

La membrana L-PRF e suoi derivati utili nella chirurgia del *wound care*

Alessandro Crisci,¹⁻³ Carmela Rescigno,² Michela Crisci⁴

¹Unità di Dermochirurgia Trapianti Cutanei e Ferite Difficili, Ospedale Privato “Villa Fiorita”, Aversa (CE), Italia; ²Dipartimento di Medicina, Università di Salerno, Fisciano (SA), Italia; ³Istituto per gli Studi e la Cura dei Diabetici, Abetia, Casagiove (CE); ⁴Facoltà di Medicina e Chirurgia, Vasile Goldis Western University of Arad, Arad, Romania

RIASSUNTO

Il crescente settore multidisciplinare dell'ingegneria tissutale mira a rigenerare, migliorare o sostituire in modo prevedibile i tessuti danneggiati o mancanti per una varietà di condizioni causate da traumi, malattie e vecchiaia. Per garantire che i metodi per l'ingegneria tissutale siano ampiamente applicabili in ambito clinico, è necessario modificarli in modo da renderli prontamente disponibili e relativamente facili da usare nella routine clinica quotidiana. Pertanto, i passaggi tra la preparazione e l'applicazione devono essere ridotti al minimo e ottimizzati per renderli pratici e l'implementazione realistica. L'obiettivo generale di sviluppare concentrati piastrinici di origine naturale può essere prodotto vicino al paziente e accelerare il processo di impianto essendo finanziariamente realistico per il paziente e per il sistema sanitario. La fibrina ricca di piastrine (PRF) e i suoi derivati sono stati utilizzati in un'ampia varietà di campi medici per la rigenerazione dei tessuti molli. In conclusione, i risultati della presente revisione sistematica evidenziano gli effetti positivi del PRF sulla guarigione delle ferite dopo terapia rigenerativa per la gestione di vari difetti dei tessuti molli riscontrabili nel *wound care*.

INTRODUZIONE

Il campo multidisciplinare dell'ingegneria tissutale mira a riparare, rigenerare o ripristinare in modo prevedibile tessuti danneggiati e di supporto, tra cui cellule, tessuti e organi, a causa di un assortimento di condizioni biologiche, tra cui anomalie congenite, lesioni, malattie e/o invecchiamento.^{1,2} Durante la loro rigenerazione, un aspetto chiave riguarda la crescita di una fonte vascolare che è in grado di supportare la funzione cellulare e lo svi-

luppo futuro dei tessuti mediante il mantenimento di uno scambio vitale di nutrienti attraverso i vasi sanguigni. Sebbene la maggior parte degli *scaffolds* di ingegneria tissutale siano di natura avascolare, rimane essenziale che tutte le strategie rigenerative si concentrino sullo sviluppo di una rete vascolare per ottenere esiti clinici positivi e rigenerazione sia sui tessuti molli che duri.³ La guarigione delle ferite comporta una cascata di eventi complessi, ordinati ed elaborati che coinvolgono molti tipi cellulari guidati dal rilascio di mediatori solubili e segnali che sono in grado di influenzare il ritorno delle cellule circolanti ai tessuti danneggiati. Le piastrine si sono dimostrate cellule importanti che regolano la fase di emostasi attraverso l'obliterazione vascolare e la facilitazione della formazione di coaguli di fibrina. E' noto che sono responsabili dell'attivazione e del rilascio di importanti biomolecole, incluse proteine piastriniche specifiche, fattori di crescita incluso il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF), i fattori della coagulazione, molecole di adesione, citochine/chemiochine e fattori angiogenici che sono in grado di stimolare la proliferazione e l'attivazione delle cellule coinvolte nella guarigione delle ferite, compresi i fibroblasti, i neutrofilii, i macrofagi e le cellule staminali mesenchimali. Nonostante l'uso diffuso di concentrati piastrinici (HPC) (Figura 1) come il plasma ricco di piastrine, uno degli inconvenienti riportati è l'uso di fattori anticoagulazione che ritardano i normali eventi di ferita.^{4,5} A causa di queste limitazioni, ulteriori ricerche sono state concentrate sullo sviluppo di un concentrato piastrinico di seconda generazione senza utilizzare fattori anticoagulazione. Come tale, un concentrato piastrinico privo di fattori di coagulazione, successivamente definito fibrina ricca di piastrine (PRF), è stato sviluppato a causa delle sue proprietà di anticipare la rigenerazione dei tes-

Corrispondenza: Alessandro Crisci, Unità di Dermochirurgia Trapianti Cutanei e Ferite Difficili, Ospedale Privato “Villa Fiorita”, 81031 Aversa (CE), Italia.
E-mail: alessandrocrisci@libero.it

Key words: Fattori di crescita; Fibrina ricca di leucociti e piastrine; Fibrina ricca di piastrine iniettabili; Cellule staminali.

Contributi: gli autori hanno contribuito equamente.

Conflitto d'interesse: gli autori dichiarano l'assenza di conflitto d'interesse.

Fondi: nessuno.

Ricevuto per la pubblicazione: 4 Dicembre 2018.
Accettato per la pubblicazione: 21 Gennaio 2019.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution Non-Commercial 4.0 License (CC BY-NC 4.0).

©Copyright A. Crisci et al., 2019
Licensee PAGEPress, Italy
Italian Journal of Wound Care 2019; 3(1):19-26
doi:10.4081/ijwc.2019.46

suti e la guarigione delle ferite. Questo *scaffold* di fibrina, che non possiede alcun potenziale citotossico, è ottenuto da 9 ml di sangue del paziente dopo 1 fase di centrifugazione e contiene una varietà di cellule del sangue – incluse piastrine, linfociti B e T, monociti, cellule staminali e granulociti neutrofili – oltre a fattori di crescita. L-PRF (anche chiamato leucociti-PRF), inoltre, contiene globuli bianchi, cellule necessarie che sono importanti durante il processo di guarigione della ferita.⁶ Inoltre, poiché i globuli bianchi, inclusi neutrofili e macrofagi, sono tra i primi tipi di cellule presenti nei siti di ferita, il loro ruolo include anche frammenti fagocitari, microbi e tessuto necrotico, prevenendo così l'infezione. I macrofagi sono anche le cellule chiave derivate dalla linea mieloide e sono considerati una delle cellule chiave implicate nella secrezione del fattore di crescita durante la guarigione delle ferite, compresi il fattore di crescita trasformante beta (TGF- β), PDGF e il fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF) (Figura 2). Queste cellule, insieme ai neutrofili e alle piastrine, sono attori chiave nella guarigione delle ferite e in

combinazione con i loro fattori di crescita/citochine secrete sono in grado di facilitare la rigenerazione dei tessuti, la formazione di nuovi vasi sanguigni (angiogenesi) e la prevenzione delle infezioni.

Nel 2008, Lundquist⁷ è stato uno dei primi a valutare

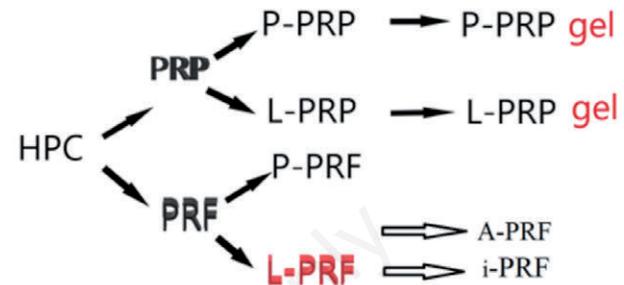


Figura 1. Concentrati piastrinici (HPC). PRP, plasma ricco di piastrine; PRF, fibrina ricca di piastrine.

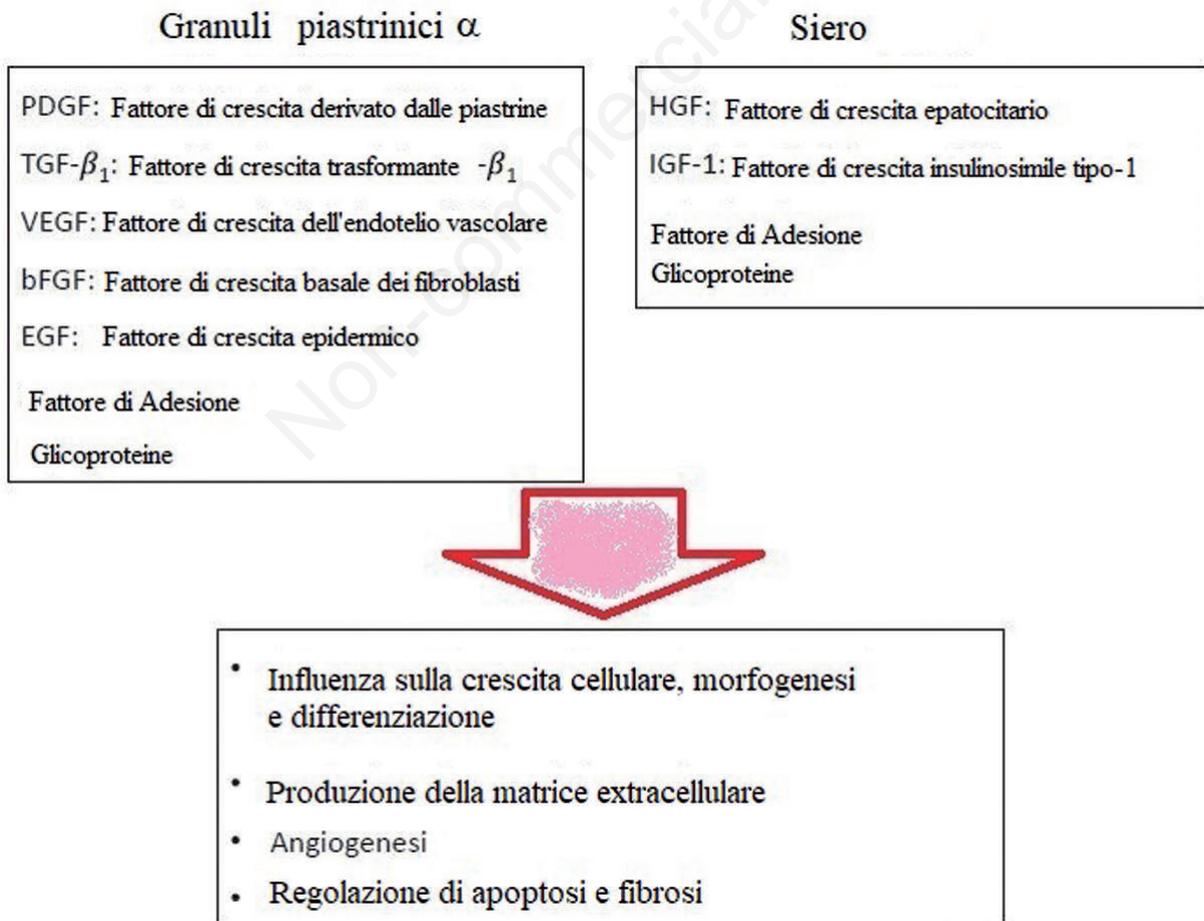


Figura 2. Funzione delle piastrine nella guarigione delle ferite.

gli effetti di PRF sui fibroblasti di derma umano. Si è constatato che l'effetto proliferativo di PRF sui fibroblasti dermici è stato in maniera significativa maggiore della colla di fibrina e del PDGF-BB ricombinante. Inoltre, la PRF induce il rilascio rapido di collagene 1 e il rilascio prolungato e la protezione contro la degradazione proteolitica dei fattori fibrogenici endogeni che è importante per la guarigione delle ferite. In un secondo studio *in vitro* condotto da Lundquist *et al.* nel 2013,⁸ la PRF ha indotto l'effetto mitogeno e migratorio sui fibroblasti dermici umani in coltura e ha inoltre dimostrato che i fibrociti (un tipo di cellula importante per la guarigione delle ferite acute) potrebbero essere coltivati all'interno di dischi di PRF, favorendo ulteriormente la guarigione delle ferite e la rigenerazione dei tessuti molli. Successivamente, Clipet *et al.*⁹ hanno trovato che PRF induce la sopravvivenza e la proliferazione dei fibroblasti e dei cheratinociti. È stato scoperto che la PRF induce la mitogenesi delle cellule endoteliali attraverso la via extracellulare di attivazione della chinasi regolata dal segnale. È stato osservato un rilascio lento e costante di fattori di crescita dalla matrice PRF che rilascia VEGF, un noto fattore di crescita responsabile della risposta mitogenetica endoteliale.

LA L-PRF E I SUOI DERIVATI NELLA GUARIGIONE DELLE ULCERE CRONICHE DELLE FERITE

L-PRF

Nella sezione longitudinale del coagulo L-PRF, prodotto secondo il protocollo standard di centrifugazione (30" di accelerazione, 2' a 2700 rpm, 4' a 2400 rpm, 3' a 3000 rpm, e 36" di decelerazione e arresto),⁴ è presente un denso coagulo di fibrina con uno spazio interfibre minimo. Le cellule sono osservate in tutto il coagulo, anche se in diminuzione verso le parti più distali del coagulo PRF (Figura 3).

Advanced-PRF

I coaguli di PRF formati con il protocollo di centrifugazione Advanced-PRF (A-PRF) (1500 rpm, 14 minuti)¹⁰ hanno mostrato una struttura più libera con più spazio interfibre e più cellule possono essere contate nel coagulo ricco di fibrina. Inoltre, le cellule sono distribuite più uniformemente nel coagulo rispetto a L-PRF, e alcune cellule possono essere trovate anche nelle parti più distali del coagulo. Un'immagine rappresentativa per la distribuzione cellulare all'interno di A-PRF è riportata nella Figura 4.

Formulazione iniettabile di PRF

Lo sviluppo di una formulazione iniettabile di PRF (denominato i-PRF)^{11,12} (centrifugato a 700 rpm [60 g] per

3 minuti) è stato perseguito con l'obiettivo di consegnare ai medici un concentrato piastrinico facile da usare in formulazione liquida che può essere utilizzata da sola o combinata facilmente con vari biomateriali. Approfittando di velocità di centrifugazione più lenta e più breve, una maggiore presenza di cellule rigenerative con maggiori concentrazioni di fattori di crescita può essere osservato rispetto ad altre formulazioni di PRF utilizzando velocità di centrifugazione più elevate.

Ghanaati *et al.*¹⁰ hanno riferito che la velocità e il tempo non influenzano le concentrazioni di monociti e cellule staminali, ma influenzano le concentrazioni di piastrine e neutrofili. Di conseguenza, A-PRF contiene più piastrine, la maggior parte è stata trovata nella parte distale della membrana PRF e L-PRF includono più neutrofili. Questo tipo di concentrato ha il potenziale per migliorare l'angiogenesi esprimendo la matrice enzimatica metalloproteinasi-9. Pertanto, l'inclusione di neutrofili nel PRF potrebbe essere presa in considerazione se l'angiogenesi è di interesse.

Le analisi dello studio di Ghanaati *et al.*¹⁰ hanno rivelato anche, che le piastrine erano le uniche presenti in ciascuna area del coagulo fino a $87 \pm 13\%$ nel gruppo L-PRF e fino al $84 \pm 16\%$ nel gruppo A-PRF (Figura 4). Inoltre, i risultati hanno mostrato che i Linfociti T (L-PRF: $12 \pm 5\%$, A-PRF: $17 \pm 9\%$), i Linfociti B (L-PRF: $14 \pm 7\%$, A-PRF: $12 \pm 9\%$), Cellule Staminali positive al CD34 (L-PRF: $17 \pm 6\%$, A-PRF: $21 \pm 11\%$), e Monociti (L-PRF: $19 \pm 9\%$, A-PRF: $22 \pm 8\%$) non sono stati trovati oltre un certo punto al massimo del 30% della lunghezza totale del coagulo, poiché sono distribuiti in prossimità del BC generato dal processo di centrifugazione (Figura 4).

EFFETTO DEL PRF SUL RILASCIO DEI FATTORI DI CRESCITA

È stato a lungo osservato che il PRF rilascia una serie di fattori di crescita per il microambiente.

Il TGF- β ha una vasta efficacia di oltre 30 fattori noti come agenti di fibrosi, con TGF- β 1 che è il più descritto in letteratura. È un noto stimolatore della proliferazione di vari tipi di cellule mesenchimali, inclusi gli osteoblasti, costituisce l'agente fibrotico più potente tra tutte le citochine. Svolge un ruolo preminente nella sintesi della molecola della matrice come il collagene I e la fibronectina, sia dagli osteoblasti che dai fibroblasti. Sebbene i suoi meccanismi di regolazione siano particolarmente complessi, TGF- β 1 svolge un ruolo attivo nella guarigione delle ferite.

Il VEGF è il fattore di crescita più potente responsabile dell'angiogenesi dei tessuti. Ha potenti effetti sul rimodellamento del tessuto e l'incorporazione del VEGF da solo in vari biomateriali ossei ha dimostrato aumenti nella nuova formazione ossea, indicando in tal modo gli effetti rapidi e potenti di VEGF.

Il fattore di crescita simile all'insulina è un regolatore positivo di proliferazione e differenziazione per la maggior parte dei tipi di cellule mesenchimali, che agiscono anche come agenti di protezione cellulare. Sebbene queste citochine siano mediatori proliferativi cellulari, costituiscono anche l'asse principale della regolazione programmata della morte cellulare (apop-

tosì),¹³ inducendo segnali di sopravvivenza che proteggono le cellule da molti stimoli apoptotici. Bayer *et al.*¹⁴ hanno esplorato per la prima volta le proprietà contenute nel PRF che possono contribuire alle sue attività antinfiammatorie/antimicrobiche. Si è scoperto che nei cheratinociti umani, la PRF induceva l'espressione di hBD-2 (β -defensina 2).

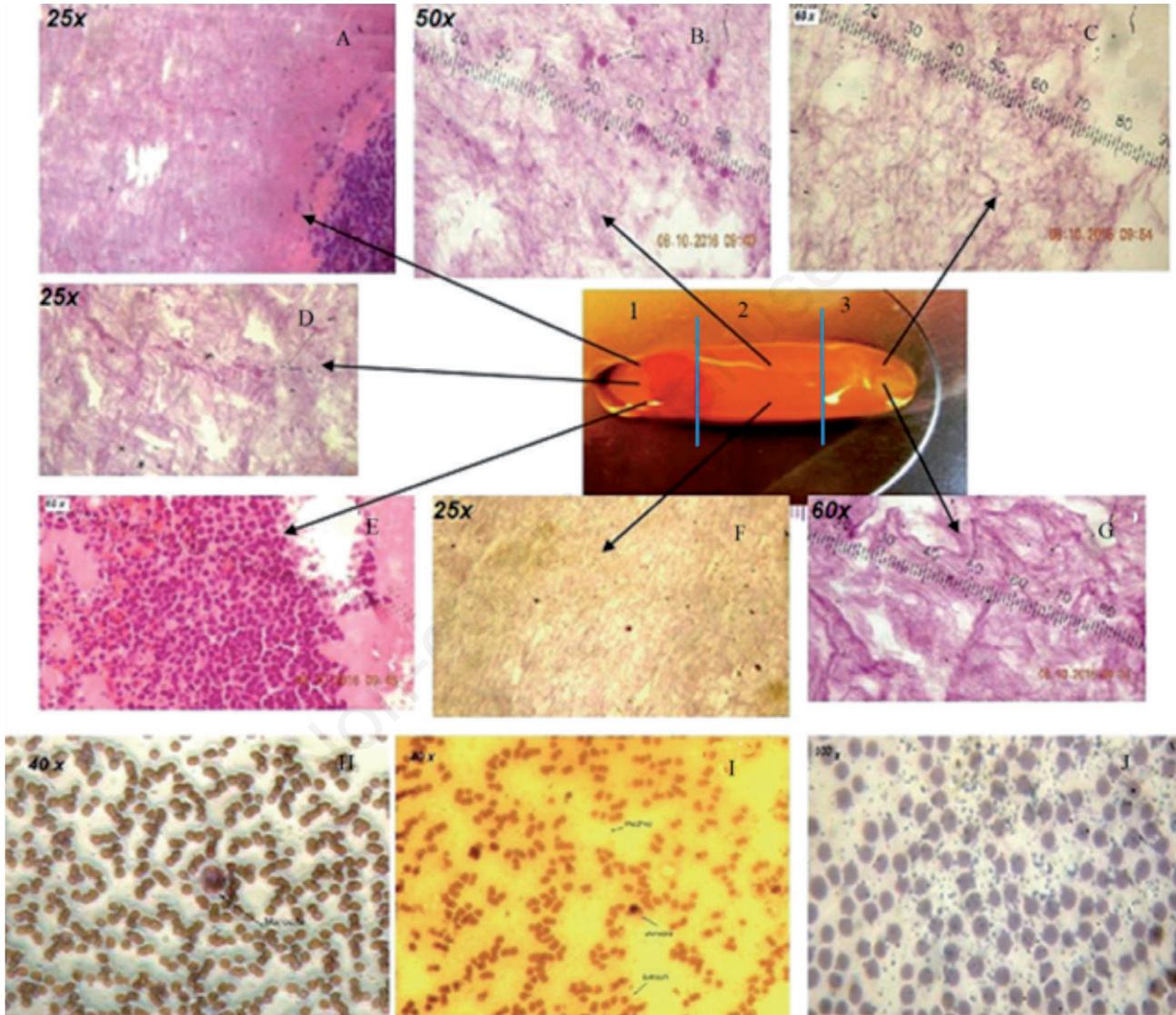


Figura 3. Membrana L-PRF di cavallo a 0 minuti dalla compressione (colorazione eosina-ematossilina). Gli strati L-PRF sono stati fissati in soluzione neutra tamponata di formalina al 10% a pH 7,2 per 48 ore e incorporata in paraffina secondo la procedura standard. Venti sezioni seriali (spessore 7 μ m) di ciascun campione sono stati tagliati usando un microtomo. A) III prossimale ingr. 25 \times globuli bianchi-reticolo di fibrina; B) III medio ingr. 60 \times eritrociti-reticolo di fibrina; C) III distale ingr. 60 \times reticolo di fibrina; D) III prossimale ingr. 25 \times eritrociti-fibrina; E) III prossimale ingr. 60 \times fibrina a dx, linfociti al centro, eritrociti e granulociti neutrofili a sx; F) III medio ingr. 25 \times reticolo di fibrina; G) III distale ingr. 60 \times reticolo di fibrina; H) striscio di coagulo rosso ingr. 40 \times presenza di monociti in un tappeto di eritrociti; I) striscio coagulo rosso ingr. 40 \times presenza di eritrociti, monociti e piastrine; J) striscio coagulo rosso ingr. 100 \times presenza di piastrine in un tappeto di eritrociti (colorazione May-Grunwald-Giemsa). *Reproduced from Crisci et al.,⁴ licensed under the terms of Creative Commons Attribution 4.0 International License.*

EFFETTI DEL PRF SULLA GUARIGIONE DELLE FERITE E DELL'ANGIOGENESI *IN VIVO*

Gli effetti del PRF sono stati in particolare studiati sulla guarigione delle ferite dei tessuti molli e sull'angiogenesi in vari modelli animali. In altre procedure mediche, l'uso del PRF è stato principalmente combinato per il successo nella gestione delle ulcere delle gambe difficili da guarire, comprese le ulcere del piede diabetico, le ulcere venose e le ulcere arteriopatiche delle gambe. Inoltre, il PRF è stato studiato per la gestione delle ulcere della mano e nei difetti dei tessuti molli.^{15,16}

ULTERIORI STUDI CLINICI RANDOMIZZATI

Uno dei vantaggi riportati dal PRF è la capacità della rete di fibrina di contenere i leucociti, di resistere e combattere le infezioni. Le ferite non cicatrizzate croniche rappresentano una sfida medica significativa e la patogenesi delle ferite non guarite richiede pertanto nuove opzioni terapeutiche per migliorare i risultati clinici. I macrofagi hanno dimostrato di essere attori chiave durante la rigenerazione tissutale, la guarigione delle ferite e la prevenzione delle infezioni. Inoltre, contengono effetti antimicrobici che sono in grado di ridurre la contaminazione batterica dopo gli interventi chirurgici.

DISCUSSIONE

Le capacità rigenerative del PRF e dei suoi derivati (A-PRF, i-PRF) (Figura 1) come coadiuvante chirurgico hanno ricevuto notevole attenzione sin dalla sua introduzione nei primi anni del nuovo millennio. Al contrario, non rimane alcuna prova chiara per chiarire il potenziale antimicrobico di questo particolare biomateriale che differisce sia strutturalmente che biologicamente da altre forme di HPC. Ghanaati *et al.*¹⁰ hanno descritto istologicamente A-PRFTM come matrice di cellule seminate su fibrina contenente una varietà di cellule del sangue compresi: piastrine, linfociti (B e T), monociti, cellule staminali e granulociti neutrofili in grado di rilasciare una serie di fattori di crescita.^{17,18} In teoria, i componenti biologici e i meccanismi fisiologici per esercitare attività antimicrobica sono simili all'interno di vari tipi di HPC e persino del sangue coagulato. Tuttavia, questi biomateriali autologhi si differenziano per quanto riguarda: i) il mix variabile di tipi di cellule; ii) la vitalità delle cellule contenute; iii) il loro modo di attivazione, naturale o chimico; iv) la densità della rete di fibrina; v) interazioni tra componenti cellulari ed extracellulari; vi) e il rilascio di una varietà di proteine. Queste differenze possono avere un impatto significativo sulle loro rispettive proprietà antinfiammatorie e antimicrobiche.¹⁹⁻²³ Inoltre, i meccanismi e le dinamiche dei singoli componenti antimicrobici contenuti in questi biomateriali sono scarsamente comprensibili.

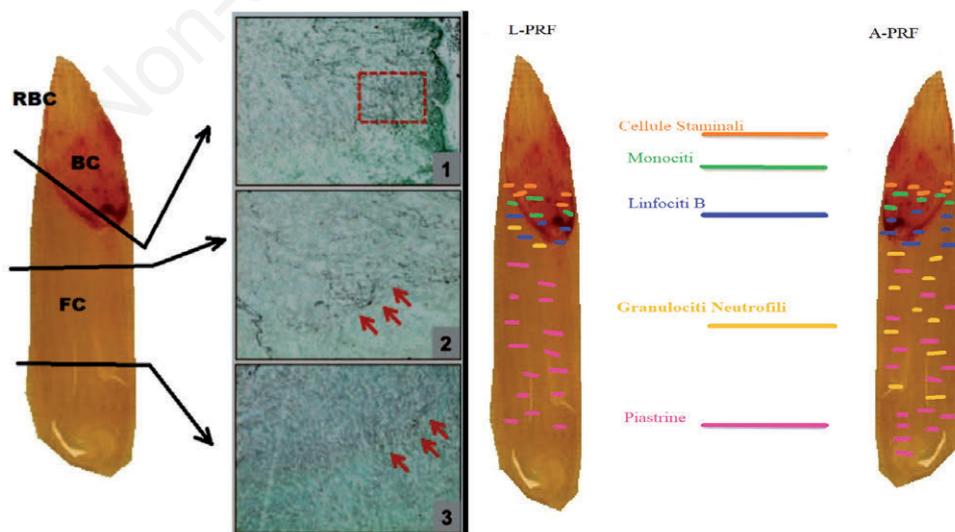


Figura 4. Advanced-PRF (A-PRF) scansione totale di un coagulo di fibrina lungo il suo asse longitudinale (colorazione di Masson-Goldner). RBC rappresenta la frazione di globuli rossi. Il *buffy coat* (BC) è la zona di trasformazione tra la frazione di RBC e il coagulo di fibrina e FC rappresenta il coagulo di fibrina. Le tre barre all'interno della scansione e le frecce mostrano i primi piani delle rispettive aree. Le frecce rosse contrassegnano le cellule che sono intrappolate all'interno della rete di fibrina.

A-PRF™ mostra l'attività antimicrobica contro tutti i singoli organismi testati all'interno di questo studio in un periodo di tempo di 24 ore. Questi risultati sono coerenti con quelli di precedenti studi che valutano le proprietà antimicrobiche di altri preparati di HPC.^{19-22,24} Poiché A-PRF™ mostra proprietà antimicrobiche è emersa la necessità di determinare se questa attività è significativamente maggiore di quella di un coagulo di sangue naturale. Sono necessarie indagini future per esplorare lo spettro antimicrobico di A-PRF™ ed esplorare la possibilità che possa agire come substrato per facilitare la crescita di organismi specifici.

Di particolare rilevanza per il chirurgo è che lo *Staphylococcus aureus* è una delle principali cause di infezioni acquisite ospedaliere, infezioni correlate a dispositivi medici interni e infezione di ferite chirurgiche.²⁵ Una ricerca significativa è focalizzata su strategie di trattamento alternative nelle infezioni guidate da *S. aureus* al fine di ridurre il rischio di sviluppare ceppi resistenti agli antibiotici.^{22,26} Per questo motivo *S. aureus* rimane l'organismo più frequentemente testato all'interno della letteratura esaminando l'attività antimicrobica di PC.¹⁹ Molte diverse preparazioni di HPC hanno dimostrato attività antimicrobica sia per ceppi meticillino-resistenti che meticillino-sensibili di *S. aureus*.^{19,22,24}

La *Candida albicans* è la più frequentemente isolata delle specie fungine all'interno del microbioma. La compromissione della risposta immunitaria di un individuo può consentire a questi funghi opportunistici di causare infezioni.^{27,28} A-PRF™ possiede una maggiore capacità di inibire costantemente la crescita di *C. albicans* rispetto a un coagulo di sangue normale. Inoltre *C. albicans* è meno suscettibile ai componenti antimicrobici delle piastrine e conferma le scoperte di Tang *et al.*²⁹ che hanno notato che i peptidi antimicrobici delle piastrine umane sono più potenti contro i batteri dei funghi.

A-PRF™ mostra un potenziale maggiore per inibire lo *Streptococcus mutans* rispetto a un coagulo di sangue naturale. Tuttavia, poiché nessun altro HPC è stato testato contro questo organismo, il meccanismo della sua inibizione e del potenziale clinico richiede ulteriori esplorazioni.

Limitazioni

Sebbene i risultati di molti studi indichino che A-PRF™ mostra un'attività antimicrobica, sono emerse diverse limitazioni. In primo luogo, l'indagine *in vitro* non imita una situazione clinica in cui A-PRF™ sarà collocato in un ambiente circondato da tessuti che rispondono a un evento chirurgico. In questo scenario, A-PRF™ può interagire con una serie di cellule e citochine coinvolte nel processo di guarigione delle ferite e modificare le iniziali risposte immunitarie e gli eventi di guarigione.^{12,20,30} Il rilascio di fattori di crescita da piastrine attivate all'interno della matrice di fibrina può anche modificare l'espressione di peptidi antimicrobici dai tessuti circostanti.¹⁴ È

possibile che numerosi fattori del paziente possano influenzare la qualità di A-PRF™. Yajamanya *et al.*³¹ hanno dimostrato che la matrice di fibrina formata dalla loro versione di PRF nei pazienti anziani era più genericamente organizzata rispetto alla matrice di fibrina dei soggetti più giovani. L'impatto di questa scoperta deve ancora essere determinato. Il tipo di cellula, il numero di cellule e la concentrazione dei componenti del plasma differiscono all'interno di ciascun coagulo e tra ciascun coagulo,^{10,32} ciascun disco campione non può essere identico all'altro. Un problema da definire è che non si è ancora in grado di determinare se il materiale testato è battericida o batteriostatico. Indipendentemente da questi inconvenienti, il metodo di diffusione del disco è stato sufficiente a dimostrare che A-PRF™ mostra attività antimicrobica.

CONCLUSIONI

Molto poco è noto ancora circa le proprietà antibatteriche del PRF e dei suoi derivati (A-PRF, i-PRF) e molto pochi studi hanno indagato su questo fenomeno. Da un punto di vista dell'ingegneria dei tessuti, rimane interessante notare che finora nessuna ricerca si è concentrata sulla forza, rigidità o resistenza del PRF nonostante il suo uso clinico per oltre 15 anni. Pertanto, rimane l'interesse per caratterizzare meglio le sue proprietà di biomateriale e la ricerca futura dovrebbe concentrarsi su quali fattori potrebbero ulteriormente migliorare le sue caratteristiche per varie applicazioni biomediche. È fondamentale che la prossima ondata di ricerca che utilizza il PRF come coadiuvante delle terapie rigenerative dei tessuti molli elabori studi appropriati con i controlli necessari per valutare ulteriormente il potenziale rigenerativo del PRF per la guarigione delle ferite dei tessuti molli.

L'uso di A-PRF™ nella pratica clinica ha mostrato un grande potenziale per migliorare la guarigione e migliorare gli esiti chirurgici poiché funge da *scaffold* autologo che ospita cellule e composti bioattivi.^{12,33-35} Tuttavia, il potenziale antimicrobico del materiale è stato dimostrato e può essere un'importante proprietà che contribuisce agli eventi di guarigione accelerati e non complicati rilevati clinicamente. I risultati di questa revisione indicano che A-PRF™ mostra tuttavia un'attività antimicrobica contro lo *S. aureus*, lo *S. mutans*, l'*Enterococcus faecalis* e la *C. albicans*. Inoltre, lo spettro e la potenza come agente antimicrobico sono di gran lunga inferiori a quelli di un antimicrobico chirurgico stabilizzato (antibiotico specifico). Sono necessarie quindi indagini future che coinvolgono A-PRF™ per determinare l'intero spettro della sua attività antimicrobica *in vitro*, la sua partecipazione *in vivo* e l'influenza delle caratteristiche del paziente sulla sua attività biologica. Inoltre, dovrebbe essere esplorato il suo potenziale clinico come veicolo per la somministrazione locale di farmaci all'interno di siti infetti.¹⁹ Gli studi futuri dovrebbero aumentare sia la varia-

zione dei pazienti che le dimensioni dei campioni per tutti gli studi futuri basati su HPC.

BIBLIOGRAFIA

1. Crisci A. Le membrane L-PRF utili in chirurgia. *J Plast Dermatol* 2015;2:75-90.
2. Crisci A, Placido F, Crisci M, Bosco A. A new instrument aid of plastic surgeon: membranes L-PRF (Platelet-Rich-Fibrin). *Update Plast Surg* 2015;3:162-72.
3. Crisci A, Serra E, Cardillo F, Crisci M. Selezione di un modello animale pertinente per la prova degli effetti in vitro della fibrina ricca di leucociti e piastrine di Choukroun (L-PRF equino). Nota su un protocollo standardizzato proposto per l'uso clinico e l'uso di L-PRF Wound Box®. *V.P.E.* 2017;1:41-50.
4. Crisci A, Lombardi D, Serra E, et al. Standardized protocol proposed for clinical use of L-PRF and the use of L-PRF Wound Box®. *J Unexplored Med Data* 2017;2:77-87.
5. Marotta G, Licito A, Serra E, et al. Evaluation of genotyping methods and costs for IL1a polymorphisms in Platelet Rich-Plasma (PRP); viewpoint for therapy on the diabetic foot ulcers. *Eur Rev Med Pharmac Sci* 2018;22:575-7.
6. Crisci A, Benincasa G, Crisci M, Crisci F. Leukocyte Platelet-Rich Fibrin (L-PRF), a new biomembrane useful in tissue repair: basic science and literature review. *Biointerface Res Appl Chem* 2018;8:3635-43.
7. Lundquist R, Dziegiel MH, Agren MS. Bioactivity and stability of endogenous fibrogenic factors in platelet-rich fibrin. *Wound Repair Regen* 2008;16:356.
8. Lundquist R, Holmström K, Clausen C, et al. Characteristics of an autologous leukocyte and platelet-rich fibrin patch intended for the treatment of recalcitrant wounds. *Wound Repair Regen* 2013;21:66-76.
9. Clipet F, Tricot S, Alno N, et al. In vitro effects of Choukroun's platelet-rich fibrin conditioned medium on 3 different cell lines implicated in dental implantology. *Implant Dent* 2012;21:51-6.
10. Ghanaati S, Booms P, Orlowska A, et al. Advanced Platelet-Rich Fibrin: a new concept for cell-based tissue engineering by means of inflammatory cells. *J Oral Implantol* 2014;40:679-89.
11. Choukroun J. Advanced-PRF and i-PRF: platelet concentrates or blood concentrates? *J Periodont Med Clin Pract* 2014;1:1-3.
12. Miron RJ, Fujioka-Kobayashi M, Hernandez M, et al. Injectable platelet rich fibrin (i-PRF): opportunities in regenerative dentistry? *Clin Oral Invest* 2017;21:2619-27.
13. Crisci A, De Crescenzo U, Crisci M. Platelet-Rich Concentrates (L-PRF, PRP) in tissue regeneration: control of apoptosis and interactions with regenerative cells. *J Clin Mol Med* 2018;1:5-12.
14. Bayer A, Lammel J, Rademacher F, et al. Platelet-released growth factors induce the antimicrobial peptide human beta-defensin-2 in primary keratinocytes. *Exper Dermatol* 2016; 25:460-5.
15. Crisci A, Marotta G, Licito A, et al. Use of leukocyte platelet (L-PRF) rich fibrin in diabetic foot ulcer with osteomyelitis (three clinical cases report). *Diseases* 2018;6:30.
16. Crisci A, Marotta G, Benincasa G, Crisci M. L-PRF (fibrina ricca in leucociti e piastrine): uso in tre casi di ulcera diabetica con osteomielite cronica. *J AMD* 2018;21:197-203.
17. Kobayashi E, Flückiger L, Fujioka-Kobayashi M, et al. Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF. *Clin Oral Invest* 2016;20:2353-60.
18. Fujioka-Kobayashi M, Miron RJ, Hernandez M, et al. Optimized platelet-rich fibrin with the low-speed concept: growth factor release, biocompatibility, and cellular response. *J Periodontol.* 2016;88:112-21.
19. Del Fabbro M, Bortolin M, Taschieri S, et al. Antimicrobial properties of platelet-rich preparations. A systematic review of the current pre-clinical evidence. *Platelets* 2016;27: 276-85.
20. Burnouf T, Chou M-L, Wu U-W, et al. Antimicrobial activity of platelet (PLT)-poor plasma, PLT-rich plasma, PLT gel, and solvent/detergent-treated PLT lysate biomaterials against wound bacteria. *Transfusion* 2013;53:138-46.
21. Cieslik-Bielecka A, Dohan Ehrenfest DM, Lubkowska A, Bielecki T. Microbicidal properties of leukocyte- and platelet-rich plasma/fibrin (L-PRP/L-PRF): new perspectives. *J Biol Regul Homeost Agents* 2012;26:43-52.
22. Anitua E, Muruzabal F, Orive G. Antimicrobial properties of plasma rich in growth factors (PRGF-ENDOREST). In: Méndez-Vilas A, ed. *Science against microbial pathogens*. Formatex; 2011. pp 414-421.
23. Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol* 2009;27:1578-67.
24. Bielecki TM, Gazdzik TS, Arendt J, et al. Antibacterial effect of autologous platelet gel enriched with growth factors and other active substances: An in vitro study. *J Bone Joint Surg* 2007;89-B:417-20.
25. Zalavras CG, Patzakis MJ, Holton P. Local antibiotic therapy in the treatment of open fractures and osteomyelitis. *Clin Orthop* 2004;427:86-93.
26. Sause WE, Buckley PT, Strohl WR, et al. Antibody-Based biologics and their promise to combat staphylococcus aureus infections. *Trends Pharmacol Sci* 2016;37:231-41.
27. Jabra-Rizk MA, Kong EF, Tsui C, et al. *Candida albicans* pathogenesis: fitting within the host-microbe damage response framework. *Infect Immun* 2016;84:2724-39.
28. Marsh PD, Zaura E. Dental biofilm: ecological interactions in health and disease. *J Clin Periodontol* 2017;44:S12-22.
29. Tan Y-Q, Yeaman MR, Selsted ME. Antimicrobial Peptides from Human Platelets. *Infect Immun* 2002;70:6524-33.
30. El-Sharkawy H, Kantarci A, Deady J, et al. Platelet-rich plasma: Growth factors and pro- and anti-inflammatory properties. *J Periodontol* 2007;78:661-9.
31. Yajamanya SR, Chatterjee A, Babu CN, Karunanithi D. Fibrin network pattern changes of platelet-rich fibrin in young versus old age group of individuals: A cell block cytology study. *J Indian Soc Periodontol* 2016;20:151-6.
32. El Bagdadi K, Kubesch A, Yu X, et al. Reduction of relative centrifugal forces increases growth factor release within solid platelet-rich-fibrin (PRF)- based matrices: a proof of concept of LSCC (low speed centrifugation concept). *Eur J Trauma Emerg Surg* 2017; doi: 10.1007/s00068-017-0785-7. [Epub ahead of print]

33. 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* 2017;44: 225-34.
34. Moraschini V, dos Santos Porto Barboza E. Use of platelet-rich fibrin membrane in the treatment of gingival recession: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontol* 2016;87:281-90.
35. Del Corso M, Vervelle A, Simonpieri A, et al. Current Knowledge and Perspectives for the Use of Platelet-Rich Plasma (PRP) and Platelet-Rich Fibrin (PRF) in oral and maxillofacial surgery part 1: periodontal and dentoalveolar surgery. *Curr Pharmaceut Biotechnol* 2012;13:1207-30.

Non-commercial use only