo. Com a utilização de uma tesoura a parte amarela separa-se da parte vermelha inferior, e com um dispositivo contido numa box do sistema, estéril, comprime-se o PRF obtido para criar uma membrana elástica de cerca 3cm x 1.5 cm.

O sucesso da técnica está totalmente dependente da tempestividade da passagem da coleta de sangue para a máquina de centrifugação, uma vez que a fibrina polimeriza muito rapidamente, e assim obtém-se uma matriz muito resistente rica em soro e plaquetas. O PRF difere do PRP em diferentes parâmetros que podem ser resumidos na maneira seguinte, a simplicidade da sua preparação e implementação, o tempo de preparação e os custos muito menores, a ausência de ativadores ou anticoagulantes.

Por causa da estrutura tridimensional da fibrina PRF é capaz de aprisionar um maior número de leucócitos que depois libertam citoquinas e fatores de crescimento que se difundem nos tecidos num

tempo gradual e contínuo por um período de 10 dias em contraste com PRP que liberta a maioria dos seus fatores de crescimento nos primeiros dias (Miron 2017). Mais, a fibrina por si mesma tem uma influência geral no processo de cura (Clark 2001) nomeadamente na promoção de neoangiogênese (Van Hinsbergh 2001). Portanto, num L-PRF, assim denominado pela maior inclusão de células brancas, os efeitos dos leucócitos e da matriz de fibrina estão profundamente interligados.

4. Análise dos leucócitos presentes no L-PRF. A regulação do processo inflamatório.

Na literatura acerca do L-PRF, a população de leucócitos foi evidenciada várias vezes (Dohan 2006, 2009, 2010) A membrana e o coágulo tem no mínimo 50% dos leucócitos do sangue inicial e estas células ficam retidas na matriz tridimensional de fibrina numa distribuição organizada. Os linfócitos são os mais presentes entre as várias populações de leucócitos e ficam mais concentrados na parte amarela mais próxima do coágulo vermelho. A membrana do L-PRF fica cheia de fatores de crescimento e de proteínas da matriz que liberta nos tecidos durante 7 dias e os leucócitos parecem ser os responsáveis pela sobreprodução de alguns destes fatores (nomeadamente VEGF e TGF1) (Dohan 2012)

A fibrina e os produtos de degradação do fibrinogénio (FDP) estimulam a migração celular dos neutrófilos e aumentam a expressão dos recetores de membrana CD11C/CD18. Este último permite a transmigração dos neutrófilos e a adesão destes ao endotélio e ao fibrinogénio. Além disso a fagocitose dos neutrófilos e o processo de degradação enzimática são modulados pelo FDP. Os monócitos chegam ao sítio de interesse numa fase posterior. A colonização da ferida pelos macrófagos também está regulada pela fibronectina por meio das propriedades físico químicas da fibrina e dos agentes quimiotáticos expressos na própria matriz. Portanto, como já foi evidenciado anteriormente a matriz de fibrina do L-PRF encontra-se relacionada diretamente e indiretamente com a maior presença das células brancas.

Além disso os leucócitos são relacionados com a lenta libertação de citocinas pro-inflamatórias nomeadamente a IL-1 β , IL-6, TNF- α e a produção IL-4. (Ríos 2015) No trabalho de Dohan & Choukroun, (2006), foi evidenciado que o maior potencial inflamatório sugerido pela presença das três citocinas pro-inflamatórias, está controlado pela libertação da IL-4 que suporta a cicatrização regularizando a inflamação para ser um potente indutor do recetor antagonista da IL-1 (IL-Ra). Esta afirmação parece simplifiativa da complexidade das vias de sinalização da citocina e do estado atual da literatura sobre o papel e o impacto da IL-4 no processo de regulação da inflamação, que

está ainda pouco esclarecido (Luzina 2012). Além disso, alguns autores recomendaram a exclusão dos leucócitos nos preparos, pela possibilidade de haver um aumento na resposta inflamatória e na secreção de hidrólase e metaloprotéase, além de outras proteases pro-inflamatórias. (Anitua 2004, 2007)

5. Análise comparada entre L-PRF e PRP na regeneração tecidual.

No estado atual da literatura realizar uma comparação entre os preparados de primeira e segunda geração sobre a eficácia na regeneração tecidual e nos efeitos destes biomateriais nas diferentes células, resultou muito complicado. Infelizmente os resultados *in vitro* são muito contraditórios devido ao facto de muitos estudos terem erros de metodologia intrínsecos (Dohan, 2010), e as escassas evidências *in vivo* ainda não parecem suficientes para tirar conclusões efetivas o que leva à necessidade de conduzir mais estudos.

Uma atenta análise mostrou que estes produtos induzem uma significativa estimulação da proliferação celular (pelo menos nos que são sensíveis aos grânulos alfa das plaquetas) dos osteoblastos (Celotti 2006, Arpornmaeklong 2004), condrócitos (Ferreira 2005), fibroblastos (Uggeri 2007, Akeda 2006) células endoteliais (Annunziata 2005) e células mesenquimais (Han 2007). Ao contrário alguns artigos mostraram que os geles de PRP não tem efeito na proliferação de osteoblastos e fibroblastos (Krasna 2007), e têm um efeito negativo nos macrófagos (Bertrand-Duchesne 2010). Outros estudos mostraram que o PRP estimula a proliferação, mas inibe a diferenciação dos osteoblastos (Doucet 2005), e células ósseas mesenquimais (BMSC) (Slapnicka 2008, Woodall 2007). Estes resultados parecem lógicos devido ao facto de os fatores de crescimento desenvolverem um padrão proliferativo. Contudo, os padrões de proliferação/diferenciação nestes modelos *in vitro* estão intimamente relacionados com as condições do próprio teste.

Pela análise feita o equilíbrio entre proliferação e diferenciação pode ser considerado como uma regra básica para analisar e comparar a maior ou menor eficácia entre L-PRF e PRP: PRP estimula a proliferação e inibe, ou pelo menos não estimula, a diferenciação celular *in vitro*.

Esta regra geral do PRP não parece ser aplicável ao L-PRF. No trabalho de Dohan et al 2009, 2010 os autores observaram que a membrana do L-PRF promove de maneira simultânea a estimulação e diferenciação de uma maneira dose-dependente dentro das culturas de células primárias do mesmo doador humano. Portanto, para o L-PRF, estes dois padrões celulares estão presentes e altamente estimulados em culturas, e o papel dos leucócitos e da arquitetura da matriz de fibrina parecem ser os recursos desta específica reação biológica. Além do mais não foram evidenciados efeitos

citotóxicos relacionados com a quantidade de L-PRF utilizada, isto porque provavelmente o L-PRF interage com as células como um biomaterial sólido e não como uma solução farmacêutica (PRP). Finalmente o mecanismo celular subjacente tem de ser percebido para preparar e utilizar estes produtos de maneira eficaz. (FIG 2 A-B))

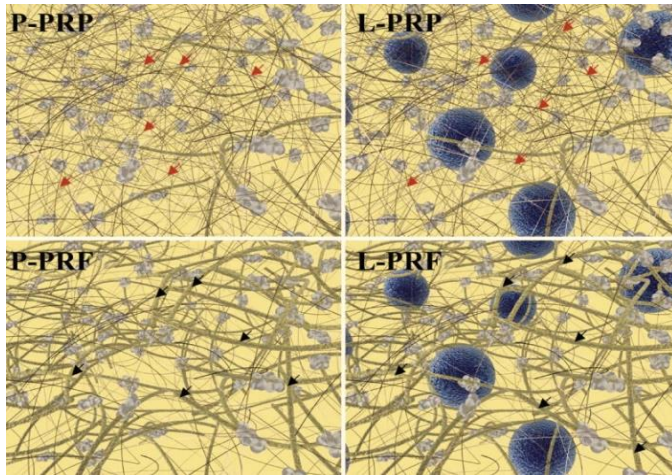
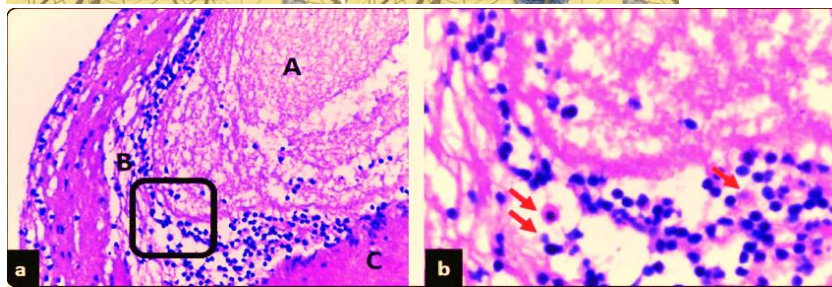


Fig. 2 A ilustração esquemática da arquitetura da matriz e das células retidas. Nas quatro diferentes preparações.

Dois parâmetros chave são identificáveis: conteúdo de leucócitos (células azuladas) e densidade da fibrina (fibras amarela-acastanhadas). Os agregados plaquetários (cinza claro) são sempre retidos nas fibras de



fibrina. Em preparações típicas de P-PRP e L-PRP, a rede de fibrina é imatura e consiste principalmente de fibrilas com pequeno diâmetro (setas vermelhas). Esta rede de fibrina

suporta a aplicação de plaquetas durante a cirurgia, mas dissolve-se rapidamente como uma cola de fibrina. Nas preparações de P-PRF e L-PRF, as fibras de fibrina são espessas (setas pretas) devido à montagem múltipla de fibras e constituem uma matriz resistente. Fig 2 B Micrografia do coágulo de L-PRF mostrando (a): rede de fibrina (A), camada leucoplaquetária (B) glóbulos vermelhos (C). (b) amplificação da área quadrada; a fibrina aparece homogênea em rosa claro. Os núcleos de leucócitos e plaquetas estavam mais localizados na junção entre os eritrócitos e a porção de fibrina. Os leucócitos podem ser facilmente identificados (setas). (Adaptado Reham 2017, Dohan 2009)

6. PRP e Guided bone regeneration (GBR), L-PRF e natural bone regeneration (NBR)

No âmbito da utilização clínica dos concentrados plaquetários, uma abordagem interessante foi sugerida pelo trabalho de Del Corso et alii 2012 sobre a evolução do conceito de GBR e sobre a análise das propriedades mecânicas da membrana de L-PRF.

Os autores referiram que na GBR as membranas não reabsorvíveis são associadas com um atraso na cicatrização com conseqüente contaminação bacteriana, necrose tecidual e falha na regeneração. Membranas reabsorvíveis são frequentemente xenoenxertos (porcino ou bovino) e podem ser rejeitados pelo paciente; além do mais não são mecanicamente bastante resistentes para proteger o compartimento ósseo a regenerar, e muitas vezes é preciso o enxerto ósseo por baixo da membrana para proteger e manter a morfologia. Neste contexto o gel de PRP parecia ser o adjuvante perfeito para incrementar a estabilidade do coágulo por baixo da membrana com a cura dos tecidos moles acima da membrana. Contudo, mais uma vez os resultados na literatura são heterogêneos (Bannister 2008)

A utilização da membrana de L-PRF durante os tratamentos de defeitos intraósseos foi chamada NBR e representa uma técnica alternativa do GBR onde a interligação entre os tecidos moles e duros é fundamental. O conceito da NBR é de regenerar tecidos utilizando uma amplificação do processo natural de cicatrização para além da situação inicial do paciente. Tal foi possível de realizar através da membrana do L-PRF que funciona como material de preenchimento com ou sem osso utilizado para manter o espaço, ou como proteção para a câmara de regeneração quer no osso quer nos compartimentos gengivais.

Esta abordagem baseia-se principalmente nas propriedades intrínsecas polivalentes da membrana do L-PRF, no que se refere à capacidade biológica de induzir proliferação e diferenciação de muitas células. (Dohan 2009, 2010). Contudo, o mecanismo biológico que define a NBR é muito mais complexo que a simples estimulação de fatores de crescimento: primeiro no interior do compartimento ósseo, o L-PRF funciona como o coágulo natural utilizado na GBR por baixo da membrana, com a única diferença do coágulo do PRF ser mais estável. Em segundo lugar, o princípio-chave da NBR é proteger o compartimento regenerativo ósseo apenas com membranas autólogas L-PRF e evitar o uso de membranas convencionais e, assim, reduzir os problemas encontrados na GBR. Neste sentido, as membranas L-PRF não só melhoram a neoangiogénese e o selamento da ferida, mas também desempenham a função de barreira competitiva entre os compartimentos ósseo e gengival. Assim, permite reforçar naturalmente a fronteira entre os 2 compartimentos e estimular a regeneração sincronizada. Em terceiro lugar, também é um parâmetro-chave do conceito NBR o impacto da cobertura L-PRF na cicatrização e remodelação dos tecidos moles. Esta é outra diferença principal com GBR, onde a regeneração gengival foi sempre secundária: na NBR, a regeneração dos compartimentos ósseo e gengival é sincronizada. A diferença entre GBR e NBR é, portanto, não apenas uma questão de família de membranas, é uma filosofia completamente diferente de tratamento cirúrgico: o conceito GBR é orientar e forçar o

osso e a gengiva a curar separadamente de forma artificial, enquanto o conceito NBR é estimular o potencial de cura natural de ambos os tecidos e orientar o desenvolvimento interconectado dos compartimentos ósseo e gengival ao longo da interface L-PRF.

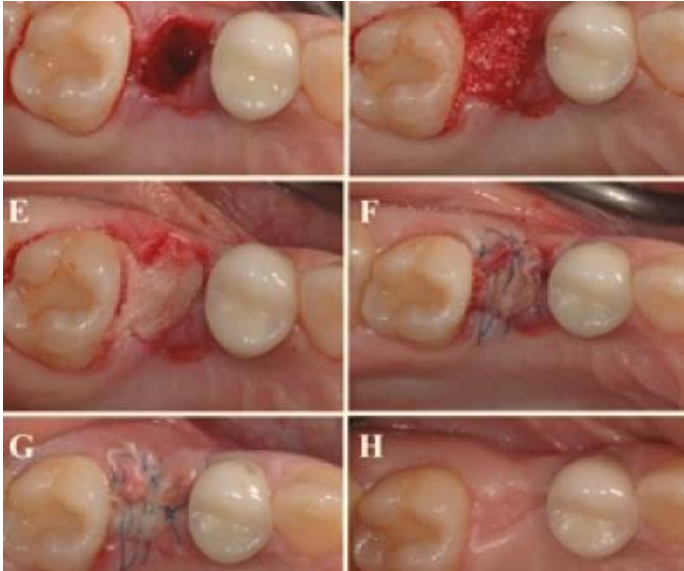


Fig. (3). Regeneração de tecido mole após avulsão. com L- PRF C) Avulsão atraumática do pré-molar e curetagem D). O alvéolo foi preenchido com uma mistura de L-PRF e osso xenogênico E) Uma membrana L-PRF foi dobrada em 3 camadas, adaptada e colocada acima do alvéolo cheio. F) Realizo de suturas múltiplas para bloquear e estabilizar a membrana dobrada com os limites da ferida. A camada externa de LPRF permaneceu em

contato com a cavidade oral. G) Após 24 horas, a reepitelização superficial na membrana L-PRF e o fechamento da ferida estavam em progresso. H). Após 4 semanas, (adaptado Del Corso et al 2012)

Por fim a técnica NBR supera outras limitações clínicas da GBR, pois a utilização dum coágulo sanguíneo autólogo otimizado pode ser utilizado em todos os tipos de pacientes (mesmo pacientes sob anticoagulantes, fumadores, etc.), além da membrana poder ser suturada e permanecer parcialmente exposta na cavidade oral, uma vez que as abas do tecido gengival estão muito danificadas e retraídas (ou simplesmente muito curtas quando o volume enxertado é muito grande) para cobrir completamente todo o local cirúrgico (FIG 3). A ideia que um biomaterial totalmente autólogo pode ter uma influência no potencial de regeneração tecidual confirma-se na revisão sistemática de Castro et al do 2016, onde a eficácia do L-PRF foi analisada em vários artigos que documentavam diferentes situações clínicas. Nos defeitos intraósseos, lesões de furca e cirurgia plástica periodontal o L-PRF mostra ser uma alternativa eficaz na regeneração dos tecidos moles e duros além de ser eficaz no controlo da dor pós-operatória.

7. A-PRF. Um biomaterial baseado nas células brancas

As recentes evidências do papel que as células brancas podem empregar na regeneração óssea e de crescimento dos vasos sanguíneos (Omar & Thomsen, 2012,), levou Joseph Choukroun em 2014 a introduzir um novo protocolo de centrifugação chamado CHOUKROUN'S Advanced PRF™ ou A-

PRF™. A ideia de base foi de desenvolver um biomaterial a partir do L-PRF, capaz de incluir o maior número possível de leucócitos e nomeadamente monócitos que tem recetores BMP e são capazes de produzir BMP-2 e BMP-7, além de ter um papel na produção de VEGF. (Choukroun 2014)

Os primeiros estudos mostraram, de fato, resultados interessantes em termo de vascularização inicial, crescimento dos tecidos moles mais rápidos, e maior libertação de citocinas em comparação com o L-PRF. (Ghanaati 2014)

O protocolo de centrifugação do A-PRF implica uma menor velocidade de rotação em comparação ao L-PRF (1500 rpm), mais tempo (14 minutos) e a utilização de tubos de vidro estéreis (Tubos A-PRF10). Para o autor este protocolo tem a capacidade de reter linfócitos B e T, de alcançar uma distribuição mais uniforme de plaquetas e neutrófilos, além de uma maior inclusão de plaquetas. Os monócitos residentes aparecem mais desenvolvidos assim como os macrófagos e os linfócitos (Ehrenfest 2014). Clinicamente, isso pode-se traduzir numa maior libertação de fatores de crescimento, apesar de vários autores terem referido resultados contraditórios.

Num trabalho de Pinto et al 2014 foi evidenciado como o novo protocolo de centrifugação produz membranas mais leves, mais curtas e mais estreitas, com uma polimerização baixa e corpos esmagados (FIG 4). Quando a quantidade de fatores de crescimento (TGF, PDGFbAB, VEGF) libertados de A-PRF foi comparada com a de L-PRF, verificou-se que os níveis eram inferiores, cerca de metade, aos do L-PRF (Ehrenfest 2014). No entanto, num outro estudo, observou-se que o A-PRF libertou quantidades significativamente maiores de fatores de crescimento quando comparado ao PRF tradicional. (Kobayashi 2016). Finalmente, um estudo de Choukroun e Ghanaati do 2018 sugere que os concentrados produzidos com protocolos de baixa velocidade de centrifugação podem ter uma capacidade maior de aprisionar leucócitos, plaquetas e fatores de crescimento. Contudo, há literatura limitada sobre a comparação entre os dois protocolos e são necessários mais estudos para verificar os benefícios e limitações do A- PRF vs L-PRF.

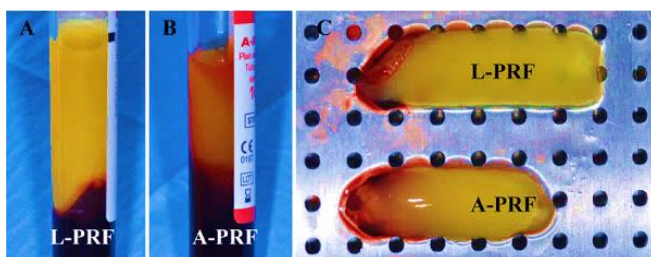


Figura 4. Comparação entre estrutura da membrana de fibrina no L-PRF e no A-PRF (Adaptado Dohan 2017).

IV. DISCUSSÃO

A eficácia biológica dos derivados sanguíneos deve ser centrada na libertação de fatores de crescimento pelos grânulos α das plaquetas e, de maneira complementar na ação imunológica dos leucócitos. Estes biomateriais funcionam como uma bomba biológica que, uma vez introduzida no local de interesse, induzem uma proliferação das células adjacentes com alguma relevância no potencial de diferenciação celular.

O objetivo deste trabalho foi o de analisar a maior ou menor eficácia produzida pela inclusão das células brancas e da fibrina nos concentrados plaquetários de primeira e segunda geração e o impacto destes componentes biológicos na regeneração tecidual, por forma a tentar produzir um esclarecimento na evolução dos protocolos que apareceram no mercado.

De maneira geral podemos afirmar que, todos os geles de PRP elevam os tecidos para um padrão proliferativo, mas o impacto na diferenciação celular é mais difícil de determinar. Todas as preparações que tentaram incluir mais leucócitos no PRP (L-PRP) revelaram resultados heterogêneos, mostrando problemas de homogeneidade nos protocolos de centrifugação e na nomenclatura dos diferentes geles, além de terem erros intrínsecos nos estudos que complicam ainda mais a análise dos resultados *in vitro* e *in vivo*.

Neste contexto, a maior inclusão de leucócitos por si mesma não pode sugerir um maior potencial regenerativo, apesar de ter um papel fundamental nas fases iniciais da inflamação e de influenciar o processo de regeneração tecidual e o potencial antimicrobiano. A interferência provocada pelas soluções externas utilizadas como ativadores como a trombina bovina ou cloreto de cálcio, além da associação com outros materiais de enxerto com potencial osteocondutivo, pode mascarar todos os resultados.

Por fim temos que evidenciar que a dificuldade na manipulação sanguínea e nos protocolos de preparação do PRP tornou cada vez mais difícil a aplicação destes preparados na prática clínica diária.

Os concentrados plaquetários de segunda geração nomeadamente L-PRF e A-PRF, surgiram no mercado para superar as limitações observadas nos gels de PRP, com base na ideia de que uma maior inclusão de leucócitos numa rede tridimensional de fibrina poderia incrementar o potencial osteogénico e antimicrobiano dos concentrados.

Neste sentido, os resultados sugeridos pelos autores do novo protocolo parecem confirmar a relevância na regulação do processo inflamatório por causa da maior inclusão dos leucócitos, e o impacto positivo das propriedades mecânicas e biológicas da fibrina no suporte do processo de migração celular e de regeneração tecidual. Contudo, ainda há uma falta de evidência sobre o impacto produzido pelas células brancas o que leva a uma dúvida considerável sobre a maior eficácia biológica destes biomateriais, até que algum autor desenvolva protocolos alternativos que removem intencionalmente os leucócitos para reduzir a fase inflamatória, e assim obtermos um efeito comparativo.

No que se refere à sua utilização clínica, a membrana de L-PRF pode ser facilmente manipulada e utilizada como uma membrana alternativa na GBR com a função de barreira competitiva capaz de estimular a proliferação e diferenciação dos fibroblastos, osteoblastos e das células mesenquimais, pode ser suturada e ficar exposta na cavidade bucal com a função de proteger imunologicamente o sitio cirúrgico a regenerar e pode levar mais estabilidade ao coágulo natural do paciente com ou sem adição de enxertos ósseos. Todas estas propriedades sugerem uma nova abordagem na regeneração guiada de tecidos onde a utilização de um material completamente autólogo e versátil pode ser considerada uma verdadeira opção de tratamento eficaz.

No que se refere ao A-PRF há literatura limitada sobre as evidências dos benefícios e limitações deste novo concentrado em comparação ao L-PRF, mas devemos ter em conta que a validade dos resultados deve ser baseada na análise de artigos independentes dos autores que produziram os diferentes protocolos de centrifugação.

V. CONCLUSÃO

De acordo com esta revisão não se pode concluir que a maior inclusão de células brancas nos protocolos de centrifugação melhorou por si mesma a eficácia dos concentrados plaquetários quer em relação à regeneração tecidual quer na atividade antimicrobiana.

Todos os estudos, para além de evidenciarem alguma relevância no controlo da fase inflamatória, mostraram resultados heterogêneos no impacto produzido pelos leucócitos, quer nos preparados de primeira quer de segunda geração, levando alguns autores a considerarem uma contraindicação a própria inclusão.

Por sua vez, parece esclarecido que a matriz de fibrina devido à própria estrutura tridimensional facilita a migração celular e parece estar relacionada com um maior aprisionamento e melhor distribuição das células o que leva a um maior potencial na libertação de fatores de crescimento. Além disso a facilidade de manipulação clínica da membrana de fibrina e a sua versatilidade parecem ser a chave num modelo de regeneração autóloga mais eficaz.

Mais estudos clínicos em animais e humanos tornam-se necessários para avaliar o impacto que estas células têm nos processos de cura.

BIBLIOGRAFIA

1. Akeda, K. et alii (2006), Platelet-rich plasma stimulates porcine articular chondrocyte proliferation and matrix biosynthesis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 14(12), 1272-1280.
2. Alsousou J et alii (2009). The biology of platelet-rich plasma and its application in trauma and orthopaedic surgery: A review of the literature. *Journal of Bone and Joint Surgery British volume* 91:987-996.
3. Anitua E et alii (2004). Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 91:4–15.
4. Anitua E et alii (2007). The potential impact of the preparation rich in growth factors (PRGF) in different medical fields. *Biomaterials*; 28, pp. 4551–4560.
5. Anitua E et alii. (2012). Antibacterial effect of plasma rich in growth factors (PRGF^(R)-Endoret^(R)) against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* strains. *Clinical and Experimental Dermatology* 02 15;372012:652–657.
6. Annunziata M. et alii. (2005) In vitro cell-type specific biological response of human periodontally related cells to platelet-rich plasma. *Journal of Periodontal Research*, 40(6), pp. 489-495.
7. Arnoczky SP e Sheibani-Rad S (2013). The basic science of platelet-rich plasma (PRP): what clinicians need to know. *Sports Medicine and Arthroscopy Review*; 21(4) pp180-185
8. Arpornmaeklong, P et alii (2004). Influence of platelet-rich plasma (PRP) on osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells. An in vitro study. *Internal. Journal of. Oral and Maxillofacial. Surgery*, 33(1), 60-70.
9. Bannister, S.R e Powell, C.A (2008). Foreign body reaction to anorganic bovine bone and autogenous bone with platelet-rich plasma in guided bone regeneration. *Journal of Periodontology*, 79(6), pp. 1116-1120.
10. Bertrand-Duchesne et alii (2010). Epidermal growth factor released from platelet-rich plasma promotes endothelial cell proliferation in vitro. *Journal. of Periodontal Research*, 45(1), 8793.
11. Bielecki TM et alii (2007). Antibacterial effect of autologous platelet gel enriched with growth factors and other active substances: an in vitro study. *Journal of Bone and Joint Surgery British volume*; 89(3) pp. 417–420.
12. Bielecki, T et alii (2009). The analysis of leukocytes for CD3, CD14, CD15, CD16, CD19, CD45, CD56 with progenitor cells (CD34+) and platelet-derived growth factors in blood and platelet-leukocyte rich plasma/gel - preliminary report. *Polish Journal of Environmental*

Studies, 18(1A), pp. 649-652.

13. Burnouf T et alii (2013). Antimicrobial activity of platelet (PLT)-poor plasma, PLT-rich plasma, PLT gel, and solvent/detergent-treated PLT lysate biomaterials against wound bacteria. *Transfusion*, 53(1) pp. 138–146.
14. Castro et alii (2016). Regenerative potential of leucocyte- and platelet-rich fibrin. Part A: intra-bony defects, furcation defects and periodontal plastic surgery. A systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Periodontology* 44(1), pp.67–82
15. Celotti, F et alii (2006). Effect of platelet-rich plasma on migration and proliferation of SaOS-2 osteoblasts: role of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta. *Wound Repair and Regeneration.*, 14(2), 195-202.
16. Chen L et alii (2013). Antibacterial effect of autologous platelet-rich gel derived from subjects with diabetic dermal ulcers in vitro. *Journal of Diabetes Research*; 269527.
17. Choukroun e Ghanaati (2018) .Reduction of relative centrifugation force within injectable platelet-rich-fibrin (PRF) concentrates advances patients own inflammatory cells, platelets and growth factors: the first introduction to the low speed centrifugation concept. *European Journal of Trauma and Emergency Surgery*, 44(1), pp. 87-95.
18. Choukroun J (2014). Advanced PRF and i-PRF: Platelet concentrate or blood concentrate? *Journal of Periodontal Medicine and Clinical Practice*, pp. 1-3.
19. Cieslik-Bielecka A et alii (2012) L-PRP/L-PRF in esthetic plastic surgery, regenerative medicine of the skin and chronic wounds. *Current Pharmaceutical Biotechnology*; 13, pp. 1266–1277.
20. Cieslik-Bielecka, A (2010). Estimation of an influence the autogenous growth factors on postoperative wound healing processes in animals and patients with double mandibular fracture, and patients with chronic wounds. *Habilitation work. Medical University of Silesia*, 6, pp. 1-164.
21. Clark, R.A (2001). Fibrin and wound healing. *Annals. N.Y. Academical. Science.*,936, pp 355-367.
22. D’asta F et alii.(2017). The contribution of leucocytes to the antimicrobial activity of platelet-rich plasma preparations: a systematic review, *Platelets*, 6, pp. 1-12.
23. De Mos M et alii (2008). Can platelet rich plasma enhance tendon repair? A cell culture study. *The American Journal of Sports Medicine*, 36, pp. 1171-117.
24. Del Corso M (2012). Current knowledge and perspectives for the use of platelet-rich plasma (PRP) and platelet-rich fibrin (PRF) in oral and maxillofacial surgery part 1: Periodontal and

- dentoalveolar surgery. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 13(7), pp. 1207–1230
25. Dohan Ehrenfest D.M. et alii (2014). The impact of the centrifuge characteristics and centrifugation protocols on the cells, growth factors and fibrin architecture of a Leukocyte- and Platelet-Rich Fibrin (L-PRF) clot and membrane. Part 1: evaluation of the vibration shocks of 4 models of table centrifuges for L-PRF. *Poseido* 2, pp.129-139.
26. Dohan Ehrenfest D.M.et alii (2006). Platelet-rich fibrin (PRF): a second generation platelet concentrate. Part III: leucocyte activation: a new feature for platelet concentrates? *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontology*, 101(3), pp. 51-55.
27. Dohan Ehrenfest D.M.et alii (2014). The impact of centrifuge characteristics and centrifugation protocols on the cells, growth factors and fibrin architecture of a leukocyte- and platelet rich fibrin (L-PRF) clot and membrane. Part 3: comparison of the growth factors content and slow release between the original L-PRF and the modified A-PRF (Advanced Platelet-Rich Fibrin) membranes. *Poseido*; 2, pp. 155-166.
28. Dohan Ehrenfest DM et alii (2012) Do the fibrin architecture and leukocyte content influence the growth factor release of platelet concentrates? An evidence-based answer comparing a pure platelet-rich plasma (P-PRP) gel and a leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Current Pharmaceutical Biotechnology*; 13(7), pp. 1145-52.
29. Dohan Ehrenfest DM et alii (2014). 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 Journal.*;4, pp.3–9
30. Dohan Ehrenfest DM, et alii (2017). The impact of the centrifuge characteristics and centrifugation protocols on the cells, growth factors, and fibrin architecture of a leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) clot and membrane. *Platelets*, 29(2), pp. 171-184.
31. Dohan Ehrenfest et alii (2010). Shedding light in the controversial terminology for platelet-rich products: platelet-rich plasma (PRP), platelet-rich fibrin (PRF), platelet-leukocyte gel (PLG), preparation rich in growth factors (PRGF), classification and commercialism. *Journal of Biomedical Material Research A*, 95(4), pp. 1280-1282.
32. Dohan Ehrenfest, D.M. et alii (2009). Slow release of growth factors and thrombospondin-1 in Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF): a gold standard to achieve for all surgical platelet concentrates technologies. *Growth Factors*, 27(1), pp. 63-69.

33. Dohan Ehrenfest, D.M. et alii (2010) Platelet-rich plasma (PRP) and platelet-rich fibrin (PRF) in human cell cultures: growth factor release and contradictory results. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontology*, 110(4), pp. 418-421.
34. Dohan Ehrenfest, D.M. et alii (2010). Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF) stimulates in vitro proliferation and differentiation of human oral bone mesenchymal stem cell in a dose-dependent way. *Archives of Oral Biology*, 55(3), pp. 185-194.
35. Dohan Ehrenfest, D.M. et alii (2010). Selecting a relevant in vitro cell model for testing and comparing the effects of a Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF) membrane and a Platelet-Rich Plasma (PRP) gel: tricks and traps. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontology*, 110(4), pp. 409-411.
36. Dohan Ehrenfest, D.M. et alii (2010). Three-Dimensional Architecture and Cell Composition of a Choukroun's Platelet-Rich Fibrin Clot and Membrane. *Journal of Periodontology*, 81(4), pp. 546-555.
37. Dohan Ehrenfest, D.M.; et alii (2006) Platelet-rich fibrin (PRF): a second generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontology*, 101(3), pp. 37-44.
38. Dohan Ehrenfest, D.M.; et alii (2006). Platelet-rich fibrin (PRF): a second generation platelet concentrate. Part II: platelet-related biologic features. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontology*, 101(3), pp.45-50.
39. Dohan Ehrenfest, D.M.; et alii (2009). In vitro effects of Choukroun's PRF (platelet-rich fibrin) on human gingival fibroblasts, dermal prekeratinocytes, preadipocytes, and maxillofacial osteoblasts in primary cultures. *Oral Surgery. Oral Medicine. Oral Pathology. Oral Radiology. And Endodontology*, 108(3), pp. 341-352.
40. Dohan Ehrenfest, D.M.; Rasmusson, L.; Albrektsson, T. (2009) Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends in Biotechnology*, 27(3), pp. 158-167.
41. Doucet, C. et alii (2005) Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: a safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. *Journal of Cellular Physiology*, 205(2), pp. 228-236.
42. El Backly RM, et alii (2013). A platelet-rich plasma-based membrane as a periosteal substitute with enhanced osteogenic and angiogenic properties: a new concept for bone repair. *Tissue Engineering Part A* 19(1– 2), pp. 152–165

43. Ferreira, C.F. et alii (2005). Platelet-rich plasma influence on human osteoblasts growth. *Clinical Oral Implants Research.*, 16(4), pp. 456-460.
44. Ghanaati S, et alii (2014). Advanced platelet-rich fibrin: a new concept for cell-based tissue engineering by means of inflammatory cells. *Journal of Oral Implantology*, 40, pp. 679-689.
45. Giovanini AF, et alii (2013). Leukocyte-platelet-rich plasma (L-PRP) impairs the osteoconductive capacity of the autograft associated to changes in the immunolocalization of TGF- β 1 and its co-expression with Wnt10b and CD34 cells. *Journal of Cranio-maxillo-facial Surgery*. 41(7): pp. 180-186.
46. Han J. et alii (2007). The effect of different platelet-rich plasma concentrations on proliferation and differentiation of human periodontal ligament cells in vitro. *Cell Proliferation.*, 40(2), pp. 241-252.
47. Intravia J, et alii (2014). In vitro evaluation of the antibacterial effect of two preparations of platelet rich plasma compared with cefazolin and whole blood. *Muscles Ligaments and Tendons Journal*, 4(1), pp.79–84.
48. Kfir, E.; Kfir, V.; Kaluski, E. (2007) Immediate bone augmentation after infected tooth extraction using titanium membranes. *Journal of Oral Implantology.*, 33(3), pp. 133-138.
49. Kobayashi E, et alii (2016). Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF. *Clinical and Oral Investigation* 20(9), pp. 2353-2360
50. Krasna, M.; et alii (2007). Platelet gel stimulates proliferation of human dermal fibroblasts in vitro. *Acta Dermatovenerologica Alpina Panonica Adriatica*, 16(3), pp. 105-110.
51. Leitner, G.C. et alii. (2006) Platelet content and growth factor release in platelet-rich plasma: a comparison of four different systems. *Vox Sanguinis*, 91, pp. 135–139
52. Lopez C, Alvarez ME, Carmona JU (2014). Temporal Bacteriostatic Effect and Growth Factor Loss in Equine Platelet Components and Plasma, *Veterinary medicine international*, 2014:525826
53. Luzina IG, et alii (2012). Regulation of inflammation by interleukin-4: a review of "alternatives". *Journal of Leukocyte Biology*, 92(4), pp. 753-64
54. Mariani E, et alii (2015). Leukocyte presence does not increase microbicidal activity of Platelet-rich Plasma in vitro. *BMC Microbiology* 15:149.
55. Martin V, Bettencourt A. (2017) Bone regeneration: Biomaterials as local delivery systems with improved osteoinductive properties. *Materials Science Engineering : C*, 82(1) pp. 363-371
56. Mautner K1, et alii (2015). A call for a standard classification system for future biologic research: the rationale for new PRP nomenclature. 7(4), pp. 53-59

57. Miron RJ ,et alii (2017) Use of platelet-rich fibrin in regenerative dentistry: a systematic review. *Clinical and Oral Investigation*. 21(6): pp. 1913-1927
58. Mishra A, Woodall J Jr, Vieira A. (2009). Treatment of tendon and muscle using platelet-rich plasma. *Clinical Sports Medicine*, 28, pp. 113-125.
59. Moojen DJ, et alii. (2008). Antimicrobial activity of platelet-leukocyte gel against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Orthopedic Research*, 26(3), pp.404–410.
60. Mooren RE, et alii. (2010) The effect of platelet-rich plasma in vitro on primary cells: rat osteoblast-like cells and human endothelial cells. *Tissue Engineering Part A*. 16(10), pp. 3159-72.
61. Omar M.et alii (2011). The stimulation of an osteogenic response by classical monocyte activation. *Biomaterial* 32(32), pp.8190-8204.
62. Pinto NR, et alii (2014). The impact of the centrifuge characteristics and centrifugation protocols on the cells, growth factors and fibrin architecture of a Leukocyte- and Platelet-Rich Fibrin (L-PRF) clot and membrane. Part 2: macroscopic, photonic microscopy and Scanning Electron Microscopy analysis of 4 kinds of L-PRF clots and membranes. *Poseido* 2: pp.141-154.
63. Portela GS, et alii (2014). L-PRP diminishes bone matrix formation around autogenous bone grafts associated with changes in osteocalcin and PPAR- γ immunoexpression, *Internal Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*.43(2), pp.261-268.
64. Reham Lotfy Aggour, Hadeel A. Sabry e Gihan Shehatah Hassan. (2017). In vitro evaluation of mechanical and structural properties of Leukocyte-platelet rich fibrin and platelet rich fibrin matrix. *Egyptian dental journal* 63, pp.305:313.
65. Ríos DL, López C, Carmona JU (2015). Platelet-rich gel supernatants stimulate the release of anti-inflammatory proteins on culture media of normal equine synovial membrane explants. *Veterinary medicine international*, 2015:547052.
66. Roffi A, et alii (2017) . Platelet-rich plasma for the treatment of bone defects: from pre-clinical rational to evidence in the clinical practice. A systematic review. *International Orthopaedics* 41(2), pp. 221-2370
67. Simonpieri A, et alii. (2012). Current knowledge and perspectives for the use of platelet-rich plasma (PRP) and platelet-rich fibrin (PRF) in oral and maxillofacial surgery part 2: Bone graft, implant and reconstructive surgery. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 13, pp. 1231–1256.

68. Slapnicka, J. et alii (2008). Effects of activated and nonactivated platelet-rich plasma on proliferation of human osteoblasts in vitro. *Journal. of Oral and Maxillofacial. Surgery.* 66(2), pp. 297-301.
69. Takeshi Kawazoe, Hak Hee Kim. (2012). Tissue Augmentation by White Blood Cell-Containing Platelet-Rich Plasma. *Cell Transplantation*, 21, pp. 601–607.
70. Uggeri, J. et alii (2007). Dose-dependent effects of platelet gel releasate on activities of human osteoblasts. *Journal of Periodontology*, 78(10), pp. 1985-1991.
71. van Hinsbergh, V.W.; Collen, A.; Koolwijk, P. (2001) Role of fibrin matrix in angiogenesis. *Annals N.Y. Academic Science*, 936, pp. 426-437.
72. Weibrich, G. et alii. (2003) Comparison of platelet, leukocyte, and growth factor levels in point-of-care platelet-enriched plasma, prepared using a modified Curasan kit, with preparations received from a local blood bank. *Clinical Oral Implants Research.* 14, pp. 357–362
73. Weibrich, G. et alii. (2003) The Harvest Smart PRePTM system versus the Friadent-Schutze platelet-rich plasma kit. *Clinical. Oral Implants Research*, 14, pp. 233–239.
74. Wenjing Yin et alii (2016) Advantages of pure platelet-rich plasma compared with leukocyte- and platelet-rich plasma in promoting repair of bone defects. *Journal of Translation Medicine*, 14 (73) pp. 1186-12967-
75. Woodall, J. et alii (2007). Cellular effects of platelet rich plasma: a study on HL-60 macrophage-like cells. *Biomedical Science Instrumentation*, 43, pp. 266-271.
76. Zumstein MA, Bielecki T, DohanEhrenfest DM. (2011) The Future of Platelet Concentrates in Sports Medicine: Platelet-Rich Plasma, Platelet-Rich Fibrin, and the Impact of Scaffolds and Cells on the Long-term Delivery of Growth Factors. *Operative Techics in Sports Medicine*, 19, pp.190–197.