

O efeito sinérgico da fibrina rica em plaquetas (PRF) e enxertos utilizados no reparo ósseo

The synergistic effect of platelet-rich fibrin (PRF) and bone substitutes

Miguel Noronha Oliveira^{1*} , Dachamir Hotza² , Bruno Henriques^{3,4} , Filipe Samuel Silva³ , João Caramês⁵ , Júlio C. M. Souza^{3,6} 

¹Centro de Ensino e Pesquisa em Implantes Dentários (CEPID), Programa de Pós-graduação em Odontologia (PPGO), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, Brasil;

²Departamento de Engenharia Química e de Engenharia de Alimentos (EQA), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, Brasil;

³Departamento de Eletrônica Industrial (CEMS-UMinho), Universidade do Minho, Guimarães, Portugal;

⁴Programa de Pós-graduação em Engenharia Mecânica, Departamento de Engenharia Mecânica (EMC), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, Brasil;

⁵Faculdade de Medicina Dentária, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal;

⁶Departamento de Ciências Dentárias, CESPU – Cooperativa de Ensino Superior Politécnico Universitário, Gandra, Portugal.

*Autor correspondente/Corresponding author: jsouza@dem.uminho.pt

Recebido/Received: 09-01-2021; Revisto/Revised: 30-09-2021; Aceite/Accepted: 12-10-2021

Resumo

O objetivo do presente trabalho foi realizar uma revisão narrativa sobre o efeito sinérgico da combinação do PRF com enxertos ósseos. A literatura científica existente relata que a adição de fibrina rica em plaquetas (PRF) enxertos ósseos acelerou a formação óssea em defeitos de menores dimensões. A literatura não é consensual no que se refere a defeitos de maiores dimensões. A adição de PRF permite a utilização de uma menor quantidade de enxertos particulados, reduzindo, deste modo, os custos de tratamento. No entanto, são necessários mais estudos clínicos randomizados que validem estes resultados.

Palavras-chave: biomateriais, cerâmicos, fibrina, reparo ósseo.

Abstract

The purpose of this study was to perform a narrative review on the synergistic effect of the combination of PRF and bone grafts. The literature data reports that the mixture of PRF to bone substitutes accelerates bone formation in small bone defects. There is no consensus in the literature regarding the effects on larger bone defects. The addition of PRF allows the use of a low amount of particulate grafts, thus reducing treatment costs. However, more randomized clinical studies are needed to validate these results.

Keywords: biomaterials, bone repair, ceramic, fibrin.

1. INTRODUÇÃO

A remodelação óssea resultante de uma extração dentária leva a uma perda de volume que pode afetar negativamente a reabilitação oral (Grunder *et al.*, 2005). Diferentes tipos de enxertos ósseos podem ser utilizados para compensar a perda óssea. Estes enxertos podem ser divididos, de acordo com a sua origem, em autógenos, xenógenos, e sintéticos ou aloplásticos. Os enxertos autógenos são considerados como a primeira opção em procedimentos de reparo ósseo. Apesar disso, os enxertos autógenos apresentam algumas desvantagens como o volume obtido, a morbilidade e complicações cirúrgicas (Araújo *et al.*, 2011). Quando se deseja obter uma estabilidade de volume maior, a escolha passa por substitutos ósseos que possuam uma taxa lenta de absorção como os xenógenos ou cerâmicos (Jung *et al.*, 2013; Brogini *et al.*, 2015; Araújo *et al.*, 2015). No entanto, estes são desprovidos de propriedades osteogénicas e osteoindutoras, essenciais ao processo de formação óssea.

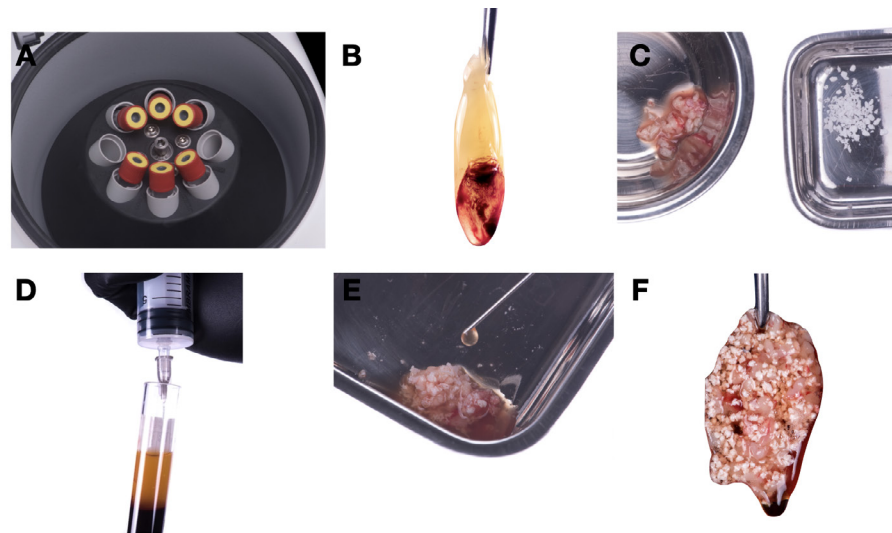
1. INTRODUCTION

Bone remodelling resulting from tooth extraction leads to volume loss that can negatively affect oral rehabilitation (Grunder *et al.*, 2005). Different types of bone grafts can be used to accelerate the bone healing. These grafts can be divided, according to their origin, into autogenous, xenogenous, synthetic or alloplastic grafts. Autogenous grafts are considered the first option in bone healing procedures. However, autogenous grafts have disadvantages, such as volume obtained, morbidity and surgical complications (Araújo *et al.*, 2011). When higher volume stability is desired, bone substitutes with a slow rate absorption are selected, such as xenogenous or ceramic grafts (Jung *et al.*, 2013; Brogini *et al.*, 2015; Araújo *et al.*, 2015). However, xenogeneic or ceramic grafts do not provide osteogenic and osteoinductive properties, which are essential to the bone formation process.

Platelet concentrates have emerged in the last 20 years as a potential regenerative material that can be used alone or mixed with other biomaterials (Castro *et al.*, 2017a; Castro *et al.*, 2017b). Platelet rich fibrin concentrates are blood extracts harvested

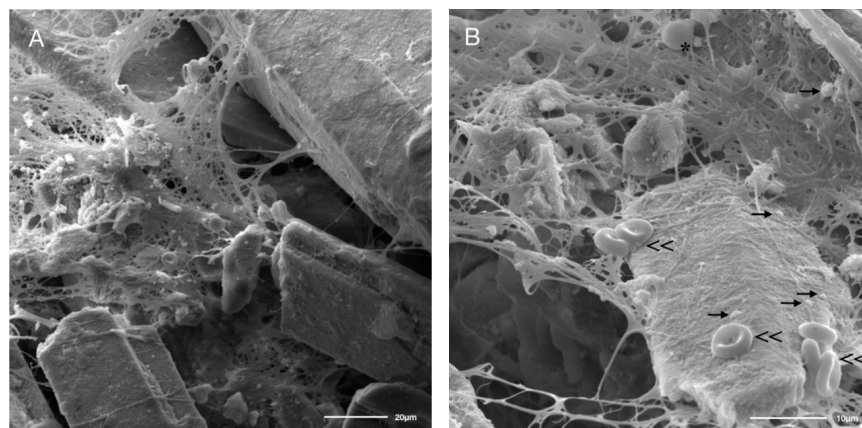
Os concentrados plaquetários emergiram nos últimos 20 anos como um potencial material regenerativo, podendo ser utilizados isoladamente ou misturados com outros biomateriais (Castro *et al.*, 2017a; Castro *et al.*, 2017b). Os concentrados plaquetários são extratos sanguíneos, obtidos após processamento de amostras de sangue total através de centrifugação (Dohan *et al.*, 2006). Têm-se desenvolvido diferentes técnicas e, com isso, diversos protocolos são usados atualmente para reparo tecidual, assim como ilustrado na Figura 1. A presente revisão de literatura aborda aspectos clínicos e evidências científicas sobre a combinação da fibrina rica em plaquetas (PRF) com materiais bioativos particulados para acelerar o reparo ósseo.

from blood processing through centrifugation as shown in Figure 1 (Dohan *et al.*, 2006). Different techniques have been developed, resulting in several protocols for tissue healing. Thus, the present review reports clinical aspects and scientific evidence on the combination of platelet rich fibrin (PRF) and particulate biomaterials for bone healing.



Figura/Figure 1: Preparação clínica do bloco de PRF (A) Processo de centrifugação. (B) Colheita do coágulo de L-PRF. (C) Mistura das membranas fragmentadas com o substituto ósseo num prato de titânio. (D) Colheita do PRF fluido. (E) O PRF fluido é adicionado a mistura, coagulando após alguns segundos e encapsulando as partículas do enxerto, o que leva à formação de um bloco compacto. (F) O bloco de PRF está pronto a ser utilizado no defeito ósseo.

Clinical preparation of the PRF block. (A) Centrifugation process. (B) L-PRF clot collection. (C) Mixing the fragmented membranes with the bone substitute in a titanium dish. (D) Collection of flowable PRF. (E) Fluid PRF is sprayed onto the mixture, coagulating after a few seconds and encapsulating the graft particles, which leads to the formation of a compact block. (F) The PRF block is ready to be used on the bone defect.



Figura/Figure 2: Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) mostrando a morfologia de um bloco de PRF composto por uma hidroxiapatite sintética. (A) É possível observar uma matriz densa de fibrina contendo no seu interior partículas de enxerto e células sanguíneas. (2,000x ampliação original) (B) Filamentos de fibrina e células sanguíneas a cobrir a superfície de partículas de enxerto. (5,000x ampliação original) (* - leucócitos; << - glóbulos vermelhos; -> - plaquetas).

Scanning electron microscopy (SEM) images showing the morphology of a PRF block composed of synthetic hydroxyapatite. (A) Dense fibrin matrix containing graft particles and blood cells (2,000x original magnification). (B) Fibrin filaments and blood cells covering the surface of graft particles (5,000x original magnification) (* - leukocytes; << - red blood cells; -> - platelets).

2. FIBRINA RICA EM PLAQUETAS

O PRF pertence à 2ª geração de concentrados plaquetários, sendo introduzido em 2001, de forma a ultrapassar as dificuldades na preparação e os resultados imprevisíveis obtidos com as formulações do Plasma rico em plaquetas (PRP) e Plasma rico em fatores de crescimento (PRGF) (Choukroun *et al.*, 2001).

A fibrina rica em plaquetas (PRF) é um enxerto, obtido de uma forma simples e natural, a partir do sangue colhido, que é centrifugado sem a adição de anticoagulantes. O coágulo de fibrina rico em plaquetas é formado por um processo natural de polimerização por reticulação durante a centrifugação do sangue, na presença de uma quantidade fisiológica de fibrinogênio e trombina (Dohan *et al.*, 2006). Trata-se de uma matriz de fibrina rica em plaquetas, leucócitos, fatores de crescimento, citocinas e células estaminais, que mostrou acelerar a cicatrização tecidual em diferentes aplicações como tratamento de defeitos periodontais, preservação alveolar e elevação de seio maxilar (Castro *et al.*, 2017a; Castro *et al.*, 2017b). O PRF oferece um comportamento mecânico adequado e elasticidade devido à formação de uma rede tridimensional de fibrina. Esta rede densa de fibrina é composta de fibras nanométricas que podem agir como um arcabouço para a proliferação celular, migração, diferenciação e entrega de fatores de crescimento, levando a um aumento da neoangiogênese (Del Corso *et al.*, 2013; Simonpieri *et al.*, 2009).

O PRF é completamente absorvido durante a cicatrização tecidual. Sendo assim, em defeitos ósseos de maiores dimensões, preconiza-se a mistura do PRF com outros substitutos ósseos de lenta absorção, que permitam a criação de um arcabouço ideal à formação óssea no defeito.

Após a centrifugação do sangue são obtidas 3 camadas: glóbulos vermelhos na camada mais inferior do tubo de colheita; uma camada superior composta de plasma pobre em plaquetas; e uma camada intermédia, designada de *buffy coat*, na qual se encontram concentrados a maioria das plaquetas e leucócitos. Este *buffy coat* é constituído por uma rede densa de fibrina. A reticulação destas fibras de fibrina estabiliza mecanicamente a arquitetura do arcabouço de PRF, sendo que essa nanoestrutura complexa de fibrina mostra um comportamento biológico e mecânico extraordinariamente elástico (Mosesson *et al.*, 2006; Guthold *et al.*, 2007).

O coágulo de PRF contém a maioria das plaquetas (cerca de 95%) e cerca de metade dos leucócitos contidos na amostra de sangue inicial colhida (Castro *et al.*, 2017a). No interior deste coágulo de fibrina estão também diversos fatores de crescimento, que são responsáveis por estimular funções biológicas como quimiotaxia, angiogênese, proliferação celular e diferenciação de células osteogênicas (Choukroun *et al.*, 2001; Dohan Ehrenfest *et al.*, 2009). Destes, podem-se destacar o fator de crescimento transformante beta-1 (TGF-β1), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e trombospodina 1. Estes fatores de crescimento estimulam a migração e maturação de células mesenquimais e epiteliais (Dohan Ehrenfest *et al.*, 2010; Sánchez *et al.*, 2003).

O coágulo de fibrina pode ser utilizado diretamente para preencher um defeito ósseo (Mazor *et al.*, 2009; Simonpieri *et al.*

2. PLATELET-RICH FIBRIN

PRF belongs to the 2nd generation of platelet concentrates and was introduced in 2001 to overcome the difficulties in preparation and the unpredictable results obtained with platelet-rich plasma (PRP) and growth factor-rich plasma formulations (PRGFs) (Choukroun *et al.*, 2001).

Platelet-rich fibrin (PRF) is a graft obtained in a simple and traditional way from harvesting blood that is centrifuged without the addition of anticoagulants. The platelet-rich fibrin clot is formed by a natural process of crosslinking polymerization during blood centrifugation in the presence of a physiological amount of fibrinogen and thrombin (Dohan *et al.*, 2006). It is a fibrin matrix rich in platelets, leukocytes, growth factors, cytokines and stem cells, which has been shown to accelerate tissue healing in different applications, such as the treatment of periodontal defects, alveolar preservation and maxillary sinus elevation (Castro *et al.*, 2017a; Castro *et al.*, 2017b). PRF offers adequate mechanical behaviour and elasticity due to the formation of a three-dimensional fibrin network. Such dense fibrin network is composed of nanometric fibres that can act as a framework for cell proliferation, migration, differentiation and delivery of growth factors, leading to an increase in neoangiogenesis (Del Corso *et al.*, 2013; Simonpieri *et al.*, 2009).

PRF is completely absorbed during tissue healing. Therefore, in larger bone defects, it is recommended to mix PRF with other bone substitutes with slow absorption, which allows the creation of an framework for bone formation in the defect.

After blood centrifugation, 3 layers are noticeable in the collection tube for PRF: a lower layer of red blood cells; an upper layer composed of platelet-poor plasma; and an intermediate layer, called the *buffy coat*, in which most platelets and white blood cells were concentrated. *Buffy coat* consists of a dense network of fibrin with nanometric fibres, which can act as a support for cell proliferation, migration and differentiation. The crosslinking of these fibrin fibres mechanically stabilizes the PRF framework architecture, and the complex fibrin nanostructure shows extraordinarily elastic biological and mechanical behaviour (Mosesson *et al.*, 2006; Guthold *et al.*, 2007).

The PRF clot contains most of the platelets (approximately 95%) and approximately half of the leukocytes contained in the initial blood sample (Castro *et al.*, 2017a). Also, several growth factors are responsible for stimulating biological functions, such as chemotaxis, angiogenesis, cell proliferation and differentiation of osteogenic cells (Choukroun *et al.*, 2001; Dohan Ehrenfest *et al.*, 2009). Of these, we can highlight transforming growth factor beta-1 (TGF-β1), platelet-derived growth factor (PDGF), vascular endothelial growth factor (VEGF) and thrombospondin 1. Growth factors stimulate the migration and maturation of mesenchymal and epithelial cells (Dohan Ehrenfest *et al.*, 2010; Sánchez *et al.*, 2003).

The fibrin clot can be used directly to fill a bone defect (Mazor *et al.*, 2009; Simonpieri *et al.*, 2011) or compressed into a membrane (Aroca *et al.*, 2009) or cylinder (Sammartino *et al.*, 2011) using adequate equipment (Xpress kit, Intra-Lock, USA) to avoid any damage to the clot (Ehrenfest *et al.*, 2010).

There are different PRF preparation protocols. Following the original protocol called L-PRF, blood (9 mL) is harvested

al., 2011) ou comprimido em uma membrana (Aroca *et al.*, 2009) ou cilindro de fibrina (Sammartino *et al.*, 2011), usando um equipamento adequado (Xpress kit, Intra-Lock, USA), de forma a evitar qualquer dano ao coágulo (Ehrenfest *et al.*, 2010).

Existem diferentes protocolos de preparação do PRF. De acordo com este protocolo original designado de L-PRF, o sangue (9 mL) é colhido de um paciente em tubos específicos de plástico revestidos com sílica, sem anticoagulante, que são centrifugados imediatamente numa centrífuga de mesa de alta qualidade, a 2700 rpm durante 12 min (Dohan Ehrenfest *et al.*, 2010). No final deste processo, é então obtido o coágulo de L-PRF, que pode ser colhido na região intermédia de cada tubo com uma pinça e a parte contendo os glóbulos vermelhos pode ser separada do coágulo de fibrina utilizando instrumentos cirúrgicos, como um elevador de periosteum (Temmerman *et al.*, 2016; Miron *et al.*, 2017). Os glóbulos vermelhos são descartados e, então, o coágulo de L-PRF pode ser colhido.

O PRF também pode ser obtido num estado fluido. De acordo com o mesmo protocolo original, o PRF fluido (e.g., i-PRF) pode ser obtido a 2700 rpm, em tubos de plástico sem revestimento de sílica, reduzindo-se o tempo de centrifugação para 3 min. O PRF fluido é rico em plaquetas, leucócitos, fibrinogénio, monómero de fibrina e fatores de crescimento (Varela *et al.*, 2018; Miron *et al.*, 2017). Varela e colaboradores realizaram uma caracterização celular, morfológica e proteica do PRF fluido obtido com uma centrifugação mais lenta (i-PRF, obtido a 700 rpm por 3 min) (Varela *et al.*, 2018). Os autores observaram que o i-PRF apresentava mais plaquetas, mais leucócitos e uma rede de fibrina tridimensional mais densa do que o coágulo de sangue periférico. Miron e colaboradores observaram que o i-PRF possuía uma capacidade de libertar uma maior quantidade de fatores de crescimento (e.g. PDGF, TGF- β) e colagénio do tipo 1, estimulando, desta forma, uma migração maior de fibroblastos quando comparado com o Plasma Rico em Plaquetas (PRP) (Miron *et al.*, 2017).

O bloco de PRF pode ser obtido pela combinação das membranas de PRF, enxerto ósseo particulado e PRF fluido. Para fazer um rácio de 50:50, duas membranas de PRF, obtidas a partir do coágulo, são fragmentadas em porções menores e combinadas com 0,5 g de enxerto ósseo particulado. Depois, o PRF fluido é adicionado à mistura, que é mexida de forma ligeira por cerca de 10 s e, ao mesmo tempo, vai-se moldando o bloco até se obter a forma desejada para preencher o defeito ósseo. O PRF fluido vai-se transformando lentamente numa rede viscosa de fibrina, agindo como um ligante autólogo de fibrina que vai aglomerar as partículas de enxerto ósseo (Choukroun *et al.*, 2014). Assim, a sua aplicação no local cirúrgico é facilitada, permitindo ultrapassar as dificuldades existentes no manuseio de enxertos ósseos particulados (Miron *et al.*, 2017; Choukroun *et al.*, 2014; Cortellini *et al.*, 2018). Os enxertos ósseos particulados melhoram a resistência e permitem a manutenção do espaço da mistura biomaterial-PRF, para que a formação óssea do defeito ocorra.

Miron e colaboradores realizaram uma revisão sistemática, tendo concluído que o PRF, sob a forma de coágulo e fluido, tem demonstrado ser útil na obtenção de uma boa cicatrização nas seguintes aplicações: preenchimento de defeitos intra-ósseos; preservação do alvéolo pós-extração; elevação atraumática do

from a patient in specific plastic tubes coated with silica and without anticoagulant, and the tubes are then immediately centrifuged in a high-quality tabletop centrifuge at 2700 rpm for 12 min (Dohan Ehrenfest *et al.*, 2010). At the end of this process, the L-PRF clot is collected from the intermediate region of each tube with forceps, and the layer containing the red blood cells can be separated from the fibrin clot using surgical instruments, such as a periosteum elevator (Temmerman *et al.*, 2016; Miron *et al.*, 2017). The red blood cells are discarded and then the yellow L-PRF clot can be collected.

PRF can also be obtained in a flowable state. According to the same original protocol, flowable PRF (e.g., i-PRF) can be obtained at 2700 rpm in plastic tubes without silica coating, reducing the centrifugation time to 3 min. Flowable PRF is rich in platelets, leukocytes, fibrinogen, fibrin and growth factors (Varela *et al.*, 2018; Miron *et al.*, 2017). Varela *et al.* performed a cellular, morphological and protein characterization of the fluid PRF obtained with a slower centrifugation (i-PRF, obtained at 700 rpm for 3 min) (Varela *et al.*, 2018). The authors noted that i-PRF had more platelets, more white blood cells, and a denser three-dimensional fibrin network than the peripheral blood clot. Miron *et al.* observed that i-PRF was able to release a higher amount of growth factors (e.g., PDGF and TGF- β) and type 1 collagen, thus stimulating a greater migration of fibroblasts when compared to platelet-rich plasma (Miron *et al.*, 2017).

PRF blocks can be obtained by combining PRF membranes, particulate bone grafts and flowable PRF. To establish a 50:50 ratio of PRF membranes to particulate bone grafts, two PRF membranes, are fragmented into smaller pieces and combined with 0.5 g of particulate bone graft. Then, the flowable PRF is added to the mixture, which is gently mixed for approximately 10 s, and at the same time, the block is moulded to match the desired shape to fill the bone defect. The flowable PRF is slowly transformed into a viscous fibrin network acting as an autologous fibrin binder that will agglomerate the bone graft particles (Choukroun *et al.*, 2014). PRF block can enhance the clinical handling of particulate bone substitutes and improve the strength and volume maintenance in the surgical site (Miron *et al.*, 2017; Choukroun *et al.*, 2014; Cortellini *et al.*, 2018).

Miron *et al.* performed a systematic review and concluded that PRF, in the form of a clot and fluid, is useful in achieving adequate bone healing in the following applications: filling intraosseous defects; preservation of the post-extraction alveolus; atraumatic elevation of the maxillary sinus; traumatic elevation of the maxillary sinus with immediate implant placement; root coverage; keratinized mucosa gain; and surface coating of implants to accelerate osseointegration (Miron *et al.*, 2017). The PRF block, on the other hand, has an indication for bone defects of greater volume. Examples of this are procedures for the preservation of larger post-extraction alveoli, elevation of the maxillary sinus and regeneration of atrophic maxillae.

3. CERAMIC MATERIALS FOR BONE GRAFTS

Autogenous bone, bone collected from the same patient receiving the graft, intra- or extra-oral, is considered the first choice material for bone grafting, because it reveals osteogenesis, osteoinduction and osteoconduction properties. Autogenous bone was shown to significantly increase bone

seio maxilar; elevação traumática do seio maxilar com instalação imediata do implante dentário; recobrimento radicular; ganho de gengiva queratinizada; revestimento da superfície de implantes para aceleração da osseointegração (Miron *et al.*, 2017). Já o bloco de PRF tem a sua indicação para defeitos ósseos de maior volume. São exemplos disso, procedimentos de preservação de alvéolos pós-extração de maior dimensão, elevação de seio maxilar e regeneração de maxilas atróficas.

3. MATERIAIS CERÂMICOS PARA ENXERTOS ÓSSEOS

O osso autógeno, colhido do próprio paciente, intra- ou extra-oralmente, é considerada a primeira escolha tendo em conta as propriedades que este possui, designadamente a osteogénese, osteoindução e a osteocondução. O osso autógeno mostrou aumentar significativamente a neoformação óssea quando comparado com enxertos ósseos de origem alógena, xenógena e sintética (aloplástica) (Broggini *et al.*, 2015). No entanto, o osso autógeno apresenta como desvantagens a morbilidade do local doador e a quantidade disponível (Buser *et al.*, 2008; Jensen *et al.*, 2006). O osso autógeno apresenta também uma taxa de absorção elevada que pode não sustentar a estabilidade de volume a longo prazo (Buser *et al.*, 2008). Os substitutos ósseos de lenta absorção como os xenógenos ou sintéticos podem providenciar uma estabilidade de volume maior quando comparado com os enxertos ósseos autógenos (Jung *et al.*, 2013; Broggini *et al.*, 2015; Araújo *et al.*, 2015). No entanto, alguns destes substitutos ósseos apresentam aspetos morfológicos, propriedades físicas, e uma composição química que levam a uma baixa taxa de migração celular e formação de vasos sanguíneos (angiogénese). Estes são normalmente utilizados para procedimentos de reconstrução óssea quando se pretende obter uma estabilidade de volume, devido à sua absorção lenta e cicatrização tardia (Broggini *et al.*, 2015). Alguns estudos mostraram a presença de partículas residuais alguns anos após a realização de procedimentos de reparo ósseo, algo que ocorre devido à absorção lenta característica destes materiais (Piatelli *et al.*, 1999; Mordenfeld *et al.*, 2010; Jensen *et al.*, 2014; Artzi *et al.*, 2000).

Têm-se procurado desenvolver novos materiais para enxertia óssea que possam melhorar a cicatrização óssea (Kirchhoff *et al.*, 2006; Best *et al.*, 2008; Noronha Oliveira *et al.*, 2017). O aprimoramento do reparo ósseo é fortemente dependente da migração celular osteogénica, da angiogénese e da taxa de absorção do biomaterial. Os novos materiais cerâmicos têm sido muito estudados no que respeita ao tamanho das suas partículas, composição química, porosidade, tamanho dos poros e taxa de absorção (Best *et al.*, 2008; Carvalho *et al.*, 2007; Oonishi *et al.*, 1999; Dahlin *et al.*, 2015). O osso humano apresenta uma estrutura porosa que varia dos 20 aos 400 μm . Poros com um diâmetro inferior a 1 μm desempenham um papel na bioatividade e na interação proteica. Poros com diâmetros entre 1 e 20 μm determinarão o comportamento celular e o tipo de células envolvidos no processo de reparo tecidual. Os poros entre 100 e 1000 μm são responsáveis pelo crescimento celular, circulação sanguínea e resistência mecânica. Já os poros maiores do que 1000 μm determinarão a forma do material e sua funcionalidade (Vallet-Regí *et al.*, 2015). Desta forma, os materiais utilizados devem ter uma macro-, micro- e nano-porosidade coexistente (Vallet-Regí *et al.*, 2015). Deve existir também um espaço mínimo entre partículas de 100 μm , essencial para

neoformation compared to allogenic, xenogeneic and synthetic (alloplastic) bone grafts (Broggini *et al.*, 2015). However, the disadvantages of autogenous bone include morbidity to the local donor and limited available amount (Buser *et al.*, 2008; Jensen *et al.*, 2006). Autogenous bone also presents an elevated resorption rate that cannot maintain volume stability in the long term healing process (Buser *et al.*, 2008). Slow resorption materials, such as xenogenous or synthetic materials, can provide higher volume stability than autogenous bone (Jung *et al.*, 2013; Broggini *et al.*, 2015; Araújo *et al.*, 2015). However, some of these bone substitutes show morphological aspects, physical properties, and a chemical composition that lead to a low rate of cellular migration and formation of blood vessels (angiogenesis). Xenogenous or synthetic substitutes are often used for reconstruction procedures when volume stability is desired due to their slow absorption and late healing (Broggini *et al.*, 2015). Some studies have shown the presence of residual particles some years after performing bone healing procedures, occurring due to the low resorption process (Piatelli *et al.*, 1999; Mordenfeld *et al.*, 2010; Jensen *et al.*, 2014; Artzi *et al.*, 2000).

The improvement of bone repair is strongly dependent on osteogenic cell migration, angiogenesis and the rate of biomaterial absorption. New ceramic materials have been extensively studied with regard to their particle size, chemical composition, porosity, pore size and absorption rate (Best *et al.*, 2008; Carvalho *et al.*, 2007; Oonishi *et al.*, 1999; Dahlin *et al.*, 2015). Human bone has a porous structure that varies from 20 to 400 μm . Thus, the porosity of a biomaterial is crucial for bone formation. Pores with a diameter of less than 1 μm play a role in bioactivity and protein interactions. Pores with diameters between 1 and 20 μm will determine the cell behaviour and the type of cells within the healing process. Pores between 100 and 1000 μm are responsible for cell growth, bloodstream and strength. Pores larger than 1000 μm will determine the shape of the material and its functionality (Vallet-Regí *et al.*, 2015). Thus, the materials used must have a co-existing macro-, micro- and nano-porosity (Vallet-Regí *et al.*, 2015). There must also be a minimum space between particles of 100 μm ; that is essential for neovascularization and bone formation (Zaner *et al.*, 1984; Felipe *et al.*, 2009). Particles with a size between 100 and 300 μm have been shown proper osteoconduction compared to granules of 1–2 mm (Kuroda *et al.*, 1995).

Xenogeneic materials (bovine, equine and porcine) are currently widely used and have a high acceptance rate. A well-documented xenogenous graft is a deproteinized bovine bone mineral (DBBM). DBBM is essentially considered a ceramic hydroxyapatite (HAp) after removal of its organic components. DBBM particle size typically ranges between 250 μm and 2 mm (Carvalho *et al.*, 2007). A study carried out in dogs by Carvalho *et al.* showed that an increased porosity of DBBM particles seemed to benefit the osteoconduction process (Carvalho *et al.*, 2007).

Synthetic ceramics are another possible alternative for bone healing. Synthetic materials exhibit well-controlled porosity, biocompatibility, osteoconduction, and non-immunogenicity. Ceramics can contain biologically active substances serving to repair, maintain, restore or improve tissue functions. Examples are calcium phosphates, bioactive glasses and vitreous ceramics (Vallet-Regí *et al.*, 2015). Depending on the application, pore size can be produced on a micro- or nano-scale (Best *et al.*, 2008; Vallet-

permitir a neovascularização e a formação óssea (Zaner *et al.*, 1984; Felipe *et al.*, 2009). As partículas com um tamanho entre 100 e 300 μm mostraram possuir uma osteocondução superior quando comparados com grânulos de 1–2 mm (Kuroda *et al.*, 1995).

Os materiais xenógenos (bovino, equino e porcino) são atualmente muito utilizados em todo o mundo e apresentam uma elevada taxa de aceitação. O enxerto xenógeno mais documentado é o osso mineral bovino desproteínizado (DBBM). O DBBM é essencialmente considerado como uma cerâmica hidroxiapatite (HAp) após a remoção dos seus componentes orgânicos. O tamanho das suas partículas varia comercialmente entre 250 μm e 2 mm (Carvalho *et al.*, 2007). Um estudo realizado em cães por Carvalho e colaboradores mostrou que uma porosidade aumentada das partículas de DBBM pareceu beneficiar o processo de osteocondução (Carvalho *et al.*, 2007).

As cerâmicas sintéticas são outra possível alternativa para reparo ósseo. Estes materiais apresentam uma porosidade bem controlada, biocompatibilidade, osteocondução, e não imunogenicidade. As cerâmicas podem ser um meio de transporte de substâncias biologicamente ativas que servirão para reparar, manter, restaurar ou melhorar as funções dos tecidos. São exemplos os fosfatos de cálcio, os vidros bioativos e as cerâmicas vítreas (Vallet-Regí *et al.*, 2015). Dependendo da aplicação, o tamanho dos seus poros pode ser produzido numa micro- ou nano-escala (Best *et al.*, 2008; Vallet-Regí *et al.*, 2001). A hidroxiapatite sintética é um dos substitutos ósseos mais utilizados. No entanto, as cerâmicas bioativas podem ser associadas para combinar as vantagens de ambos os materiais. Exemplo disso é a combinação bifásica da HAp com o fosfato tricálcico fase β (β -TCP) que possibilita uma remodelação óssea mais rápida do que a maioria das cerâmicas bioativas absorvíveis (Broggini *et al.*, 2015; Barrère *et al.*, 2006; Jensen *et al.*, 2009). De acordo com alguns autores, a combinação de HAp e β -TCP permite um balanço excelente para permitir uma estabilidade a longo prazo (Nery *et al.*, 1992). O HAp é responsável pela resposta óssea inicial, enquanto que o β -TCP permite a remodelação óssea (Dahlin *et al.*, 2015). Esta combinação pode ser usada em diferentes percentagens. Uma das mais usadas é um rácio de 60/40 para HAp/ β -TCP (%m/m), que parece mimetizar a estrutura óssea medular humana (Jensen *et al.*, 2007). O enxerto bifásico de HAp/ β -TCP mostrou possuir uma capacidade osteogénica superior relativamente aos restantes enxertos ósseos, sendo mesmo tão eficiente quanto os enxertos ósseos autógenos (Jensen *et al.*, 2009; Fellah *et al.*, 2008).

4. BLOCO DE PRF/BIOMATERIAIS: EVIDÊNCIAS CIENTÍFICAS

O defeito ósseo deve ser preenchido com uma matriz que facilite a adesão, migração e diferenciação de células osteoblásticas progenitoras. A adição de concentrados plaquetários aos defeitos ósseos mostrou acelerar a taxa e grau de formação óssea (Mazor *et al.*, 2009; Hamzacebi *et al.*, 2015; Kassolis *et al.*, 2000; Anwandter *et al.*, 2016). A rede forte e flexível de fibrina do PRF suporta a inclusão de citocinas e a migração de células envolvidas na angiogénese e responsáveis pela neoformação óssea. No entanto, em defeitos ósseos de maiores dimensões é necessário associar um enxerto ósseo particulado. Esta mistura facilitará o manuseio do enxerto e a

Regí *et al.*, 2001). Synthetic hydroxyapatite is one of the most widely used bone substitutes. Also, bioactive ceramics can be mixed to combine the advantages of both materials. An example is the biphasic combination of HAp with β -phase tricalcium phosphate (β -TCP), which enables faster bone remodelling than most absorbable bioactive ceramics (Broggini *et al.*, 2015; Barrère *et al.*, 2006; Jensen *et al.*, 2009). HAp is responsible for the initial bone response, while β -TCP allows for bone remodelling (Dahlin *et al.*, 2015). One of the most commonly biphasic combination used is a 60/40 ratio of HAp/ β -TCP (%m/m), which seems to mimic the human marrow bone structure (Jensen *et al.*, 2007). The HAp/ β -TCP biphasic graft was shown a proper osteogenic capacity compared to other ceramic bone grafts (Jensen *et al.*, 2009; Fellah *et al.*, 2008).

4. PRF BLOCK/BIOMATERIALS: SCIENTIFIC EVIDENCE

Bone defects can be filled with a biomaterial that facilitates the adhesion, migration and differentiation of osteoblastic progenitor cells. The addition of platelet concentrates to bone substitutes has been shown to accelerate the rate and degree of bone formation (Mazor *et al.*, 2009; Hamzacebi *et al.*, 2015; Kassolis *et al.*, 2000; Anwandter *et al.*, 2016). The strong and flexible fibrin network of PRF supports the inclusion and cytokines of cells involved in angiogenesis and responsible for bone neoformation. The combination between PRF and graft materials facilitates the handling of the graft and its placement in the bone defect. PRF can be mixed with autogenous, allogeneic, xenogeneic or synthetic grafts (Tischler *et al.*, 2002; de Obarrio *et al.*, 2000; Anitua *et al.*, 2004). However, the literature is scarce on prospective randomized studies carried out in humans to evaluate the use of PRF blocks.

The PRF matrix acts as a scaffold for particulate grafts, favouring neoangiogenesis, while the particulate bone graft material serves as a space maintainer for bone healing (Del Corso *et al.*, 2013; Simonpieri *et al.*, 2009). Bone substitutes have different osteogenic potentials and absorption rates. Considering the PRF is completely absorbed, the type of bone substitute must be taken into account. In an animal study carried out in pigs, the use of PRF prevented instability of the particles of the biomaterials due to their cross-linking during polymerization, and this reduced the risk of failure during bone healing (Mir-Mari *et al.*, 2017). Regarding the preservation of post-extraction alveoli, the addition of PRF to demineralized and lyophilized bone allografts showed benefits in preserving the width of the alveolar crest (Avila-Ortiz *et al.*, 2016).

Tatullo *et al.* reported faster bone formation by adding PRF to inorganic graft particles, which allowed them to notice primary stability of dental implants at 106 days after maxillary sinus elevation (Tatullo *et al.*, 2012). Zhang *et al.* reported a higher percentage of bone neoformation in the group in which PRF was added (Zhang *et al.*, 2012). On the other hand, other authors did not find beneficial results in adding PRF to particulate grafts after 6 months of healing (Zhang *et al.*, 2012; Cömert Kılıç *et al.*, 2017). However, the addition of PRF has the advantage of fewer particulate grafts being needed, thus reducing the cost of treatment for the patient. PRF can be used alone as a filling material for the maxillary sinus only when placing the implant immediately, since the implant provides a holding effect on the sinus membrane, keeping it in an elevated position (Mazor *et al.*,

sua colocação no defeito ósseo. O PRF pode ser misturado com enxertos do tipo autógeno, alógeno, xenógeno ou sintético (Tischler *et al.*, 2002; de Obarrio *et al.*, 2000; Anitua *et al.*, 2004). No entanto, a literatura é escassa em estudos prospectivos randomizados realizados em humanos que avaliem a utilização do bloco de PRF.

A matriz de fibrina de PRF funciona como um arcabouço para os enxertos particulados, favorecendo a neoangiogênese, enquanto o material de enxerto ósseo particulado serve como um mantenedor de espaço para o reparo ósseo. Esta combinação dará a resistência mecânica necessária às primeiras etapas iniciais da cicatrização (Del Corso *et al.*, 2013; Simonpieri *et al.*, 2009). Os substitutos ósseos apresentam diferentes potenciais osteogênicos e taxas de absorção. Tendo em conta que o PRF é completamente absorvido, deve-se ter em atenção qual o tipo de substituto ósseo será usado em combinação com o PRF. Porém, a literatura ainda não é consensual na seleção do enxerto ósseo particulado ideal para ser misturado com o PRF. Num estudo animal realizado em porcos, a utilização do PRF permitiu evitar a instabilidade das partículas dos biomateriais, devido à sua reticulação durante a polimerização e, assim, diminuir os riscos de falha durante a cicatrização óssea (Mir-Mari *et al.*, 2017). Relativamente à preservação de alvéolos pós-extração, a adição de PRF ao aloenxerto ósseo desmineralizado e liofilizado mostrou benefícios na preservação da largura da crista alveolar (Avila-Ortiz *et al.*, 2016).

Tatullo e colaboradores reportaram uma formação óssea mais rápida pela adição do PRF às partículas de enxerto inorgânico, o que permitiu obter estabilidade primária de implantes dentários aos 106 dias, após a elevação do seio maxilar (Tatullo *et al.*, 2012). Já Zhang e colaboradores relatam uma maior percentagem de neoformação óssea no grupo em que foi adicionado o PRF (Zhang *et al.*, 2012). Por outro lado, outros autores não encontraram efeitos adicionais em adicionar PRF aos enxertos particulados após 6 meses de cicatrização (Zhang *et al.*, 2012; Cömert Kiliç *et al.*, 2017). No entanto, a adição de PRF por si só constitui uma vantagem, uma vez que é necessário menos enxerto particulado, reduzindo, desta forma, o custo do tratamento para o paciente. O PRF pode ser usado isoladamente como material de preenchimento do seio maxilar apenas quando é possível instalar o implante de forma imediata, uma vez que o implante vai exercer um efeito de suporte da membrana sinusal, mantendo-a numa posição elevada (Mazor *et al.*, 2009; Simonpieri *et al.*, 2011; Ali *et al.*, 2015; Tajima *et al.*, 2013).

O PRF fluido pode ser adicionado às membranas de PRF e ao enxerto particulado para originar o bloco de PRF. A utilização deste bloco permitirá ao paciente ter uma cicatrização mais rápida pelos fatores de crescimento contidos no PRF e uma menor morbidade, pois não é necessário recorrer a um local doador. No entanto, ainda existem poucos estudos sobre o uso do bloco de PRF e são diversos os protocolos disponíveis para a sua obtenção (de Almeida Barros Mourão *et al.*, 2015; Andrade *et al.*, 2016). Cortellini e colaboradores reportaram um ganho volumétrico $1,05 \pm 0,7 \text{ cm}^3$ após 5-8 meses de utilizarem o bloco de PRF para reconstruir maxilas atroficas (Cortellini *et al.*, 2018). Neste estudo, a taxa de absorção do enxerto obtida foi de $15,6 \pm 6,7 \%$ que, no entanto, não impediu a colocação de implantes dentários em todos os casos. Neste estudo, a

2009; Simonpieri *et al.*, 2011; Ali *et al.*, 2015; Tajima *et al.*, 2013).

Flowable PRF can be added to the PRF membranes and the particulate graft to form the PRF block. The use of this block allows the patient to heal faster due to the growth factors contained in the PRF, and it generates less morbidity, as a donor site is not necessary. However, there are still few studies on the use of PRF blocks, and there are several protocols available for obtaining it (de Almeida Barros Mourão *et al.*, 2015; Andrade *et al.*, 2016). Cortellini *et al.* obtained a volumetric gain of $1.05 \pm 0.7 \text{ cm}^3$ after 5-8 months of using the PRF block to repair atrophic maxillae (Cortellini *et al.*, 2018). In that study, the graft absorption rate was recorded at $15.6 \pm 6.7\%$; however, it did not prevent the placement of dental implants in all cases. In that study, the interaction between PRF and particulate graft material seemed to have a synergistic effect. The authors concluded that the combination of PRF and particulate grafts is an adequate technique for augmentation of atrophic jaws. However, further randomized clinical studies and histological analyses are needed to validate those results. The use of PRF blocks seems to be promising for two reasons: first when compared to conventional bone healing techniques, techniques utilizing PRF blocks cause less morbidity for the patient. Furthermore, treatment costs are lower, as fewer bone substitutes are needed. However, there is a lack of studies that compare the use of PRF blocks to conventional grafting methods.

5. CONCLUSIONS

Platelet-rich fibrin (PRF) has been used successfully in combination with particulate grafts for bone repair of larger defects. Some studies have shown that combining PRF with particulate grafts has a synergistic effect: the particulate materials maintain the space necessary for bone repair, and the fibrin matrix of the PRF acts as a scaffold rich in platelets, leukocytes and growth factors favouring neoangiogenesis and accelerating tissue healing. However, further randomized clinical trials are needed to validate such results. The use of PRF blocks "provide a lower patient morbidity and lower treatment costs than those of conventional grafting techniques.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization, MNO and JCMS; methodology, MNO, BH and JCMS; validation, BH and JCMS; formal analysis, BH; research, MNO and JCMS; resources, not applicable; data curation, JCMS; writing - preparation of the original draft, MNO and JCMS; writing - proofreading and editing, DH and JC; visualization, MNO and JCMS; supervision, BH, FSS and JCMS; project coordination, FSS and JCMS. All authors read and agreed with the published version of the manuscript.

interação entre PRF e material de enxertia particulado pareceu desempenhar um efeito sinérgico. Os autores concluíram que a combinação de PRF e enxerto particulado é uma técnica adequada para reabilitação de maxilares atroficos. No entanto, segundo os mesmos, são necessários mais estudos clínicos randomizados e análises histológicas que validem estes resultados. A utilização do bloco de PRF parece ser promissora, uma vez que, quando comparada com técnicas convencionais causam menos morbidade ao paciente, por não ser necessária a remoção de enxertos autógenos, e os custos do tratamento são mais baixos pela necessidade de uma menor quantidade de substitutos ósseos. No entanto, a literatura carece de estudos que comparem a utilização do bloco de PRF com os métodos convencionais de enxertia.

5. CONCLUSÕES

A fibrina rica em plaquetas (PRF) tem sido utilizada com sucesso em combinação com enxertos particulados para o reparo ósseo de defeitos de maiores dimensões. Alguns estudos reportam que a combinação do PRF demonstra ter um efeito sinérgico, no qual os materiais particulados mantêm o espaço necessário ao reparo ósseo e a matriz de fibrina do PRF atua como um arcabouço, rico em plaquetas, leucócitos e fatores de crescimento que favorecem a neoangiogénese e acelera a cicatrização dos tecidos. No entanto, são necessários mais estudos clínicos randomizados que validem estes resultados. A utilização do bloco de PRF possibilita uma menor morbidade ao paciente e os custos do tratamento são mais baixos quando comparado às técnicas convencionais de enxertia.

CONTRIBUIÇÕES AUTORAIS

Conceptualização, MNO e JCMS; metodologia, MNO, BH e JCMS; validação, BH e JCMS; análise formal, BH.; investigação, MNO e JCMS; recursos, Não aplicável; curadoria de dados, JCMS; redação - preparação do draft original, MNO e JCMS; redação - revisão e edição, DH e JC; visualização, MNO e JCMS; supervisão, BH, FSS e JCMS; coordenação do projeto, FSS e JCMS. Todos os autores leram e concordaram com a versão publicada do manuscrito.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS/REFERENCES

- Ali S, Bakry SA, Abd-Elhakam H. Platelet-rich fibrin in maxillary sinus augmentation: a systematic review. *J Oral Implantol* **41(6)**, 746–53 (2015).
- Andrade CX, Orrego A, Pinto N. Hematologic profile of four autologous fibrinogen based binder obtained with different protocols. In: Conference: *1st European Meeting on Enhanced Natural Healing in Dentistry*, 2–3 (2016).
- Anitua E, Andia I, Ardanza B, Nurden P, Nurden AT. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost* **91(1)**, 4–15 (2004).
- Anwandter A, Bohmann S, Nally M, Castro AB, Quirynen M, Pinto N. Dimensional changes of the post extraction alveolar ridge, preserved with leukocyte- and platelet rich fibrin: a clinical pilot study. *J Dent* **52**, 23–9 (2016).
- Araújo MG, da Silva JCC, de Mendonça AF, Lindhe J. Ridge alterations following grafting of fresh extraction sockets in man. A randomized clinical trial. *Clin Oral Implants Res* **26(4)**, 407–12 (2015).
- Araújo MG, Lindhe J. Socket grafting with the use of autologous bone: an experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res* **22(1)**,

9–13 (2011).

- Aroca S, Keglevich T, Barbieri B, Gera I, Etienne D. Clinical evaluation of a modified coronally advanced flap alone or in combination with a platelet-rich fibrin membrane for the treatment of adjacent multiple gingival recessions: a 6-month study. *J Periodontol* **80**(2), 244–52 (2009).
- Artzi Z, Tal H, Dayan D. Porous bovine bone mineral in healing of human extraction sockets. Part 1: histomorphometric evaluations at 9 months. *J Periodontol* **71**(6), 1015–23 (2000).
- Avila-Ortiz G, Bartold PM, Giannobile W, Katagiri W, Nares S, Rios H, Spagnoli D, Wikesjö UM. Biologics and Cell Therapy Tissue Engineering Approaches for the Management of the Edentulous Maxilla: A Systematic Review. *Int Oral Maxillofac Impl* **31**Suppl, s121–164 (2016).
- Barrère F, van Blitterswijk CA, de Groot K. Bone regeneration: molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics. *Int J Nanomedicine* **1**(3), 317–32 (2006).
- Best SM, Porter AE, Thian ES, Huang J. Bioceramics: past, present and for the future. *J Eur Ceram Soc* **28**(7), 1319–27 (2008).
- Broggini N, Bosshardt DD, Jensen SS, Bornstein MM, Wang C-C, Buser D. Bone healing around nanocrystalline hydroxyapatite, deproteinized bovine bone mineral, biphasic calcium phosphate, and autogenous bone in mandibular bone defects. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **103**(7), 1478–87 (2015).
- Buser D, Chen ST, Weber HP, Belser UC. Early implant placement following single-tooth extraction in the esthetic zone: biologic rationale and surgical procedures. *Int J Periodontics Restorative Dent* **28**(5), 441–51 (2008).
- Carvalho AL, Faria PEP, Grisi MFM, et al. Effects of granule size on the osteoconductivity of bovine and synthetic hydroxyapatite: a histologic and histometric study in dogs. *J Oral Implantol* **33**(5), 267–76 (2007).
- Castro AB, Meschi N, Temmerman A, et al. Regenerative potential of leucocyte- and platelet-rich fibrin. Part A: intra-bony defects, furcation defects and periodontal plastic surgery. A systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol* **44**(1), 67–82 (2017).
- Castro AB, Meschi N, Temmerman A, et al. Regenerative potential of leucocyte- and platelet-rich fibrin. Part B: sinus floor elevation, alveolar ridge preservation and implant therapy. A systematic review. *J Clin Periodontol* **44**(2), 225–34 (2017).
- Choukroun J, Adda F, Schoeffler C, Vervelle A. Une opportunité en paro-implantologie. Le PRF, <https://www.scienceopen.com/document?vid=a1a5f6be-e645-4718-8e53-dbb6870c25e0>; (2001).
- Choukroun J. Advanced PRF. i-PRF: platelet concentrates or blood concentrates. *J Periodont Med Clin Pract*, 1:3 (2014).
- Cömert Kılıç S, Güngörmüş M, Parlak SN. Histologic and histomorphometric assessment of sinus-floor augmentation with beta-tricalcium phosphate alone or in combination with pure-platelet-rich plasma or platelet-rich fibrin: A randomized clinical trial. *Clin Implant Dent Relat Res* **19**(5), 959–967 (2017).
- Cortellini S, Castro AB, Temmerman A, Van Dessel J, Pinto N, Jacobs R, Quirynen M. L-PRF block for bone augmentation procedure: a proof-of-concept study. *J Clin Periodont* **45**(5), 624–634 (2018).
- Dahlin C, Obrecht M, Dard M, Donos N. Bone tissue modelling and remodelling following guided bone regeneration in combination with biphasic calcium phosphate materials presenting different microporosity. *Clin Oral Implants Res* **26**(7), 814–22 (2015).
- de Almeida Barros Mourão CF, Valiense H, Melo ER, Mourão NBMF, Maia MD-C. Obtention of injectable platelets rich-fibrin (i-PRF) and its polymerization with bone graft. *Rev Col Bras Cir* **42**(6), 421–3 (2015).
- de Obarrio JJ, Araúz-Dutari JI, Chamberlain TM, Croston A. The use of autologous growth factors in periodontal surgical therapy: platelet gel biotechnology—case reports. *Int J Periodontics Restorative Dent* **20**(5), 486–97 (2000).

- Del Corso M, Dohan Ehrenfest DM. Immediate implantation and peri-implant natural bone regeneration (NBR) in the severely resorbed posterior mandible using leukocyte and platelet-rich fibrin (L-PRF): a 4-year follow-up, http://asnportal.com/images/dental_report/periodontics-oral-surgery-implants/poseido-201312109-16-delcor-copia.pdf; (2013).
- Dohan DM, Choukroun J, Diss A, *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* **101(3)**, (2006).
- Dohan Ehrenfest DM, de Peppo GM, Doglioli P, Sammartino G. Slow release of growth factors and thrombospondin-1 in Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF): a gold standard to achieve for all surgical platelet concentrates technologies. *Growth Factors* **27(1)**, 63–9 (2009).
- Dohan Ehrenfest DM, Del Corso M, Diss A, Mouhyi J, Charrier J-B. Three-dimensional architecture and cell composition of a Choukroun's platelet-rich fibrin clot and membrane. *J Periodontol* **81(4)**, 546–55 (2010).
- Ehrenfest DMD. How to optimize the preparation of leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF, Choukroun's technique) clots and membranes: introducing the PRF Box. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **110(3)**, 275–8 (2010).
- Felipe MEMC, Andrade PF, Novaes AB, *et al.* Potential of bioactive glass particles of different size ranges to affect bone formation in interproximal periodontal defects in dogs. *J Periodontol* **80(5)**:808–15 (2009).
- Fellah BH, Gauthier O, Weiss P, Chappard D, Layrolle P. Osteogenicity of biphasic calcium phosphate ceramics and bone autograft in a goat model. *Biomaterials* **29(9)**, 1177–88 (2008).
- Grunder U, Gracis S, Capelli M. Influence of the 3-D bone-to-implant relationship on esthetics. *Int J Periodontics Restorative Dent* **25(2)**, 113–9 (2005).
- Guthold M, Liu W, Sparks EA, *et al.* A comparison of the mechanical and structural properties of fibrin fibers with other protein fibers. *Cell Biochem Biophys* **49(3)**, 165–81 (2007).
- Hamzacebi B, Oduncuoglu B, Alaaddinoglu EE. Treatment of peri-implant bone defects with platelet-rich fibrin. *Int J Periodontics Restorative Dent* **35(3)**, 415–22 (2015).
- Jensen SS, Bornstein MM, Dard M, Bosshardt DD, Buser D. Comparative study of biphasic calcium phosphates with different HA/TCP ratios in mandibular bone defects. A long-term histomorphometric study in minipigs. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **90(1)**, 171–81 (2009).
- Jensen SS, Bosshardt DD, Gruber R, Buser D. Long-term stability of contour augmentation in the esthetic zone: histologic and histomorphometric evaluation of 12 human biopsies 14 to 80 months after augmentation. *J Periodontol* **85(11)**, 1549–56 (2014).
- Jensen SS, Broggini N, Hjørtting-Hansen E, Schenk R, Buser D. Bone healing and graft resorption of autograft, anorganic bovine bone and beta-tricalcium phosphate. A histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. *Clin Oral Implants Res* **17(3)**, 237–43 (2006).
- Jensen SS, Yeo A, Dard M, Hunziker E, Schenk R, Buser D. Evaluation of a novel biphasic calcium phosphate in standardized bone defects: a histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. *Clin Oral Implants Res* **18(6)**, 752–60 (2007).
- Jung RE, Philipp A, Annen BM, *et al.* Radiographic evaluation of different techniques for ridge preservation after tooth extraction: a randomized controlled clinical trial. *J Clin Periodontol* **40(1)**, 90–8 (2013).
- Kassolis JD, Rosen PS, Reynolds MA. Alveolar ridge and sinus augmentation utilizing platelet-rich plasma in combination with freeze-dried bone allograft: case series. *J Periodontol* **71(10)**, 1654–61 (2000).
- Kirchhoff M, Bienengraber V, Lenz S, Gerber T, Henkel KO. A new synthetic bone replacement material with osteoinductive

- properties—in vivo investigations. *BIOMaterialien* **7(4)**, 78–96 (2006).
- Kuroda T. Bone formation and mechanical properties of the cancellous bone defect site filled with hydroxyapatite granules. *Nihon Seikeigeka Gakkai Zasshi* **69(10)**, 1037–49 (1995).
- Mazor Z, Horowitz RA, Del Corso M, Prasad HS, Rohrer MD, Dohan Ehrenfest DM. Sinus floor augmentation with simultaneous implant placement using Choukroun's platelet-rich fibrin as the sole grafting material: a radiologic and histologic study at 6 months. *J Periodontol* **80(12)**, 2056–64 (2009).
- Mir-Mari J, Benic GI, Valmaseda-Castellón, E, Hämmerle CHF, Jung RE. Influence of wound closure on the volume stability of particulate and non-particulate GBR materials: an in vitro cone-beam computed tomographic examination. Part II. *Clinical Oral Implants Research* **28**, 631–639 (2017).
- Miron RJ, Fujioka-Kobayashi M, Bishara M, Zhang Y, Hernandez M, Choukroun J. Platelet-Rich Fibrin and Soft Tissue Wound Healing: A Systematic Review. *Tissue Eng Part B* **23(1)**, 83-99 (2017).
- Miron RJ, Fujioka-Kobayashi M, Hernandez M, et al. Injectable platelet rich fibrin (i-PRF): opportunities in regenerative dentistry? *Clin Oral Invest* **21(8)**, 2619-2627 (2017).
- Mordenfeld A, Hallman M, Johansson CB, Albrektsson T. Histological and histomorphometrical analyses of biopsies harvested 11 years after maxillary sinus floor augmentation with deproteinized bovine and autogenous bone. *Clin Oral Implants Res* **21(9)**, 961–70 (2010).
- Mosesson MW, Siebenlist KR, Meh DA. The structure and biological features of fibrinogen and fibrin. *Ann N Y Acad Sci* **936(1)**, 11–30 (2006).
- Nery EB, LeGeros RZ, Lynch KL, Lee K. Tissue response to biphasic calcium phosphate ceramic with different ratios of HA/beta TCP in periodontal osseous defects. *J Periodontol* **63(9)**, 729–35 (1992).
- Nizam N, Eren G, Akcalı A, Donos N. Maxillary sinus augmentation with leukocyte and platelet-rich fibrin and deproteinized bovine bone mineral: A split-mouth histological and histomorphometric study. *Clin Oral Implants Res* **29(1)**, 67-75 (2018).
- Noronha Oliveira M, Rau LH, Marodin A, et al. Ridge Preservation After Maxillary Third Molar Extraction Using 30% Porosity PLGA/HA/β-TCP Scaffolds With and Without Simvastatin: A Pilot Randomized Controlled Clinical Trial. *Implant Dent* **26(6)**, 832-840 (2017).
- Oonishi H, Hench LL, Wilson J, et al. Comparative bone growth behavior in granules of bioceramic materials of various sizes. *J Biomed Mater Res* **44(1)**, 31–43 (1999).
- Piattelli M, Favero GA, Scarano A, Orsini G, Piattelli A. Bone reactions to anorganic bovine bone (Bio-Oss) used in sinus augmentation procedures: a histologic long-term report of 20 cases in humans. *Int J Oral Maxillofac Implants* **14(6)**, 835–840 (1999).
- Sammartino G, Ehrenfest DMD, Carile F, Tia M, Bucci P. Prevention of hemorrhagic complications after dental extractions into open heart surgery patients under anticoagulant therapy: the use of leukocyte- and platelet-rich fibrin. *J Oral Implantol* **37(6)**, 681–90 (2011).
- Sánchez AR, Sheridan PJ, Kupp LI. Is platelet-rich plasma the perfect enhancement factor? A current review. *Int J Oral Maxillofac Implants* **18(1)**, 93–103 (2003).
- Simonpieri A, Choukroun J, Del CM, Sammartino G, Ehrenfest DMD. Simultaneous sinus-lift and implantation using microthreaded implants and leukocyte- and platelet-rich fibrin as sole grafting material: a six-year experience. *Implant Dent* **20(1)**, 2–12 (2011).
- Simonpieri A, Choukroun J, Del CM, Sammartino G, Ehrenfest DMD. Simultaneous sinus-lift and implantation using microthreaded implants and leukocyte- and platelet-rich fibrin as sole grafting material: a six-year experience. *Implant Dent* **20(1)**, 2–12 (2011).
- Simonpieri A, Del Corso M, Sammartino G, Dohan Ehrenfest DM. The relevance of Choukroun's platelet-rich fibrin and metronidazole during complex maxillary rehabilitations using bone allograft.

- Part II: implant surgery, prosthodontics, and survival. *Implant Dent* **18(3)**, 220–9 (2009).
- Tajima N, Ohba S, Sawase T, Asahina I. Evaluation of sinus floor augmentation with simultaneous implant placement using platelet-rich fibrin as sole grafting material. *Int J Oral Maxillofac Implants* **28(1)**, 77–83 (2013).
- Tatullo M, Marrelli M, Cassetta M, Pacifici A, Stefanelli LV, Scacco S, Dipalma G, Pacifici L, Inchingolo F. Platelet Rich Fibrin (P.R.F.) in reconstructive surgery of atrophied maxillary bones: clinical and histological evaluations. *Int J Med Sci* **9(10)**, 872–880 (2012).
- Temmerman A, Vandessel J, Castro A, Jacobs R, Teughels W, Pinto N, Quirynen M. The use of leucocyte and platelet-rich fibrin in socket management and ridge preservation: a split-mouth, randomized, controlled clinical trial. *J Clin Periodontol* **43(11)**, 990–9 (2016).
- Tischler M. Platelet rich plasma. The use of autologous growth factors to enhance bone and soft tissue grafts. *N Y State Dent J* **68(3)**, 22–4 (2002).
- Vallet-Regí M, Ruiz-Hernández E. Bioceramics: from bone regeneration to cancer nanomedicine. *Adv Mater* **23(44)**, 5177–218 (2015).
- Vallet-Regi M. Ceramics for medical applications. *J Chem Soc Dalton Trans* **2**, 97–108 (2001).
- Varela HA, Souza JCM, Nascimento RM, *et al*. Injectable platelet rich fibrin (i-PRF): cell content, morphological and protein characterization. *Clin Oral Invest* (2018).
- Yang L-C, Hu S-W, Yan M, Yang J-J, Tsou S-H, Lin Y-Y. Antimicrobial activity of platelet-rich plasma and other plasma preparations against periodontal pathogens. *J Periodontol* **86(2)**, 310–8 (2015).
- Zaner DJ, Yukna RA. Particle size of periodontal bone grafting materials. *J Periodontol* **55(7)**, 406–9 (1984).
- Zhang Y, Tangl S, Huber CD, Lin Y, Qiu L, Rausch-Fan X. Effects of Choukroun's platelet-rich fibrin on bone regeneration in combination with deproteinized bovine bone mineral in maxillary sinus augmentation: a histological and histomorphometric study. *J Craniomaxillofac Surg* **40**, 321–328 (2012).