



Obtenção de plasma rico em plaquetas: avaliação do efeito da centrifugação sobre a concentração de plaquetas através da comparação entre protocolos

Caroline Peres Klein^{1*}, Sandrine Comparsi Wagner² e Jefferson Braga da Silva³

Recebido: 05 de dezembro de 2010 Recebido após revisão: 03 de junho de 2011 Aceito: 11 de agosto de 2011
Disponível on-line em <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/1799>

RESUMO: (Obtenção de plasma rico em plaquetas: avaliação do efeito da centrifugação sobre a concentração de plaquetas através da comparação entre protocolos). Diferentes áreas das ciências da saúde buscam encontrar novas biotecnologias, a fim de empregá-las na bioengenharia tecidual. Nesse contexto, está inserido o plasma rico em plaquetas, que consiste em um pequeno volume de plasma contendo alta concentração de plaquetas, e se trata de um método potencial para fornecer um complexo de fatores de crescimento que favorecem o reparo de diferentes tecidos no âmbito da medicina regenerativa. O objetivo do estudo foi avaliar o efeito da centrifugação (velocidade x tempo) sobre a concentração de plaquetas, através da comparação de três diferentes protocolos de obtenção de plasma rico em plaquetas. Foi coletado sangue total em tubos contendo o anticoagulante ácido citrato dextrose (ACD) de dez indivíduos voluntários. O sangue foi separado em quatro alíquotas, destinadas ao processamento do plasma rico em plaquetas por três diferentes protocolos e à contagem basal de plaquetas. Todos os protocolos testados foram eficazes para concentrar as plaquetas em pelo menos três vezes mais do que os valores basais, porém não houve diferença estatisticamente significativa entre os resultados de concentração de plaquetas entre os protocolos por análise de variância ($p \leq 0,445$). A análise de regressão realizada foi capaz de prever as relações entre as variáveis com correlação positiva significativa entre o aumento do número de plaquetas. Os protocolos que utilizaram maior tempo de centrifugação obtiveram correlação positiva entre o número basal de plaquetas e o aumento do número de plaquetas após a obtenção do PRP.

Palavras-chave: concentrado de plaquetas, fatores de crescimento, reparo tecidual, engenharia de tecidos.

ABSTRACT: (Platelet-rich plasma: evaluation of centrifugation effect on platelet concentration and comparison of protocols). The most different areas of health sciences seek to find new biotechnologies, in order to use them in tissue bioengineering. In this context, is inserted the platelet-rich plasma, who consists in high platelet concentration in a small volume of plasma, which is a potential method to provide a complex of growth factors that leads to repair of different tissues in medicine regenerative. The aim of this study was to assess the centrifugation effect (spin x time) on the platelet concentration, through comparison of three different protocols for producing platelet-rich plasma. Whole blood was drawn into tubes containing acid citrate dextrose as anticoagulant from ten healthy volunteers. The blood was divided into four aliquots for producing platelet-rich plasma by three different protocols and baseline platelet counts. All the protocols used were effective to concentrate platelets at least three times more than baseline values, however there was no statistically significant difference in the results of platelet concentration between the protocols for analysis of variance ($p \leq 0,445$). Regression analysis performed was able to predict the relationships between variables with significant positive correlation between the increases in the number of platelets. Protocols that used longer centrifugation time had a positive correlation between the number of baseline platelets count and the increases in platelets count after obtaining PRP.

Key words: platelet concentrate, growth factors, tissue healing, tissue engineering.

INTRODUÇÃO

O plasma rico em plaquetas (PRP) consiste em um concentrado autólogo de plaquetas em um pequeno volume de plasma obtido através da centrifugação do sangue. A introdução do PRP como uma nova biotecnologia com possíveis efeitos terapêuticos deu-se a partir de estudos realizados por Marx *et al.* (1998), cuja proposta de trabalho foi justamente introduzir estudos com PRP e explorar seu potencial de aumentar a proporção de formação óssea.

Posteriormente, o interesse no uso clínico do PRP como biomaterial aumentou na medicina regenerativa,

visto sua capacidade de conduzir ao reparo dos mais diferentes tecidos. Entre as publicações descritas, encontram-se aplicações clínicas incluindo a cirurgia oral e maxilofacial (Marx *et al.* 1998, Anitua *et al.* 1999), periodontal (Ouyang & Qiao 2006, Sammartino *et al.* 2009, Yamamiya *et al.* 2008), cirurgia plástica estética (Cervelli *et al.* 2009), cirurgia ortopédica (Kon *et al.* 2009, Nin *et al.* 2009), lesões de pele (Kazakos *et al.* 2009, Tark *et al.* 2009), queimaduras (Malauskas *et al.* 2009), regeneração de unidades foliculares do couro cabeludo (Uebel *et al.* 2006), entre outras.

O potencial efeito do PRP na engenharia de tecidos é atribuído à sua capacidade de promover a regenera-

1. Graduanda de biomedicina da Universidade Feevale. Novo Hamburgo, RS, Brasil.

2. Professora Dra. da Universidade Feevale. Novo Hamburgo, RS, Brasil.

³ Livre-Docente, Coordenador do Laboratório de Habilidades Médicas e Pesquisa Cirúrgica da PUCRS e do Serviço de Cirurgia da Mão e Microcirurgia do Hospital São Lucas da PUCRS. Porto Alegre, RS, Brasil.

* Autor para contato. E-mail: carolpkl@gmail.com

ção de tecidos através da liberação de fatores de crescimento presentes nos alfa-grânulos plaquetários (Marx 2004). Esses grânulos são abundantes fontes de fatores como: 3 isômeros do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF-aa, PDGF-bb e PDGF-ab); dois isômeros do fator de crescimento transformador – beta (TGF-beta1 e TGF-beta2); fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e fator de crescimento epitelial (EGF) (Marx 2001, Marx *et al.* 1998, Ren *et al.* 2008, Rozman & Bolta 2007, Sanchez *et al.* 2003).

A secreção desses fatores inicia após a ativação plaquetária e está diretamente relacionada com a formação de um novo tecido e com a revascularização (Everts *et al.* 2006). Os fatores de crescimento exibem propriedades mitogênicas e quimiotáticas que disparam uma série de respostas biológicas, incluindo a promoção e modulação de funções celulares envolvendo a cicatrização e regeneração de tecidos moles e duros, e na melhora da proliferação celular (Arora *et al.* 2009, Marx *et al.* 1998).

A resposta celular ocorre quando a contagem de plaquetas atinge valores de quatro a cinco vezes maiores do que os níveis basais (Everts *et al.* 2006), cujos valores de referência para humanos variam entre 140.000/ μL a 400.000/ μL (Hoffbrand *et al.* 2008). Assim, a melhora no reparo de tecidos duros e tecidos moles é demonstrada quando a contagem de plaquetas alcança aproximadamente $1 \times 10^6/\mu\text{L}$. Da mesma forma, não é observada melhora adicional na terapêutica desses tecidos quando a contagem de plaquetas for superior a $1 \times 10^6/\mu\text{L}$ (Marx 2001, Weibrich *et al.* 2004).

Atualmente, inúmeros protocolos para preparar o PRP estão descritos embora não exista um protocolo padrão (Andrade *et al.* 2008, Borzini & Mazzucco 2007). Existem os protocolos propostos em kits comerciais desenvolvidos para o preparo do PRP, porém, a estes estão agregados custos dispendiosos (Weibrich *et al.* 2005, Mazzucco 2008); e existem também os protocolos realizados *in house*, com custos muito inferiores (Sonnleitner *et al.* 2000, Gonshor. 2002). Devido à inexistência de um protocolo padrão, torna-se de grande valia estudos que avaliem diferentes métodos. Portanto, o objetivo desta pesquisa foi avaliar o efeito da centrifugação sobre a concentração de plaquetas e comparar diferentes métodos para o preparo do PRP.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostra

O estudo foi realizado no Laboratório de Biomedicina da Universidade Feevale, onde em um mesmo dia,

foram recrutados para participar do estudo, dez indivíduos voluntários saudáveis, com idade entre 18 e 30 anos. Indivíduos fumantes, com qualquer tipo de doença sistêmica ou com história de terapia com anticoagulantes e imunossupressores foram excluídos do estudo. O estudo foi submetido à análise e aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa sob o protocolo de número 2.08.03.10.1828, e cada participante assinou um termo de consentimento livre e esclarecido.

A partir de cada indivíduo voluntário, foi coletado 20 mL de sangue total por punção da veia cubital mediana, distribuídos em tubos do tipo vacutainer contendo o anticoagulante ácido citrato dextrose (ACD-solution, Becton Dickinson, BD). Para cada doador, o volume total de sangue coletado, foi distribuído em quatro alíquotas: uma para a contagem basal de plaquetas e uma para cada um de três protocolos selecionados para comparação: P1, protocolo de Gonshor (2002); P2, protocolo de Sonnleitner *et al.* (2000); e P3, protocolo de Dugrillon *et al.* (2002).

Preparação do plasma rico em plaquetas

Para obter o PRP, o sangue total foi submetido a duas centrifugações com rotor angular (Excelsia™ II Centrifuge), seguindo orientações de processamento de cada um dos protocolos selecionados (Tab. 1). Todas as etapas de manipulação das amostras até a produção do PRP foram realizadas pelo mesmo operador.

Após a primeira centrifugação do sangue total, realizada conforme cada um dos protocolos, este ficou dividido em três fases conforme o gradiente de densidade de seus constituintes: a fase inferior representada pelas hemácias, a intermediária representada por uma fase esbranquiçada, também referida como zona de névoa (ZN), que contém as plaquetas e os leucócitos, e a superior representada pelo plasma. As frações correspondentes à ZN e ao plasma, juntamente com pequena fração de hemácias foram aspiradas com o auxílio de uma pipeta e transferidas para um tubo de ensaio. O volume restante contendo a maior parte das hemácias foi desprezado.

A partir da segunda centrifugação, conforme cada um dos protocolos, o plasma pobre em plaquetas (PPP) foi obtido, cerca de dois terços do plasma na região superior do tubo, e o concentrado de plaquetas junto com os leucócitos e algumas hemácias no fundo. O PPP foi desprezado; o volume que resultou no tubo (porção inferior do plasma, plaquetas, leucócitos e pequena porção de hemácias) foi homogeneizado, formando o PRP.

Contagem plaquetária

Foram utilizados 50 μL do sangue total e do plasma

Tabela 1. Descrição dos protocolos (P1, P2 e P3) de obtenção de plasma rico em plaquetas (PRP) discutidos neste trabalho.

Protocolos	Primeira centrifugação	Segunda centrifugação
P1 Gonshor (2002)	1226 RPM (160g) x 10min	1939 RPM (400g) x 10min
P2 Sonnleitner <i>et al.</i> (2000)	1226 RPM (160g) x 20min	1939 RPM (400g) x 15min
P3 Dugrillon <i>et al.</i> (2002)	1426 RPM (205g) x 20min	2817 RPM (800g) x 15min

rico em plaquetas obtido por cada um dos três protocolos de cada amostra foram utilizados para determinar a quantidade de plaquetas, utilizando um contador automatizado de células (KX-21 Sysmex).

Análise Estatística

Os dados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) e por análise de regressão para avaliar a relação entre as variáveis, por meio do R-Sq ajustado, que é a razão entre a soma dos quadrados entre grupos e a soma de quadrados total utilizando o software Minitab®. A significância foi determinada quando $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

O volume de sangue total em cada alíquota para a realização do protocolo foi entre 6 a 6,5 mL. A contagem basal de plaquetas no sangue total variou de 123 a 237 $\times 10^3/\mu\text{L}$ (média = $174,9 \times 10^3/\mu\text{L} \pm 34,30 \times 10^3/\mu\text{L}$). A contagem automatizada dos parâmetros hematológicos basais foi levemente subestimada com o uso do anticoagulante ACD-A comparado à contagem realizada com o sangue com EDTA, anticoagulante de rotina laboratorial (dados não mostrados). Em vista disso, o indivíduo com contagem plaquetária basal de $123 \times 10^3/\mu\text{L}$ foi incluído nesse estudo. O volume de PRP obtido após o processamento do sangue total foi de aproximadamente 650 μL , para cada um dos protocolos.

Os valores mínimos e máximos, a média, o desvio padrão e o coeficiente de variação da concentração de plaquetas, obtidos após o processo de obtenção de PRP por cada um dos protocolos, estão apresentados na tabela 2.

A comparação entre os diferentes protocolos por análise de variância não demonstrou diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,445$). A variação na porcentagem da concentração de plaquetas, descritas na tabela 3, após os processos de obtenção do PRP foi de $618 \pm 2\%$ para o P1, $733 \pm 2\%$ para o P2 e $668 \pm 2\%$ para o P3.

A análise de regressão foi realizada para verificar a relação linear entre a contagem de plaquetas encontrada em cada um dos protocolos em relação à contagem basal de plaquetas no sangue total. Os resultados do concentrado de plaquetas obtidos pelo P1 comparados aos do sangue total não demonstraram diferença significativamente estatística ($p \leq 0,458$) e o R-Sq (ajustado) de 0%, porém foi encontrada diferença significativa entre os resultados do concentrado de plaquetas obtidos pelo P2 e os do sangue total e entre os resultados de P3 e do sangue total, com $p \leq 0,021$, R-Sq (ajustado) de 44,7% e

$p \leq 0,025$, R-Sq (ajustado) de 42,4%, respectivamente. A análise de regressão foi capaz de prever as relações entre as variáveis com correlação significativa.

DISCUSSÃO

O uso do plasma rico em plaquetas em diversas especialidades cirúrgicas tem conduzido a melhoras nos resultados de reparação de tecidos lesados (Anitua *et al.* 2008, Hom *et al.* 2007, Weibrich *et al.* 2004, Yamamiya *et al.* 2008). No entanto, mesmo com o aumento na demanda para a aplicação do PRP em sítios lesados, ainda não se tem um método de obtenção padrão. Existem inúmeros estudos publicados oferecendo novas técnicas para produção de PRP (Dugrillon *et al.* 2002, Efeoglu *et al.* 2004, Landesberg *et al.* 2000, Lozada *et al.* 2001, Marlovits *et al.* 2004, Vendramin *et al.* 2009) e por esse motivo o presente estudo teve como objetivo comparar três diferentes protocolos. Os parâmetros analisados para que a concentração ideal terapêutica estabelecida por Marx (1998) de 1×10^6 plaquetas/ μL fosse alcançada foram referentes à centrifugação, quanto ao tempo e velocidade.

A relevância da atuação do PRP na bioengenharia é realçada pela capacidade de produção e liberação de fatores de crescimento pelas plaquetas (Marx 2004, Su *et al.* 2008, Weibrich *et al.* 2002, Weibrich *et al.* 2001). Esses fatores estão presentes no local onde existe uma lesão tecidual para atuar como moduladores dos eventos celulares, onde lhes são atribuídas funções de agentes antiinflamatórios, quimiotáticos e mitogênicos (Rozman *et al.* 2007, Sanchez *et al.* 2003, Werner & Grose 2003).

Essa resposta observada na presença de fatores de crescimento derivados de plaquetas também ocorre espontaneamente no organismo humano, onde quando um tecido é lesado, inicia uma cascata de eventos que inclui coagulação, inflamação, formação de um tecido novo e remodelamento desse tecido, que conduz pelo menos a uma reconstrução parcial da área lesada (Everts *et al.* 2006, Marx 2004). A ativação das plaquetas em resposta ao dano tecidual e vascular resulta na formação de um tampão plaquetário e coágulo sanguíneo para providenciar a hemostasia e secretar suas proteínas biologicamente bioativas (fatores de crescimento, quimiocinas, citocinas, proteínas adesivas) (Werner *et al.* 2003), porém a resposta espontânea é muito inferior àquela observada com o uso do PRP (Anitua *et al.* 2008, Ouyang *et al.* 2006, Radice *et al.* 2010). O potencial do PRP é o alto conteúdo de plaquetas em pequeno volume de

Tabela 2. Concentração de plaquetas após obtenção de plasma rico em plaquetas (PRP) segundo diferentes protocolos (P1, P2 e P3).

Protocolo	Valor mínimo (μL)	Valor máximo (μL)	Média \pm dp (μL)	Cv (%)
P1	643×10^3	1.816×10^3	$1.065 \times 10^3 \pm 384 \times 10^3$	36%
P2	673×10^3	1.853×10^3	$1.295 \times 10^3 \pm 451 \times 10^3$	35%
P3	655×10^3	1.773×10^3	$1.169 \times 10^3 \pm 352 \times 10^3$	30%

Abreviaturas: P1, protocolo segundo Gonshor (2002); P2, protocolo segundo Somleitner *et al.* (2000); P3, protocolo segundo Dugrillon *et al.* (2002); dp, desvio padrão; Cv, coeficiente de variação. $p = 0,445$.

Tabela 3. Concentração do número de plaquetas (%) nos diferentes protocolos (P1, P2 e P3).

	Valor mínimo	Valor máximo	Média ± dp
P1	325%	1014%	618% ± 2
P2	474%	1068%	733% ± 2
P3	467%	1022%	668% ± 2

Abreviaturas: P1, protocolo segundo Gonshor (2002); P2, protocolo segundo Sonnleitner *et al.* (2000); P3, protocolo segundo Dugrillon *et al.* (2002); dp, desvio padrão.

plasma, obtido de forma autóloga.

A concentração de plaquetas, a partir dos diferentes protocolos, foi modulada através da velocidade e tempo de centrifugação utilizado em cada um dos protocolos. Neste estudo, comparamos protocolos que diferem em velocidade de centrifugação (P1 = P2; P3) e tempo (P1; P2 = P3). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os resultados de concentração de plaquetas entre os protocolos por análise de variância e todos os protocolos testados foram eficazes para concentrar as plaquetas.

No entanto, para verificar a relação da concentração de plaquetas obtida no PRP a partir do sangue total, foi realizada uma análise de regressão linear que foi capaz de prever as relações entre as variáveis com correlação significativa. O P1 não demonstrou relação entre o número de plaquetas e o aumento na sua concentração após a execução do método (R-Sq ajustado = 0% e $p \leq 0,458$), desta forma pode-se dizer que não há associação significativa entre a contagem inicial de plaquetas e a contagem de plaquetas do PRP obtido. O P2 e P3 mostraram que existe associação significativa entre a contagem inicial de plaquetas e a contagem de plaquetas do PRP obtido (R-Sq ajustado = 44,7% e 42,4%, respectivamente).

Um fator considerado para a escolha dos protocolos a serem comparados foi que forças excessivas danificam as plaquetas (Andrade *et al.* 2008), portanto este estudo evitou utilizar protocolos com essa característica. Requisitos como a utilização da velocidade de centrifugação descrita em força de centrifugação relativa (força g), cuja notação é universal, devido ser a tradução da forma do rotor da centrífuga e tamanho (Marx 2000) foram levados em consideração para a escolha dos protocolos a fim de reproduzir o método de forma mais fidedigna.

CONCLUSÃO

A partir da análise de regressão foi possível perceber que o baixo tempo de centrifugação não foi capaz de produzir um concentrado plaquetário onde se pode estabelecer correlação do aumento no número de plaquetas a partir do número de plaquetas basal. Ao contrário, quando utilizado um tempo mais longo, existe correlação positiva entre a concentração de plaquetas no PRP a partir do número de plaquetas basal. As velocidades de centrifugação utilizadas (de 160g a 800g) mostraram ser suficientes para concentrar as plaquetas e então serem aplicadas na clínica.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, M. G., DE FREITAS BRANDAO, C. J., SA, C. N., DE BITTENCOURT, T. C. & SADIGURSKY, M. 2008. Evaluation of factors that can modify platelet-rich plasma properties. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 105(1): e5-e12.
- ANITUA, E., AGUIRRE, J. J., ALGORTA, J., AYERDI, E., CABEZAS, A. I., ORIVE, G. & ANDIA, I. 2008. Effectiveness of autologous preparation rich in growth factors for the treatment of chronic cutaneous ulcers. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 84(2): 415-421.
- ARORA, N. S., RAMANAYAKE, T., REN, Y. F. & ROMANOS, G. E. 2009. Platelet-rich plasma: a literature review. *Implant Dent*, 18(4): 303-310.
- BORZINI, P. & MAZZUCCO, L. 2007. Platelet-rich plasma (PRP) and platelet derivatives for topical therapy. What is true from the biologic view point? *ISBT Science Series*, 2: 272-281.
- CERVELLI, V., GENTILE, P., SCIOLI, M. G., GRIMALDI, M., CASCIANI, C. U., SPAGNOLI, L. G. & ORLANDI, A. 2009. Application of platelet-rich plasma in plastic surgery: clinical and in vitro evaluation. *Tissue Eng Part C Methods*, 15(4): 625-634.
- DUGRILLON, A., EICHLER, H., KERN, S. & KLUTER, H. 2002. Autologous concentrated platelet-rich plasma (cPRP) for local application in bone regeneration. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 31(6): 615-619.
- EFEOLU, C., AKCAY, Y. D. & ERTURK, S. 2004. A modified method for preparing platelet-rich plasma: an experimental study. *J Oral Maxillofac Surg*, 62(11): 1403-1407.
- EVERTS, P. A., KNAPE, J. T., WEIBRICH, G., SCHONBERGER, J. P., HOFFMANN, J., OVERDEVEST, E. P., BOX, H. A. & VAN ZUN-DERT, A. 2006. Platelet-rich plasma and platelet gel: a review. *J Extra Corpor Technol*, 38(2): 174-187.
- GONSHOR, A. 2002. Technique for producing platelet-rich plasma and platelet concentrate: background and process. *Int J Periodontics Restorative Dent*, 22(6): 547-557.
- HOFFBRAND, A. V., MOSS, P. A. H. & PETTIT, J. E. 2008. *Fundamentos em Hematologia*. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed. p.274 - 288.
- HOM, D. B., LINZIE, B. M. & HUANG, T. C. 2007. The healing effects of autologous platelet gel on acute human skin wounds. *Arch Facial Plast Surg*, 9(3): 174-183.
- KAZAKOS, K., LYRAS, D. N., VERETTAS, D., TILKERIDIS, K. & TRYFONIDIS, M. 2009. The use of autologous PRP gel as an aid in the management of acute trauma wounds. *Injury*, 40(8): 801-805.
- KON, E., BUDA, R., FILARDO, G., DI MARTINO, A., TIMONCINI, A., CENACCHI, A., FORNASARI, P. M., GIANNINI, S. & MARCACCI, M. 2009. Platelet-rich plasma: intra-articular knee injections produced favorable results on degenerative cartilage lesions. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 18(4): 472-479.
- LANDESBURG, R., ROY, M. & GLICKMAN, R. S. 2000. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. *J Oral Maxillofac Surg*, 58(3): 297-300; discussion 300-291.
- LOZADA, J. L., CAPLANIS, N., PROUSSAEFS, P., WILLARSEN, J. & KAMMEYER, G. 2001. Platelet-rich plasma application in sinus graft surgery: Part I-Background and processing techniques. *J Oral Implantol*, 27(1): 38-42.
- MARLOVITS, S., MOUSAVI, M., GABLER, C., ERDOS, J. & VECSEI, V. 2004. A new simplified technique for producing platelet-rich plasma: a short technical note. *Eur Spine J*, 13(Suppl 1): S102-106.

- MARX, R. E. 2000. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. *J Oral Maxillofac Surg*, 58(3): 300-301.
- MARX, R. E. 2001. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent*, 10(4): 225-228.
- MARX, R. E. 2004. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg*, 62(4): 489-496.
- MARX, R. E., CARLSON, E. R., EICHSTAEDT, R. M., SCHIMMELE, S. R., STRAUSS, J. E. & GEORGEFF, K. R. 1998. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 85(6): 638-646.
- MAZZUCCO, L., BALBO, V., CATTANA, E. & BORZINI, P. 2008. Platelet-rich plasma and platelet gel preparation using Plateletex. *Vox Sang*, 94(3): 202-208.
- NIN, J. R., GASQUE, G. M., AZCARATE, A. V., BEOLA, J. D. & GONZALEZ, M. H. 2009. Has platelet-rich plasma any role in anterior cruciate ligament allograft healing? *Arthroscopy*, 25(11): 1206-1213.
- OUYANG, X. Y. & QIAO, J. 2006. Effect of platelet-rich plasma in the treatment of periodontal intrabony defects in humans. *Chin Med J (Engl)*, 119(18): 1511-1521.
- RADICE, F., YANEZ, R., GUTIERREZ, V., ROSALES, J., PINEDO, M. & CODA, S. Comparison of magnetic resonance imaging findings in anterior cruciate ligament grafts with and without autologous platelet-derived growth factors. *Arthroscopy*, 26(1): 50-57.
- REN, Q., YE, S. & WHITEHEART, S. W. 2008. The platelet release reaction: just when you thought platelet secretion was simple. *Curr Opin Hematol*, 15(5): 537-541.
- ROZMAN, P. & BOLTA, Z. 2007. Use of platelet growth factors in treating wounds and soft-tissue injuries. *Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat*, 16(4): 156-165.
- SAMMARTINO, G., TIA, M., GENTILE, E., MARENZI, G. & CLAUDIO, P. P. 2009. Platelet-rich plasma and resorbable membrane for prevention of periodontal defects after deeply impacted lower third molar extraction. *J Oral Maxillofac Surg*, 67(11): 2369-2373.
- SANCHEZ, A. R., SHERIDAN, P. J. & KUPP, L. I. 2003. Is platelet-rich plasma the perfect enhancement factor? A current review. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 18(1): 93-103.
- SONNLEITNER, D., HUEMER, P. & SULLIVAN, D. Y. 2000. A simplified technique for producing platelet-rich plasma and platelet concentrate for intraoral bone grafting techniques: a technical note. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 15(6): 879-882.
- SU, C. Y., KUO, Y. P., NIEH, H. L., TSENG, Y. H. & BURNOUF, T. 2008. Quantitative assessment of the kinetics of growth factors release from platelet gel. *Transfusion*, 48(11): 2414-2420.
- TARK, K. C., CHUNG, S., LEE, S. B. & LEW, D. H. 2009. Crescent excision for minimizing operative scars in circular skin lesions. *Dermatol Surg*, 35(1): 124-126.
- UEBEL, C. O., SILVA, J. B., CANTARELLI, D. & MARTINS, P. 2006. The role of platelet plasma growth factors in male pattern baldness surgery. *Plast Reconstr Surg*, 118(6): 1458-1466; discussion 1467.
- VENDRAMIN, F. S., FRANCO, D. & FRANCO, T. R. 2009. Método de obtenção do gel de plasma rico em plaquetas autólogo. *Rev Bras Cir Plást*, 24(2): 212-218.
- WEIBRICH, G., KLEIS, W., HITZLER, W. & HAFNER, G. 2005. Comparison of the platelet concentrate collection system with the plasma-rich-in-growth-factors kit to produce platelet-rich plasma: a technical report. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 20(1): 118-23.
- WEIBRICH, G., HANSEN, T., KLEIS, W., BUCH, R. & HITZLER, W. E. 2004. Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone*, 34(4): 665-671.
- WEIBRICH, G., KLEIS, W. K., HAFNER, G. & HITZLER, W. E. 2002. Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count. *J Craniomaxillofac Surg*, 30(2): 97-102.
- WEIBRICH, G., KLEIS, W. K., KUNZ-KOSTOMANOLAKIS, M., LOOS, A. H. & WAGNER, W. 2001. Correlation of platelet concentration in platelet-rich plasma to the extraction method, age, sex, and platelet count of the donor. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 16(5): 693-699.
- WERNER, S. & GROSE, R. 2003. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev*, 83(3): 835-870.
- YAMAMIYA, K., OKUDA, K., KAWASE, T., HATA, K., WOLFF, L. F. & YOSHIE, H. 2008. Tissue-engineered cultured periosteum used with platelet-rich plasma and hydroxyapatite in treating human osseous defects. *J Periodontol*, 79(5): 811-818.