



**INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA**

**REGENERAÇÃO ALVEOLAR UTILIZANDO CENTRIFUGADOS  
SANGUÍNEOS**

Trabalho submetido por  
**Andrei Bourscheit**  
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

**setembro de 2020**





**INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA**

**REGENERAÇÃO ALVEOLAR UTILIZANDO CENTRIFUGADOS  
SANGUÍNEOS**

Trabalho submetido por  
**Andrei Bourscheit**  
para a obtenção do grau de **Mestre** em Medicina Dentária

Trabalho orientado por  
**Professora Doutora Alexandra Figueiredo**  
e coorientado por  
**Professor Doutor Paulo João Bela Teiga de Durão Maurício**

**setembro de 2020**



## **Dedicatória**

Dedico este trabalho à minha família, especialmente à minha esposa Cintia e aos meus filhos Lucas e Júlia, pelo amor, pelos ensinamentos, pelo incentivo e por estarem sempre ao meu lado.

À minha mãe pelo amor, pelo incentivo, pela admiração e por sempre desejar o meu sucesso.

.



## **Agradecimentos**

Este espaço é dedicado à expressão do meu agradecimento a um conjunto de pessoas que tornaram possível a realização desta dissertação.

Agradeço, à minha orientadora, Professora Doutora Alexandra Figueiredo e ao meu co-orientador, Professor Doutor Paulo João Bela Teiga de Durão Mauricio pelo apoio, pela disponibilidade, pela dedicação e pelo empenho, fundamentais na organização e desenvolvimento deste trabalho.

Ao júri, gostaria de expressar meu agradecimento pela disponibilidade.

Ao Instituto Universitário Egas Moniz, nas pessoas do seu Magnífico Reitor, o Professor Doutor Gil Alves Pessanha Alcoforado, e do seu Ilustríssimo Diretor Clínico, o Professor Doutor José João Mendes, que mantiveram as actividades académicas em meio a uma crise sem precedentes, demonstrando admirável capacidade de liderança e gestão.

A todos os docentes que recriaram a forma de ensinar neste momento tão delicado e atípico.

A todos os funcionários desta Instituição, pelo profissionalismo que garante o bom funcionamento de todas as actividades.

A todos os colegas e amigos de diferentes nacionalidades, que de alguma forma participaram desta minha caminhada.

Quero expressar o meu eterno agradecimento à minha esposa Cíntia e aos meus filhos, Lucas e Júlia, pela dedicação, carinho, apoio incondicional e companheirismo ao longo deste percurso académico. Sem eles nada faria sentido!

A Deus, por iluminar o meu caminho, clarear meus pensamentos, direccionar os meus passos e me fazer sentir sempre Sua presença.

A todos, minha mais eterna GRATIDÃO.





## Resumo

A regeneração alveolar é um método amplamente utilizado na medicina dentária para aumentar a quantidade e a qualidade óssea em áreas de defeitos alveolares. O enxerto autólogo tem sido considerado o padrão de ouro para estas situações, embora apresente importantes limitações como maior morbidade, maior tempo cirúrgico, maior tempo de recuperação, maior incidência de complicações, o custo associado à colheita e preparação do material, e, em algumas situações, disponibilidade limitada.

Assim, a procura constante por um biomaterial confiável que permita aumentar as capacidades biológicas dos materiais de substituição óssea, levou ao aparecimento dos derivados sanguíneos, que funcionam como um conector biológico entre os diferentes elementos do enxerto, estimulando a diferenciação das células-troncos e a migração de células osteoprogenitoras para o centro do enxerto.

Os concentrados sanguíneos são produtos biológicos autólogos, derivados de uma amostra sanguínea do paciente, são constituídos principalmente por plaquetas, fibrina, leucócitos e fatores de crescimento. Estes apresentam elevadas concentrações de fatores de crescimento e citosinas que desempenham um papel vital na cicatrização de vários tecidos.

Tendo por base a presença de leucócitos e a arquitetura das fibras, os concentrados plaquetários são divididos em quatro grupos principais. Estas quatro famílias de derivados sanguíneos têm assinaturas, mecanismos biológicos e aplicações clínicas diferentes.

Os derivados sanguíneos são preparados através de técnicas de centrifugação gravitacional, sendo o grupo PRP obtido a partir de sangue com anticoagulante, enquanto o grupo PRF é obtido a partir de sangue sem anticoagulante. As preparações dos concentrados diferem substancialmente na quantidade e dinâmica da libertação dos fatores de crescimento.

A presente revisão bibliográfica tem como objetivo descrever os diferentes protocolos de obtenção dos concentrados sanguíneos, bem como apresentar a aplicação clínica dos PRGF, L-PRF e A-PRF na regeneração tecidual.

Palavras-chave: concentrados plaquetários; PRP; PRF; fatores de crescimento.



## **Abstract**

Alveolar regeneration is a method used in dentistry to increase bone quantity and quality in areas of alveolar defects. The autologous graft is considered the gold standard for these situations, but it is subject to important limitations such as greater morbidity, longer surgical time, longer recovery time, higher incidence of complications, cost associated with the harvest and preparation of the material, and, in some situations, limited availability.

Thus, the constant search for a reliable biomaterial that can increase the biological capacities of bone replacement materials has led to the appearance of blood derivatives that function as a biological connector between the different elements of the graft, stimulating stem cell differentiation and of osteoprogenitor cells migration towards the center of the graft.

The blood Concentrates are autologous biological products, derived from a patient's blood sample, consisting mainly of platelets, fibrin, leukocytes and growth factors. Also, they hold high concentrations of growth factors and cytokines which play a vital role in the healing of various tissues.

Based on the presence of leukocytes and fiber architecture, the platelet concentrates are divided into four main groups. These four families of blood products are distinguish regarding signature, biological mechanisms and clinical applications.

They are prepared using gravitational centrifugation techniques, the PRP being obtained from anticoagulated blood while the PRF is obtained from non-anticoagulated blood. Concentrate preparations differ substantially in the amount and dynamics of growth factor release

The present study aims to describe the different protocols for obtaining blood concentrates, as well as to present the clinical application of PRGF, L-PRF and A-PRF in tissue regeneration.

Keywords: platelet concentrates; PRP; PRF; growth factors.



## Índice Geral

<b>I.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
<b>II.</b>	<b>DESENVOLVIMENTO</b>	<b>18</b>
1.	FISIOLOGIA ÓSSEA	18
2.	PLAQUETAS	20
2.1	<i>Propriedades regenerativas das plaquetas</i>	21
2.1.1	Grânulos Alfa ( $\alpha$ )	21
2.1.2	Grânulos densos	22
2.1.3	Lisossomos	22
3.	FATORES DE CRESCIMENTO	23
3.1	<i>Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas</i>	23
3.2	<i>Fator de Crescimento Transformador Beta</i>	25
3.3	<i>Fator de Crescimento Endotelial Vascular</i>	26
3.4	<i>Fator de Crescimento de Fibroblastos</i>	27
3.5	<i>Fator de crescimento semelhante à insulina</i>	27
3.6	<i>Proteínas Ósseas Morfogenéticas</i>	28
4.	CONCENTRADOS PLAQUETÁRIOS	29
4.1	<i>Plasma Rico em Plaquetas (PRP)</i>	31
4.1.1	Plasma rico em fatores de crescimento (PRGF)	31
4.1.2	Plasma rico em plaquetas puro (P-PRP)	33
4.1.3	Plasma rico em plaquetas e leucócitos (L-PRP)	34
4.2	<i>Fibrina Rica em Plaquetas (PRF)</i>	35
4.2.1	Fibrina rica em plaquetas pura (P-PRF)	35
4.2.2	Fibrina rica em plaquetas e leucócitos (L-PRF)	36
4.2.3	Fibrina rica em plaquetas avançada (A-PRF)	38
4.2.4	Fibrina rica em plaquetas injetável (I-PRF)	40
5.	LIBERTAÇÃO DOS FATORES DE CRESCIMENTO	41
5.1	<i>PDGF-AA, PDGF-AB e PDGF-BB</i>	41
5.2	<i>TGF-<math>\beta</math>1 e VEGF</i>	44
5.3	<i>EGF e IGF</i>	46
6.	APLICAÇÕES CLÍNICAS DO PRGF, L-PRF E A-PRF	47
6.1	<i>PRGF</i>	47
6.2	<i>L-PRF</i>	49
6.3	<i>A-PRF</i>	55
<b>III.</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>60</b>
<b>IV.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>62</b>



## Índice de Figuras

Figura 1 - Protocolo de Anitua, PRGF <sup>R</sup> .....	31
Figura 2 - Versatilidade da tecnologia PRGF <sup>R</sup> .....	31
Figura 3 - Protocolo manual clássico de dois passos do PRP.....	34
Figura 4 - Imagem ilustrando a arquitetura celular e arquitetura da matriz das quatro categorias dos concentrados plaquetários.....	37
Figura 5 - Comparação entre estrutura da membrana de fibrina no L-PRF e no APRF.....	39
Figura 6 - Protocolos de preparação dos protocolos sanguíneos.....	40
Figura 7 - Fator de crescimento total libertado durante um período de 10 dias para PDGF-AA.....	41
Figura 8 - Fator de crescimento total libertado durante um período de 10 dias para PDGF-BB.....	41
Figura 9 - Fator de crescimento total libertado durante um período de 10 dias para PDGF-AB.....	42
Figura 10 - Fator de crescimento total libertado durante um período de 10 dias para TGFβ1.....	43
Figura 11 - Fator de crescimento total libertado durante um período de 10 dias para VEGF.....	44
Figura 12 - Fator de crescimento total libertado durante um período de 10 dias para EGF.....	46
Figura 13 - Fator de crescimento total libertado durante um período de 10 dias para IGF.....	46
Figura 14 - Regeneração alveolar com L-PRF.....	51
Figura 15 - Regeneração Natural Tecidual (NTR).....	53
Figura 16 – Regeneração Óssea Natural (NBR).....	54



## **Índice de Tabelas**

Tabela 1 - Principais fatores de crescimento que atuam na regeneração óssea.....28

Tabela 2 - Comparação entre a quantidade total e inicial de fatores crescimento libertados em uma membrana de L-PRF e A-PRF.....45



## **Lista de Abreviaturas**

ADP - Difosfato de adenosina.

ATP - Trifosfato de adenosina.

A-PRF - Fibrina rica plaquetas avançada.

BC - Buffy coat ou camada leuco-plaquetária.

BMP - Proteínas ósseas morfogenéticas.

BMSC - Celulas estaminais da medula óssea.

GF – Fator de crescimento.

FDBA - Aloenxerto com osso liofilizado.

FGF - Fator de crescimento de fibroblastos.

IGF-I - Fatores de crescimento semelhante à insulina.

IL – Interleucina.

IL-1 $\beta$  - Interleucina 1 beta.

IL-4 - Interleucina 6.

IL-6 - Interleucina 18.

I-PRF – Fibrina rica em plaquetas injetável.

L-PRF- Fibrina rica em plaquetas e leucócitos.

L-PRP - Plasma rico em plaquetas e leucócitos.

MSCs - Células estaminais mesenquimais.

PDGF - Fator de crescimento derivado de plaquetas.

PDGF-AA - Fator de crescimento derivado de plaquetas isoforma AA.

PDGF-AB - Fator de crescimento derivado de plaquetas isoforma AB.

PDGF- BB - Fator de crescimento derivado de plaquetas isoforma BB.

PDGF-CC - Fator de crescimento derivado de plaquetas isoforma CC.

PDGF-DD - Fator de crescimento derivado de plaquetas isoforma DD.

PDGFR-  $\alpha\alpha$  - Receptor- $\alpha\alpha$  do fator de crescimento derivado de plaquetas.

PDGFR-  $\alpha\beta$  - Receptor- $\alpha\beta$  do fator de crescimento derivado de plaquetas.

PDGFR-  $\beta$  - Receptor- $\beta$  do fator de crescimento derivado de plaquetas.

PPP – Plasma pobre em plaquetas.

PPGF – Plasma pobre em fatores de crescimento.

PRGF - Plasma rico em fatores de crescimento.

PRFM - Matriz rica em fibras plaquetárias.

PRF – Fibrina rica em plaquetas.

PRP - Plasma rico em plaquetas.

P-PRP - Plasma rico em plaquetas puro.

NTR – Regeneração Tecidual Natural.

GTR – Regeneração Tecidual Guiada.

NBR – Regeneração Óssea Natural.

GBR – Regeneração Óssea Guiada.

RCF - Altas forças centrífugas.

RPM - Rotações por minutos.

TGF- $\beta$  - Fator de crescimento transformador- $\beta$ .

TNF- $\alpha$  - Fator de necrose tumoral- $\alpha$ .

EGF - Fator de crescimento epidérmico.

VEGF - Fatores de crescimento vascular endotelial.

$\mu$ l - Microlitro.

$\mu$ m - Micrometro.

nm - Nanometro.

ng - Nanog

pg - Picog

## **I. Introdução**

A regeneração alveolar é um método amplamente utilizado na medicina dentária para aumentar a quantidade e a qualidade óssea em áreas de defeitos alveolares. A falta de previsibilidade nos procedimentos regenerativos, com vários materiais de enxerto, sugere que a melhoria nas propriedades osteogênicas, osteoindutoras e osteocondutoras desses materiais são altamente desejáveis (Baldwin et al., 2019; Sánchez, Sheridan & Kupp, 2003).

Atualmente, o osso autólogo é considerado o “padrão de ouro” nos procedimentos de enxerto óssea, pois contém os três elementos necessários para a remodelação e reparção óssea: osteocondutividade, osteoindutividade e propriedades osteogênicas. A osteocondutividade é inerente a todos os tipos de enxertos ósseos e é melhor descrita como um suporte para ligação e proliferação celular. A osteoindução descreve a sinalização necessária para a diferenciação de células osteoprogenitoras em osteoblastos e osteoclastos. A Osteogênese refere-se à formação e desenvolvimento ósseo através da ação de células diferenciadas (Baldwin et al., 2019). Apesar do elevado grau de eficácia associado ao uso do autoenxerto, esta abordagem está sujeita a importantes limitações: maior morbidade no local doador, maior tempo cirúrgico, maior tempo de recuperação, maior incidência de complicações, o custo adicional associado à colheita e preparação do material, e, em algumas situações, disponibilidade limitada (de Sousa, Lemos, Santiago-Júnior, Faverani, & Pellizzer, 2018). Estas limitações levaram ao desenvolvimento e aumento do uso clínico de aloenxertos, xenoenxertos e substitutos ósseos de origem sintética.

Estes substitutos ósseos tornaram-se uma ferramenta poderosa na Medicina Dentária, sendo aplicados em praticamente todas as áreas que procuram a excelência no tratamento de reabilitação. Apesar de alguns destes materiais demonstrarem possuir efeitos regenerativos, a falta inerente de fatores de crescimento nativos leva à ausência de propriedades osteoindutoras (Giannoudis & Pountos, 2005).

Deste modo, a procura constante por um biomaterial confiável que consiga aumentar as capacidades biológicas dos materiais de substituição óssea, levou ao surgimento dos derivados sanguíneos que funcionam como um conector biológico entre

os diferentes elementos do enxerto estimulando a diferenciação das células-troncos e a migração de células osteoprogenitoras para o centro do enxerto (Simonpieri et al., 2012).

O uso dos derivados sanguíneos, como tratamento terapêutico, tornou-se relevante na medicina desportiva e na ortopedia em 1970, a partir dos trabalhos de Matras que levaram à criação da cola de fibrina para melhorar a cicatrização e controlar a inflamação (Dohan Ehrenfest et al., 2014).

Os Concentrados Sanguíneos são, da mesma forma que o enxerto autógeno, produtos biológicos derivados do próprio paciente. Estes concentrados são obtidos através de amostra sanguínea e constituídos principalmente por plaquetas, fibrina, leucócitos e fatores de crescimento. Apresentam altas concentrações de fatores de crescimento e citosinas que desempenham um papel vital na cicatrização de vários tecidos (Dohan Ehrenfest et al., 2012).

Podem ser aplicados isoladamente, sobre o topo de um enxerto ou associados a outros materiais para melhorar a regeneração de tecidos moles e duros em cirurgias dento-alveolares e maxilo-faciais (Del Corso et al., 2012; Engler-Pinto et al., 2019).

Segundo Dohan Ehrenfest et al. (2009, 2014), com base na presença de leucócitos e arquitetura das fibras, os concentrados plaquetários são divididos em quatro grupos principais: plasma rico em plaquetas puro sem leucócitos (P-PRP) e com uma rede de fibras de baixa densidade após a ativação; plasma rico em leucócitos e plaquetas (L-PRP), com leucócitos e com uma rede de fibras de baixa densidade após a ativação; fibrina rica em plaquetas pura (P-PRF) sem leucócitos e com uma rede de fibrinas de alta densidade; e fibrina rica em leucócitos e plaquetas (L-PRF) com leucócitos e uma rede de fibras de alta densidade.

Os derivados sanguíneos são preparados através de técnicas de centrifugação gravitacional, sendo o grupo PRP obtido a partir de sangue com anticoagulante, enquanto o grupo PRF é obtido a partir de sangue sem anticoagulante (Harrison et al., 2018). As preparações dos concentrados diferem substancialmente na quantidade e na

dinâmica da libertação dos fatores de crescimento (Castillo, Pouliot, Kim & Dragoo, 2011; Dragoo et al., 2012; Mazzocca et al., 2012).

O objetivo da técnica de centrifugação é promover a separação dos componentes sanguíneos para descartar elementos considerados não utilizáveis (principalmente os glóbulos vermelhos, pesados e facilmente separados), reunir e concentrar os elementos que podem ser utilizados em aplicações terapêuticas. Em suma, todos estes produtos, independentemente da técnica utilizada, são extratos do tecido circulante do sangue. São os próprios tecidos, e não preparações farmacêuticas (Choukroun & Ghanaati, 2018; Dohan Ehrenfest et al., 2014).

Esta revisão bibliográfica tem como objetivo descrever os diferentes protocolos de obtenção dos concentrados sanguíneos, bem como apresentar a aplicação clínica dos PRGF, L-PRF e A-PRF na regeneração tecidual.



## **II. Desenvolvimento**

### **1. Fisiologia óssea**

A perda dentária induz uma série de alterações locais complexas e integradas que afetam os tecidos moles e duros. Estas alterações locais surgem com o objetivo de fechar a ferida do alvéolo e restaurar a homeostase do tecido (Araújo, Silva, Misawa & Sukekava 2015).

Após a extração de um único dente, a crista alveolar poderá apresentar uma redução limitada na sua dimensão vertical e uma redução horizontal até 50% da largura da crista original. A quantidade de reabsorção óssea será maior na região vestibular do que na região lingual ou palatina. A reabsorção óssea na região posterior ocorre de forma mais severa por comparação com a região anterior (Schropp, 2004). Após múltiplas extrações dentárias, a crista alveolar poderá sofrer uma acentuada contração nas direções vertical e horizontal. Vários anos após as extrações, os indivíduos poderão sofrer uma grande variação na redução da crista alveolar e alguns poderão exibir uma reabsorção total da crista alveolar (Bergman & Carlsson, 1985). O fim do processo de cicatrização ocorre quando a cavidade alveolar é completamente preenchida por tecido ósseo e totalmente recoberta por tecido epitelial. É de esperar uma ampla variação entre os indivíduos em relação ao tempo necessário para a conclusão da cicatrização. A cavidade alveolar pode ser restaurada entre 10 e 20 semanas e o preenchimento ósseo radiográfico pode ser observado entre 3 e 6 meses após a extração. Enquanto a maioria das alterações dimensionais, que compreendem a cicatrização do alvéolo, ocorrem durante os primeiros 3 meses, a remodelação do processo alveolar pode continuar por até 1 ano após a extração (Trombelli et al., 2008).

O processo de cicatrização da cavidade pode ser dividido em três fases sequenciais e frequentemente sobrepostas: fase inflamatória, fase proliferativa e fase de remodelação. O coágulo sanguíneo serve como uma matriz que permite o movimento e a proliferação celular. As plaquetas são essenciais para a formação de coágulos sanguíneos (Ghiasi, Chen, Vaziri, Rodriguez & Nazarian, 2017).

A fase inflamatória inicia-se do primeiro ao sétimo dia após a lesão (Cho, Gerstenfeld & Einhorn., 2002). Nesta fase, as plaquetas libertam diferentes fatores de crescimento que atraem células inflamatórias: neutrófilos, macrófagos e linfócitos para o local lesionado. Estas células secretam citocinas pró-inflamatórias: fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucinas (IL-1, IL-6, IL-18) que aumentam a angiogénese e a cicatrização tecidual (Gerstenfeld, Cullinane, Barnes, Graves & Einhorn, 2003; Ghiasi et al., 2017; Martino, Briquez, Maruyama & Hubbell, 2015). A angiogénese e o redesenvolvimento da rede vascular fornecem células, nutrição, oxigénio, fatores de crescimento e outros componentes necessários para a cicatrização. A angiogénese precede a osteogénese e desempenha um papel vital na formação óssea (Ghiasi et al., 2017). A angiogénese é ainda um fator-chave para a remodelação óssea, fornecendo as condições apropriadas para as atividades osteoblásticas e osteoclásticas. As células endoteliais desempenham um papel crítico na migração e transformação celular, secreção de fatores de crescimento, sinalização celular e outros processos biológicos (Carrier, Geris, Van Gastel, Carmeliet & Van Oosterwyck, 2015; Hankenson, Gagne & Shaughnessy, 2015).

Na fase proliferativa ocorre a formação de tecido conjuntivo e a substituição do tecido de granulação por tecido ósseo imaturo (Marsell & Einhorn, 2011). Esta fase pode ser dividida em duas partes: fibroplasia e formação de tecido ósseo imaturo. A fibroplasia envolve a rápida deposição de uma matriz provisória que será penetrada por vários vasos e células formadoras de osso. Em seguida, projeções de osso imaturo são estabelecidas ao redor dos vasos sanguíneos formando muitas vezes osteónios primários. No fim desta fase ocorre o recobrimento total da ferida alveolar pelo tecido epitelial (Araújo et al., 2015).

Na fase de reparação/remodelação, as células-tronco mesenquimais são recrutadas a partir dos tecidos moles ou vasos sanguíneos adjacentes (Granero-Moltó et al., 2009). Diferentes fatores de crescimento, como proteínas morfogénicas ósseas (BMPs) e TGF- $\beta$ , desempenham um papel no recrutamento de células-tronco mesenquimais. Estas melhoram a regeneração óssea, pois induzem a diferenciação de osteoblastos. A fase de remodelação é caracterizada pela substituição do osso imaturo

pelo osso lamelar. Os fatores de crescimento também estão envolvidos nesta fase (Kon et al., 2001; Lee et al., 2000).

## **2. Plaquetas**

As plaquetas são células sanguíneas anucleadas, medindo de 2 a 4  $\mu\text{m}$  de diâmetro, com múltiplas funções e uma vida útil curta. Circulam no sangue entre 7 a 10 dias, após o qual são eliminadas no baço e no fígado (Quach et al., 2018). A produção das plaquetas ocorre principalmente na medula óssea e é precedida pela diferenciação de células-tronco hematopoiéticas em megacariócitos poliploides (50 a 100  $\mu\text{m}$  de diâmetro), que eliminam inúmeras protrusões citoplasmáticas de ramificação longas chamadas pro plaquetas (van der Meijden & Heemskerk, 2019).

Segundo Gremmel et al. (2016), a contagem normal de plaquetas no sangue em indivíduos saudáveis varia de 150.000 a 450.000 plaquetas /  $\mu\text{l}$ .

Apesar de não apresentarem núcleo, as plaquetas são constituídas por organelas, incluindo mitocôndrias, microtúbulos, autofagossomos, endossomos, lisossomos, grânulos  $\alpha$  e grânulos densos (van der Meijden & Heemskerk, 2019).

De acordo com Gremmel et al. (2016), a estrutura das plaquetas pode ser dividida em quatro zonas:

- Zona periférica: é formada pela membrana plasmática (rica em glicocálice), bicamada lipídica e filamentos de actina. O glicocálice é essencial para a adesão, ativação e agregação plaquetária.
- Zona de gel: consiste em microfilamentos de actina, uma matriz na qual todas as organelas plaquetárias estão suspensas; e microtúbulos.
- Zona organelar: contém as organelas secretoras: grânulos  $\alpha$ , grânulos densos e lisossomos.
- Zona do sistema de membrana: além da membrana plasmática, contém o aparelho de Golgi, o sistema canalicular, os túbulos densos e o retículo endoplasmático.

## **2.1 Propriedades regenerativas das plaquetas**

As plaquetas demonstram capacidade regenerativa pois são ricas em fatores de crescimento. O papel funcional das plaquetas foi alargado nos últimos anos, incluindo processos como inflamação, imunidade inata, crescimento e desenvolvimento, angiogênese, cicatrização de feridas e metástase do cancro. A exocitose dos grânulos plaquetários é central para a função plaquetária e participa de todo o conjunto da atividade plaquetária (Calcei & Rodeo, 2019).

As plaquetas contêm pelo menos três tipos principais de grânulos: grânulos  $\alpha$ , grânulos densos e lisossomos, que carregam cargas distintas e variam em biogênese, tráfico e exocitose (Sharda & Flaumenhaft, 2018).

### **2.1.1 Grânulos Alfa ( $\alpha$ )**

Os grânulos  $\alpha$  têm formato redondo ou oval, apresentam um diâmetro de 200 a 500 nm e são as organelas plaquetárias mais abundantes, cada plaqueta possui entre 50 a 80 grânulos  $\alpha$  (Yadav & Storrie, 2017).

Os grânulos  $\alpha$  armazenam fatores de crescimento (GF), proteínas de adesão, coagulação e proteínas fibrinolíticas que são secretadas após a ativação. Estas moléculas bioativas têm propriedades regenerativas ósseas à medida que aumentam a osteogênese e a angiogênese (Shakir et al., 2015). Os fatores de crescimento (GF) incluem fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ), fatores de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), fatores de crescimento derivados de plaquetas AB (PDGF-AB, PDGF-BB) (Calcei & Rodeo, 2019). Os fatores de crescimento desempenham um papel fundamental na quimiotaxia, proliferação, diferenciação celular, formação de matriz extracelular, osteogênese e prevenção de reabsorção óssea (Ornitz & Marie, 2015; Shakir et al., 2015; Wu et al., 2016).

### **2.1.2 Grânulos densos**

Os grânulos densos, conhecidos também como grânulos  $\delta$ , medem cerca de 150 nm de diâmetro e são os segundos grânulos plaquetários mais abundantes, podendo ser encontrados 3 a 8 grânulos por plaquetas (Sharda & Flaumenhaft, 2018).

Estes grânulos contêm altas concentrações de nucleotídeos de adenina, nomeadamente Difosfato de Adenosina (ADP) e Trifosfato de Adenosina (ATP), cálcio, magnésio e potássio. Além disso, polifosfatos e aminas bioativas, como serotonina e histamina, estão presentes nos grânulos densos das plaquetas (Gremmel et al., 2016). Cutarelli et al., (2016) relatam que o ATP pode afetar a mineralização de maneira bifásica; em baixas concentrações, o ATP aumenta a deposição mineral, enquanto que em altas concentrações reduz a deposição mineral. Por outro lado, o polifosfato em baixa concentração (10  $\mu$ M) inibe a mineralização da matriz nos osteoblastos, enquanto que em concentrações mais altas (100  $\mu$ M), aumenta a função e mineralização dos osteoblastos (Gremmel et al., 2016).

A serotonina é a molécula de libertação mais rápida das plaquetas após a ativação, independentemente do tipo de material de ativação, atuando na redução da densidade mineral óssea e inibindo a diferenciação e proliferação dos osteoblastos (Nam et al., 2016).

### **2.1.3 Lisossomos**

Os lisossomos são estruturas membranosas, esféricas e ricas em enzimas digestivas. Cada plaqueta contém no máximo 3 lisossomos. Os lisossomos das plaquetas possuem enzimas que degradam proteínas, como catepsinas, elastase e colagenase; enzimas de degradação de carboidratos, tais como glucosidase e galactosidase; e a fosfatase ácida como enzima de clivagem de éster de fosfato (Gremmel et al., 2016).

### 3. Fatores de Crescimento

A engenharia tecidual tem sido objeto de extensa pesquisa nos últimos anos. A capacidade do corpo humano de se regenerar da perda de tecido é limitada, levando frequentemente a incapacidade funcional. Com os avanços da engenharia tecidual, os fatores de crescimento tornaram-se disponíveis como alternativa para os procedimentos de regeneração. Este facto faz com que o uso dos fatores de crescimento autólogos seja um campo da saúde em rápido crescimento, com foco na manipulação destes fatores e proteínas secretoras para maximizar a cicatrização de ossos e de tecidos moles (Giannoudis & Pountos, 2005; Civinini, Macera, Nistri, Redl & Innocenti, 2011).

Os factores de crescimento são constituídos por um conjunto de proteínas capazes de estimular o crescimento, migração, proliferação e diferenciação celular. Eles podem ser usados isoladamente ou em adição à outros biomateriais como alternativa às técnicas de reconstrução convencionais para defeitos maxilofaciais (Herford, Miller & Signorino, 2017).

Como citado anteriormente, os fatores de crescimento (GF) incluem fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ), fatores de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF) (Calcei & Rodeo, 2019).

#### 3.1 Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas

O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) é um polipeptídeo de duas cadeias secretado pelos grânulos  $\alpha$  das plaquetas, existindo em cinco isoformas de polipetídeos: PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC e PDGF-DD. Entre estas isoformas, PDGF-BB é um ligante único que pode interagir com todos os três receptores de PDGF, a saber, PDGFR-  $\alpha\alpha$  , PDGFR-  $\alpha\beta$  e PDGFR-  $\beta$  . O PDGF-BB é um potente mitógeno e quimio atraente para muitos tipos de células e tem a capacidade de promover a angiogénese. Assim, PDGF-BB é considerado um fator regulador chave no reparo e regeneração de tecidos (Zhang et al., 2018).

O PDGF, que está contido em grânulos  $\alpha$  plaquetários, só é libertado após a ativação das plaquetas no processo de coagulação do sangue ou quando as plaquetas aderem nos locais de lesão dos vasos sanguíneos. O PDGF pode servir para promover a cicatrização de feridas, pois é o mitógeno mais potente no soro para células de origem mesenquimal. A sua capacidade de regeneração está diretamente relacionada com sua capacidade em aumentar o número de células-tronco da medula, no local da lesão, e consequentemente permitir a diferenciação destas células em osteoblastos (Shah, Keppler & Rutkowski, 2014).

O PDGF demonstrou promover a angiogénese, além de aumentar a neovascularização da ferida e a formação de tecido de granulação, elementos iniciais do processo de cicatrização. Este, recruta fibroblastos e células inflamatórias para os locais da lesão, induzindo a deposição de colágeno e a neoformação de vasos sanguíneos (Griffin et al., 2015).

Zhang et al. (2018), avaliaram a regeneração óssea usando um modelo de defeito calvarial de tamanho crítico em ratos. Este estudo demonstrou que o PDGF-BB aumenta a diferenciação osteogénica enquanto inibe a diferenciação adipogénica das células mesenquimais. Através de radiografias e análises histológicas concluiu-se que o PDGF-BB melhorou a angiogénese e a osteogénese mediadas por células mesenquimais durante a regeneração óssea. Esses resultados sugerem que o PDGF-BB facilita a regeneração óssea, aprimorando as habilidades osteogénicas e angiogénicas das células mesenquimais.

O PDGF estimula a síntese de DNA e das proteínas ósseas atuando como regulador sistémico ou local do crescimento esquelético. Como factor de crescimento sistémico, pode ser libertado durante a agregação plaquetária e ter efeitos importantes nos estágios iniciais da cicatrização dos defeitos ósseos. Como factor local, ele pode interagir com outros hormonas e factores de crescimento, fazendo com que as células ósseas respondam a outros factores presentes no tecido esquelético. Para além dos seus efeitos na formação óssea, o PDGF demonstrou estimular a reabsorção óssea, tendo assim, efeitos complexos na remodelação óssea (Shah et al., 2014).

O PDGF e o VEGF estão intimamente relacionados, e o VEGF pode sinalizar através de receptores de PDGF para regular a migração e proliferação de células tronco mesenquimais. Na bioengenharia óssea, a administração de PDGF em arcabouços desmineralizados de matriz óssea à base de colágeno associado a heparina reticulada, aumentou e prolongou sua atividade local, além de aumentar a celularização e vascularização do arcabouço. Os papéis do PDGF na angiogênese, na migração e na proliferação celular, bem como seu papel em conjunto com o VEGF, torna-o um candidato atraente em engenharia de tecidos (Griffin et al., 2015).

### **3.2 Fator de Crescimento Transformador Beta**

O termo fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ) é aplicado à superfamília de fatores de crescimento dos quais a família de proteínas morfogenéticas ósseas é um membro (BMPs). Estas proteínas são sintetizadas e encontradas em plaquetas e macrófagos, bem como, em alguns outros tipos de células. Quando ocorre uma lesão, elas são libertadas por degranulação de plaquetas ou ativamente secretadas por macrófagos (Herford et al., 2017).

Nos seres humanos, três subtipos de TGF- $\beta$  estão presentes: TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 e TGF- $\beta$ 3. Os TGF- $\beta$ 1 e TGF- $\beta$ 2 parecem ser os mais importantes em relação à reparação do tecido conjuntivo e à regeneração óssea. O TGF- $\beta$  pode inibir a formação de osteoclastos e, portanto, favorecer a formação óssea sobre a reabsorção. O TGF- $\beta$  é um potente estimulador da formação óssea, promovendo a diferenciação osteoblástica e a síntese da matriz osteóide (Civinini et al., 2011; Morikawa, Derynck & Miyazono, 2016).

A sinalização do fator de crescimento transformador (TGF- $\beta$ ) não é apenas importante no desenvolvimento do sistema esquelético, mas também é essencial na remodelação óssea no osso adulto. O processo de remodelação óssea envolve atividades celulares integradas, induzidas por múltiplos estímulos, para equilibrar a reabsorção óssea e a formação óssea. O TGF- $\beta$  desempenha um papel na remodelação óssea,

coordenando as atividades celulares para manter a homeostase óssea (Iwasaki, Yamato & Fukagawa, 2018).

As funções mais importantes são quimiotaxia e mitogênese de precursores de osteoblastos, embora ainda tenha como função biológica a angiogênese, a estimulação do crescimento celular, a diferenciação celular, a síntese de matriz extra celular e imunossupressão (Devescovi, Leonardi, Ciapette & Cenni, 2008; Herford et al., 2017; Iwasaki et al., 2018).

### **3.3 Fator de Crescimento Endotelial Vascular**

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) tem origem nas células musculares lisas, plaquetas e osteoblastos. Este, pertence a uma família de proteínas homodiméricas que consistem em pelo menos 5 membros: VEGF-A ou VEGF, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E. O VEGF, como a forma mais abundante, desempenha papéis importantes na proliferação, migração e ativação das células endoteliais, bem como na promoção da permeabilidade e fenestração dos vasos sanguíneos (Hu & Olsen, 2016).

O VEGF é uma proteína de sinalização que promove a migração e mitose de células endoteliais, angiogênese e fenestração de vasos sanguíneos, tem efeito quimiotático para macrófagos e granulócitos, promove a diferenciação de condrócitos e osteoblastos e promove uma vasodilatação através da libertação de óxido nítrico (Civinini et al., 2011; Griffin et al., 2015).

O VEGF parece também controlar a sobrevivência e a diferenciação de condrócitos e osteoblastos, além de recrutar osteoclastos. Quando utilizado em conjunto com outros fatores de crescimento parece ter um melhor desempenho. Por exemplo, o VEGF combinado com BMP-7 demonstrou resultar numa osteogênese precoce e numa formação óssea com densidade mais alta do que o uso isolado de BMP-7 (Griffin et al., 2015).

Ren et al. (2018), investigaram os efeitos do VEGF isoladamente e em associação com BMP-2. Os autores observaram que a aplicação do VEGF isoladamente não foi suficiente para estimular a formação óssea. No entanto, o efeito do VEGF aplicado simultaneamente com BMP-2 e incorporado numa base de microcápsula de polilactídeo-poli(etileno glicol)-polilactídeo, melhorou a formação óssea, tanto ao nível da densidade, como ao nível do volume.

### **3.4 Fator de Crescimento de Fibroblastos**

O fator de crescimento de fibroblastos (FGF) é secretado pelas células endoteliais, fibroblastos, mastócitos e condrócitos. A família dos fatores de crescimento FGF é composta por 23 membros, onde se destacam o FGF - 1 que é responsável pela maturação dos condrócitos e o FGF-2 que é responsável pela proliferação e diferenciação do osteoblasto, inibição da apoptose do osteoblasto imaturo, indução da apoptose do osteócito maduro e reabsorção óssea (Civinini et al., 2011; Devescovi et al., 2008; Majidinia, Sadeghpour & Yousefi, 2018).

A via de sinalização do FGF atua na regulação da proliferação e diferenciação dos osteoblastos e fibroblastos, na osteogênese, bem como em inúmeros outros processos celulares importantes, incluindo angiogênese e cicatrização das feridas (Majidinia et al., 2018).

### **3.5 Fator de crescimento semelhante à insulina**

O fator de crescimento semelhante à insulina (IGF- I) é um polipeptídeo produzido pelos hepatócitos, células endoteliais, osteoblastos e condrócitos. São promotores de crescimento que estimulam a proliferação e a diferenciação dos osteoblastos e a formação de matriz óssea (Civinini et al., 2011; Oryan, Alidadi & Moshiri., 2016).

Num estudo preconizado por Oryan et al. (2016), exploraram os efeitos da combinação do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) e fator de

crescimento derivado de plaquetas (PDGF) na formação óssea ao redor de implantes dentários. Os autores concluíram que ao aplicar o IGF-1 ou o PDGF-BB de forma isolada, ambos têm o efeito de acelerar a cicatrização das feridas a curto prazo; enquanto que em combinação, ocorreu o aparecimento de tecido de granulação, deposição de cálcio e formação de tecido ósseo.

### **3.6 Proteínas Ósseas Morfogenéticas**

As proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) fazem parte da superfamília do TGF- $\beta$  que é composta por mais de 20 proteínas e consistem em proteínas produzidas pelos osteoblastos, condrócitos e células osteoprogenitoras. Apenas seis das BMPs identificadas (BMP-2, 4, 6, 7, 9, 14), demonstraram propriedades osteogênicas significativas, sendo que somente as BMP-2 e BMP-7 estimulam o processo de neovascularização (Jacobs, 2017).

As BMPs são responsáveis por promover a quimiotaxia, angiogênese, proliferação e diferenciação de células mesenquimais e osteoprogenitoras através da ligação a receptores específicos das células-tronco mesenquimais, osteoblastos e condrócitos. Estas têm sido utilizadas como opção terapêutica para estimular a regeneração óssea em cirurgias de aumento do rebordo alveolar e elevação do seio maxilar (Herford et al., 2017).

Embora as BMPs apresentem propriedades osteoindutoras e osteogênicas comprovadas, o seu uso clínico é limitado quando comparado a outros fatores de crescimento. Este facto ocorre porque as BMPs têm custo elevado e exibem vários efeitos adversos associadas ao seu uso, incluindo formação óssea heterotópica excessiva (especialmente dada a tendência de o líquido penetrar no tecido mole circundante), o potencial remoto para carcinogênese, insuficiência renal, insuficiência hepática e necessidade de altas concentrações de forma a transpor a baixa disponibilidade e perda de bioatividade (Calcei & Rodeo, 2019).

**Tabela 1.** Principais fatores de crescimento que atuam na regeneração óssea (Adaptado de Devescovi et al., 2008).

Fatores de Crescimento	Origem Celular	Efeito Biológico	Ação no Osso
<b>BMP</b>	Célula osteoprogenitora, osteoblastos, condrócitos, (BMP2).	Condro-osteogênese, Osteoindução, (BMP2).	Migração de osteoprogenitores, quimiotaxia, indução de proliferação, diferenciação e síntese de matriz.
<b>FGF</b>	Fibroblastos, células endoteliais, condrócitos, mastócitos	Angiogênese, proliferação dos fibroblastos e células musculares lisas dos vasos	Maturação do condrócito (FGF-1), Proliferação e diferenciação do osteoblasto, inibição da apoptose do osteoblasto imaturo, indução da apoptose do osteócito maduro, reabsorção óssea (FGF-2).
<b>IGF</b>	Osteoblastos, condrócitos, hepatócitos, célula endoteliais.	Regulação efeitos da hormona do crescimento.	Proliferação osteoblástica e síntese da matriz óssea, reabsorção óssea.
<b>PDGF</b>	Plaquetas, osteoblastos, célula endotelial, monócito, macrófago	Proliferação de células do tecido conjuntivo, quimiotaxia e angiogênese de monócitos, macrófagos e células do músculo liso	Migração, proliferação e diferenciação de células osteoprogenitoras
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Plaquetas, osteoblastos, BMSC, fibroblastos, células endoteliais, macrófagos, condrócitos.	Imunossupressão, angiogênese, estimulação do crescimento celular, diferenciação e síntese de matriz extracelular.	Proliferação de células mesenquimais indiferenciadas, recrutamento de osteoblasto precursor, diferenciação de condrócitos e osteoblastos, produção de matriz óssea, recrutamento de osteoclasto precursor.
<b>VEGF</b>	Osteoblastos, plaquetas	Angiogênese	Conversão de cartilagem em osso, diferenciação e proliferação de osteoblastos

#### 4. Concentrados Plaquetários

Os concentrados plaquetários são extratos sanguíneos obtidos após o processamento de uma amostra de sangue do paciente e através da centrifugação. O

objetivo do processamento é separar os componentes sanguíneos para descartar elementos considerados não utilizáveis, principalmente os glóbulos vermelhos, e reunir e concentrar os elementos que podem ser utilizados em aplicações terapêuticas como: plaquetas, fatores de crescimento, fibrina, leucócitos e outras formas de células circulantes no plasma (Agrawal, 2017; Dohan Ehrenfest et al., 2014). Os concentrados sanguíneos podem ser preparados por centrifugação ou plasmaferese. O uso da plasmaferese, realizado em banco de sangue, está limitado devido aos riscos para a saúde do paciente e custos elevados (Demiralp, 2003).

Os parâmetros para a classificação dos concentrados plaquetários devem ser baseados em três fatores (Dohan Ehrenfest et al., 2009):

- Kits de preparação e centrífugas usadas - o tamanho da centrífuga, a duração do procedimento, o custo dos kits e dos dispositivos são fatores significativos ao considerar o uso repetitivo dessas técnicas em prática cirúrgica diária. A ergonomia do kit e a complexidade do procedimento também são parâmetros fundamentais, pois procedimentos complexos dificultam a execução e a reprodutibilidade.

- Conteúdo do concentrado: volume final do concentrado utilizável depende da colheita inicial de sangue e pode definir as possíveis aplicações clínicas da preparação.

- Rede de fibrina: suporta as plaquetas e os leucócitos durante a sua aplicação, a densidade da rede de fibras é determinada principalmente pela concentração do fibrinogênio durante a preparação.

Segundo Dohan Ehrenfest et al., (2009), com base na presença de leucócitos e arquitetura das fibras (Figura 4), os concentrados plaquetários são divididos em:

- P-PRP - Plasma rico em plaquetas puro, sem leucócitos e com uma rede de fibras de baixa densidade após a ativação;

- L-PRP - Plasma rico em plaquetas e leucócitos, com leucócitos e com uma rede de fibras de baixa densidade após a ativação;

- P-PRF - Fibrina rica em plaquetas pura, sem leucócitos e com uma rede de fibrinas de alta densidade;
- L-PRF - Fibrina rica em plaquetas e leucócitos, com leucócitos e uma rede de fibras de alta densidade.

#### **4.1 Plasma Rico em Plaquetas (PRP)**

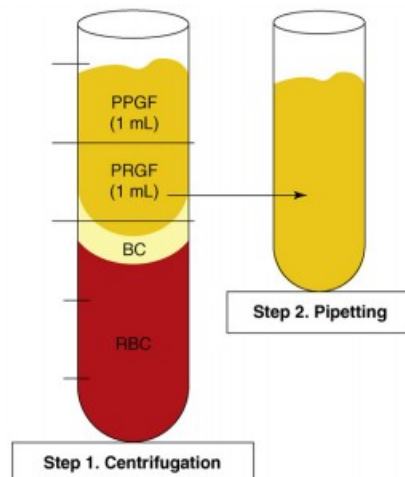
##### **4.1.1 Plasma rico em fatores de crescimento (PRGF)**

Um dos primeiros protocolos de concentrados sanguíneos, que recebeu o nome de plasma rico em fatores de crescimento (PRGF), foi descrito por Anitua em 1999 e foi patenteado pelo Instituto de BioTecnologia da Espanha. Comercializado com o nome Endoret<sup>®</sup>, esta tecnologia permite a formulação de um plasma rico em plaquetas, tanto na forma líquida quanto na forma de coágulo (Dohan Ehrenfest et al., 2009). O PRGF é considerado um concentrado plaquetário de primeira geração, pois utiliza um anticoagulante e um ativador da coagulação. O anticoagulante é o citrato de sódio, que irá impedir a alteração dos receptores de membrana das plaquetas, e o ativador é o cloreto de cálcio, que promoverá a degranulação plaquetária e a polimerização da fibrina, formando um gel plaquetário responsável pela liberação de fatores de crescimento (Fioravanti et al., 2015; Giannini et al., 2015; Masuki et al., 2016).

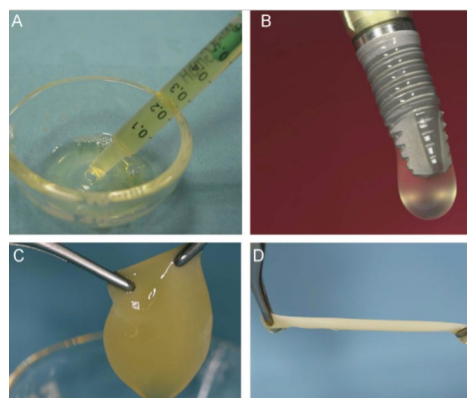
Segundo Anitua et al. (2019), esta tecnologia permite acelerar o processo de cicatrização devido à grande concentração de plaquetas que funcionam como um reservatório e veículo de liberação de proteínas e fatores de crescimento.

Neste protocolo, o sangue venoso é recolhido em tubos estéreis de 9ml cada, contendo 0,4 ml de citrato de sódio a 3,8% (anticoagulante). Após a recolha, os tubos são centrifugados suavemente (8min a 460g) para obter as três camadas típicas: glóbulos vermelhos, camada leuco-plaquetária ou “buffy coat” (BC) e plasma acelular. O plasma acelular contém as camadas, empiricamente, definidas como plasma pobre em fatores de crescimento (PPGF) e plasma rico em fatores de crescimento (PRGF) (Figura 1). Um mililitro da camada de PPGF é descartada e o PRGF, logo acima do BC, é

recolhido por pipetagem cuidadosa. O PRGF de todas as amostras é recolhido num único tubo, onde se adiciona o cloreto de cálcio para induzir a polimerização da fibrina. Após 15 a 20 minutos, é formado um gel de PRGF que deverá ser imediatamente utilizado (Figura 2) (Anitua et al., 2012; Dohan Ehrenfest et al., 2009).



**Figura 1.** Protocolo de Anitua, PRGF<sup>R</sup> (Adaptado de Dohan Ehrenfest et al., 2009).



**Figura 2.** Versatilidade da tecnologia PRGF: (A) o sobrenadante de PRGF; (B) o PRGF líquido usado para bioativar superfícies de implantes dentários; (C) o PRGF tipo coágulo composto por componentes celulares e fibrilares e (D) a fibra elástica, densa e hemostática ( Adaptado de Anitua, Sánchez Orive & Andía, 2007).

#### **4.1.2 Plasma rico em plaquetas puro (P-PRP)**

Segundo Kobayashi et al. (2016), o plasma rico em plaquetas (PRP) é uma concentração autóloga de fatores derivados do sangue total do paciente centrifugado para atingir concentrações 2 a 3 vezes acima do sangue periférico. Na década de 1970, foi introduzida como cola de fibrina e adquiriu popularidade nos campos médico e dentário para a regeneração de tecidos duros e moles. A sua vantagem é a capacidade de libertar uma grande quantidade de proteínas e fatores de crescimento logo após a ativação.

Para ser considerado um PRP, o plasma sanguíneo deve conter mais de 1.000.000 unidades de plaquetas por microlitro de sangue. Concentrações inferiores a esta não conferem ao plasma sanguíneo a capacidade de acelerar o processo de cicatrização (Fadadu, Mazzola, Hunter & Davis, 2019).

Existem numerosos protocolos na literatura atual que descrevem as condições ideais para centrifugação e processamento do PRP. Apesar dessas variações, todos os protocolos seguem uma sequência genérica que consiste na coleta de sangue em tubos contendo anticoagulantes, uma centrifugação inicial para separar as hemácias, centrifugações subsequentes para concentrar plaquetas e outros componentes e uma ativação da amostra adicionando um agonista de plaquetas (Mihaylova et al., 2017; Oryan et al., 2016).

Antes da intervenção cirúrgica, é recolhida cerca de 20–80 ml de sangue do paciente em tubos contendo o anticoagulante. Os tubos são submetidos à primeira etapa de centrifugação, com rotação suave, fazendo com que o sangue total se separe em três frações: plasma pobre em plaquetas (camada mais superficial), camada leucoplaquetária ou “buffy coat” (camada intermediária) e a última fração contendo glóbulos vermelhos. Na etapa seguinte, a camada pobre em plaquetas e a parte superior da camada leucoplaquetária são transferidas para outro tubo e expostas a uma segunda centrifugação com alta rotação. Em seguida, a maior parte da camada de plasma pobre em plaquetas (PPP) é removida e a concentração de grânulos de plaquetas no fundo do

tubo é ressuspensa num pequeno volume de plasma para produzir P-PRP (Figura 3) (Dhurat & Sukesh, 2014; Fadadu et al., 2019; Oryan et al., 2016).

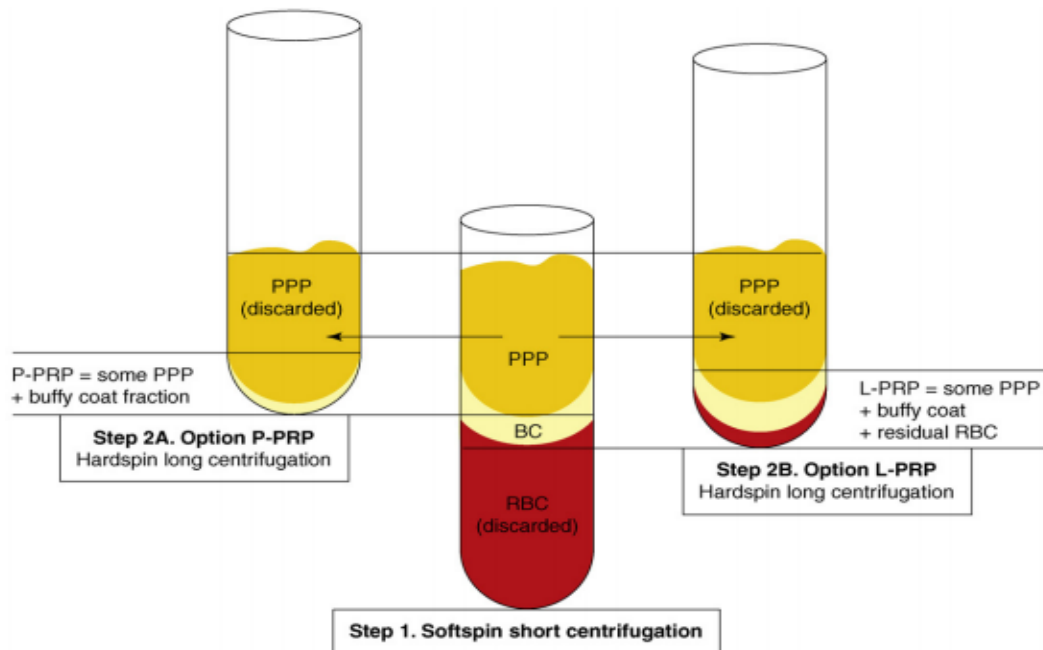
Se adicionarmos ativadores ao PRP, como trombina ou cloreto de cálcio, ocorrerá a degranulação plaquetária e a polimerização da fibrina, formando um gel plaquetário e a liberação de fatores de crescimento (Blair & Flaumenhaft 2009). A liberação dos fatores de crescimento inicia-se dentro dos 10 minutos iniciais e atinge 95% da sua capacidade na primeira hora após a ativação do PRP, indicando que o PRP ativado deve ser utilizado nos primeiros minutos após sua ativação (Somani, Zaidi & Jaidka, 2011).

#### **4.1.3 Plasma rico em plaquetas e leucócitos (L-PRP)**

O L-PRP têm um processamento muito semelhante ao P-PRP, apresentando como característica principal a presença de plaquetas, leucócitos e uma rede de fibras de baixa densidade. Os leucócitos têm uma forte influência na liberação de FCs, particularmente TGF- $\beta$ 1 e os neutrófilos, que são leucócitos granulocíticos, têm um papel crucial na defesa do organismo contra infecções (Dohan Ehrenfest et al., 2009).

Existem inúmeros protocolos que tentam incluir uma maior quantidade de leucócitos no PRP. Estes protocolos também aplicam duas etapas de centrifugação, sendo que na primeira etapa são separados os componentes sanguíneos em três frações: plasma pobre em plaquetas, camada leucoplaquetária ou “buffy coat” e a última camada contendo glóbulos vermelhos. Em seguida, a camada pobre em plaquetas, a camada leucoplaquetária (BC) e parte superficial da camada de glóbulos vermelhos são transferidas para outro tubo e centrifugados em alta velocidade para separar a amostra novamente nos seus componentes. A porção mais acima, PPP, é descartada e o L-PRP consiste na concentração de plaquetas, leucócitos e algumas hemácias suspensas numa pequena fração do plasma. Após o processamento, o L-PRP pode ser aplicado na forma líquida ou na forma de coágulo (Figura 3)(Dohan Ehrenfest et al., 2009). Para promover a degranulação plaquetária e a polimerização da fibrina, formando um gel plaquetário e a liberação de fatores de crescimento deve-se adicionar trombina ou cloreto de cálcio.

Após o processamento, o L-PRP pode ser aplicado na forma líquida ou como coágulo (Blair & Flaumenhaft, 2009).



**Figura 3.** Protocolo manual clássico de dois passos do PRP. (Adaptado de Dohan Ehrenfest et al., 2009).

## 4.2 Fibrina Rica em Plaquetas (PRF)

### 4.2.1 Fibrina rica em plaquetas pura (P-PRF)

Nesta categoria, existe apenas um método disponível. O Fibrinet Kit PRFM da Cascade<sup>®</sup> Medical (Nova Jersey, EUA). A empresa alega que o sistema produz um concentrado de plaquetas "natural" devido à ausência de trombina bovina. No entanto, têm sido levantadas dúvidas, porque o sangue é misturado com anticoagulante e um gel de separação, levando ao que poderia ser considerada uma condição antinatural. A principal diferença é que apenas quantidades muito baixas de leucócitos são recolhidos devido ao gel separador específico usado neste método. No entanto, a eficiência da recolha de plaquetas é alta e a preservação das plaquetas durante o procedimento parece

aceitável, mas ainda não existem estudos que demonstrem a real eficiência do Fibrinet Kit PRFM (Madi, Samuel & Kedr, 2017).

O sangue é recolhido em tubos específicos contendo citrato trissódico e um gel separador tixotrópico, sendo depois centrifugado a 1.100 rpm por 6 minutos. Isso separa o sangue em três camadas: glóbulos vermelhos, camada leucoplaquetária e plasma pobre em plaquetas. As camadas leucoplaquetária e plasma pobre em plaquetas são coletadas e ativadas com cloreto de cálcio. O processo de coagulação é desencadeado pela presença do cloreto de cálcio e o tubo é imediatamente centrifugado a 4.500 rpm por 15min. Em seguida, o coágulo da matriz rica em fibras plaquetárias (PRFM) pode ser coletado e aplicado no local cirúrgico (Dohan Ehrenfest et al., 2009; Uthappa, Jagadish, Amit & Sreelakshmi, 2017).

#### **4.2.2 Fibrina rica em plaquetas e leucócitos (L-PRF)**

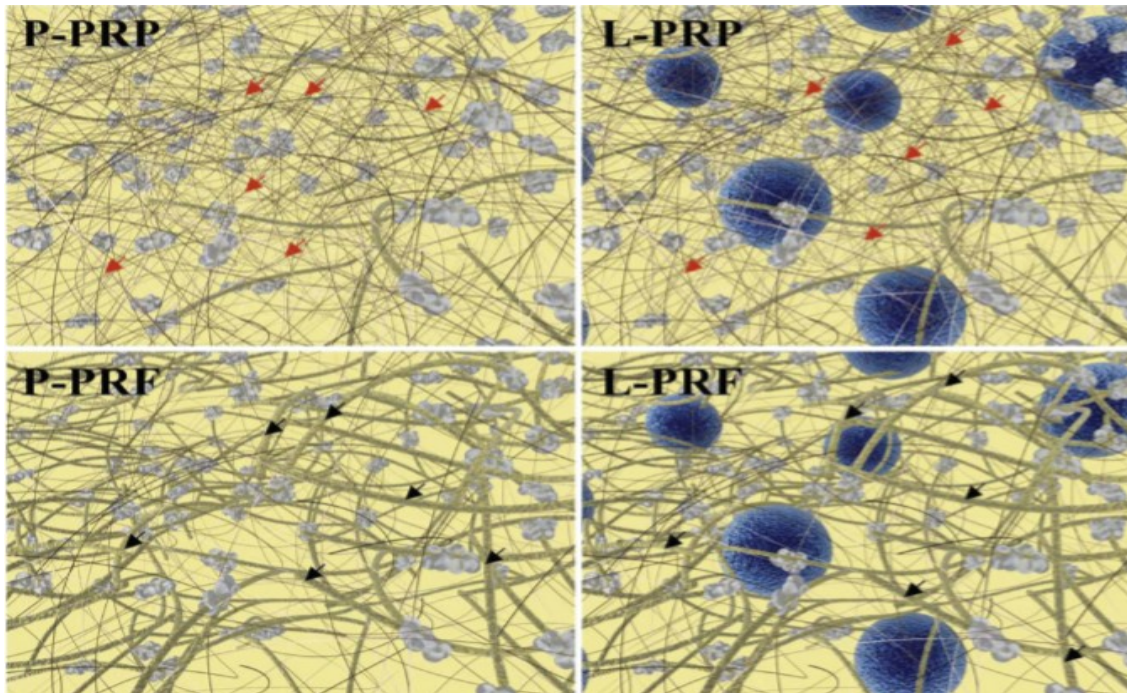
A fibrina rica em plaquetas e leucócitos (L-PRF) é considerada a segunda geração de concentrados plaquetários, confeccionada com sangue autólogo sem a adição de anticoagulantes, ativadores ou quaisquer agentes gelificantes. É um biomaterial tridimensional obtido por centrifugação simples a partir de amostra de sangue total do paciente, formando um gel de fibrina que é polimerizado lentamente e fortemente (Figura 4). É abundante em fatores de crescimento, plaquetas, leucócitos (quase metade da colheita inicial de sangue) e linfócitos (Zumarán et al., 2018).

A membrana de L-PRF é estável, resistente, adesiva e de fácil manipulação. Pode ser cortada ou adaptada a diferentes defeitos ou condições anatómicas, pode ser aplicada isoladamente ou em associação com outros biomateriais. Além da facilidade clínica de uso e manuseio, apresenta uma composição bioquímica que fornece características hemostáticas, angiogénicas, osteogénicas, anti-inflamatórias, antimicrobianas, inibidoras de dor e curativas (Castro et al., 2019).

O protocolo L-PRF desenvolvido por Choukroun e colaboradores na França é uma biotecnologia relativamente nova para estimular e acelerar a cicatrização e regeneração de tecidos, sendo considerado a segunda geração de concentrados

plaquetários (Daugela, Grimuta, Sakavicius, Jonaitis & Juodzbaly, 2018; Castro et al., 2019).

Esta técnica tem uma execução relativamente simples, de fácil reprodutividade e com custo reduzido. O protocolo consiste na remoção de 10 ml de sangue do paciente por punção venosa e recolhida em tubos revestidos por vidro. Não são utilizados anticoagulantes ou qualquer tipo de aditivo. O sangue é imediatamente centrifugado por 12 minutos a 2400 rpm. Como não existe a presença de anticoagulantes, a ativação plaquetária e a polimerização da fibrina são desencadeadas imediatamente. Após a centrifugação, são obtidas três camadas: uma camada inferior de hemácias, uma camada superior de plasma pobre em plaquetas e uma camada intermediária de fibrina coagulada (L-PRF). No L-PRF, uma rede densa de fibrina com plaquetas e leucócitos enredados possui propriedades mecânicas únicas que permitem seu uso como arcabouço para outros tipos de células. O L-PRF pode ser usado na forma de coágulo ou pressionado entre duas compressas para formar uma membrana bastante resistente (Madurantakam, Yoganarasimha & Hasan, 2015; Pinto et al., 2016; Zumarán et al., 2018; Dohan Ehrenfest et al., 2018; Chou, Chang & Wang, 2020). As membranas devem ser usadas em até 2 horas, desde que permaneçam hidratadas (Pinto et al., 2016).



**Figura 4.** Imagem ilustrando a arquitetura celular e arquitetura da matriz das quatro categorias dos concentrados plaquetários. Dois parâmetros são importantes: presença de leucócitos (círculos azuis) e densidade da fibrina (fibras amarelas e marrom claro). Agregados de plaquetas (formas verde clara) estão sempre assentados na rede de fibrinas. No P-PRP e L-PRP as fibras de fibras são imaturas e consistem principalmente de fibras com diâmetro reduzido (setas vermelhas) devido à polimerização simples da fibra. Essa rede de fibrina suporta a aplicação de plaquetas durante a cirurgia, mas se dissolve rapidamente como uma cola de fibrina. Nas preparações de P-PRF e L-PRF, as fibras de fibrina são grossas (setas pretas) devido ao conjunto de múltiplas fibras e constituem uma matriz resistente que pode ser considerada como um biomaterial de fibrina (Adaptado de Dohan Ehrenfest et al., 2009).

#### 4.2.3 Fibrina rica em plaquetas avançada (A-PRF)

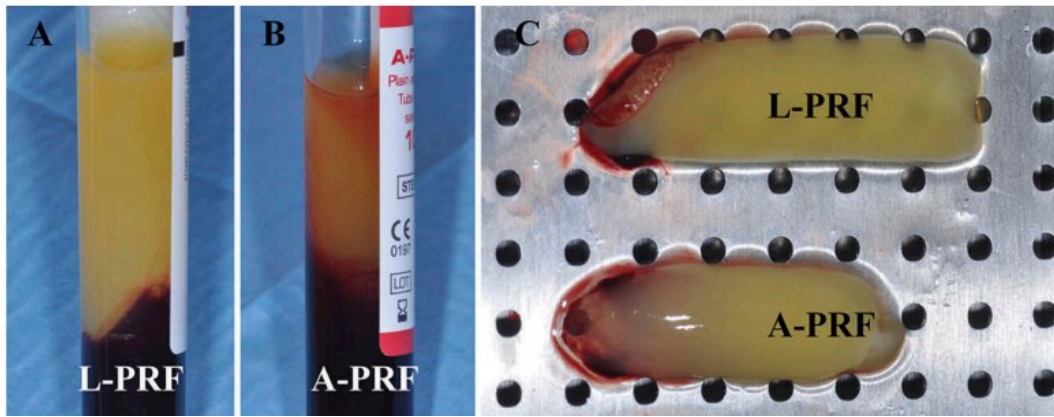
O processo de centrifugação do PRF é baseado na aplicação de altas forças centrífugas (RCF). Análises histológicas do coágulo de PRF demonstraram que as plaquetas e células inflamatórias no esqueleto de fibrina acumulam-se principalmente na porção proximal do coágulo de PRF (Ghanaati et al., 2014). O ajuste do RCF influencia na distribuição celular dentro da matriz podendo aumentar a capacidade

regenerativa das matrizes baseadas em PRF. Deste modo, o ajuste fino do processo de centrifugação em termos de redução da RCF e de um ligeiro aumento do tempo de centrifugação resultou numa PRF avançada, com números de leucócitos aprimorados, especialmente granulócitos neutrofilicos. Além disso, as plaquetas e leucócitos no A-PRF foram distribuídos uniformemente por todo o coágulo em comparação ao PRF (Choukroun & Ghanaati, 2018).

O processamento deste concentrado plaquetário é realizado através da diminuição das rotações por minuto (rpm) e aumento do tempo de centrifugação. Como resultado vamos obter uma fibrina rica em plaquetas avançada (A-PRF), com boas características mecânicas, tendo a capacidade de reter linfócitos B e T e fazer uma distribuição mais uniforme das plaquetas, neutrófilos e monócitos (Dohan Ehrenfest et al., 2014). Além disso a membrana A-PRF apresenta a capacidade de fazer uma libertação lenta e contínua de fatores de crescimento (Fujioka-Kobayashi et al., 2017).

O protocolo de processamento do A-PRF é bastante simples e realizado através da recolha de 10 ml de sangue do paciente. A amostra sanguínea é colocada em tubos revestidos por vidro, sem adição de anticoagulantes. O sangue é imediatamente centrifugado por 8 minutos a uma velocidade de 1300 rpm. Como não existe a presença de anticoagulantes, a ativação plaquetária e a polimerização da fibrina são desencadeadas imediatamente. Após a centrifugação, são obtidas três camadas: uma camada inferior de hemácias, uma camada superior de plasma pobre em plaquetas e uma camada intermediária de fibrina coagulada (A-PRF). Este coágulo de A-PRF pode ser pressionado entre duas compressas para formar uma membrana de espessura constante (; Chenchev, Ivanova, Neychev & Cholakova, 2017; Fujioka-Kobayashi et al., 2017; Clark et al., 2018; Lorenz, Al-Maawi, Sader & Ghanaati, 2018; Ansarizadeh, Mashayekhan & Saadatmand, 2019). As membranas devem ser usadas até 2 horas, desde que permaneçam hidratadas (Pinto et al., 2016).

De acordo com Dohan Ehrenfest et al. (2018), quando realizaram uma observação macroscópica, as membranas de A-PRF produzidas com 10 ml de sangue foram muito menores que os coágulos e membranas de L-PRF produzidas com 9 ml de sangue. Sistemáticamente o L-PRF era pelo menos 30% maior que os coágulos e membranas do A-PRF (Figura 5).



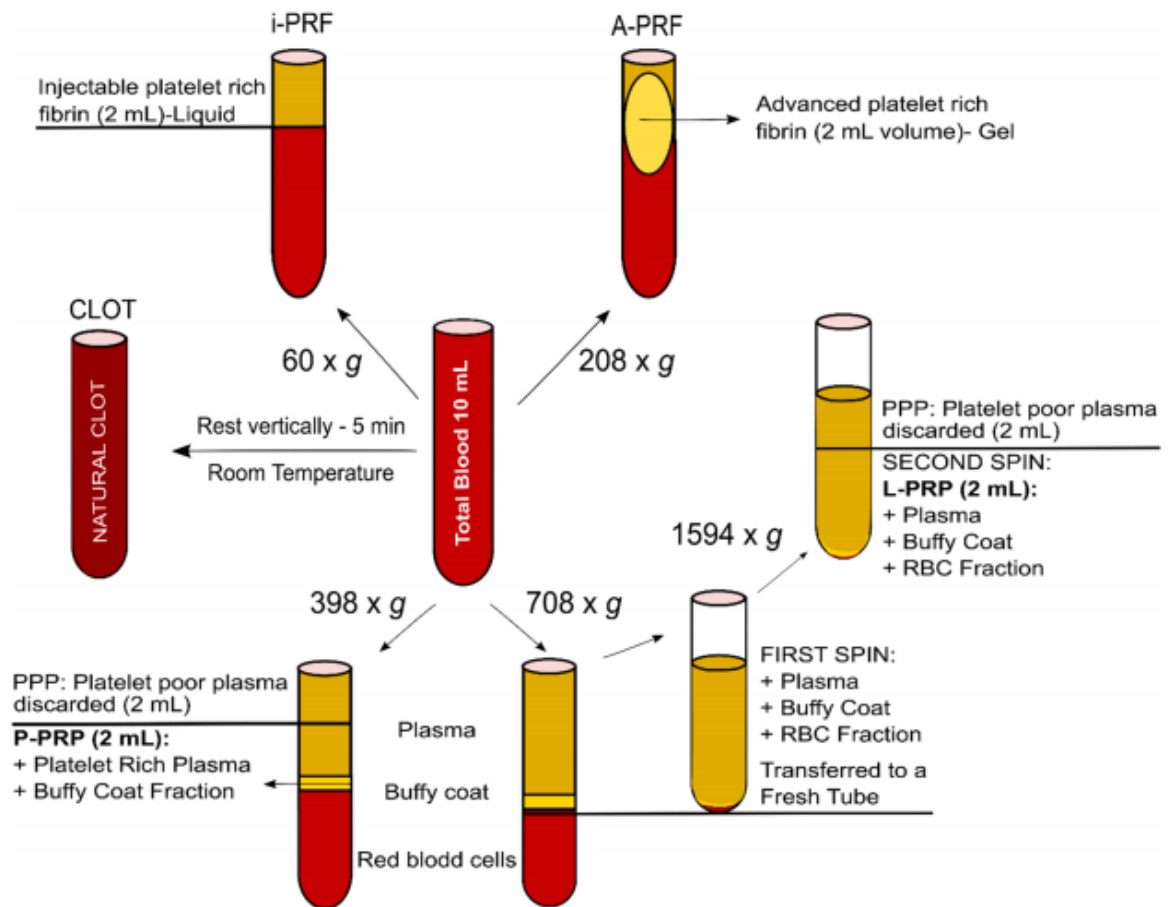
**Figura 5.** Comparação entre estrutura da membrana de fibrina no L-PRF e no A-PRF (Adaptado de ( Dohan Ehrenfest et al., 2018).

#### 4.2.4 Fibrina rica em plaquetas injetável (I-PRF)

Com base nos resultados obtidos na redução da RCF, foi levantada a questão de saber em que medida esta redução sistemática poderia influenciar no aumento de plaquetas e leucócitos, bem como nos fatores de crescimento dos concentrados sanguíneos obtidos. Assim, ocorreu o desenvolvimento de uma fórmula injetável de PRF, denominada de I-PRF, com o objetivo de fornecer aos clínicos um concentrado de plaquetas de fácil manipulação, com formulação líquida e que pode ser utilizada isolada ou combinada com vários biomateriais (Choukroun & Ghanaati, 2018).

O aproveitamento das velocidades de centrifugação mais lentas e mais curtas, uma maior presença de células regenerativas, com maiores concentrações de fatores de crescimento podem ser observadas quando comparadas a outras formulações de PRF utilizando velocidades de centrifugação mais altas (Miron et al., 2017).

O protocolo de preparação do I-PRF consiste na recolha de 10 ml de sangue total do paciente, sem adição de anticoagulante, que deve ser centrifugado a 700 rpm por 3 minutos. Após a centrifugação recolhe-se 1 ml do I-PRF da camada superior que pode ser injetada ou misturada a outro biomaterial (Miron et al., 2017; Wang, Zhang, Choukroun, Ghanaati & Miron, 2018).



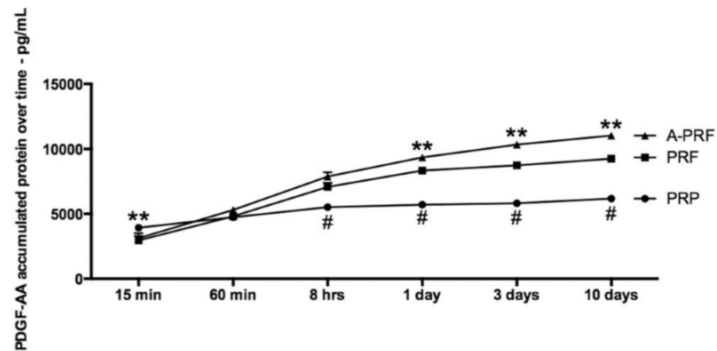
**Figura 6.** Protocolos de preparação dos protocolos sanguíneos (Adaptado de FernándezMedina, Vaquette & Ivanovski., 2019).

## 5. Liberação dos Fatores de Crescimento

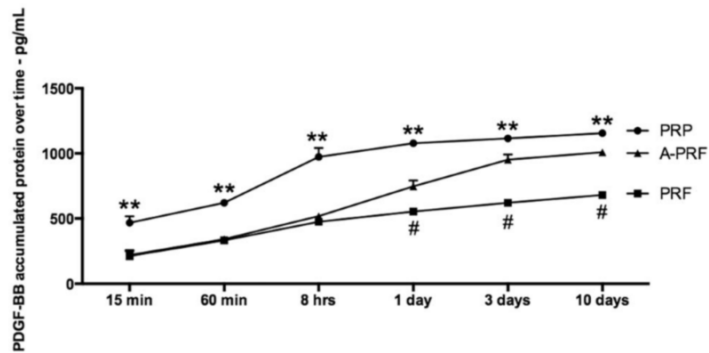
### 5.1 PDGF-AA, PDGF-AB e PDGF-BB

A análise da liberação do fator de crescimento de PDGF-AA, demonstrou que, após 15 minutos, níveis significativamente mais altos de PDGF-AA foram libertados pelo PRP quando comparados ao PRF ou A-PRF. Entretanto, foram observados níveis mais baixos aos 60 minutos, demonstrando que o PRP liberta rapidamente PDGF-AA entre 0 e 15 minutos e, posteriormente, significativa diminuição da liberação é observada comparativamente até 10 dias. Não houve diferenças significativas entre os

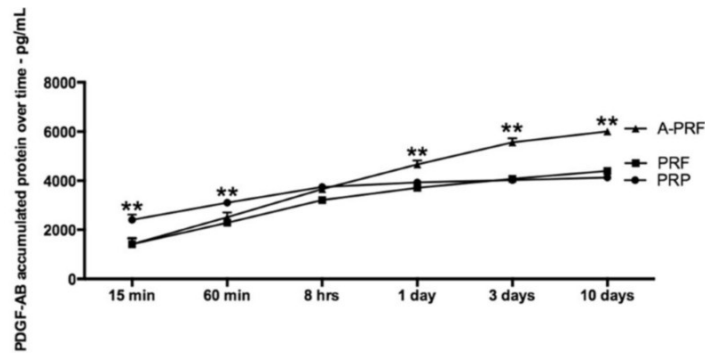
A-PRF e PRF variando de 15 minutos a 1 dia; a partir do 3º ao 10º dia A-PRF mostrou maior liberação do fator de crescimento de PDGF-AA quando comparado ao PRP ou PRF. Tendências semelhantes também foram observadas para o PDGF-AB e PDGF-BB. No entanto, o conteúdo total de proteínas para o fator de crescimento PDGF-BB foi significativamente maior nas amostras de PRPs quando comparado ao PRF e ao APRF em todos os momentos (Figuras 7, 8 e 9) (Kobayashi et al., 2016).



**Figura 7.** PDGF-AA (pg/ml) libertado num período de 10 dias (Adaptado de Kobayashi et al., 2016).



**Figura 8.** PDGF-BB (pg/ml) libertado num período de 10 dias (Adaptado de Kobayashi et al., 2016).



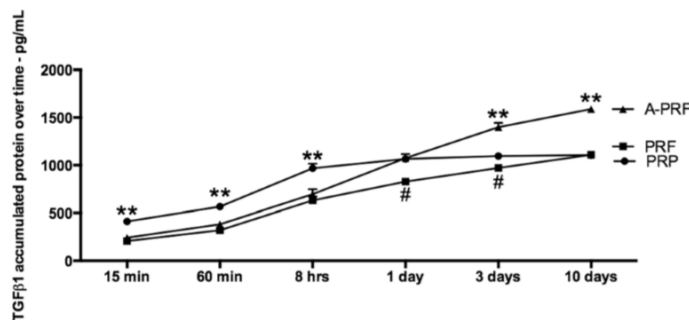
**Figura 9.** PDGF-AB (pg/ml) libertado num período de 10 dias (Adaptado de Kobayashi et al., 2016).

Miron et al. (2017), compararam a libertação de PDGF-AA, PDGF-AB e PDGF-BB entre PRP e I-PRF. Foi possível observar que, a partir dos 15 minutos até 8 horas, houve uma libertação precoce desses fatores de crescimento do PRP quando comparado ao I-PRF. Posteriormente, a libertação total dos fatores de crescimento foi quantificada até um período de 10 dias. Verificaram que PDGF-AA, PDGF-AB demonstraram fatores de crescimento total mais altos liberados do I-PRF quando comparados ao PRP. No entanto, a libertação total do fator de crescimento de PDGF-BB foi significativamente maior no PRP quando comparado ao I-PRF.

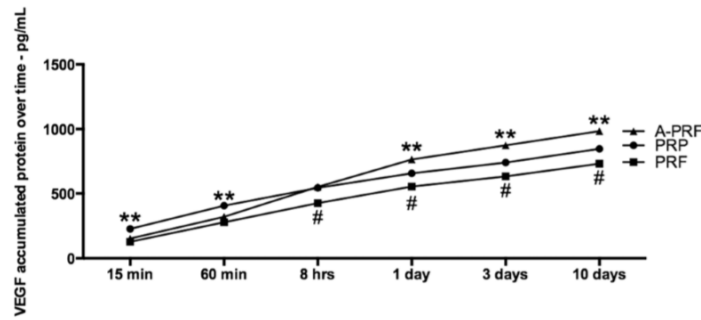
Dohan Ehrenfest et al. (2018), compararam a libertação de fatores de crescimentos de uma membrana de A-PRF e L-PRF em sete tempos diferentes: 20 minutos, 1 hora, 4 horas, 1 dia, 3 dias, 5 dias e 7 dias. Quantidades significativas de PDGF-AB foram encontradas em todos os tempos da pesquisa, mesmo 7 dias após a produção na membrana L-PRF e até 3 dias na membrana A-PRF. Importa ressaltar que a membrana L-PRF permaneceu em boas condições até o último tempo experimental (7 dias), enquanto a membrana A-PRF se dissolveu completamente no terceiro dia. Por este motivo, o último valor de A-PRF foi medido no terceiro dia experimental.

## 5.2 TGF- $\beta$ 1 e VEGF

Mais uma vez, foi observado que o PRP demonstrou níveis significativamente mais altos de liberação de TGF- $\beta$ 1 e VEGF nos momentos iniciais, 15 minutos até 8 horas, quando comparado ao PRF e ao A-PRF. Posteriormente, os níveis no PRP caíram para níveis mais baixos quando comparados a PRF ou A-PRF. O A-PRF, demonstrou níveis significativamente mais altos em 1, 3 e 5 dias para as concentrações de TGFB1 e VEGF. O acúmulo de proteína foi significativamente mais elevado nos primeiros instantes do PRP e caiu significativamente para níveis mais baixos ao fim de 10 dias quando comparado ao PRF e ao A-PRF. A liberação total de proteína foi significativamente mais alta para o A-PRF aos 3 dias e 10 dias para TGFB1 e 1, 3 e 10 dias para VEGF quando comparada com PRP e PRF (Figuras 10 e 11) (Kobayashi et al., 2016).



**Figura 10.** TGF- $\beta$ 1 (pg/ml) libertado num período de 10 dias (Adaptado de Kobayashi et al., 2016).



**Figura 11.** VEGF (pg/ml) libertado num período de 10 dias (Adaptado de Kobayashi et al., 2016).

Segundo Miron et al. (2017), a partir de 15 minutos até 8 horas, o PRP demonstrou níveis mais elevados de libertação de TGF- $\beta$ 1 e VEGF quando comparado ao I-PRF. Porém, a libertação total de VEGF e TGF- $\beta$ 1 foi significativamente superior no PRP quando comparado ao I-PRF.

Dohan Ehrenfest et al. (2018), na mesma experiência relatam que observaram quantidades significativas de TGF $\beta$ -1 e VEGF em cada período experimental, mesmo 7 dias após a produção com a membrana L-PRF original e até 3 dias com a membrana A-PRF. Estas quantidades de moléculas apresentaram uma cinética específica de libertação lenta. As liberações de TGF $\beta$ -1 e VEGF mostraram perfis gerais semelhantes, caracterizados por um rápido aumento na libertação durante as primeiras 24 horas. Para o L-PRF original, foi observada uma libertação significativa, porém mais lenta, até ao dia 5 (120 horas); durante os últimos 2 dias do experimento, as membranas continuaram a libertar quantidades significativas destas moléculas, mas muito lentamente. Para o A-PRF, a libertação também diminuiu após o primeiro dia, mas a libertação parou rapidamente após a dissolução completa da membrana de A-PRF. A libertação lenta de TGF $\beta$ -1, PDGF-AB e VEGF a partir de uma membrana de L-PRF sempre foi significativamente muito mais forte em todos os tempos experimentais do que a libertação de uma membrana de A-PRF (Tabela 2).

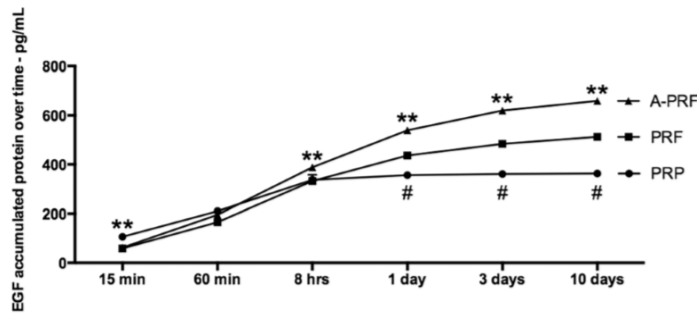
**Tabela 2.** Comparação entre a quantidade total de FC libertada no final do tempo experimental (após 168 horas) e a quantidade extraída inicial de cada molécula, testada numa membrana L-PRF e numa membrana A-PRF. (Adaptado de Dohan Ehrenfest et al., 2018).

Molécula testada		TGF- $\beta$ 1 (ng)	VEGF (pg)	PDGF-AA (ng)	BMP-2 (pg)
Total FC liberados depois 7 dias	L-PRF	315.5	6602	67.1	580
	A-PRF	92.1	2445	20.9	NA
Total liberado no tempo zero	L-PRF	44.4	994	44.4	79
	A-PRF	18.6	514	15	NA
Proporção entre libertação inicial e final	L-PRF	7.1	6.64	1.51	7.34
	A-PRF	4.95	4.76	1.39	NA

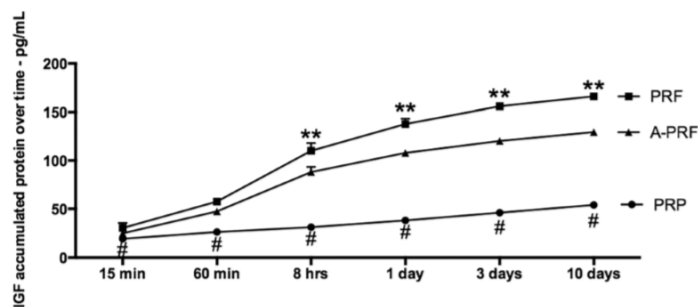
### 5.3 EGF e IGF

Foram observadas tendências diferentes para a libertação de EGF e IGF. Foi encontrada uma libertação de proteína significativamente mais elevada no A-PRF para EGF aos 60 minutos, 8 horas, 1 dia e 3 dias. Comparativamente em quase todos os tempos, 15 minutos, 60 minutos, 8 horas e 1 dia, observaram-se níveis significativamente mais baixos de IGF no PRP. A maior concentração total de EGF foi encontrada no A-PRF e a mais baixa foi encontrada no PRP, enquanto que a maior concentração total de IGF foi encontrada no PRF e a mais baixa foi encontrada no PRP (Figura 12) (Kobayashi et al., 2016).

A libertação dos fatores de crescimento total EGF e IGF, num período de 10 dias, demonstraram níveis significativamente mais altos para o I-PRF quando comparados com o PRP (Figura 13) (Miron et al., 2017).



**Figura 12.** EGF (pg/ml) libertado num período de 10 dias (Adaptado de Kobayashi et al., 2016).



**Figura 13.** IGF (pg/ml) libertado num período de 10 dias (Adaptado de Kobayashi et al., 2016).

## 6. Aplicações Clínicas do PRGF, L-PRF e A-PRF

### 6.1 PRGF

O PRGF<sup>R</sup> (Endoret<sup>R</sup>), pode ser considerado um P-PRP por não apresentar leucócitos na sua composição, tem vindo a ser utilizado ao longo dos anos em Medicina Dentária para promover a regeneração dos tecidos alveolares. Diferencia-se dos representantes do PRP por apresentar um protocolo simplificado com apenas um

processo de centrifugação. Com o protocolo Endoret<sup>R</sup> (BTI, Vitoria, Spain) podemos obter duas formulações diferentes, uma na forma líquida e outra na forma de coágulo (Anitua et al., 2012; Fioravanti et al., 2015). Outra vantagem do PRGF<sup>R</sup> em relação aos demais PRP é o facto de não se utilizar trombina bovina no seu processamento, o que impede as reações de corpo estranho (Giannini et al., 2015; Masuki et al., 2016).

A literatura é repleta de estudos sobre os benefícios do PRGF a nível da regeneração alveolar pós-extração, onde este concentrado plaquetário pode ser aplicado na forma de um coágulo, para o total preenchimento do alvéolo dentário (Haraji, Lassemi, Motamedi, Alavi & Adibnejad, 2012; Mozzati, Gallesio, di Romana, Bergamasco & Pol, 2014; Cocero et al., 2015). Para além deste coágulo, pode optar-se pela produção de uma membrana de fibrina de PRGF com o intuito de cobrir o coágulo antes da realização da sutura gengival (Mozzati et al., 2014).

Anitua et al. (2015), realizaram ensaio clínico onde 60 pacientes, com indicação de extrações simples, foram randomizados para receber plasma rico em fatores de crescimento (PRGF) ou coágulo sanguíneo. Os resultados mostraram que no grupo que recebeu PRGFR<sup>®</sup> ocorreu uma melhor cicatrização ao longo de todo o período observado, com formação de um epitélio queratinizado significativamente mais espesso e o osso recém-formado com volume basal significativamente maior. Concluíram ainda que, o PRGF<sup>R</sup> pode ser uma ferramenta útil para melhorar a cicatrização das cavidades de extração, minimizando as complicações pós-operatórias e estimulando a regeneração dos tecidos duros e moles.

Mozzati et al. (2014), concluíram que a aplicação do PRGF após a extração melhorou o processo de cicatrização em pacientes diabéticos, acelerando o encerramento do alvéolo (epitelização) e a maturação dos tecidos, comprovando a associação entre o uso do PRGF e a melhoria da cicatrização de feridas em pacientes diabéticos.

Anitua et al. (2015), afirmam que clinicamente é possível observar uma cicatrização mais rápida da ferida operatória, pois o PRGF<sup>®</sup> tem a capacidade de acelerar o processo de regeneração tecidular.

O PRGF<sup>R</sup> pode ser misturado com outro biomaterial, tornando a sua manipulação mais fácil e melhorando as propriedades osteocondutoras do enxerto. Este também pode ser utilizado na expansão e split de crista nas atrofia maxilares e na elevação dos seios maxilares, aumentando a formação óssea e promovendo a vascularização do tecido (Anitua et al., 2012; Solakoglu et al., 2019).

Dragonas et al. (2019), efetuaram uma revisão sistemática para avaliar os efeitos do PRGF na nova formação óssea, na cicatrização de tecidos moles, na dor e no edema pós-operatório, em locais submetidos a procedimentos de preservação, aumento alveolar e aumento dos seios maxilares. Concluíram que existem evidências limitadas sobre os efeitos do PRGF em diferentes procedimentos de enxerto ósseo intraoral, mas existem benefícios relatados na cicatrização de tecidos moles e na sintomatologia pós-operatória.

Os resultados do PRGF para ativação da superfície de implantes são bastante controversos, mas segundo Simonpieri et al. (2012), a osseointegração é dependente de parâmetros físico-químicos e de mecanismos biológicos entre a superfície óssea e a textura do implante. Durante a colocação do implante, a superfície do implante é coberta de sangue e a coagulação na superfície cria imediatamente uma camada espessa de fibrina e plaquetas. O sangue continua a ser a primeira matriz durante a osseointegração, mas apenas uma pequena camada de sangue é necessária para cumprir esta função biológica inicial. A adição artificial de mais alguns fatores de crescimento de um PRP na superfície não deve modificar significativamente a arquitetura da camada inicial de sangue nas fases iniciais da cicatrização, nem influenciar as interações físico-químicas entre o implante e o tecido ósseo. Portanto, as suspensões de PRP são menos biologicamente ativas do que o sangramento natural para o revestimento sanguíneo de uma superfície de implante.

## **6.2 L-PRF**

O L-PRF é preparado através de um protocolo simplificado, sem a necessidade de manuseio bioquímico do sangue, podendo ser aplicado como um coágulo ou como

uma membrana sobre o local da lesão (Khorshidi, Raoofi, Bagheri, & Banihashemi, 2016). Este coágulo consegue preservar a sua composição numa quantidade de células muito próximas das do sangue inicialmente recolhido, como plaquetas ativadas, anticorpos e leucócitos (Fioravanti et al., 2015).

As células que estão ativas no L-PRF agem sinergicamente para dar seguimento no processo de cicatrização. Os leucócitos irão produzir grandes quantidades de VEGF que estimula a angiogénese e, que serão responsáveis pela regulação imunológica. As plaquetas irão libertar os fatores de crescimento, a fibrina irá absorver esses fatores libertando-os lenta e continuamente. O gel do L-PRF continuará a libertar fatores de crescimento, proteínas da coagulação e fatores de crescimento por mais de 7 dias (Dohan Ehrenfest et al., 2012).

A aplicação clínica do L-PRF abrange um grande número de procedimentos cirúrgicos, dentre os quais podemos citar: manipulação de tecidos moles, elevação de seio maxilar, estabilização e proteção de biomateriais (em bloco ou particulados), tratamento da perfuração da membrana de Schneider, coberturas das recessões gengivais, regeneração de defeitos ósseos, preservação de alvéolos pós- extrações, tratamentos associados a implantes dentários e cirurgias endodônticas (Del Corso et al., 2012; Pinto et al., 2016; Simonpieri et al., 2012).

O sucesso da técnica está diretamente relacionado com o tempo entre a recolha sanguínea e sua transferência para a centrifugadora, pois o sangue inicia o seu processo de coagulação assim que entra em contato com as paredes de vidro do tubo (Naik, Karunakar, Jayadev & Marshal, 2013; Pinto et al., 2016).

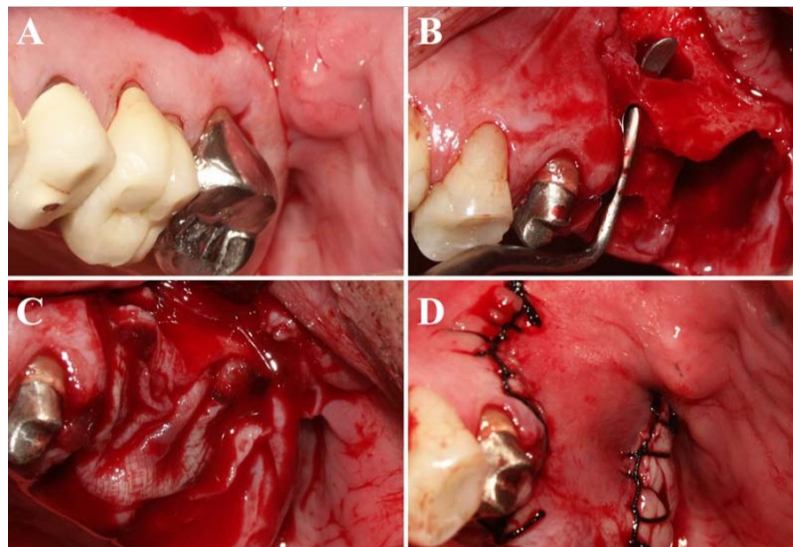
Dragonas et al. (2019), concluíram que o uso do L-PRF em cavidades após extrações foi associado a um modesto efeito benéfico, diminuindo a remodelação da crista alveolar e a dor pós-operatória quando comparada à cicatrização natural. Em oposição, o uso de L-PRF em procedimentos de aumento do seio maxilar não foi associado a resultados mais favoráveis. As evidências limitadas sobre os efeitos do L-PRF nos procedimentos de enxerto ósseo intraoral realçam a necessidade de mais pesquisas para avaliar completamente as suas indicações clínicas, com ênfase na aplicação de protocolos padronizados para a preparação deste produto autólogo.

Castro et al. (2017) analisaram, através de uma revisão sistemática, o efeito da fibrina rica em plaquetas e leucócitos (L-PRF) nos procedimentos de regeneração óssea e na osseointegração. Na pesquisa, foram criados três subgrupos: elevação do assoalho sinusal, preservação da crista alveolar e terapia com implantes. Na elevação do assoalho sinusal, para uma janela lateral e também para a técnica trans-alveolar, foi relatada uma cicatrização óssea histologicamente mais rápida quando o L-PRF foi adicionado aos xenoenxertos. Segundo o estudo, a aplicação isolada do L-PRF melhorou a preservação da largura alveolar, resultando em menor reabsorção óssea bucal em comparação à cura natural. Na terapia do implante, observaram melhor estabilidade do implante ao longo do tempo e menor perda óssea marginal quando o L-PRF foi aplicado.

Castro et al. (2017) analisaram o potencial regenerativo L-PRF durante a cirurgia periodontal. Na pesquisa foram criados três subgrupos: defeitos intra-ósseos, defeitos de furca e cirurgia plástica periodontal. Para os defeitos intra-ósseos, foram encontradas reduções significativas de profundidade de bolsa, ganho no nível de inserção clínica e preenchimento ósseo ao comparar o L-PRF com o debridamento do retalho aberto. Para defeitos de furca, houve redução significativa da profundidade de bolsa, ganho de nível de inserção e preenchimento ósseo foram relatados ao comparar o L-PRF com o debridamento do retalho aberto. Já na cirurgia plástica periodontal, quando o L-PRF foi comparado a um enxerto de tecido conjuntivo, resultados semelhantes foram registados para redução de profundidade de bolsa, ganho de nível de inserção e largura do tecido queratinizado. Os autores concluíram que o L-PRF melhora a cicatrização de lesões periodontais.

Os “plugues” e as membranas de L-PRF podem ser usados para preencher as cavidades pós-extração, mesmo quando associados a destruições císticas graves após a remoção do cisto e permitir uma rápida regeneração óssea e gengival. Também pode ser misturada com um substituto ósseo e usada como cobertura protetora sobre a área enxertada e pode ser empregue para o encerramento da ferida gengival quando é impossível ou difícil de coadaptar os bordos da ferida com as suturas (Choukroun et al., 2006; Magremanne, Baeyens, Awada & Vervaeet, 2009). Com o uso das membranas do L-PRF pretende-se estimular a cicatrização gengival, e também proteger o enxerto ósseo do ambiente oral e mantê-lo dentro do sítio ósseo, como uma barreira biológica.

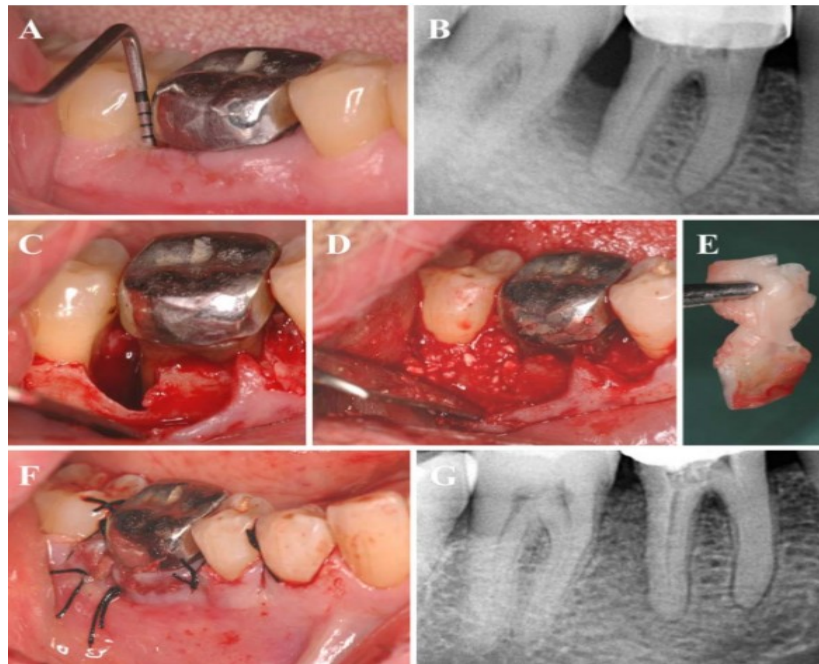
Finalmente, a técnica L-PRF pode ser considerada uma opção eficiente para a preservação das cristas alveolares, e de preenchimento sistemático das cavidades ósseas, podendo se tornar num procedimento padrão para uma cirurgia oral de alta qualidade, em muitas situações (Figura 14). No entanto, mesmo para a técnica L-PRF relativamente fácil de usar e de baixo custo, a escolha de usar sistematicamente a L-PRF em todas as avulsões permanece altamente dependente da forma de trabalhar e da filosofia do Médico Dentista (Del Corso et al., 2012).



**Figura 14.** Regeneração alveolar com L-PRF. A - 1º e 2º molares apresentam lesão quística com destruição do tecido de suporte. B - Os molares foram extraídos e o quisto foi removido cuidadosamente, as demais paredes ósseas eram muito finas e os defeitos ósseos eram profundos e extensos, apresentando risco significativo de cicatrização óssea incompleta e invaginação fibrosa. C - As cavidades do cisto e as cavidades alveolares foram preenchidas com 4 membranas de L-PRF para regeneração óssea e protegidas com 2 membranas de L-PRF para indução da cicatrização e remodelação de tecidos moles. D - Suturas foram realizadas para evitar a exposição da membrana e a contaminação da grande câmara regenerativa (Adaptado de Del Corso et al., 2012).

O uso de membranas de L-PRF durante o tratamento de defeitos intra-ósseos periodontais foi chamado NTR (Regeneração Tecidual Natural) e representou uma técnica alternativa à GTR (Regeneração Tecidual Guiada). O conceito de NTR é promover a regeneração dos vários tecidos periodontais necessários para uma função

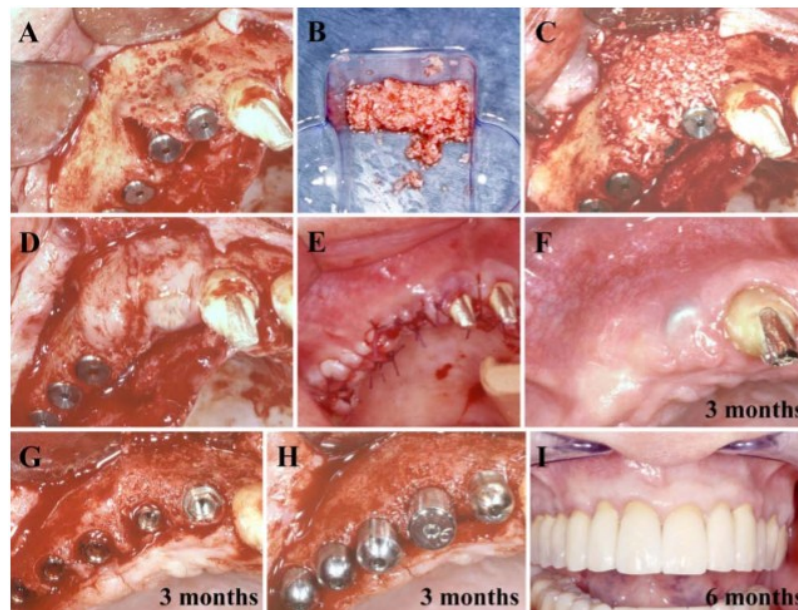
dentária normal (osso, ligamento periodontal, fixação gengival) com membranas de L-PRF como material de enchimento e membrana de proteção, na maioria das vezes em associação com um biomaterial ósseo como mantenedor de espaço. O NTR é frequentemente combinado com uma solução de metronidazol embebendo o material de enchimento, a fim de proteger o compartimento de cicatrização óssea das contaminações bacterianas inevitáveis (Figura 15) (Choukroun et al., 2008). Contudo, a diferença entre GTR e NTR não é apenas a substituição das várias membranas heterólogas usadas na GTR, por um novo tipo de membrana autóloga natural, é também uma verdadeira evolução do conceito. De facto, as membranas de L-PRF são coágulos sanguíneos otimizados e, portanto, as suas interações com os tecidos não seguem estritamente os princípios fundamentais da GTR. As membranas GTR têm que estabilizar o coágulo sanguíneo e criar uma barreira à prova de células contra a invaginação de tecidos moles. A membrana NBR é o próprio coágulo sanguíneo (rico em células) e é apenas uma barreira competitiva bioativa. Enquanto que, outras membranas são consideradas corpos estranhos pelos tecidos hospedeiros e interferem no processo natural de cicatrização dos tecidos, uma membrana L-PRF é tão natural quanto o tecido hospedeiro, é um coágulo sanguíneo preparado de forma otimizada e que pode ser facilmente manipulado por um cirurgião (Del Corso et al., 2012).



**Figura 15.** Regeneração Natural Tecidual (NTR). A - Profundidade de sondagem de 16 mm. B - RX periapical comprovando extensão da lesão. C e D - Defeito limpo e preenchido com L-PRF e xenoenxerto na proporção de volumétrica 50/50, em associação com metronidazol a 0,5% solução. E - Uma membrana de L-PRF foi adaptada para cobrir o defeito ósseo preenchido e ajustar-se ao espaço interdental estreito. Outra membrana foi colocada ao redor do dente para aumentar a cicatrização gengival e a remodelação na área mesial do retalho. F - Suturas profundas foram realizadas para estabilizar firmemente o retalho. G. - A primeira radiografia pós-cirúrgica confirmou o preenchimento completo do defeito intra-ósseo (Adaptado de Del Corso et al., 2012).

Outro conceito de engenharia de tecidos utilizada com o L-PRF é a Regeneração Óssea Natural (NBR). O conceito geral de NBR consiste na regeneração simultânea de um volume ósseo e do tecido gengival em regiões atróficas ou em torno de implantes dentários (Figura 16). O L-PRF pode ser usado como material de enchimento dentro da câmara regenerativa, na maioria das vezes associado à um biomaterial usado como mantenedor de espaço e também como membrana de proteção acima do compartimento regenerativo ósseo. Durante as suturas, os retalhos são puxados acima do enxerto ósseo; se suturas não forem possíveis, não será um problema se houver camadas suficientes de L-PRF para cobrir o volume enxertado, uma vez que a cobertura de L-PRF pode

proteger o local cirúrgico do ambiente bucal e promover a rápida proliferação e migração celular, reepitelização e fechamento da ferida (Simonpieri et al., 2012).



**Figura 16.** Regeneração Óssea Natural (NBR). A - Defeito ósseo peri-implantar. B - L-PRF misturado com enxerto ósseo. C - Aplicação do material de enxerto sobre o defeito ósseo. D- Adaptação da membrana L-PRF. E - Sutura. F - Três meses após a cirurgia. G e H - Colocação de parafusos transgengivais. I - Seis meses depois, confecção da prótese (Adaptado de Simonpieri et al., 2012).

### 6.3 A-PRF

A fibrina avançada rica em plaquetas (A-PRF) é um produto sanguíneo autógeno com aplicações em cirurgia dento-alveolar. Pode ser utilizada nas áreas de periodontologia, endodontia, implantodontia e cirurgia oral. No entanto, há informações mínimas sobre sua aplicação ou eficácia clínica ideal (Clark et al., 2018).

Soto-Peñaloza et al. (2020) realizaram um estudo para investigar a dor e qualidade de vida em 50 indivíduos que foram submetidos à cirurgia endodôntica para tratamento de 50 lesões apicais na região anterior da maxila. Um ensaio clínico

randomizado de dois braços paralelos foi realizado com o objetivo de comparar a cirurgia endodôntica com e sem a aplicação da A-PRF como tratamento adjuvante. Como resultados, observaram que a percepção da dor foi leve nos dois grupos; mostrou-se menos variável durante os primeiros 4 dias no grupo teste, mostrando menores valores de dor extrema. O grupo de controle reportou funções significativamente piores do sono e da fala, sendo o sangramento e o mau hálito os sintomas mais relatados.

Num estudo de Sousa et al. (2020), os autores avaliaram o efeito curativo das A-PRF em feridas palatinas, resultantes da colheita de enxerto gengival livre, na taxa de reepitelização e na experiência de dor após cirurgia. Concluíram que, o uso de curativos de A-PRF pode ser um método simples e eficaz de acelerar o processo de cicatrização e reduzir o desconforto pós-operatório associado à colheita de enxerto gengival livre.

Os concentrados plaquetários têm sido muito estudados e utilizados na área da periodontologia regenerativa. Sameera et al. (2018), realizaram estudo para comparar a técnica de incisão vestibular semilunar com a técnica de bolsa e túnel em combinação com A-PRF e L-PRF para o tratamento das recessões gengivais múltiplas de Classe I e II de Miller. Os autores verificaram ainda, que todos os locais foram curados sem intercorrências e sem complicações pós-operatórias. Ocorreu uma redução na profundidade da recessão, na largura da recessão e nos níveis de perda de inserção clínica no início do estudo, 3 meses e 6 meses após a cirurgia. Este estudo, concluiu que a técnica de incisão vestibular semilunar apresenta melhores resultados do que a técnica de bolsa e túnel para o tratamento de múltiplas recessões gengivais com membranas A-PRF e L-PRF.

Clark et al. (2018), efetuaram um estudo para verificar se existiam benefícios na utilização de membranas de A-PPR na preservação alveolar. Quarenta pacientes com indicação para extração de dentes unirradiculares e substituição por implantes dentários foram randomizados em uma das quatro abordagens: A-PRF, A-PRF + FDBA, FDBA ou coágulo sanguíneo. As extrações foram realizadas, segundo os autores, de forma atraumática, preservando tecido ósseo. Após uma média de 15 semanas de cicatrização, as amostras do núcleo ósseo foram colhidas no momento da colocação do implante e enviadas para análise histomorfométrica. As dimensões do alvéolo foram medidas

imediatamente após a extração e antes da colocação do implante. Observou-se perda significativamente maior da altura da crista no grupo coágulo sanguíneo em comparação aos grupos A-PRF e A-PRF + FDBA, ossos significativamente mais vitais estavam presentes no grupo A-PRF em comparação com o grupo FDBA, não houve diferenças significativas na redução da largura da crista entre os grupos e a densidade mineral óssea foi significativamente maior no grupo FDBA em comparação com o coágulo sanguíneo .

Diferentes técnicas de aumento são usadas em cirurgia oral para recuperar estruturas ósseas perdidas. Chenchev et al. (2017), propuseram avaliar a possibilidade de regeneração óssea, utilizando uma combinação de xenoenxerto e concentrados plaquetários. Um homem de 18 anos de idade, sofreu um trauma que ocasionou avulsão do incisivo superior direito (11) e fratura parcial da crista alveolar. O tratamento foi realizado através da associação de enxerto ósseo particulado, I-PRF e A-PRF. Os resultados clínicos foram revisados 4 meses após o procedimento e um implante dentário foi colocado. Os autores concluíram que a associação entre enxerto ósseo, I-PRF e A-PRF, é benéfico para regeneração alveolar, concordando com Simonpieri et al. (2012) que afirmam que a combinação destes materiais funciona como um "conector biológico" entre os diferentes elementos do enxerto e atua como uma matriz de suporte para a neoangiogênese, para a captura de células-tronco e a para migração de células osteoprogenitoras para o centro do enxerto.

A transferência óssea autóloga é considerada o padrão ouro para o aumento do rebordo alveolar antes da instalação dos implantes, especialmente em defeitos ósseos graves. Apesar de apresentar algumas vantagens, o enxerto autólogo apresenta várias desvantagens, como necessidade de um sítio doador, aumento da morbidade e dor. Lorenz et al. (2018), relataram, pela primeira vez, uma combinação de A-PRF + ósseo xenôgeno e o I-PRF líquido, juntamente com uma malha de titânio planejada em 3D individualizada. O objetivo foi regenerar um defeito ósseo grave ocasionado por um tumor na mandíbula. O enxerto ósseo enriquecido com componentes regenerativos da PRF permitiu a reconstrução do defeito ressectivo mandibular sob a malha 3-D sem transplante ósseo autólogo. A Reabilitação completa e a restauração da função oral do paciente foram alcançadas. A análise histológica das biópsias ósseas extraídas

confirmou que o novo osso dentro da região aumentada teve origem no osso residual. Dentro das limitações do caso apresentado, o conceito aplicado parece ser uma abordagem promissora para aumentar a capacidade regenerativa de um material substituto ósseo, bem como diminuir a necessidade por transplante ósseo autólogo, mesmo nos casos em que o osso autólogo é considerado o padrão ouro. Lorenz et al. (2018) concluíram que a associação de A-PRF + enxerto ósseo + I-PRF pode ser considerado uma fonte confiável para aumentar as capacidades biológicas dos materiais de substituição óssea.



### **III. Conclusão**

A procura incessante pela melhoria dos processos naturais de cicatrização e regeneração corroborou para o surgimento dos concentrados sanguíneos atualmente utilizados nas mais diversas áreas da Medicina Dentária.

Podemos concluir que, por serem produtos biológicos autólogos, constituídos por concentrações suprafisiológicas de plaquetas e fatores de crescimento (GFs), os concentrados sanguíneos podem estimular o crescimento, a migração, a proliferação e a diferenciação celular, sendo capazes de acelerar o processo de cicatrização. Uma das suas grandes vantagens é ser autólogo, não havendo possibilidade de induzir reações imunológicas.

Contudo, existem inúmeras variáveis que podem interferir na qualidade e nas características histológicas destes concentrados, sendo elas: a recolha do sangue, o tempo da recolha até à centrifugação, o protocolo de centrifugação, o tipo de centrifugadora utilizada, o tempo de espera até a utilização do coágulo, o tipo de indicação de uso, a associação com outros biomateriais, entre outros.

Por último, é importante ter presente que, seja qual for o produto, estas preparações ricas em fatores de crescimento não são mágicas, e o sucesso da sua aplicação depende totalmente das capacidades dos cirurgiões em entender, preparar, usar e combinar corretamente estas tecnologias. O PRP e o PRF estão na fronteira entre a engenharia dos tecidos e a prática clínica, portanto, o seu uso adequado requer uma visão biologicamente orientada. Este facto já sucedeu com os géis de PRP, e começa a ocorrer com o L-PRF e com os conceitos de NTR e NBR que apresentam potencial para revolucionar a Medicina Dentária regenerativa.

Deste modo, é da competência do Médico Dentista, compreender esta nova tecnologia de tratamento e avaliar a questão custo benefício, tendo sempre como prioridade o bem-estar do paciente.

É assim possível concluir que os concentrados sanguíneos necessitam de melhorias na sua padronização e formulação para que possam ter uma maior previsibilidade e confiabilidade nos resultados clínicos.



#### IV. Bibliografia

- Agrawal, A. A. (2017). Evolution, current status and advances in application of platelet concentrate in periodontics and implantology. *World Journal of Clinical Cases*, 5(5), 159. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v5.i5.159>
- Anitua, E., Murias-Freijo, A., Alkhraisat, M. H., & Orive, G. (2015). Clinical, radiographical, and histological outcomes of plasma rich in growth factors in extraction socket: a randomized controlled clinical trial. *Clinical Oral Investigations*, 19(3), 589–600. <https://doi.org/10.1007/s00784-014-1278-2>
- Anitua, E., Nurden, P., Prado, R., Nurden, A. T., & Padilla, S. (2019). Autologous fibrin scaffolds: When platelet- and plasma-derived biomolecules meet fibrin. *Biomaterials*, 192, 440–460. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.11.029>
- Anitua, E., Prado, R., & Orive, G. (2012). Bilateral sinus elevation evaluating plasma rich in growth factors technology: A report of five cases. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 14(1), 51–60. <https://doi.org/10.1111/j.1708-8208.2009.00233.x>
- Anitua, E., Sánchez, M., Orive, G., & Andía, I. (2007). The potential impact of the preparation rich in growth factors (PRGF) in different medical fields. *Biomaterials*, 28(31), 4551–4560. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.06.037>
- Ansarizadeh, M., Mashayekhan, S., & Saadatmand, M. (2019). Fabrication, modeling and optimization of lyophilized advanced platelet rich fibrin in combination with collagen-chitosan as a guided bone regeneration membrane. *International Journal of Biological Macromolecules*, 125, 383–391. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.078>
- Araújo, M. G., Silva, C. O., Misawa, M., & Sukekava, F. (2015). Alveolar socket healing: What can we learn? *Periodontology 2000*, 68(1), 122–134. <https://doi.org/10.1111/prd.12082>
- Baldwin, P., Li, D. J., Auston, D. A., Mir, H. S., Yoon, R. S., & Koval, K. J. (2019). Autograft, Allograft, and Bone Graft Substitutes: Clinical Evidence and Indications for Use in the Setting of Orthopaedic Trauma Surgery. *Journal of Orthopaedic Trauma*, 33(4), 203–213. <https://doi.org/10.1097/BOT.0000000000001420>
- Bergman, B., & Carlsson, G. E. (1985). Clinical long-term study of complete denture wearers. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 53(1), 56–61.
- Blair, P., & Flaumenhaft, R. (2009). Platelet  $\alpha$ -granules: Basic biology and clinical correlates. *Blood Reviews*, 23(4), 177–189. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2009.04.001>
- Calcei, J. G., & Rodeo, S. A. (2019). Orthobiologics for Bone Healing. *Clinics in Sports Medicine*, 38(1), 79–95. <https://doi.org/10.1016/j.csm.2018.08.005>

- Carrier, A., Geris, L., Gastel, N. van, Carmeliet, G., & Oosterwyck, H. Van. (2015). Oxygen as a critical determinant of bone fracture healing-A multiscale model. *Journal of Theoretical Biology*, 365, 247–264. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2014.10.012>
- Castillo, T. N., Pouliot, M. A., Hyeon Joo Kim, & Drago, J. L. (2011). Comparison of growth factor and platelet concentration from commercial platelet-rich plasma separation systems. *American Journal of Sports Medicine*, 39(2), 266–271. <https://doi.org/10.1177/0363546510387517>
- Castro, A. B., Meschi, N., Temmerman, A., Pinto, N., Lambrechts, P., Teughels, W., & Quirynen, M. (2017). Regenerative potential of leucocyte- and platelet-rich fibrin. Part B: sinus floor elevation, alveolar ridge preservation and implant therapy. A systematic review. *Journal of Clinical Periodontology*, 44(2), 225–234. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12658>
- Castro, A., Cortellini, S., Temmerman, A., Li, X., Pinto, N., Teughels, W., & Quirynen, M. (2019). Characterization of the Leukocyte- and Platelet-Rich Fibrin Block: Release of Growth Factors, Cellular Content, and Structure. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 34(4), 855–864. <https://doi.org/10.11607/jomi.7275>
- Chenchev, I. L., Ivanova, V. V., Neychev, D. Z., & Cholakova, R. B. (2017). Application of Platelet-Rich Fibrin and Injectable Platelet-Rich Fibrin in Combination of Bone Substitute Material for Alveolar Ridge Augmentation - a Case Report. *Folia Medica*, 59(3), 362–366. <https://doi.org/10.1515/folmed-2017-0044>
- Cho, T. J., Gerstenfeld, L. C., & Einhorn, T. A. (2002). Differential temporal expression of members of the transforming growth factor  $\beta$  superfamily during murine fracture healing. *Journal of Bone and Mineral Research*, 17(3), 513–520. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2002.17.3.513>
- Chou, T. M., Chang, H. P., & Wang, J. C. (2020). Autologous platelet concentrates in maxillofacial regenerative therapy. *Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 36(5), 305–310. <https://doi.org/10.1002/kjm2.12192>
- Choukroun, J., & Ghanaati, S. (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), 87–95. <https://doi.org/10.1007/s00068-017-0767-9>
- Choukroun, Joseph, Diss, A., Simonpieri, A., Girard, M. O., Schoeffler, C., Dohan, S. L., Dohan, A. J. J., Mouhyi, J., & Dohan, D. M. (2006). Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part IV: Clinical effects on tissue healing. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, 101(3), 56–60. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2005.07.011>

- Choukroun, Joseph, Simonpieri, A., Del Corso, M., Mazor, Z., Sammartino, G., & Ehrenfest, D. M. D. (2008). Controlling systematic perioperative anaerobic contamination during sinus-lift procedures by using metronidazole: An innovative approach. *Implant Dentistry*, *17*(3), 257–270. <https://doi.org/10.1097/ID.0b013e318181349a>
- Civinini, R., Macera, A., Nistri, L., Redl, B., & Innocenti, M. (2011). The use of autologous blood-derived growth factors in bone regeneration. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism*, *8*(1), 25–31.
- Clark, D., Rajendran, Y., Paydar, S., Ho, S., Cox, D., Ryder, M., Dollard, J., & Kao, R. T. (2018). Advanced platelet-rich fibrin and freeze-dried bone allograft for ridge preservation: A randomized controlled clinical trial. *Journal of Periodontology*, *89*(4), 379–387. <https://doi.org/10.1002/JPER.17-0466>
- Cocero, N., Pucci, F., Messina, M., Pollio, B., Mozzati, M., & Bergamasco, L. (2015). Autologous plasma rich in growth factors in the prevention of severe bleeding after teeth extractions in patients with bleeding disorders: A controlled comparison with fibrin glue. *Blood Transfusion*, *13*(2), 287–294. <https://doi.org/10.2450/2014.0124-14>
- Cutarelli, A., Marini, M., Tancredi, V., D'Arcangelo, G., Murdocca, M., Frank, C., & Tarantino, U. (2016). Adenosine Triphosphate stimulates differentiation and mineralization in human osteoblast-like Saos-2 cells. *Development Growth and Differentiation*, *58*(4), 400–408. <https://doi.org/10.1111/dgd.12288>
- Daugela, P., Grimuta, V., Sakavicius, D., Jonaitis, J., & Juodzbaly, G. (2018). Influence of leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) on the outcomes of impacted mandibular third molar removal surgery: A split-mouth randomized clinical trial. *Quintessence International*, *49*(5), 377–388. <https://doi.org/10.3290/j.qi.a40113>
- de Sousa, C. A., Lemos, C. A. A., Santiago-Júnior, J. F., Faverani, L. P., & Pellizzer, E. P. (2018). Bone augmentation using autogenous bone versus biomaterial in the posterior region of atrophic mandibles: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Dentistry*, *76*(June 2018), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2018.06.014>
- Del Corso, M., Vervelle, A., Simonpieri, A., Jimbo, R., Inchingolo, F., Sammartino, G., & M. Dohan Ehrenfest, D. (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), 1207–1230. <https://doi.org/10.2174/138920112800624391>
- Demiralp, B. (2003). Effects of PRP Growth Factors on Cells Involved in Periodontal Wound Healing. *Journal of the Canadian Dental Association*, *664*(10), 20–24.

- Devescovi, V., Leonardi, E., Ciapetti, G., & Cenni, E. (2008). Growth factors in bone repair. *La Chirurgia Degli Organi Di Movimento*, 92(3), 161–168.  
<https://doi.org/10.1007/s12306-008-0064-1>
- Dhurat, R., & Sukesh, M. (2014). Principles and methods of preparation of platelet-rich plasma: A review and author's perspective. *Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery*, 7(4), 189. <https://doi.org/10.4103/0974-2077.150734>
- Dohan Ehrenfest, D., Bielecki, T., Mishra, A., Borzini, P., Inchingolo, F., Sammartino, G., Rasmusson, L., & A. Evert, P. (2012). In Search of a Consensus Terminology in the Field of Platelet Concentrates for Surgical Use: Platelet-Rich Plasma (PRP), Platelet-Rich Fibrin (PRF), Fibrin Gel Polymerization and Leukocytes. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 13(7), 1131–1137.  
<https://doi.org/10.2174/138920112800624328>
- Dohan Ehrenfest, D. M., Andia, I., Zumstein, M. A., Zhang, C. Q., Pinto, N. R., & Bielecki, T. (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(1), 3–9.  
<https://doi.org/10.32098/mltj.01.2014.02>
- Dohan Ehrenfest, D. M., Pinto, N. R., Pereda, A., Jiménez, P., Corso, M. Del, Kang, B. S., Nally, M., Lanata, N., Wang, H. L., & Quirynen, M. (2018). 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), 171–184.  
<https://doi.org/10.1080/09537104.2017.1293812>
- 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), 158–167.  
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.11.009>
- Dragonas, P., Schiavo, J. H., Avila-Ortiz, G., Palaiologou, A., & Katsaros, T. (2019). Plasma rich in growth factors (PRGF) in intraoral bone grafting procedures: A systematic review. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 47(3), 443–453.  
<https://doi.org/10.1016/j.jcms.2019.01.012>
- Dragoo, J. L., Braun, H. J., Durham, J. L., Ridley, B. A., Odegaard, J. I., Luong, R., & Arnoczky, S. P. (2012). Comparison of the acute inflammatory response of two commercial platelet-rich plasma systems in healthy rabbit tendons. *American Journal of Sports Medicine*, 40(6), 1274–1281.  
<https://doi.org/10.1177/0363546512442334>
- Engler-Pinto, A., Siéssere, S., Calefi, A., Oliveira, L., Ervolino, E., de Souza, S., Furlaneto, F., & Messori, M. R. (2019). Effects of leukocyte- and platelet-rich fibrin associated or not with bovine bone graft on the healing of bone defects in rats with osteoporosis induced by ovariectomy. *Clinical Oral Implants Research*,

30(10), 962–976. <https://doi.org/10.1111/clr.13503>

- Fadadu, P. P., Mazzola, A. J., Hunter, C. W., & Davis, T. T. (2019). Review of concentration yields in commercially available platelet-rich plasma (PRP) systems: A call for PRP standardization. *Regional Anesthesia and Pain Medicine*, 44(6), 652–659. <https://doi.org/10.1136/rapm-2018-100356>
- Fernández-Medina, T., Vaquette, C., & Ivanovski, S. (2019). Systematic comparison of the effect of four clinical-grade platelet rich hemoderivatives on osteoblast behaviour. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(24). <https://doi.org/10.3390/ijms20246243>
- Fioravanti, C., Frustaci, I., Armellini, E., Condò, R., Arcuri, C., & Cerroni, L. (2015). Autologous blood preparations rich in platelets, fibrin and growth factors. *Oral & Implantology*, 8(4), 96–113. <https://doi.org/10.11138/orl/2015.8.4.096>
- Fujioka-Kobayashi, M., Miron, R. J., Hernandez, M., Kandalam, U., Zhang, Y., & Choukroun, J. (2017). Optimized Platelet-Rich Fibrin With the Low-Speed Concept: Growth Factor Release, Biocompatibility, and Cellular Response. *Journal of Periodontology*, 88(1), 112–121. <https://doi.org/10.1902/jop.2016.160443>
- Gerstenfeld, L. C., Cullinane, D. M., Barnes, G. L., Graves, D. T., & Einhorn, T. A. (2003). Fracture healing as a post-natal developmental process: Molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 88(5), 873–884. <https://doi.org/10.1002/jcb.10435>
- Ghanaati, S., Booms, P., Orlowska, A., Kubesch, A., Lorenz, J., Rutkowski, J., Les, C., Sader, R., Kirkpatrick, C. J., & Choukroun, J. (2014). Advanced platelet-rich fibrin: A new concept for cell-based tissue engineering by means of inflammatory cells. In *Journal of Oral Implantology* (Vol. 40, Issue 6). <https://doi.org/10.1563/aaid-joi-D-14-00138>
- Ghiasi, M. S., Chen, J., Vaziri, A., Rodriguez, E. K., & Nazarian, A. (2017). Bone fracture healing in mechanobiological modeling: A review of principles and methods. *Bone Reports*, 6, 87–100. <https://doi.org/10.1016/j.bonr.2017.03.002>
- Giannini, S., Cielo, A., Bonanome, L., Rastelli, C., Derla, C., Corpaci, F., Falisi, G., Cielo, A., & Bonanome, L. (2015). Comparison between PRP, PRGF and PRF: *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 19(1), 927–930.
- Giannoudis, P. V., & Pountos, I. (2005). Tissue regeneration: The past, the present and the future. *Injury*, 36(SUPPL. 4), 2–5. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2005.10.006>
- Granero-Moltó, F., Weis, J. A., Miga, M. I., Landis, B., Myers, T. J., O’Rear, L., Longobardi, L., Jansen, E. D., Mortlock, D. P., & Spagnoli, A. (2009). Regenerative effects of transplanted mesenchymal stem cells in fracture healing. *Stem Cells*, 27(8), 1887–1898. <https://doi.org/10.1002/stem.103>
- Gremmel, T., Frelinger, A., & Michelson, A. (2016). Platelet Physiology. *Seminars in*

- Thrombosis and Hemostasis*, 42(03), 191–204. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1564835>
- Griffin, K. S., Davis, K. M., McKinley, T. O., Anglen, J. O., Chu, T. M. G., Boerckel, J. D., & Kacena, M. A. (2015). Evolution of Bone Grafting: Bone Grafts and Tissue Engineering Strategies for Vascularized Bone Regeneration. *Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism*, 13(4), 232–244. <https://doi.org/10.1007/s12018-015-9194-9>
- Hankenson, K. D., Gagne, K., & Shaughnessy, M. (2015). Extracellular signaling molecules to promote fracture healing and bone regeneration. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 94, 3–12. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.09.008>
- Haraji, A., Motamedi, M. H., Adibnejad, S., Alavi, M., & Lassemi, E. (2012). Effect of plasma rich in growth factors on alveolar osteitis. *National Journal of Maxillofacial Surgery*, 3(1), 38. <https://doi.org/10.4103/0975-5950.102150>
- Harrison, P., Alsousou, J., Andia, I., Burnouf, T., Dohan Ehrenfest, D., Everts, P., Langer, H., Magalon, J., Marck, R., & Gresele, P. (2018). The use of platelets in regenerative medicine and proposal for a new classification system: guidance from the SSC of the ISTH. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 16(9), 1895–1900. <https://doi.org/10.1111/jth.14223>
- Herford, A. S., Miller, M., & Signorino, F. (2017). Maxillofacial Defects and the Use of Growth Factors. *Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America*, 29(1), 75–88. <https://doi.org/10.1016/j.coms.2016.08.006>
- Hu, K., & Olsen, B. R. (2016). The roles of vascular endothelial growth factor in bone repair and regeneration. *Bone*, 91, 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2016.06.013>.The
- Iwasaki, Y., Yamato, H., & Fukagawa, M. (2018). TGF-beta signaling in bone with chronic kidney disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(8). <https://doi.org/10.3390/ijms19082352>
- Jacobs, J. J. (2017). Bone Grafts and Their Substitues: Understanding The Three Os. *Orthopaedic Proceedings*, 99(SUPP\_7), 55. <https://doi.org/10.1302/0301-620X.98B1.36350>
- Khorshidi, H., Raoofi, S., Bagheri, R., & Banihashemi, H. (2016). Comparison of the Mechanical Properties of Early Leukocyte-and Platelet-Rich Fibrin versus PRGF/Endoret Membranes. *International Journal of Dentistry*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/1849207>
- Kobayashi, E., Flückiger, L., Fujioka-Kobayashi, M., Sawada, K., Sculean, A., Schaller, B., & Miron, R. J. (2016). Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF. *Clinical Oral Investigations*, 20(9), 2353–2360. <https://doi.org/10.1007/s00784-016-1719-1>
- Kon, T., Cho, T. J., Aizawa, T., Yamazaki, M., Nooh, N., Graves, D., Gerstenfeld, L.

- C., & Einhorn, T. A. (2001). Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing. *Journal of Bone and Mineral Research*, 16(6), 1004–1014. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2001.16.6.1004>
- Lee, K.-S., Kim, H.-J., Li, Q.-L., Chi, X.-Z., Ueta, C., Komori, T., Wozney, J. M., Kim, E.-G., Choi, J.-Y., Ryoo, H.-M., & Bae, S.-C. (2000). Runx2 Is a Common Target of Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 and Bone Morphogenetic Protein 2, and Cooperation between Runx2 and Smad5 Induces Osteoblast-Specific Gene Expression in the Pluripotent Mesenchymal Precursor Cell Line C2C12. *Molecular and Cellular Biology*, 20(23), 8783–8792. <https://doi.org/10.1128/mcb.20.23.8783-8792.2000>
- Lorenz, J., Al-maawi, S., Sader, R., & Ghanaati, S. (2018). Journal of Oral Implantology Individualized titanium mesh combined with platelet-rich fibrin and deproteinized bovine bone : A new approach for challenging augmentation Individualized titanium mesh combined with platelet-rich fibrin and. *Journal of Oral Implantology*, 44(5), 345–351. <https://doi.org/https://doi.org/10.1563/aaid-joi-D-18-00049>
- Madi, M., Samuel ,M., Kedr, M. (2017). Platelet Rich Fibrin and Periodontal Tissue Regeneration. *Advances in Dentistry & Oral Health*, 4(5), 3–6. <https://doi.org/10.19080/ADOH.2017.04.555649>
- Madurantakam, P., Yoganarasimha, S., & Hasan, F. K. (2015). Characterization of Leukocyte-platelet Rich Fibrin, A Novel Biomaterial. *Journal of Visualized Experiments*, 2015(103), 1–8. <https://doi.org/10.3791/53221>
- Magremanne, M., Baeyens, W., Awada, S., & Vervaet, C. (2009). Kyste osseux solitaire de la mandibule et fibrine riche en plaquettes (PRF). *Revue de Stomatologie et de Chirurgie Maxillo-Faciale*, 110(2), 105–108. <https://doi.org/10.1016/j.stomax.2009.01.003>
- Majidinia, M., Sadeghpour, A., & Yousefi, B. (2018). The roles of signaling pathways in bone repair and regeneration. *Journal of Cellular Physiology*, 233(4), 2937–2948. <https://doi.org/10.1002/jcp.26042>
- Marsell, R., & Einhorn, T. A. (2011). The biology of fracture healing. *Injury*, 42(6), 551–555. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2011.03.031>
- Martino, M. M., Briquez, P. S., Maruyama, K., & Hubbell, J. A. (2015). Extracellular matrix-inspired growth factor delivery systems for bone regeneration. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 94, 41–52. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.04.007>
- Masaki, H., Okudera, T., Watanebe, T., Suzuki, M., Nishiyama, K., Okudera, H., Nakata, K., Uematsu, K., Su, C.-Y., & Kawase, T. (2016). Growth factor and pro-inflammatory cytokine contents in platelet-rich plasma (PRP), plasma rich in growth factors (PRGF), advanced platelet-rich fibrin (A-PRF), and concentrated growth factors (CGF). *International Journal of Implant Dentistry*, 2(1).

<https://doi.org/10.1186/s40729-016-0052-4>

- Mazzocca, A. D., Mccarthy, M. B. R., Chowaniec, D. M., Cote, M. P., Romeo, A. a, Bradley, J. P., Arciero, R. a, & Beitzel, K. (2012). Platelet-Rich Plasma Differs According to. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, *94-A*(4), 308–316.
- Mihaylova, Z., Mitev, V., Stanimirov, P., Isaeva, A., Gateva, N., & Ishkitiev, N. (2017). Use of platelet concentrates in oral and maxillofacial surgery: an overview. *Acta Odontologica Scandinavica*, *75*(1), 1–11.  
<https://doi.org/10.1080/00016357.2016.1236985>
- Miron, R. J., Fujioka-Kobayashi, M., Hernandez, M., Kandalam, U., Zhang, Y., Ghanaati, S., & Choukroun, J. (2017). Injectable platelet rich fibrin (i-PRF): opportunities in regenerative dentistry? *Clinical Oral Investigations*, *21*(8), 2619–2627. <https://doi.org/10.1007/s00784-017-2063-9>
- Morikawa, M., Derynck, R., & Miyazono, K. (2016). TGF- $\beta$  and the TGF- $\beta$  family: Context-dependent roles in cell and tissue physiology. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *8*(5). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021873>
- Mozzati, M., Gallesio, G., Di Romana, S., Bergamasco, L., & Pol, R. (2014). Efficacy of plasma-rich growth factor in the healing of postextraction sockets in patients affected by insulin-dependent diabetes mellitus. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, *72*(3), 456–462. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2013.10.010>
- Naik, B., Karunakar, P., Jayadev, M., Marshal, V. R. (2013). Role of Platelet Rich Fibrin in Wound Healing. *Journal of Conservative Dentistry*, *16*(4), 284–293.  
<https://doi.org/10.4103/0972-0707.114344>
- Nam, S.-S., Lee, J. C., Kim, H. J., Park, J.-W., Lee, J.-M., Suh, J.-Y., Um, H.-S., Kim, J.-Y., Lee, Y., & Kim, Y.-G. (2016). Serotonin Inhibits Osteoblast Differentiation and Bone Regeneration in Rats. *Journal of Periodontology*, *87*(4), 461–469.  
<https://doi.org/10.1902/jop.2015.150302>
- Ornitz, D. M., & Marie, P. J. (2015). Fibroblast growth factor signaling in skeletal development and disease. *Genes and Development*, *29*(14), 1463–1486.  
<https://doi.org/10.1101/gad.266551.115>
- Oryan, A., Alidadi, S., & Moshiri, A. (2016). Platelet-rich plasma for bone healing and regeneration. *Expert Opinion on Biological Therapy*, *16*(2), 213–232.  
<https://doi.org/10.1517/14712598.2016.1118458>
- Pinto, N., Teughels, W., Temmerman, A., & Quirynen, M. (2016). Consensus Guidelines on the Use of L-PRF from the 1st European Meeting on Enhanced Natural Healing in Dentistry. *Research Gate, October*.  
<https://doi.org/10.13140/RG.2.2.36712.88326>
- Quach, E., Chen, W., & Li, R. (2018). Mechanisms of platelet clearance and translation to improve platelet storage. *Blood*, *131*(14), 1512–1521.  
<https://doi.org/10.1182/blood-2017-08-743229>

- Ren, Q., Cai, M., Zhang, K., Ren, W., Su, Z., Yang, T., Sun, T., & Wang, J. (2018). Effects of bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) release from polylactide-poly (ethylene glycol)-polylactide (PELA) microcapsule-based scaffolds on bone. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, *51*(2), 1–8. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20176520>
- Sameera, S., Nagasri, M., Aravind Kumar, P., Indeevar, P., Raviraj, K., & Musalaiah, S. V. V. S. (2018). Comparison of two surgical techniques in the treatment of multiple gingival recessions sandwiched with a combination of A-PRF and L-PRF. *Saudi Dental Journal*, *30*(3), 183–189. <https://doi.org/10.1016/j.sdentj.2018.03.002>
- Sánchez, A. R., Sheridan, P. J., & Kupp, L. I. (2003). Is platelet-rich plasma the perfect enhancement factor? A current review. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, *18*(1), 93–103.
- Schropp, L. (2004). Bone healing and soft tissue contour changes following single-tooth extraction: A clinical and radiographic 12-month prospective study. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, *23*(4), 313–323. <https://doi.org/10.1016/j.prosdent.2003.10.022>
- Shah, P., Keppler, L., & Rutkowski, J. (2014). A review of platelet derived growth factor playing pivotal role in bone regeneration. *Journal of Oral Implantology*, *40*(3), 330–340. <https://doi.org/10.1563/AAID-JOI-D-11-00173>
- Shakir, S., MacIsaac, Z. M., Naran, S., Smith, D. M., Bykowski, M. R., Cray, J. J., Craft, T. K., Wang, D., Weiss, L., Campbell, P. G., Mooney, M. P., Losee, J. E., & Cooper, G. M. (2015). Transforming growth factor beta 1 augments calvarial defect healing and promotes suture regeneration. *Tissue Engineering - Part A*, *21*(5–6), 939–947. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2014.0189>
- Sharda, A., & Flaumenhaft, R. (2018). *The life cycle of platelet granules [ version 1 ; referees : 2 approved ] Referee Status : 7*(0), 1–12. <https://doi.org/10.12688/f1000research.13283.1>
- Simonpieri, A., Del Corso, M., Vervelle, A., Jimbo, R., Inchingolo, F., Sammartino, G., & M. Dohan Ehrenfest, D. (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*(7), 1231–1256. <https://doi.org/10.2174/138920112800624472>
- Solakoglu, Ö., Götz, W., Kiessling, M. C., Alt, C., Schmitz, C., & Alt, E. U. (2019). Improved guided bone regeneration by combined application of unmodified, fresh autologous adipose derived regenerative cells and plasma rich in growth factors: A first-in-human case report and literature review. *World Journal of Stem Cells*, *11*(2), 124–146. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v11.i2.124>
- Somani, R., Zaidi, I., & Jaidka, S. (2011). International journal of clinical pediatric dentistry. *International Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, *4*(1), 69–75.

<http://www.jaypeejournals.com/eJournals/ShowText.aspx?ID=1110&Type=FREE&TYP=TOP&IN=&IID=96&isPDF=NO>

- Soto-Peñaloza, D., Peñarrocha-Diago, M., Cervera-Ballester, J., Peñarrocha-Diago, M., Tarazona-Alvarez, B., & Peñarrocha-Oltra, D. (2020). Pain and quality of life after endodontic surgery with or without advanced platelet-rich fibrin membrane application: a randomized clinical trial. *Clinical Oral Investigations*, 24(5), 1727–1738. <https://doi.org/10.1007/s00784-019-03033-5>
- Sousa, F., Machado, V., Botelho, J., Proença, L., Mendes, J. J., & Alves, R. (2020). Effect of A-PRF Application on Palatal Wound Healing after Free Gingival Graft Harvesting: A Prospective Randomized Study. *European Journal of Dentistry*, 14(1), 63–69. <https://doi.org/10.1055/s-0040-1702259>
- Trombelli, L., Farina, R., Marzola, A., Bozzi, L., Liljenberg, B., & Lindhe, J. (2008). Modeling and remodeling of human extraction sockets. *Journal of Clinical Periodontology*, 35(7), 630–639. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2008.01246.x>
- Uthappa, K. B., Jagadish B.S., Amit, K. W. & Sreelakshmi, S. (2017). Platelet-Rich Fibrin: a Review. *International Journal of Advanced Research*, 5(11), 677–681. <https://doi.org/10.21474/ijar01/5819>
- van der Meijden, P. E. J., & Heemskerk, J. W. M. (2019). Platelet biology and functions: new concepts and clinical perspectives. *Nature Reviews Cardiology*, 16(3), 166–179. <https://doi.org/10.1038/s41569-018-0110-0>
- Wang, X., Zhang, Y., Choukroun, J., Ghanaati, S., & Miron, R. J. (2018). Effects of an injectable platelet-rich fibrin on osteoblast behavior and bone tissue formation in comparison to platelet-rich plasma. *Platelets*, 29(1), 48–55. <https://doi.org/10.1080/09537104.2017.1293807>
- Wu, M., Chen, G., & Li, Y. P. (2016). TGF- $\beta$  and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease. *Bone Research*, 4(March). <https://doi.org/10.1038/boneres.2016.9>
- Yadav, S., & Storrrie, B. (2017). The cellular basis of platelet secretion: Emerging structure/function relationships. *Platelets*, 28(2), 108–118. <https://doi.org/10.1080/09537104.2016.1257786>
- Zhang, M., Yu, W., Niibe, K., Zhang, W., Egusa, H., Tang, T., & Jiang, X. (2018). The effects of platelet-derived growth factor-BB on bone marrow stromal cell-mediated vascularized bone regeneration. *Stem Cells International*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/3272098>
- Zumarán, C. C., Parra, M. V., Olate, S. A., Fernández, E. G., Muñoz, F. T., & Haidar, Z. S. (2018). The 3 R's for platelet-rich fibrin: A “super” tri-dimensional biomaterial for contemporary naturally-guided oro-maxillo-facial soft and hard tissue repair, reconstruction and regeneration. *Materials*, 11(8). <https://doi.org/10.3390/ma11081293>

