

Influência da força centrífuga na cinética de liberação de fatores de crescimento em rede de fibrina rica em plaquetas e leucócitos em humanos hígidos

Influence of centrifugal force on the release kinetics of growth factors in platelet-rich and leukocyte-rich fibrin network in healthy humans

Influencia de la fuerza centrífuga en la cinética de liberación de factores de crecimiento en la red de fibrina rica en plaquetas y leucocitos en humanos sanos

Recebido: 19/10/2022 | Revisado: 13/11/2022 | Aceitado: 17/11/2022 | Publicado: 27/11/2022

Roberto Fernandes Pacheco

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9140-1667>
Centro Universitário Ingá Uningá, Brasil
E-mail: drrobertopacheco@hotmail.com

Antônio Luis Neto Custódio

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2211-9195>
Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil
E-mail: antonio.custodio@gmail.com

Daniela Martins de Souza

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4273-8479>
Sociedade Brasileira dos Cirurgiões-Dentistas, Brasil
E-mail: danimart.voy@gmail.com

Carolina Lúcia de Oliveira Pacheco

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9587-2992>
Faculdades Unidas do Norte Minas, Brasil
E-mail: caluoliveira@gmail.com

José Ricardo de Albergaria-Barbosa

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5127-8318>
Universidade Estadual de Campinas, Brasil
E-mail: barbosa@fop.unicamp.br

Resumo

A Odontologia está cada dia mais avançada no uso de biomateriais em várias áreas de atuação. A fibrina rica em plaquetas (PRF) é um exemplo desse avanço, mas apesar disso ainda existem muitas lacunas acerca de todo o potencial biológico desse material. A questão crucial para a qualidade, aplicabilidade e função do PRF está ligada à forma de obtenção desse material. Alterações no processo de centrifugação podem alterar a composição desse biomaterial e também a sua forma de ativação dos tecidos. Objetivo desse estudo foi avaliar a influência da velocidade e força centrífuga na cinética de liberação de fatores de crescimento pela PRF humana. Materiais e métodos: Para o desenvolvimento do estudo, utilizou-se amostras de sangue periférico de pacientes saudáveis e submeteu esse material a três protocolos com forças de centrifugação diferentes: 400g, 800g e 200g. Os PRFs obtidos foram cultivados em meio estéril de cultura de células e avaliados nos tempos: 15 minutos, 1 dia, 3 dias e 7 dias. Os fatores de crescimento foram detectados pela método ELISA e quantificados em todos os protocolos. Dos resultados obtidos foi visto que apenas o fator de crescimento EGF apresentou diferenças significativas ($p=0,044$) nas alterações da força centrífuga nos tempos avaliados. Os outros fatores apresentaram mudanças na detecção ao longo dos dias. Conclusão: Essas variações no protocolo não interferem na detecção da maioria dos fatores de crescimento, o que traz segurança ao profissional na obtenção do potencial do material, mesmo com pequenas variações em sua forma de processamento.

Palavras-chave: Odontologia; Fibrina; Plasma rico em plaquetas; Sangue; Proliferação de células.

Abstract

Dentistry is increasingly advanced in the use of biomaterials in various areas of activity. Platelet-rich fibrin (PRF) is an example of this advance, but despite this, there are still many gaps regarding the full biological potential of this material. The crucial issue for the quality, applicability and function of PRF is linked to the way in which this material is obtained. Changes in the centrifugation process can change the composition of this biomaterial and also its form of tissue activation. The aim of this study was to evaluate the influence of velocity and centrifugal force on the kinetics of growth factor release by human PRF. Materials and methods: For the development of the study, peripheral blood samples from healthy patients were used and this material was subjected to three protocols with different centrifugation forces: 400g, 800g and 200g. The PRFs obtained were grown in sterile cell culture medium and evaluated at times: 15 minutes, 1 day, 3 days and 7 days. Growth factors were detected by the ELISA method and quantified in all protocols. From the results

obtained, it was seen that only the growth factor EGF showed significant differences ($p=0.044$) in changes in centrifugal force at the times evaluated. The other factors showed changes in detection over the days. Conclusion: These variations in the protocol do not interfere in the detection of most growth factors, which gives the professional confidence in obtaining the potential of the material, even with small variations in its processing form.

Keywords: Dentistry; Fibrin; Platelet-rich plasma; Blood; Cell proliferation.

Resume

La odontología está cada vez más avanzada en el uso de biomateriales en diversas áreas de actividad. La fibrina rica en plaquetas (PRF) es un ejemplo de este avance, pero a pesar de ello, todavía existen muchas lagunas en cuanto al potencial biológico completo de este material. El tema crucial para la calidad, aplicabilidad y función de PRF está relacionado con la forma en que se obtiene este material. Los cambios en el proceso de centrifugación pueden modificar la composición de este biomaterial y también su forma de activación tisular. El objetivo de este estudio fue evaluar la influencia de la velocidad y la fuerza centrífuga en la cinética de liberación del factor de crecimiento por PRF humana. Materiales y métodos: Para el desarrollo del estudio se utilizaron muestras de sangre periférica de pacientes sanos y este material fue sometido a tres protocolos con diferentes fuerzas de centrifugación: 400g, 800g y 200g. Las PRF obtenidas se cultivaron en medio de cultivo celular estéril y se evaluaron en tiempos: 15 minutos, 1 día, 3 días y 7 días. Los factores de crecimiento fueron detectados por el método ELISA y cuantificados en todos los protocolos. De los resultados obtenidos se observó que solo el factor de crecimiento EGF mostró diferencias significativas ($p=0.044$) en los cambios de fuerza centrífuga en los tiempos evaluados. Los otros factores mostraron cambios en la detección a lo largo de los días. Conclusión: Estas variaciones en el protocolo no interfieren en la detección de la mayoría de los factores de crecimiento, lo que da confianza a los profesionales en la obtención del potencial del material, incluso con pequeñas variaciones en la forma de procesamiento.

Palabras clave: Odontología; Fibrina; Plasma rico en plaquetas; Sangre; Proliferación celular.

1. Introdução

A expressão “engenharia de tecidos”, ou “engenharia tecidual”, surgiu, originalmente, com a construção laboratorial de dispositivos que continham células e mediadores, numa matriz biológica ou sintética, utilizada em pacientes com o intuito de facilitar a regeneração de determinados tecidos (Langer & Vacanti, 2016). Esses dispositivos utilizados na engenharia tecidual são conhecidos como biomateriais e possuem uma ampla aplicabilidade nas áreas da saúde. Geralmente, os biomateriais combinam três elementos-chave: *scaffolds* (estruturas tridimensionais que servem de suporte ao crescimento celular), moléculas de sinalização (como os fatores de crescimento) e células (osteoblastos, fibroblastos, ou outras populações adequadas à regeneração do tecido lesado) (Jahanbani et al., 2020). Um dos principais objetivos da pesquisa com biomateriais, no campo da engenharia de tecidos, é promover uma reação tecidual induzida por um determinado material, que leva à regeneração e uma cicatrização eficaz do tecido lesionado. Assim, um biomaterial deve servir como uma barreira temporária para revestir defeitos e promover a regeneração dos tecidos, sendo compatível com o tecido e, mais importante ainda, ser aplicável clinicamente. No campo da regeneração, a vascularização desempenha um papel crucial, uma vez que assegura um fornecimento contínuo de nutrientes. Além disso, favorece a remoção de resíduos de produtos celulares a partir do suporte da região enxertada.

Entre os grandes desafios apresentados pela pesquisa clínica está o desenvolvimento de aditivos cirúrgicos bioativos, visando a regulação da inflamação e uma melhora cicatricial. De fato, após cada intervenção, ocorrem fenômenos complexos na remodelação dos tecidos, o que resulta na sobrevivência e cicatrização dos mesmos. A regeneração de tecidos é mediada por uma grande variedade de eventos, intra e extracelulares, que são regulados por biossinalizadores e por um processo complexo que depende de uma sequência de eventos que incluem: fixação, migração e proliferação celular (Wu et al., 2012).

O desenvolvimento de tecnologias a base de concentrado de plaquetas tem sido aprimorado, afim de otimizar a cicatrização tecidual. O objetivo de todas estas tecnologias é extrair, através de centrifugação e métodos de manipulação, todos os elementos que poderiam ser usados para melhorar a cicatrização e promover a regeneração de tecidos a partir de uma amostra de sangue. O plasma rico em plaquetas (PRP) foi a primeira geração de derivados de amostras de sangue humano, utilizados com este propósito. Estudos comparativos mostraram que o PRP tem um efeito positivo no processo de cicatrização de feridas e

na regeneração tecidual (Nobrega et al., 2022; Campos & Souza, 2021; Ehrenfes et al., 2009). No entanto, a adição de anticoagulantes e de trombina bovina limita a aplicação clínica do PRP e apela a estratégias alternativas, clinicamente viáveis.

Devido a restrições legais sobre a manipulação de sangue, surgiu na França uma nova família de concentrado de plaquetas, diferente de cola de fibrina ou um concentrado de plaquetas clássico. Este novo biomaterial, chamado de *platelet rich fibrin* (PRF), ou fibrina rica em plaqueta, é similar a uma matriz cicatricial autóloga (Choukroun et al., 2006). Ao contrário dos outros concentrados de plaquetas usados até então, trata-se de uma técnica em que é necessária somente a centrifugação de sangue do paciente, sem outros aditivos. Esta, pretende mimetizar o processo natural de coagulação, e produzir uma membrana bioativa simples e econômica que funciona como uma rede de fibrina. Com isso, resulta tanto na migração quanto na proliferação celulares de forma mais eficiente. Em particular, esse biomaterial é composto por plaquetas (ricas em fatores de crescimento), rede de fibrina (servindo como uma matriz de suporte) e, em alguns casos, rica em células (principalmente as várias populações de leucócitos) (Costa et al., 2021; Bielecki & Ehrenfest, 2012; Ehrenfes et al., 2010).

Estão disponíveis várias técnicas para a preparação dos concentrados plaquetários atualmente. Todavia, as suas diferentes indicações podem parecer confusas, uma vez que cada método de manipulação origina diferentes produtos, biologicamente diferentes e com aplicações diversificadas (Ehrenfes et al., 2009). A classificação proposta por Ehrenfest et al., 2012, divide os concentrados plaquetários em quatro categorias, dependendo do seu conteúdo de leucócitos e fibrina:

- P-PRP: Plasma rico em plaquetas puro;
- L-PRP: Plasma rico em plaquetas e leucócitos;
- P-PRF: Fibrina rica em plaquetas puro;
- L-PRF: Fibrina rica em plaquetas e leucócitos.

O desenvolvimento da fibrina rica em plaquetas (PRF) simplificou drasticamente o procedimento de preparação de concentrados de plaquetas e facilitou sua aplicação clínica. A eficácia clínica da PRF tem sido demonstrada em estudos pré-clínicos e clínicos, com interessantes resultados *in vitro* (Ehrenfes et al., 2010; Ehrenfes et al., 2009) com várias possibilidades de aplicações clínicas na cirurgia bucal, principalmente na cirurgia de implante com levantamento do seio maxilar e em cirurgia periodontal (Bastami & Khojasteh, 2016).

Os efeitos biológicos desta matriz de fibrina podem ser divididos em quatro aspectos da cicatrização: angiogênese, controle imunitário, recrutamento das células precursoras circundantes e proteção. A angiogênese consiste na formação de novos vasos sanguíneos a partir de outros pré-existentes. Para isso, é necessária a presença de uma matriz extracelular para permitir a migração, divisão e a alteração fenotípica das células endoteliais e também a ação das plaquetas presentes neste biomaterial. A sua ativação é fundamental para iniciar a hemostasia. Contudo, a sua degranulação implica também na liberação de citocinas capazes de estimular a migração celular e a proliferação na matriz de fibrina (Choukroun et al., 2006).

A propriedade de angiogênese deste substrato é explicada pela estrutura tridimensional e pela ação simultânea das citocinas que se encontram aprisionadas na estrutura da matriz. A matriz de fibrina contém diversas populações do sistema imunológico, bem como todos os elementos celulares e moleculares que permitem uma cicatrização eficaz. As capacidades de defesa contra infecções parecem ser significativas, devido às suas propriedades quimiotáticas, assim como à sua capacidade de facilitar o acesso das citocinas ao local da lesão (Ghanaati et al., 2014).

Desenvolvimentos recentes na biologia celular e molecular, frutos de pesquisa contínua (Reddy et al., 2020), aumentaram a compreensão dos processos de cicatrização e regeneração de feridas. Assim, o papel crucial dos leucócitos e seus subgrupos como principais protagonistas para modular as várias fases durante a cicatrização de feridas foram esclarecidos. Além disso, as plaquetas, bem como a rede de fibrina são conhecidos por desempenhar um papel importante no processo de cicatrização

de feridas (Litvinov & Weisel, 2016). Os leucócitos participam na angiogênese e linfogênese, enquanto que a rede de fibrina é um fator chave nos estágios iniciais da cicatrização de feridas, tornando seus efeitos sinérgicos com as plaquetas e sua função como um reservatório de citocinas.

O processo de regeneração ou reparação do tecido requer uma reação harmoniosa de vários tipos de células, incluindo células de resposta imune (neutrófilos, macrófagos, linfócitos), células epiteliais e fibroblastos bem como outras células relevantes para o tecido em questão. O conceito de *scaffold* de PRF parece ser uma fonte ideal de componentes para o processo de cicatrização. Esta rede autóloga derivada do sangue pode ser uma fonte única de células estaminais hematopoiéticas (HSCs), que são de grande importância na medicina regenerativa (Ogawa et al., 2013). Contudo, ainda é controverso se os fatores de crescimento estão significativamente concentrados em preparações de PRF para facilitar a cicatrização de feridas e a regeneração de tecidos (Masuki et al., 2016).

Neste método de livre acesso, uma amostra de sangue é obtida sem anticoagulante e centrifugada imediatamente durante 12 minutos. Uma grande vantagem da presente metodologia é a sua simplicidade de preparação: o processo de centrifugação ativa a coagulação e, como resultado, ocorre a formação de um coágulo. Este coágulo é constituído por uma rede de fibrina tridimensional em que as plaquetas e outras células do sangue são aprisionadas. Há uma liberação gradual e rápida de fatores de crescimento da PRF. No fim do processo, um coágulo de L-PRF pode ser recolhido no meio do tubo. Este coágulo reúne quase todas as plaquetas e metade dos leucócitos da coleta de sangue inicial (com maioria de linfócitos) (Ehrenfest et al., 2010). A fibrina apresenta uma dupla função: reservatório de citocinas e matriz de cicatrização celular aptos a serem liberados (Ehrenfest et al., 2012). É uma fonte de fatores de crescimento ativos que são, entre outros, o *platelet derived growth factor* (PDGF), ou fator de crescimento derivado de plaquetas, o *transforming growth factor beta* (TGFβ), fator de crescimento transformador beta, e o *vascular endothelial growth factor* (VEGF), fator de crescimento endotelial vascular. Este coágulo pode então ser utilizado diretamente como material de preenchimento ou associados com materiais de enxertia óssea, ou pode ser comprimida, transformando-se em uma membrana de fibrina L-PRF bem resistente (Peck et al., 2016). A liberação destes fatores começa de 5 a 10 minutos após a coagulação e continua durante dias (Schär et al., 2015a).

Embora o “Protocolo de Choukroun” tenha sido claramente delineado, várias publicações não seguiam os métodos prescritos (Peck et al., 2016). A chave para essas diferenças pode ter sido a utilização de centrífugas distintas ou uma força centrífuga relativa (RCF) específica (400 G). Centrífugas são equipamentos que aplicam uma força centrífuga relativa para separar as partículas de uma solução. A RCF, também conhecida como força G (força gravitacional), é gerada quando uma determinada massa é submetida a um movimento circular, tal como ocorre no processo de centrifugação de amostras biológicas, que é o processo no qual ocorre a separação de soro, plasma e outros fluídos biológicos.

Recentes estudos demonstraram que modificações na velocidade de centrifugação e no tempo de centrifugação podem favorecer um aumento na liberação do fator de crescimento da PRF que por sua vez podem influenciar diretamente a regeneração de tecidos aumentando a migração de fibroblastos, surgindo o conceito de baixa velocidade (Fujioka-Kobayashi et al., 2017; Ghanaati et al., 2014).

Embora os estudos mencionados acima evidenciem o potencial considerável de PRF em termos de regeneração de tecidos e aplicação clínica, ainda não está claro como as células são distribuídas neste tipo de arcabouço de fibrina, e como essa distribuição pode ser afetada de acordo com as variações de tempo, velocidade da centrifugação e alterações na RCF. Assim, estudos pré-clínicos e clínicos adicionais são necessários para avaliar este novo conceito.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da força centrífuga na cinética de fatores de crescimento pela formação de fibrina rica em plaquetas (PRF) humana. E também avaliar a liberação quantitativa dos fatores de crescimento em relação à variação da exposição à RCF ou força G e analisar a concentração dos fatores de crescimento liberados de leucócitos e plaquetas (L-PRF) durante a cultura in vitro em diferentes tempos.

2. Metodologia

2.1 Obtenção de amostras de coágulo de PRF

Foi realizada uma pesquisa de natureza experimental quantitativa (Estrela, 2018), sendo aprovada pelo comitê de ética da UFMG com o Número do Parecer: 2.381.598. Foram utilizados 6 voluntários saudáveis oriundos do Center for Gastrointestinal Biology do ICB – UFMG (20-45 anos, ASA 1), não fumantes, sem história recente de ingestão de álcool, aspirina ou qualquer medicação, nem doenças que atinjam o processo de coagulação. Todas as coletas de sangue foram realizadas e processadas por bioquímicos ou biomédicos treinados, oriundos do *Center for Gastrointestinal Biology* do ICB – UFMG.

Previamente, na semana dos testes, todos os pacientes foram submetidos a uma coleta de amostra de sangue para verificação dos níveis normais das células vermelhas, leucócitos e plaquetas. Para cada voluntário, dois tubos de sangue (tubos de plástico revestidos com vidro, 10ml, sem anticoagulante) foram obtidos a partir da veia antecubital, recolhidos utilizando-se sistemas de coletas a vácuo equipados com agulhas 21 G, para cada protocolo testado, totalizando seis tubos por paciente.

O sangue foi coletado de forma rápida (menos de 25 segundos por tubo) e a centrifugação para cada protocolo começou após o último tubo de cada grupo ter sido recolhido ao longo de um tempo total de 2-3 minutos máximo. Para neutralizar o parâmetro relativo à qualidade da centrífuga, foi utilizada a mesma centrífuga científica, para todos os protocolos testados. Isso resultou em três tempos de coletas para cada paciente.

As membranas de PRF foram preparadas de acordo com um protocolo original (Dohan, 2006) e para também com duas alterações na RCF. Essa alteração resultou em um protocolo com o dobro da RCF original e outro protocolo com metade da RCF original. Em todos os protocolos testados o tempo de centrifugação foi constante (Figura 1).

Figura 1 - Captação das membranas dentro da capela de fluxo laminar.



Fonte: Autores.

Os protocolos utilizados foram:

- 1) **L-PRF**: PRF padrão (protocolo original, DOHAN, 2006) - Tubo de plástico revestido de vidro estéril (10 mL; Força de 400g, durante 12 min);
- 2) **APRF+**: PRF- RCF alto. Tubo de plástico revestido de vidro estéril (10 ml, Força de 800 g; durante 12 min);
- 3) **A-PRF**: PRF- RCF baixo. Tubo de plástico revestido de vidro estéril (10 ml, Força de 200 g; durante 12 min).

Após centrifugação, os coágulos/membranas foram cuidadosamente recuperados a partir dos tubos. A fração de células vermelhas do sangue foi removida de tal modo que a parte do coágulo rico em fibrina não seja fosse danificada. Esta técnica é descrita detalhadamente no protocolo desenvolvido por Dohan, 2006.

2.2 Quantificação de Proteínas com ELISA

Para determinar a quantidade de fatores de crescimento libertados a partir de L-PRF, APRF+ e A-PRF aos 15 min, 1 dia, 3 dias e 7 dias, as amostras foram colocadas num agitador incubadora a 36°C para permitir a libertação do fator de crescimento no meio de cultura. Em cada ponto de tempo, os 5 ml de meio de cultura foram recolhidos, congelados e substituídos por 5 ml de meios de cultura adicionais. A quantificação de proteínas foi realizada utilizando o método ELISA.

Nos pontos de tempo desejados, FGF (DY252, gama = 16,38-4000 pg/ml), TGF-p1 (DY240, gama = 31,20-2000 pg / ml), VEGF (DY293B, gama = 15,6-1000 pg / ml), EGF (DY236, gama = 3,91- 250 pg / ml) e IGF-1 (DY291, Intervalo = 31,20-2000 pg / ml) foram quantificados utilizando um kit ELISA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) de acordo com o protocolo do fabricante.

2.3 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando Prism Versão 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, La Jolla, EUA). Inicialmente os dados foram analisados descritivamente. Para as variáveis categóricas foram apresentadas frequências absolutas e relativas e para as variáveis numéricas, medidas-resumo (média, desvio padrão, mediana, mínimo e máximo).

As comparações de médias foram realizadas utilizando-se o teste não paramétrico de Friedman. Em se verificando diferenças de médias, os grupos de médias distintos foram identificados via comparações múltiplas de Dunn-Bonferroni para se manter o nível de significância global.

Para todos os testes estatísticos foram utilizados um nível de significância de 5%. As análises foram realizadas utilizando-se o pacote estatístico SPSS 20.0 e STATA 17.

3. Resultados

3.1 Características demográficas das amostras avaliadas

Foram avaliadas as informações de 6 pacientes, cuja média das idades foi de 36,8 anos (DP= 7,1 anos), sendo observada uma idade mínima de 27 anos e máxima de 45 anos. Desses pacientes, 66,7% eram do sexo feminino. Todos os indivíduos incluídos nesses estudos eram sistemicamente saudáveis.

3.2 Comparação da variação de tempo de incubação nos diferentes RCF, por fator de crescimento avaliado

Conforme Tabela 1, verificaram-se diferenças de médias entre tempos de incubação para EGF submetidas às forças 200G (p=0,042), 400G (p=0,011), 800G (p=0,029); TGFA submetidas às forças 200G (p<0,001), 400G (p=0,001), 800G (p<0,001) e VEGF submetidas às forças 200G (p=0,001), 400G (p<0,001), 800G (p=0,001). Já para FGF e IGF1, não se verificaram diferenças de médias entre tempos de incubação independentemente das forças de centrifugação.

Tabela 1 - Medidas – resumo dos fatores de crescimento por tempo de incubação, segundo força de centrifugação.

	Tempo de incubação				p ^s	p ^t						
	15'	1 dia	3 dias	7 dias		15' x 1 dia	15' x 3 dias	15' x 7 dias	1 dia x 3 dias	1 dia x 7 dias	3 dias x 7 dias	
EGF (pg/mL)												
200G	1,05 ± 0,50	61,16 ± 8,11	24,80 ± 38,61	69,28 ± 16,77	0,042	0,025	1,000	0,044	0,265	1,000	0,442	
400G	0,00 ± 0,00	47,08 ± 9,41	22,86 ± 35,59	57,65 ± 10,59	0,011	0,344	0,705	0,007	1,000	1,000	0,561	
800G	0,00 ± 0,00	49,94 ± 15,55	24,90 ± 40,79	54,09 ± 10,29	0,029	0,152	1,000	0,044	1,000	1,000	1,000	
FGF (pg/mL)												
200G	0,00 ± 0,00	1,45 ± 3,55	0,00 ± 0,00	0,58 ± 1,42	0,572	-	-	-	-	-	-	
400G	0,97 ± 2,38	5,80 ± 6,03	2,95 ± 4,58	1,09 ± 2,66	0,434	-	-	-	-	-	-	
800G	4,49 ± 5,56	6,65 ± 6,03	3,22 ± 5,26	1,52 ± 3,72	0,158	-	-	-	-	-	-	
IGF1 (pg/mL)												
200G	0,87 ± 1,01	1,04 ± 0,92	0,82 ± 1,01	0,21 ± 0,50	0,233	-	-	-	-	-	-	
400G	0,66 ± 0,94	1,06 ± 1,25	0,96 ± 1,26	0,48 ± 1,17	0,372	-	-	-	-	-	-	
800G	1,33 ± 1,56	1,45 ± 1,70	1,17 ± 1,75	0,39 ± 0,43	0,756	-	-	-	-	-	-	
TGFa (pg/mL)												
200G	0,47 ± 1,16	4,19 ± 3,48	11,99 ± 7,29	24,89 ± 10,41	<0,001	1,000	0,044	<0,001	1,000	0,044	1,000	
400G	0,64 ± 1,58	5,37 ± 2,63	10,61 ± 4,14	22,71 ± 6,75	0,001	0,705	0,083	<0,001	1,000	0,083	0,705	
800G	0,89 ± 2,19	8,24 ± 5,03	16,44 ± 9,15	31,19 ± 12,20	<0,001	1,000	0,044	<0,001	1,000	0,044	1,000	
VEGF (pg/mL)												
200G	2,98 ± 7,30	80,16 ± 44,45	160,18 ± 63,44	259,65 ± 95,91	0,001	0,705	0,044	0,001	1,000	0,152	1,000	
400G	5,47 ± 9,61	71,11 ± 34,96	145,05 ± 69,72	262,22 ± 160,41	<0,001	1,000	0,044	<0,001	1,000	0,044	1,000	
800G	13,22 ± 16,93	76,96 ± 39,27	198,37 ± 105,04	337,50 ± 186,96	0,001	1,000	0,083	0,001	0,705	0,022	1,000	

p^s - nível descritivo do teste de Friedman. p^t - nível descritivo das comparações múltiplas de Dunn-Bonferro. Fonte: Autores.

Dessa forma, tem-se que:

- EGF – Sob a centrifugação a 200G, verificou-se que a média a 15 minutos foi inferior ao de 1 dia e 7 dias, similares entre si. Já para as centrifugações a 400G e 800G, observou-se que a média aos 15 minutos foi inferior ao de 7 dias, não se verificando diferenças de médias entre demais momentos de incubação;

- TGFa – Sob a centrifugação a 200G e 800G, observou-se que as médias a 15 minutos foram inferiores ao de 3 dias e 7 dias. Além disso, verificou-se que a média de 1 dia foi inferior ao de 7 dias. Já na condição de 400G, nota-se somente que a média de 15 minutos foi inferior ao de 7 dias;

- VEGF – Sob a centrifugação a 200G e 400G, observou-se que as médias a 15 minutos foram inferiores ao de 3 dias e 7 dias, não se verificando diferenças de médias entre esses dois momentos. Já na condição de 800G, nota-se que a média de 15 minutos foi inferior ao de 7 dias. Adicionalmente, para 400G e 800G, as médias de 1 dia foram inferiores aos de 7 dias.

3.3 Comparação da liberação dos fatores de crescimento nas variações de tempo de incubação entre os diferentes RCF

Conforme Tabela 3, verificaram-se diferenças de médias entre forças de centrifugação para EGF aos 15 minutos ($p=0,002$), 1 dia ($p=0,042$) e 7 dias ($p=0,009$) de incubação e para VEGF aos 15 minutos ($p=0,009$). Já para FGF, IGF1 e TGFa não se observaram diferenças de médias entre forças de centrifugação em todos os tempos de incubação.

Tabela 2 - Resumo dos fatores de crescimento por força de centrifugação, segundo tempo de incubação.

	Força da Centrifugação			p ^s	p ^t		
	200	400	800		200 x 400	200 x 800	400 x 800
EGF (pg/mL)							
15'	1,05 ± 0,50	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,002	0,028	0,028	1,000
1 dia	61,16 ± 8,11	47,08 ± 9,41	49,94 ± 15,55	0,042	0,021	0,043	1,000
3 dias	24,80 ± 38,61	22,86 ± 35,59	24,90 ± 40,79	0,368	-	-	-
7 dias	69,28 ± 16,77	57,65 ± 10,59	54,09 ± 10,29	0,009	0,021	0,012	1,000
FGF (pg/mL)							
15'	0,00 ± 0,00	0,97 ± 2,38	4,49 ± 5,56	0,061	-	-	-
1 dia	1,45 ± 3,55	5,80 ± 6,03	6,65 ± 6,03	0,179	-	-	-
3 dias	0,00 ± 0,00	2,95 ± 4,58	3,22 ± 5,26	0,273	-	-	-
7 dias	0,58 ± 1,42	1,09 ± 2,66	1,52 ± 3,72	0,867	-	-	-
IGF1 (pg/mL)							
15'	0,87 ± 1,01	0,66 ± 0,94	1,33 ± 1,56	0,311	-	-	-
1 dia	1,04 ± 0,92	1,06 ± 1,25	1,45 ± 1,70	0,174	-	-	-
3 dias	0,82 ± 1,01	0,96 ± 1,26	1,17 ± 1,75	0,717	-	-	-
7 dias	0,21 ± 0,50	0,48 ± 1,17	0,39 ± 0,43	0,761	-	-	-
TGFa (pg/mL)							
15'	0,47 ± 1,16	0,64 ± 1,58	0,89 ± 2,19	0,368	-	-	-
1 dia	4,19 ± 3,48	5,37 ± 2,63	8,24 ± 5,03	0,069	-	-	-
3 dias	11,99 ± 7,29	10,61 ± 4,14	16,44 ± 9,15	0,115	-	-	-
7 dias	24,89 ± 10,41	22,71 ± 6,75	31,19 ± 12,20	0,135	-	-	-
VEGF (pg/mL)							
15'	2,98 ± 7,30	5,47 ± 9,61	13,22 ± 16,93	0,009	1,000	0,028	0,250
1 dia	80,16 ± 44,45	71,11 ± 34,96	76,96 ± 39,27	0,607	-	-	-
3 dias	160,18 ± 63,44	145,05 ± 69,72	198,37 ± 105,04	0,513	-	-	-
7 dias	259,65 ± 95,91	262,22 ± 160,41	337,50 ± 186,96	0,846	-	-	-

p^s - nível descritivo do teste de Friedman. p^t - nível descritivo das comparações múltiplas de Dunn-Bonferroni. Fonte: Autores.

Dessa forma:

- EGF – Aos 15 minutos, 1 dia e 7 dias, verificou-se que as médias dessa citocina submetida a 200G foi superior aos de 400G e 800G, similares entre si;
- VEGF – Verificou-se diferenças de médias entre forças apenas aos 15 minutos – a média da citocina aos 200G foi inferior ao de 800G.

4. Discussão

As aplicações dos concentrados de plaquetas nas diversas áreas da Odontologia, tornaram-se uma prática comum devido ao seu potencial biológico quando se pretende melhorar os processos de reparação e regeneração tecidual. Essas aplicabilidades são dependentes das propriedades biológicas desse concentrado que, devido as variações na composição celular e na liberação de fatores, conseguem alcançar diferentes objetivos (Miron et al., 2017).

Isso é possível porque o componente celular obtido pode responder de maneira diferente sob estímulos diferentes, como por exemplo a variação de RCF a que é submetido. Sendo assim, forças mecânicas podem alterar mecanismos de produção molecular intracelular, aumentando ou diminuindo a liberação de moléculas. Esse processo é conhecido como mecanotransdução e descreve as alterações intracelulares que ocorrem em uma célula quando submetida a estímulos físicos (Janota et al., 2020). Tendo isso em mente, os estudos de obtenção do PRF têm sugerido modificações nos protocolos originais a fim de extrair os diferentes potenciais biológicos que esse material tem a oferecer (Ehrenfest et al., 2018).

O presente trabalho teve o objetivo de verificar as mudanças nesse potencial com a alteração RCF do protocolo original, e assim avaliar a eficácia dessa alteração na liberação de fatores de crescimento e se isso tem impacto durante a primeira semana após a aplicação do protocolo de obtenção do material.

Nesse estudo foi visto que todos os fatores de crescimento foram detectados nos diferentes dias e variações de RCF e alguns apresentaram diferenças entre as condições experimentadas.

O EGF é um fator com ação reepitelizante devido a estimulação de queratinócitos e também acelera a formação de tecido de granulação saudável, além de promover a substituição de tecido lesionado por tecido saudável (ZENG; HARRIS, 2014). Nesse trabalho foi observada uma diferença na liberação do EGF entre os tempos avaliados. A diferença ocorreu entre os primeiros 15 minutos e o sétimo dia em todas as variações de RCF, sendo observado um aumento durante o tempo, com o maior pico de liberação no último dia. Além disso, foi visto uma diferença entre os RCFs avaliados sendo o RCF baixo com maior detecção nos tempos 15 minutos, 1 dia e 7 dias.

O aumento do EGF ao longo do tempo também foi observado por Kobayashi et al. (2016b) com os maiores picos em 8 horas e um dia, entre os dez dias avaliados. Nesse trabalho também foi visto maior liberação de EGF na aplicação do protocolo A-PRF quando comparado a PRF e PRP. Esses achados indicaram que uma menor velocidade poderia ser mais vantajosa em relação a liberação de EGF, que ocorreria ao longo do tempo. Isso corrobora com os dados desse trabalho que indicam uma maior liberação de EGF em RCF baixo e com isso uma alta liberação do fator até o sétimo dia.

O FGF tem papel em diversos mecanismos celulares e está muito relacionado a ação dos fibroblastos. Ele estimula a migração, proliferação e sobrevivência das células no ferimento além de estimular a produção de matriz extracelular (XIE et al., 2020). No presente estudo não foram observadas diferenças estatísticas entre as condições experimentadas, mas observa-se uma tendência maior de liberação do fator quando se utiliza o RCF alto. Chatterjee e Debnath (2019) também não observaram diferenças estatísticas de liberação do FGF nos primeiros sete dias. Uma detecção significativamente maior só foi observada após o sétimo dia, se estendendo até o vigésimo terceiro dia. Provavelmente, a não observação de diferença nesse presente estudo seja devido a quantidade de dias analisados que não contemplaram os maiores valores de liberação.

Já o IGF é um fator que estimula o desenvolvimento tecidual por regular o sistema metabólico e mitogênico celular. Além disso, o IGF também estimula o crescimento e amadurecimento celular o que é benéfico para acelerar os processos de

reparação (Takahashi, 2019). Nesse trabalho não foram observadas diferenças significativas na detecção de IGF. Apesar disso é interessante salientar que, diferentemente dos outros fatores avaliados, o IGF apresenta uma alta detecção logo nos primeiros 15 minutos. Isso é observado até o sétimo dia, que apresenta uma redução em todos os protocolos. Esse perfil também foi observado por Schär et al. (2015b) onde o IGF teve o maior pico de detecção no primeiro momento de avaliação, 8 horas, e teve uma redução considerável no sétimo dia.

O TGF α é um fator de crescimento que se liga ao receptor de EGF e possui ação sinérgica com TGF β na migração, proliferação e diferenciação dos queratinócitos e na ativação dos macrófagos. O VEGF por sua vez é um fator de crescimento ligado a angiogênese que aumenta a oxigenação e nutrição local (Apte et al., 2019). Esses dois fatores apresentaram resultados similares nas condições aplicadas. Ambos não foram influenciados pela alteração de RCF, mas apresentaram diferenças significativas na detecção ao longo do tempo progressivamente. O aumento progressivo na detecção desses fatores até o sétimo dia também foi observada por Schär et al. (2015b), com uma redução nos dias seguintes.

Com esses resultados podemos inferir que as variações na RCF aplicadas nesse trabalho não alteraram de forma significativa a maioria dos fatores avaliados, com exceção do EGF. O EGF é um fator importante nas fases de reepitelização do tecido e conseqüentemente no processo de maturação, reparação e proteção da ferida. Com RCF mais baixo conseguimos obter maiores valores de EGF nas fases finais da cicatrização, sete dias, e isso pode ser muito vantajoso dependendo da localização, extensão e intensidade do ferimento. A maior disponibilidade de EGF poderia reduzir o tempo de cicatrização e reduzir a comorbidade do paciente, mas mais estudos são necessários para comprovar essa questão (Goodarzi et al., 2018).

Um outro ponto que podemos salientar é que existe uma vantagem no fato de não acontecer grandes variações nos outros fatores estudados. Com indicação precisa, podemos alterar o RCF para beneficiar a liberação de EGF sem que isso prejudique ou altere a liberação dos outros fatores de crescimento. Com isso podemos ajustar a aplicação desse concentrado com a liberação de EGF potencializada em situações nas quais a função desse fator é mais requisitada.

Os benefícios do uso de EGF em processos de cicatrização e reparo já foram descritos por alguns autores. Um desses exemplos foi a cicatrização de feridas por corte na pele, acelerada e associada a diminuição de comorbidades em pacientes com aplicação tópica de EGF. Outro exemplo interessante foi a aceleração do tratamento em pacientes com úlceras gástricas, o que mostra o seu potente papel na reepitelização. Nesse panorama, a engenharia tecidual tem usado substitutos de pele, compostos por matriz extracelular e células, que são enriquecidos com EGF para potencializar a epitelização de ferimentos em pacientes que sofreram queimaduras ou outros traumas na pele (Hardwicke et al., 2008).

A melhora na cicatrização de membranas também foi observada em membranas timpânicas. Nesse tipo de membrana, além da cicatrização a regeneração morfológica é necessária para restabelecer a função, e isso foi visto quando se utilizou aplicação de EGF em membranas danificadas (Lou, 2021).

Esses achados nos evidenciam que o EGF pode ser aliado importante nessas situações nas quais uma epitelização acelerada é desejada, como velamento de perfurações da membrana do seio maxilar, fechamentos de cirurgias de enxertos livres gengivais, tratamentos de feridas necróticas em complicações de preenchimentos faciais, feridas de pé de diabético, escaras, mas que são necessários novos estudos para comprovar sua efetividade.

5. Conclusão

Com os dados obtidos nesse trabalho podemos concluir que a variação da RCF para uma força G mais baixa, 200G, favorece a liberação de EGF. Além disso, o uso de 200G favorece a maior liberação de EGF em 15 minutos, 1 dia e 7 dias quando comparados ao protocolo padrão e de maior RCF. Podemos concluir também que essas variações não alteraram de forma significativa a liberação dos outros fatores de crescimento.

O método de utilização dos agregados plaquetários está cada vez mais estabelecido para permitir sua aplicação na área medica e odontológica, particularmente na dermatologia cosmética e harmonização orofacial. Entretanto, ainda são necessários futuros estudos a fim de alcançar melhores protocolos clínicos para obtenção de resultados superiores nos tratamentos.

Referências

- Apte, R. S., Chen, D. S., & Ferrara, N. (2019). VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development. *Cell*, 176(6), 1248–1264. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2019.01.021>
- Bastami, F., & Khojasteh, A. (2016). Use of Leukocyte-and Platelet-Rich Fibrin for Bone Regeneration: A Systematic Review. *Regeneration, Reconstruction & Restoration*, 1, 47. <https://doi.org/10.7508/rrr.2016.02.001>
- Bielecki, T., & M. Dohan Ehrenfest, D. (2012). Platelet-Rich Plasma (PRP) and Platelet-Rich Fibrin (PRF): Surgical Adjuvants, Preparations for In Situ Regenerative Medicine and Tools for Tissue Engineering. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 13(7), 1121–1130. <https://doi.org/10.2174/138920112800624292>
- Campos, J. H., & Souza, D. M. de. (2021). Plasma Rico em Plaquetas Otimizando o Rejuvenescimento Dérmico nos Procedimentos Estéticos. *Aesthetic Orofacial Science*, 2(2). <https://doi.org/10.51670/aos.v2i2.47>
- Costa, D. G., Silva, T. C. B., Costa, M. D. M. de A., Martins, V. da M. and Dietrich, L. (2021) “Fibrine rich in platelets”, *Research, Society and Development*, 10(6), p. e11510615520. doi: 10.33448/rsd-v10i6.1520.
- Chatterjee, A., & Debnath, K. (2019). Comparative evaluation of growth factors from platelet concentrates: An in vitro study. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 23(4), 322–328. https://doi.org/10.4103/JISP.JISP_678_18
- Choukroun, J., 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). <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2005.07.011>
- Dohan, D. M., Choukroun, J., Diss, A., Dohan, S. L., Dohan, A. J. J., Mouhyi, J., & Gogly, B. (2006a). Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part I: Technological concepts and evolution. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, 101(3). <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2005.07.008>
- Dohan, D. M., Choukroun, J., Diss, A., Dohan, S. L., Dohan, A. J. J., Mouhyi, J., & Gogly, B. (2006b). Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part II: Platelet-related biologic features. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, 101(3), e45–e50. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2005.07.009>
- Dohan Ehrenfest, D. M., Del Corso, M., Diss, A., Mouhyi, J., & Charrier, J.-B. (2010). Three-Dimensional Architecture and Cell Composition of a Choukroun’s Platelet-Rich Fibrin Clot and Membrane. *Journal of Periodontology*, 81(4), 546–555. <https://doi.org/10.1902/jop.2009.090531>
- Dohan Ehrenfest, D. M., Doglioli, P., de Peppo, G. M., Del Corso, M., & Charrier, J. B. (2010). Choukroun’s platelet-rich fibrin (PRF) stimulates in vitro proliferation and differentiation of human oral bone mesenchymal stem cell in a dose-dependent way. *Archives of Oral Biology*, 55(3), 185–194. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2010.01.004>
- 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). In *Trends in Biotechnology* (Vol. 27, Issue 3, pp. 158–167). Trends Biotechnol. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.11.009>
- 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>
- Estela, C. (2018). Metodologia Científica: Ciência, Ensino, Pesquisa. Editora Artes Médicas.
- 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>
- Ghanaati, S., Booms, P., Orłowska, 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. *Journal of Oral Implantology*, 40(6), 679–689. <https://doi.org/10.1563/aaid-joi-D-14-00138>
- Goodarzi, P., Falahzadeh, K., Nematizadeh, M., Farazandeh, P., Payab, M., Larijani, B., Tayanloo Beik, A., & Arjmand, B. (2018). Tissue Engineered Skin Substitutes. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1107, 143–188. https://doi.org/10.1007/5584_2018_226
- Hardwicke, J., Schmaljohann, D., Boyce, D., & Thomas, D. (2008). Epidermal growth factor therapy and wound healing--past, present and future perspectives. *The Surgeon : Journal of the Royal Colleges of Surgeons of Edinburgh and Ireland*, 6(3), 172–177. [https://doi.org/10.1016/S1479-666X\(08\)80114-X](https://doi.org/10.1016/S1479-666X(08)80114-X)
- Jahanbani, Y., Davaran, S., Ghahremani-Nasab, M., Aghebati-Maleki, L., & Yousefi, M. (2020). Scaffold-based tissue engineering approaches in treating infertility. *Life Sciences*, 240. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2019.117066>

- Janota, C. S., Calero-Cuenca, F. J., & Gomes, E. R. (2020). The role of the cell nucleus in mechanotransduction. *Current Opinion in Cell Biology*, 63, 204–211. <https://doi.org/10.1016/J.CEB.2020.03.001>
- Langer, R., & Vacanti, J. (2016). Advances in tissue engineering. *Journal of Pediatric Surgery*, 51(1), 8–12. <https://doi.org/10.1016/J.JPESUR.2015.10.022>
- Le, A. D. K., Enweze, L., DeBaun, M. R., & Dragoo, J. L. (2019). Platelet-Rich Plasma. In *Clinics in Sports Medicine* (Vol. 38, Issue 1, pp. 17–44). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.csm.2018.08.001>
- Litvinov, R. I., & Weisel, J. W. (2016). What Is the Biological and Clinical Relevance of Fibrin? *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 42(4), 333–343. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1571342>
- Lou, Z. (2021). Efeito do fator de crescimento epidérmico na pseudocicatrização de perfurações traumáticas da membrana timpânica. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, 87(1), 53–58. <https://doi.org/10.1016/J.BJORL.2019.06.011>
- Masaki, H., Okudera, T., Watanabe, 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>
- Miron, R. J., Zucchelli, G., Pikos, M. A., Salama, M., Lee, S., Guillemette, V., Fujioka-Kobayashi, M., Bishara, M., Zhang, Y., Wang, H. L., Chandad, F., Nacopoulos, C., Simonpieri, A., Aalam, A. A., Felice, P., Sammartino, G., Ghanaati, S., Hernandez, M. A., & Choukroun, J. (2017). Use of platelet-rich fibrin in regenerative dentistry: a systematic review. *Clinical Oral Investigations*, 21(6), 1913–1927. <https://doi.org/10.1007/S00784-017-2133-Z>
- Nobrega, R. M. V. da., Castro, I., & Bastos, B. (2022). Eficácia clínica do Concentrado- Plasma Rico em Fibrina (C-PRF) associado à vitamina C como bioestimulador. *Aesthetic Orofacial Science*, 3(1), 49-57. <https://doi.org/10.51670/aos.v3i1.79>
- Peck, M., Hiss, D., & Stephen, L. (2016). Factors affecting the preparation, constituents, and clinical efficacy of leukocyte- and platelet- rich fibrin (L-PRF). *SADJ: Journal of the South African Dental Association = Tydskrif van Die Suid-Afrikaanse Tandheelkundige Vereniging*, 71, 298–302.
- Reddy, L. V. K., Murugan, D., Mullick, M., Begum Moghal, E. T., & Sen, D. (2020). Recent Approaches for Angiogenesis in Search of Successful Tissue Engineering and Regeneration. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 15(2), 111–134. <https://doi.org/10.2174/1574888X14666191104151928>
- Schär, M. O., Diaz-Romero, J., Kohl, S., Zumstein, M. A., & Nestic, D. (2015a). Platelet-rich Concentrates Differentially Release Growth Factors and Induce Cell Migration In Vitro. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 473(5), 1635–1643. <https://doi.org/10.1007/s11999-015-4192-2>
- Schär, M. O., Diaz-Romero, J., Kohl, S., Zumstein, M. A., & Nestic, D. (2015b). Platelet-rich Concentrates Differentially Release Growth Factors and Induce Cell Migration In Vitro. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 473(5), 1635. <https://doi.org/10.1007/S11999-015-4192-2>
- Takahashi, S. I. (2019). IGF research 2016-2018. *Growth Hormone & IGF Research: Official Journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society*, 48–49, 65–69. <https://doi.org/10.1016/J.GHIR.2019.10.004>
- Wu, C. L., Lee, S. S., Tsai, C. H., Lu, K. H., Zhao, J. H., & Chang, Y. C. (2012). Platelet-rich fibrin increases cell attachment, proliferation and collagen-related protein expression of human osteoblasts. *Australian Dental Journal*, 57(2), 207–212. <https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2012.01686.x>
- Zeng, F., & Harris, R. C. (2014). Epidermal growth factor, from gene organization to bedside. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 28, 2–11. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCDB.2014.01.011>