

FIBRINA RICA EM PLAQUETAS E LEUCÓCITOS VERSUS PLASMA RICO EM PLAQUETAS: PROPRIEDADES E APLICAÇÃO CLÍNICA

LEUKOCYTE AND PLATELET-RICH FIBRIN VERSUS PLATELET RICH PLASMA: PROPERTIES AND CLINICAL APPLICATION

Raquel Camargo de Abreu Sant`Anna¹

Resumo

As plaquetas são os principais elementos envolvidos no processo de cicatrização. Seus grânulos possuem fatores de crescimento que iniciam e sustentam a cicatrização. A fibrina rica em plaquetas e leucócitos (L-PRF) é uma matriz de fibrina que contém leucócitos e plaquetas. É obtida através de sangue recém colhido e centrifugado, sem aditivos químicos e representa uma nova geração de concentrados plaquetários. O Plasma Rico em Plaquetas (PRP) é um concentrado plaquetário obtido através da centrifugação de sangue não coagulado, onde é adicionado anticoagulante e depois ocorre a centrifugação. Este estudo teve como objetivo elucidar as diferenças entre o L-PRF e o PRP e buscar evidências para as diferentes indicações clínicas do uso do L-PRF através de uma revisão da literatura. Concluiu-se que, os concentrados PRP e L-PRF são produtos completamente distintos. O PRP libera os fatores de crescimento massivamente nas primeiras horas e é rapidamente dissolvido do sítio. O L-PRF pode ser uma ótima ferramenta de auxílio na cicatrização de feridas cirúrgicas, promovendo proteção e regulando a resposta inflamatória.

Palavras-chave: L-PRF. Plasma Rico em Plaquetas. Fibrina. Plaquetas. Regeneração Óssea.

Abstract

Platelets are the main elements involved in wound healing. After coagulation, platelets granules release growth factors that initiate and support healing. Leukocyte and platelet –rich fibrin (L-PRF) is a fibrin matrix that contains leukocytes and platelets. It is obtained from recent collected blood, with no biochemical blood handling, and represents a new generation of platelet concentrates, with a simplified processing. The Platelet Rich Plasma (PRP) is a platelet concentrate obtained poscentrifugation of blood with anticoagulant. The aim of this study was to clarify some differences between L-PRF fibrin mash and PRP and find scientific evidences to support L-PRF's different clinical indications, through a study review. Finally, both platelet concentrates are completely different. PRP releases growth factors massively in the first hours and it is quickly dissolved from the site. L-PRF can be an excellent tool improving wound healing, promoting protection and modulating inflammatory response.

Keywords: L-PRF. Platelet Rich Plasma. Fibrin. Platelets. Bone Regeneration.

¹ Capitão-Tenente (Cirurgião-dentista) - Especialista em Implantodontia, Clínica de Periodontia, Odontoclínica Central da Marinha, Rio de Janeiro, Brasil

Recebido em 22/05/2018

Aprovado em 21/08/2018

Introdução

A Odontologia reconstrutiva atual tem como um dos grandes desafios o desenvolvimento de aditivos cirúrgicos bioativos que auxiliem a regulação da inflamação e aumentem a velocidade do processo de cicatrização, de forma a aumentar a previsibilidade das técnicas cirúrgicas e dos enxertos utilizados. A Fibrina Rica em Plaquetas e Leucócitos (L-PRF) nos permite obter uma malha de fibrina enriquecida com fatores de crescimento, de um sangue não coagulado, sem nenhum artifício biomecânico ou químico, formando uma matriz que favorece a cicatrização acelerando a regeneração dos tecidos moles e duros (1). O objetivo deste trabalho é esclarecer as diferenças entre o L-PRF e o Plasma Rico em Plaquetas (PRP) e buscar evidências científicas para as diferentes indicações clínicas do uso do L-PRF.

Revisão de literatura

Foram utilizados como estratégia de busca recursos informacionais, como base de dados eletrônicas (LILACS), o portal *PubMed*, que engloba o *Medline* e duas bibliotecas digitais (Banco de Teses da CAPES e SciELO). As palavras chaves (português/ inglês) utilizadas em combinação foram: L-PRF; Fibrina; Regeneração Tecidual; Cicatrização.

Plaquetas

As plaquetas desempenham um papel decisivo na localização e formação do coágulo de fibrina, aderindo-se ao local lesado do vaso e liberando o conteúdo de seus grânulos α . Há dois tipos de grânulos, os grânulos α e os grânulos densos. Estes secretam adenosina difosfato (ADP), adenosina trifosfato (ATP), serotonina, cálcio, pirofosfato, P-selectina, fator de transformação do crescimento, catecolaminas e guanosina di e tri fosfato. Os grânulos ainda secretam proteínas com funções diversas, como o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), fator de transformação do crescimento (TGF) e fator de crescimento de célula endotelial (ECGF), responsáveis por estimular a cicatrização das feridas. Também produzem proteínas como fibrinogênio, fibronectina, vitronectina, fator V, fator plaquetário 4 (PF-4), β -tromboglobulina (β -TG), inibidor do ativador do plasminogênio (PAI-1), inibidor de plasmina e α 2-macroglobulina (2).

A fibrina é a fórmula ativa de uma molécula plasmática chamada fibrinogênio. O fibrinogênio é encontrado massivamente no plasma e tem papel determinante na agregação plaquetária durante a hemostasia. É o produto final da cascata de coagulação. Sendo uma proteína solúvel, transforma-se em fibrina insolúvel pela ação da trombina. A polimerização do gel de fibrina constitui a primeira matriz cicatricial (3). O adesivo de fibrina reproduz o último estágio da cascata de coagulação, durante a qual o fibrinogênio é convertido em fibrina na presença de trombina, fator XIII, fibronectina e íons de cálcio. São eficientes no controle de sangramentos, entretanto, estes adesivos não garantem a hemostasia na hemorragia vascular severa e não devem substituir as técnicas cirúrgicas aceitas (4).

As pesquisas voltaram-se para os meios de se utilizar os fatores de crescimento a fim de aprimorar a cicatrização das feridas. Compostos por um grupo de polipeptídeos, os fatores de crescimento formam um grupo de mediadores biológicos que exercem papel essencial na estimulação e regulação dos processos de reparo dos tecidos, como mitogênese, quimiotaxia, diferenciação e síntese de matriz, importantes no processo de osteogênese (5). Observou-se que a aplicação dos fatores de crescimento na formação do tecido ósseo ampliou ou acelerou o processo de regeneração óssea normal (6).

Dentre os fatores de crescimento e diferenciação encontrados no osso, no cimento e nos tecidos de feridas em cicatrização, há o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), o fator de transformação do crescimento Beta (TGF-Beta), o fator de crescimento de fibroblatos (FGF), o fator de crescimento semelhante a insulina (IGF) e as proteínas ósseas morfogenéticas (BMP) (7).

O PRP é a primeira geração de gel de plaquetas utilizado para estimular a regeneração tecidual. Por conter grande número de plaquetas, é um material com alta concentração de fatores de crescimento (8). Sua concentração de plaquetas é 4 a 7 maior que o usual no sangue. Um coágulo normal encontrado numa ferida em estágio inicial de cicatrização é composto por 94% de células vermelhas, 5% de plaquetas e 1% de células brancas, enquanto o PRP é composto por 94% de plaquetas, apenas 5% de células vermelhas e 1% de células brancas. Desta forma, células que não contribuem para a cicatrização (células vermelhas) são substituídas

por células que estimulam todas as fases da regeneração tecidual, o que explica a capacidade deste material em promover a cicatrização dos tecidos (9). O PRP é um concentrado obtido após lenta centrifugação de sangue adicionado de citrato de sódio e trombina como anticoagulantes. Ocorre sedimentação das hemácias e leucócitos, sendo que plaquetas ficam em suspensão no plasma. As plaquetas ficam concentradas em grande número, em condições de liberar os fatores de crescimento, em um pequeno volume de plasma (10). A produção do PRP requer a utilização de anticoagulante, o que torna a matriz de fibrina mais frágil, além de levar 1 hora de centrifugação, ao contrário do L-PRF cuja produção deve ser feita sem adição de anticoagulante, tornando a matriz mais forte e flexível (11). Não foram observados benefícios nem se comprovou a eficácia do PRP devido à carência de estudos randomizados com metodologias adequadas (12).

Comparando-se a eficácia do PRP e L-PRF na apicogênese e indução de regeneração pulpar, ambos induziram apicogênese, porém apenas nos dentes tratados com L-PRF houve formação de ponte de dentina (13).

A formação da matriz de fibrina durante a ativação do concentrado plaquetário e a concentração de leucócitos são parâmetros chaves na liberação dos fatores e apresentam um forte impacto biológico na equação da cicatrização. A literatura existente quanto à liberação de fatores de crescimento plaquetário no PRP mostra resultados contraditórios e não é muito relevante por falta de controle destes parâmetros, além da contagem de plaquetas (14). Também é possível que os dados relatados não utilizavam a escala correta, utilizando a unidade nanograma/ml para TGF e PDGF, quando a concentração normal para esses fatores não ativados deveria ser em picogramas/ml (15). Havia, também, uma variedade de terminologias e classificações levando a uma confusão entre os produtos avaliados, além de inadequadas metodologias de análise. A maior parte dos produtos testados não foram completamente caracterizados, e dados importantes, como concentração de leucócitos e arquitetura da matriz de fibrina, não foram estudados (16).

Obtenção da membrana de Fibrina Rica em Plaquetas e Leucócitos

O L-PRF, desenvolvido por Choukron *et al.*, na França, em 2001, representa uma segunda geração de concentrados plaquetários, definido como um biomaterial autólogo composto de uma matriz de fibrina rica em plaquetas e leucócitos, gerado para simplificar a preparação sem uso de aditivos bioquímicos. As citocinas presentes nas plaquetas e leucócitos têm um importante papel na biologia deste biomaterial. A arquitetura da malha de fibrina que o sustenta é um elemento determinante responsável pelo real potencial terapêutico. Citocinas são rapidamente usadas e metabolizadas em um tecido em cicatrização. Uma malha de fibrina fisiológica, como o L-PRF, terá efeitos muito distintos daqueles encontrados na cola de fibrina enriquecida com citocinas, como o PRP, que tem efeito massivo, sem controle e apenas temporário (17).

O protocolo de obtenção do L-PRF é simples: uma amostra de 10 ml de sangue é coletada em tubo de vidro sem anticoagulante e deve ser imediatamente centrifugada em uma rotação de 3000 rpm (aproximadamente 400 g de acordo com o cálculo) por 10 minutos. A ausência de anticoagulante implica na ativação em poucos minutos da maior parte das plaquetas presentes na amostra. Essas plaquetas estarão em contato com as paredes do tubo e desencadearão a cascata de coagulação. Um processo natural de coagulação ocorre e o coágulo de fibrina será obtido no meio do tubo, entre o corpúsculo de base vermelha (RCB) e o plasma acelular no topo do tubo. As plaquetas ficam massivamente presas na matriz de fibrina (18).

Alguns parâmetros devem ser respeitados para que se obter o L-PRF, como o protocolo de centrifugação, o tamanho da centrífuga e o tipo de centrifugação. Qualquer alteração no protocolo leva a obtenção de um material biológico distinto. A vibração da centrífuga provoca danos às células sanguíneas presentes no tubo (19). O sucesso desta técnica depende inteiramente da velocidade de coleta do sangue e da transferência deste para a centrífuga. Se este processo não for realizado imediatamente, poderá ocorrer falha na obtenção da membrana (3).

A caixa de PRF (PRF Box®) foi desenvolvida para produzir membranas na mesma espessura, manter a membrana hidratada por algumas horas e recolher o soro que sai da membrana, rico em vitronectina e fibronectina. Este soro pode ser usado para hidratar materiais de enxerto, molhar o

sítio cirúrgico ou para preservar material autólogo (20).

A matriz de fibrina pode ser arquitetada em duas formas diferentes: com junções tetramoleculares condensadas (bilaterais) ou trimoleculares conectadas (equilaterais). Junções bilaterais são provocadas por uma ativação e polimerização drásticas, por exemplo, em altas concentrações de trombina, que favorece a formação de uma malha rica em monofibras, similares às de uma cola de fibrina, que não é particularmente favorável ao enredamento das citocinas e migração das células. Um processo de polimerização fisiologicamente lento favorece uma maior concentração de junções equilaterais, permitindo a obtenção de uma matriz flexível, com multifibras capazes de suportar o enredamento da citocinas e a migração celular (21).

Quando pressionado entre duas gazes, o L-PRF se torna uma forte membrana que pode ser utilizada para regeneração óssea guiada, em cirurgia oral e maxilofacial, periodontia, implantodontia, otorrinolaringologia e cirurgia plástica (14).

A demonstração do impacto da arquitetura do coágulo e da presença de leucócitos no mecanismo biológico do L-PRF é um passo importante para ampliar as perspectivas de utilização do material. A presença de leucócitos tem forte impacto por suas propriedades imunológicas e antibacterianas, defendendo o sítio cirúrgico de infecções e regulando a cicatrização (22).

Mecanismo Biológico

O L-PRF vai atuar em quatro fases fundamentais no processo de reparação: angiogênese, controle imunológico, liberação de fatores de crescimento e células mesenquimais indiferenciadas, além de servir como cobertura e arcabouço para migração epitelial (23). A degranulação das plaquetas ativadas leva à liberação de citocinas capazes de estimular a migração e proliferação celular para o interior da malha de fibrina nos primeiros estágios da cicatrização (24). O perfil de liberação das três principais citocinas (PDGF, TGF, e IGF) nas diferentes partes do tubo coletado de L-PRF foi avaliado, e comparados com os de um tubo de PRP. Foi concluído que não houve diferença significativa entre as concentrações de citocinas medidas no plasma pobre em plaquetas (PPP) sobrenadante e no coágulo de L-PRF. Os autores consideraram que, no coágulo de L-PRF,

os leucócitos permanecem presos nos polímeros da malha de fibrina e secretam as citocinas apenas após o início do processo de remodelação da matriz (efeito a longo prazo), sendo estimuladas a iniciar a reconstrução da ferida (24).

O papel dos leucócitos presentes no L-PRF foi investigado através da análise de cinco mediadores IL-1 β , IL-6, IL-4, TNF- α e VEGF. A principal atividade da IL-1 β é a ativação dos linfócitos T *Helper*. TNF- α ativa os monócitos e estimula a capacidade de remodelação dos fibroblastos, além de modular a atividade dos fatores chave como as IL-1 e IL-6 (16). Os leucócitos produzem grande quantidade de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), uma citocina muito potente, com ação direta no controle do comportamento endotelial das células como proliferação, migração, especialização, angiogênese e sobrevivência (18). Demonstrou-se que o número de leucócitos encontrado no coágulo de L-PRF foi significativamente maior que o do plasma. Sugere-se que a lenta ativação do sangue para gerar o L-PRF pode induzir o aumento da degranulação dos leucócitos, estimulando os mecanismos de defesa e favorecendo a defesa contra infecções pelas propriedades quimiotáticas das citocinas liberadas (18).

A arquitetura do coágulo de L-PRF foi analisada a fim de avaliar a concentração e distribuição de plaquetas e leucócitos na malha. Estes ficaram concentrados em uma parte intermediária do coágulo, entre a região RCR (*Red Corpuscule Residue*) e o coágulo de fibrina. Sugere-se que esta região deve permanecer intacta para que se colete a maior parte de plaquetas e leucócitos possíveis. A composição celular deste biomaterial mostra que se trata de um tecido vivo, que deve ser manipulado com cautela para que seus componentes celulares permaneçam estáveis (17).

Comparou-se a liberação de fatores de crescimento (TGF β , PDGF, VEGF) e proteínas de matriz (trombospondina-1, fibronectina e vitronectina) nos preparados de L-PRF e PRP. A liberação dos fatores de crescimento, promotores de imunidade e cicatrização, e proteínas de matriz, foi superior nas membranas de L-PRF, que pareciam intactas após 7 dias, enquanto as membranas de PRP estavam completamente dissolvidas em 5 dias. Os padrões de liberação de proteínas encontrados foram muito distintos entre as membranas de PRP e L-PRF. A membrana de L-PRF liberou lentamente

grandes quantidades de TGF β , PDGF, VEGF, trombosporina-I e fibronectina, por pelo menos 7 dias. No PRP as moléculas não estão envoltas em uma malha, pois a polimerização da fibrina é incompleta, sendo liberadas massivamente após a primeira hora de produção. Além disso, não contém leucócitos e não têm como sustentar a produção de novos fatores de crescimento (14, 26).

Mesmo que ambos os produtos sejam concentrados plaquetários, suas estruturas intrínsecas, a biologia e cinética molecular são completamente opostas. No PRP a liberação mais forte ocorre nas primeiras 4 horas. O L-PRF libera fatores de crescimento e proteínas de adesão durante um período mais longo (7 a 14 dias) e apresenta uma forte arquitetura de fibrinas (14).

Fibrina, fibronectina, PDGF e TGF β são essenciais para modular a proliferação de fibroblastos e sua migração para o interior do coágulo. Esta migração é ótima quando há um número máximo de conexões equilaterais na matriz de fibrina. Este fato representa uma das principais diferenças do PRP e L-PRF (23).

O L-PRF foi utilizado como único material de preenchimento em procedimentos de levantamento de seio maxilar com instalação de implantes simultâneos. Seis meses após a cirurgia, todos os implantes estavam clinicamente estáveis. Nenhum implante foi perdido em *follow up* de 6 anos e o ganho de osso vertical foi substancial, entre 8,5 e 12 mm (27).

Investigou-se o potencial da membrana de L-PRF associada ao osso bovino desproteínizado em cirurgia de levantamento de seio. Concluiu-se que o uso do L-PRF reduziu significativamente o tempo de cicatrização (28). A membrana também tem se mostrado eficiente na proteção da membrana sinusal, podendo ser utilizada para fechar perfurações. Pode ser útil na proteção da janela de acesso ao seio maxilar, evitando migração do tecido mole, seguindo o conceito de regeneração óssea guiada e isolando a cavidade do seio para a formação de novo osso, substituindo, assim, as tradicionais membranas reabsorvíveis de colágeno (29).

Uma revisão sistemática da literatura avaliou o potencial regenerativo do L-PRF em 3 situações: em cirurgia para elevação do assoalho do seio maxilar, para preservação da espessura do osso alveolar e na terapia com implantes. Na elevação do soalho do seio a aplicação do L-PRF acelerou a

cicatrização e formação de osso maduro. Promoveu preservação da espessura do osso alveolar após exodontia e promoveu maior estabilidade dos implantes, com valores maiores e crescentes do coeficiente de estabilidade (30).

Os efeitos do L-PRF sobre as células mesenquimais indiferenciadas presentes no osso (BMSC) também foram analisados. A membrana aumentou significativamente a proliferação e diferenciação das BMSC, num efeito dose dependente. O meio de cultura sem L-PRF não atingiu o grau de diferenciação dos meios de cultura com a membrana. Análises com microscopia eletrônica de varredura revelaram nódulos de mineralização mais numerosos e melhor estruturados nos grupos tratados com L-PRF (31). O L-PRF aumenta a proliferação de diferentes tipos celulares como fibroblastos, osteoblastos, adipócitos e queratinócitos, além de estimular a diferenciação osteoblástica (25). Aumenta também a adesão celular e proliferação dos osteoblastos, facilitando a formação da matriz extracelular de colágeno. A fibrina promove benefícios diretos para o processo de reparação óssea (32).

O uso da membrana de L-PRF mostrou efeito positivos no tratamento de recessões gengivais. Tem sido considerada uma alternativa de baixo custo, de fácil aquisição e que não requer a remoção de tecido doador (33). O L-PRF oferece uma redução de custos em relação aos biomateriais xenógenos e uma independência relativa a fatores comerciais (28).

A membrana de L-PRF funciona como um verdadeiro tecido fibroso apresentando um módulo de elasticidade comparável à do tecido arterial, e representa cerca de 50% da rigidez da pele humana intacta. Na prática clínica, o alto módulo de elasticidade da L-PRF confere flexibilidade significativa e adaptabilidade, podendo ser facilmente suturada (14). Este material pode ser considerado como enxerto de tecido vivo (34).

O insumo chave das tecnologias de concentrados plaquetários não deve ser a quantidade de plaquetas, mas plaquetas, leucócitos, fibrina e fatores de crescimento interligados no produto final. A abordagem apenas quantitativa não é suficiente para definir os mecanismos biológicos envolvidos: a arquitetura tridimensional específica da malha de fibrina e as plaquetas e leucócitos presos dentro do emaranhado de fibrinas são extremamente importante para a obtenção dos resultados (17).

Conclusão

O PRP e L-PRF são materiais distintos. A matriz de L-PRF é mais forte e flexível com propriedades biológicas superiores às do PRP. É indicada para cirurgias de levantamento de seio maxilar, reconstruções ósseas com mais previsibilidade, recobrimentos radiculares, entre outros, apresentando um uso clínico promissor.

A autora declara que não há conflito de interesse ou a revelação clara de quaisquer interesses econômicos ou de natureza que poderiam causar constrangimento se conhecidos depois da publicação do artigo.

Autora de correspondência: Raquel Camargo de Abreu Sant'Anna, Odontoclínica Central da Marinha, Primeiro Distrito Naval, Praça Barão de Ladário, I, Centro, CEP: 20091-000 Email: camargoabreu@hotmail.com

Referências bibliográficas

- 1 - Choukron J, et al. Unn opportunitéén paro implantologie: Le PRF. *Implantodontie*. 2001; 42:55-62.
- 2 - Zago MA, Falcão RP, Pasquini R. *Hematologia: Fundamentos e Prática*. 1.ed. São Paulo: Atheneu, 2001.
- 3 - Dohan DMD, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part I: Technological concepts and evolution *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006; 101: E37-44.
- 4 - Gibbe JW, Ness PM. Fibrin Glue: The perfect operative Sealant? *Transfusion*. 1990; 30 (8): 741-747.
- 5 - Misch CE. *Implantes dentários contemporâneos*. Santos: Ed São Paulo. 2006.
- 6 - Garg AK. Emprego do PRP nos enxertos ósseos em implantes dentários e periodontia In: Garg AK, *Prática da Implantodontia*. São Paulo: Ed Premier, 2003.
- 7 - Mugalra GM. Efectos de los factores de crecimiento sobre el hueso: sus implicâncias para la Implantologia. *Rev Soc Odontol*. 1999; (12):6-14.
- 8 - Nikolidakis D, Jansen JA. The biology of platelet-rich plasma and its application in oral surgery: literature review. *Tissue Eng Part B Rev*. 2008; 14(3):249–258.
- 9 - Marx RE, Garg AK. Dental and Craniofacial applications of platelet-Rich Plasma. United Kingdon: Ed. Quintessence. 2005; (1).
- 10 - Dusse LMS, et al. Platelet – Rich Plasma and its application in Dentistry. 2008; 40(3):193-197.
- 11 - Ehrenfest DMD, Rasmusson L. and Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to Leukocyte and platelet rich fibrin (L-PRF) *Trends Biotechnol*. 2009; 27: 158-167.
- 12 - Del Fabbro M, Bortolin M, Taschieri S. Is autologous platelet concentrate beneficial for post-extraction socket healing? A systematic review. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2011; 40(9):891-900.
- 13 - Jaya Prasad, Ida de Noronha de Ataíde, Paul Chalakkal and Lalit Kumar Likhyan. Comparison between the Outcomes of Two Platelet-Rich Concentrates on Apexogenesis in Young Permanent Incisors Requiring Endodontic Retreatment, *Contemp Clin Dent*. 2018; 9(Suppl 1): S156–S159.
- 14 - Ehrenfest DMD, et al. Do the Fibrin Architecture and leucocyte content influence the growth fator release of platelet concentrates? An evidence based answer comparing a pure platelet –rich plasma(P-PRP) Gel and a leucocyte and platelet-rich fibrina(L_PRF). *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2012; 13:1145-1152.
- 15 - Leitner GC, et al. Platelet content and growth factor release in platelet-rich plasma: a comparison of four different systems. *Vox Sang*. 2006; 91(2): 135-139.
- 16 - Dohan DMD, Choukroun J. PRP, cPRP, PRF, PRG, PRGF, FC ...How to find your way in the jungle of platelet concentrates? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007; 103(3):305-306.
- 17 - Ehrenfest DMD, et al. Three-Dimensional Architecture and Cell Composition of a Choukroun's Platelet-Rich Fibrin Clot and Membrane. *J Perio Res*. 2010; 81:546-555.
- 18 - Dohan DMD, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part III: Leucocyte activation: A new feature for platelet concentrates? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006; 101: E51-5.
- 19 - Ehrenfest DMD, et al, 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*. 2017; doi 10.1080/09537104.2017.1293812.
- 20 - Toffler M, et al. Continuing Education Introducing Choukroun's Platelet Rich, Fibrin (PRF) to the reconstructive, surgery milieu. *J Implant Advanced Clin Dent*. 2009; 1(6): 21-32.
- 21 - Van Hinsbergh VV, et al. Role of fibrin matrix in angiogenesis. *Ann NY Acad Sci*. 2001; 936: 426-437.
- 22 - Bielecki T, Dohan Ehrenfest DM, Everts PA, Wiczowski A. The Role of Leukocytes from L-PRP/L-PRF in Wound Healing and Immune Defense: New Perspectives. *Curr Pharma Biotechnol*. 2012; doi 1153-116211531873-4316/12.
- 23 - Choukron J, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part IV: Clinical effects on tissue healing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006; 101:E56-60.
- 24 - Dohan DMD, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part II: Platelet-related biologic features. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006; 101: E45-50.

- 25 - Wether K, et al. Determination of vascular endothelial growth factor (VEGF) in circulation blood.: significance of VEGF in various leucocytes and platelets. *Scand. J Clin Lab Invest.* 2002; 62: 343-350.
- 26 - Ehrenfest DMD, et al. Slow release of growth factors and thrombospondin-1 in Choukroun's platelet-rich fibrina (PRF) a gold standard to achieve for all surgical platelet concentrates technologies, *Growth factors.* 2009; 27 (1):63-69.
- 27 - Simonpierre A, et al. Simultaneous sinus-lift and implantation and leukocyte- and platelet fibrin as sole grafting material: A six year experience. *Implant Dent.* 2011; 20 (1): 2-12.
- 28 - Tatullo M, et al. Platelet Rich Fibrin (PR.F) in Reconstructive surgery of atrophied maxillary bones: clinical and histological evaluations. *Ont J Med Sci.* 2012; 9:872-880.
- 29 - Costa AL, et al. Levantamento de seio maxilar com instalação simultânea de implante utilizando Fibrina Rica em Plaquetas e Leucócitos como único biomaterial: avaliação tomográfica do ganho ósseo após seis meses. *ImplantNews.* 2014; 11(2): 213-222.
- 30 - Castro AB, Meschi N, Temmerman A, Pinto N, Lambrechts P, Teughels W, Quirynen M. Regenerative potential of leukocyte- and platelet-rich fibrin. Part B: sinus floor elevation, alveolar ridge preservation, and implant therapy. A systematic review. *J Clin Periodontol.* 2017; doi: 10.1111/jcpe.12658/2017.
- 31 - Ehrenfest DMD, et al. Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF) stimulates in vitro proliferation and differentiation of human oral bone mesenchymal stem cell in a dose-dependent way. *Arch Oral Biol.* 2010, 55: 185 – 194.
- 32 - Wu CL, et al. Platelet-rich fibrin increases cell attachment, proliferation and collagen-related protein expression of human osteoblasts. *Aust Dent J.* 2012; 57:207-12.
- 33 - Moraschini V, Barboza Edos S. Use of Platelet-Rich Fibrin Membrane in the Treatment of Gingival Recession: A Systematic Review and Meta-Analysis *J Periodontol.* 2016; 87(3):281-290.
- 34 - Castro AB, Meschi N, Temmerman A, Pinto N, Lambrechts P, Teughels W, Quirynen M. Regenerative potential of leukocyte- and platelet-rich fibrin. Part A :intra-bony defects, furcation defects and periodontal plastic surgery. A systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol.* 2016; doi 10.1111/jcpe.2016