

*Adrieli de Paula Neves*

***Avaliação da influência do plasma rico em  
plaquetas, da terapia com laser em baixa  
intensidade ou da associação de ambos na  
cicatrização de defeitos de fenestração  
periodontal em ratos. Estudo histoquímico e  
imunoistoquímico***

ARAÇATUBA - SP

2015

*Adrieli de Paula Neves*

***Avaliação da influência do plasma rico em  
plaquetas, da terapia com laser em baixa  
intensidade ou da associação de ambos na  
cicatrização de defeitos de fenestração  
periodontal em ratos. Estudo histoquímico e  
imunoistoquímico***

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba - UNESP, para a obtenção do Título de MESTRE EM ODONTOLOGIA (Área de Periodontia).

**Orientadora:** Professora Adjunto Maria José Hitomi Nagata

**Co-Orientadores:** Professor Titular Valdir Gouveia Garcia

Professor Assistente Dr. Edilson Ervolino

ARAÇATUBA - SP

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

N518a	<p>Neves, Adrieli de Paula. Avaliação da influência do plasma rico em plaquetas, da terapia com laser em baixa intensidade ou da associação de ambos na cicatrização de defeitos de fenestração periodontal em ratos : estudo histoquímico e imunoistoquímico / Adrieli de Paula Neves. - Araçatuba, 2015 84 f. : il. + 1 CD-ROM</p>
	<p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba Orientadora: Profa. Maria José Hitomi Nagata Coorientador: Prof. Valdir Gouveia Garcia Coorientador: Prof. Edilson Ervolino</p>
	<p>1. Plasma rico em plaquetas 2. Terapia a laser de baixa intensidade 3. Periodontia 4. Colágeno 5. Imuno-histoquímica 6. Ratos. I. T.</p>
	<p>Black D6 CDD 617.64</p>

## *Dados Curriculares*

---

### *Adrieli de Paula Neves*

Nascimento: 13.07.1991 – Colorado/PR

Filiação: Aparecido Neves da Silva  
Dejanira de Paula Bernardes da Silva

2009-2012: Curso de Graduação em Odontologia  
Faculdade de Odontologia de Presidente Prudente – Universidade do  
Oeste Paulista – UNOESTE

2013-2015: Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área  
de Periodontia – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita  
Filho” – UNESP

*Dedicat6ria*

## *A* Deus

Que com amor imensurável, desde o ventre da minha mãe, deu sentido a minha existência, me proporcionando desde muito pequena sentir Sua luz que me orienta! A Ti Deus que me inspira através do Espírito Santo a corrigir minhas falhas e persistir em minhas virtudes, e me fortaleceu para concluir esta fase da minha vida! A Ti meu Deus que nos momentos mais difíceis sempre me mostrou que a Tua graça nunca me levará até onde ela não possa me alcançar e que mesmo que eu não entenda, todas as coisas são propósitos Teus para que eu possa crescer! A vós Senhor que realiza grandes prodígios a meu favor e com Sua mão me fortalece quando eu me sinto fraco, me fazendo entender que tudo e todos foram feitos para a honra e glória de Deus! Ciente de todo esse amor Senhor, eu desejo imensamente nunca se desviar do seu caminho e sempre ser canal de graça na vida das outras pessoas! Graças te dou, ó Pai, Senhor dos céus e da terra, pois escondeste estas coisas dos sábios e cultos, e as revelaste aos pequeninos (Mateus 11,25). Muito obrigada meu Senhor, quero sempre a Tua Luz!

*"Fizeste-nos para Ti e inquieto está o nosso coração enquanto  
não repousar em Ti."*

*Santo Agostinho*

## *Aos* meus amados pais, **Dejanira e Aparecido**

*Mãe,*

Quero agradecer-lhe por mesmo sem entender, ter aceitado a minha escolha de realizar o mestrado, demonstrando seu grande amor por mim! Você sempre foi meu porto seguro, onde eu encontrei abrigo durante as tempestades desta vida, pois mais que mãe você é minha grande amiga. Obrigada pelas vezes, que mesmo sem ter palavras, você permaneceu no telefone comigo, só para me mostrar que estava ali do meu lado em qualquer situação! Obrigada por nos dias mais difíceis, mais que em palavras, mas sim em ações ser um exemplo de pessoa que confia em Deus! Te Amo Mãe!

*Pai,*

Muito obrigada por ser um exemplo de pessoa batalhadora, que nunca nos permitiu faltar nada! Você nos ensinou com suas ações as coisas mais importantes da vida, sempre foi modelo de administrador, e de pessoa honesta! Muito obrigada por me acompanhar em cada passo da minha vida, sempre me direcionando palavras de orientação, que me ajudaram a nortear minhas escolhas. Te amo Pai!

*“São sábios os pais que conhecem seu próprio filho, mas um filho é mais sábio ainda, por amá-los verdadeiramente...”*

*Autor desconhecido*

## *A* minha amada irmã **Débora**

Desde criança você sempre foi minha companheira nos momentos divertidos e difíceis! Você sempre esteve muito interligada a mim através da nossa fé em Deus, que nos fez perseverar em nossas batalhas pessoais e profissionais para alcançar com êxito nossas metas! Você é um exemplo de pessoa comprometida com tudo que faz, e por isso merecedora de todas as bênçãos que Deus te concede! Você esteve com nossa família quando eu não pude estar, e por isso sou muito grata a você! Meu coração se alegra por ter uma irmã tão especial, e espero contar mais e mais com você daqui para frente, principalmente em nossa vida profissional! Te Amo Dé, que Nosso Senhor Jesus Cristo continue sendo seu Guia!

*“Ter uma irmã é ter, para sempre, uma infância lembrada  
com segurança em outro coração.”*

*Tatí Bernardi*



## *Ao* meu amado noivo **Carlos**

Eu dedico este trabalho também a você meu amor, porque você foi a pessoa mais presente nesta fase da minha vida! Mesmo podendo falar comigo poucas vezes por dia, você se fez presença em cada palavra de afeto e estímulo para que eu não desistisse. Você me ajudou a olhar com outros olhos cada situação difícil neste período! Foi exemplo de amor e paciência com minhas inseguranças! Senti saudade, mas nem por isso desejei me afastar deste sonho, e em muitos momentos desejei até mais que eu mesma! Você é lindo em todos os sentidos, seu imenso coração desperta cada dia mais em mim o desejo de estar sempre com você! Quero poder contar com você nesta nova fase, assim como contei até aqui! Te Amo! Que Deus possa abençoar sempre nosso amor!

*"O amor só é lindo, quando encontramos alguém que nos transforme no melhor que podemos ser."*

*Mário Quintana*

*Agradecimentos  
Especiais*

**A** minha orientadora Professora Dr<sup>a</sup>. **Maria José Hitomi Nagata**

Agradeço a senhora pela oportunidade de realizar o mestrado, pelo acolhimento no Programa de Pós-graduação em Odontologia, e pela orientação durante este período. Através da senhora eu conheci os aspectos mais importantes do cenário mundial de pesquisa, e melhorei meu senso crítico profissional. A senhora me orientou a realizar da melhor maneira os procedimentos clínicos, sempre valorizando muito os pacientes, alimentando assim, o meu desejo de oferecer o melhor tratamento a eles. Orientou-me também a ser rigorosa com minhas atividades acadêmicas, sempre com muito comprometimento e dedicação. Agradeço imensamente pela paciência com que lidou com minha inexperiência. Que Deus possa cumulá-la de todo entendimento e sabedoria. Muito obrigada!

**A**o meu co-orientador Professor Dr<sup>o</sup>. **Valdir G. Garcia**

Agradeço imensamente ao senhor por nos oferecer um olhar de experiência sobre a vida acadêmica, e valorizar em nós, os sentimentos mais bonitos, como a alegria e a vontade de viver. O senhor quando chega em nosso laboratório leva um alto astral, que é muito importante para nos manter firmes em direção às nossas metas! Com muita simplicidade nos acolhe frente às preocupações que surgem durante a nossa vida de pós-graduação. No senhor encontramos um

modelo de pesquisador, que tem sede do conhecimento e vê possibilidades em todas as coisas para se pesquisar e conquistar novos entendimentos. Só tenho a agradecê-lo por tudo e desejar que o senhor continue sendo essa pessoa agradável de se conviver!

*A*o meu co-orientador Professor Dr.<sup>o</sup> **Edilson Ervolino**

Agradeço imensamente por poder contar com o senhor como meu co-orientador e pela compreensão em todos os momentos do mestrado. O senhor é um exemplo de professor realmente comprometido com o aprendizado dos alunos, no qual todos querem se espelhar! É um pesquisador extremamente qualificado e isso é resultado do comprometimento com que o senhor realiza todas as coisas. Este trabalho não poderia ser realizado sem o seu empenho em fazer todas as coisas da melhor maneira. Agradeço a Deus por ter sido acompanhada por uma pessoa tão dedicada e generosa e peço a Ele que continue te abençoando! Muito obrigada por tudo professor!

*A* querida Professora Dr.<sup>a</sup> **Suely Mogami Bonfim**

Agradeço pelo empenho em realizar essa pesquisa. Através do mestrado eu tive a satisfação de conhecê-la e em pouco tempo me identifiquei com a sua maneira

tranquila de conduzir as coisas, tornando os experimentos momentos agradáveis. A senhora sempre foi muito receptiva com as nossas idéias e dúvidas, facilitando o desenvolvimento em cada metodologia. Por ser uma pessoa tão agradável, eu sempre me senti muito à vontade em todos os momentos que estivemos juntas e isso fez com que eu te admirasse cada vez mais. A senhora é uma excelente profissional, sempre fez de tudo para que nossas pesquisas fossem desenvolvidas com muito rigor. Fico muito feliz pela oportunidade de te conhecer! Peço a Deus que ilumine todos os seus caminhos! Muito Obrigada!

*A* amiga **Carol**

Agradeço de coração a você, pois nenhuma das etapas desta pesquisa poderiam ter sido realizadas sem a sua participação. Fico muito feliz de saber que o mestrado não foi só um momento de aperfeiçoamento profissional, mas também um momento de desenvolvimento pessoal, pois a relação que mantivemos foi nos dois sentidos muito satisfatória. Mais que uma companheira, você foi para mim uma amiga, que com sua experiência me ajudou a lidar com todos os obstáculos que tive durante este período. Você me ofereceu a mão todas as vezes que eu sentia que sozinha eu não conseguiria e com isso me deu segurança para continuar e aqui chegar. Você ofereceu a palavra sincera que muitas vezes eu precisava ouvir. Foi muito bom saber que eu sempre poderia contar com você,

pois das mudanças até as comilanças você sempre me acompanhou! Serei sempre extremamente grata a Deus por nossa amizade, pois Ele nos colocou juntas para que cada uma pudesse oferecer o seu melhor e concretizarmos o sonho de chegarmos até aqui! Em tão pouco tempo você se tornou muito especial, quero poder contar sempre com você! MUITÍSSIMO obrigada!

**A** amiga **Eliana**

Agradeço a Deus e a Duda por ter te conhecido e por não só morarmos juntas, fazermos parte do mesmo departamento, passarmos quase o dia inteiro juntas, mas por nos tornarmos em tão pouco tempo, tão amigas! Você foi àquela pessoa de confiança com a qual eu podia compartilhar minhas confidências, sem medo de não ser compreendida. Você me acompanhou no último ano em praticamente todas as minhas experiências aqui em Araçatuba, e sua presença sempre tornou as coisas mais divertidas e verdadeiras. Companheirismo foi o forte da nossa amizade (a cozinha da Pério sabe do que estou falando). Sua simplicidade fez com que eu pudesse me tornar íntima e me sentir muito bem em estar com você. Nós dividimos até mesmo as dificuldades que passamos, e por isso só tenho a agradecer a Deus por cada experiência vivida ao seu lado. Que Deus possa retribuir todo o bem que você me fez! Levarei sua cumplicidade por onde eu for! Muito Obrigada!

# *Agradecimientos*

## **A MINHA SINCERA GRATIDÃO. . .**

Ao Professor Drº. **Álvaro Francisco Bosco**

A presença do senhor sempre alegrou nossas quartas-feiras e sua experiência profissional me estimulou a procurar cada vez mais, oferecer o melhor tratamento para os meus pacientes. O olhar compreensivo e descontraído com que o senhor nos olhava durante as cirurgias, me fazia se sentir mais tranquila e segura e é nisto que consiste o ensinar. Muito obrigada professor!

À Professora Drª. **Letícia Theodoro**

Agradeço por cuidar com muita dedicação do departamento da Pério e por ter atuado com muita compreensão com cada um de nós no dia-a-dia. Que a senhora continue sempre essa pessoa entusiasmada com tudo que faz, e assim alcance todas as suas metas. Muito obrigada!

À Professora Drª. **Flávia Furlaneto Messoria**

Agradeço pela companhia, pois em pouco tempo que a senhora esteve dando aula em Araçatuba, demonstrou muito carinho com tudo que realizou e foi sempre muito atenciosa durante as aulas práticas na graduação. Além disso, transmitiu através de sua experiência um olhar muito positivo sobre todas as coisas referentes à carreira profissional e acadêmica. Obrigada pelos momentos juntas!



Ao Professor Drº. **Juliano Milanezi**

Agradeço por todo o acompanhamento na pós-graduação, em especial, pelas clínicas de pós-graduação em que o senhor nos orientou desde as técnicas empregadas nas cirurgias, até a maneira como agir com o paciente. Sou muito grata pelo conhecimento adquirido durante esses anos.

Ao Professor Drº. **Michel Messoria**

Agradeço pelo suporte principalmente nas análises estatísticas, pois o senhor sempre esteve muito disposto a nos ajudar e mesmo distante sempre se esforçou em esclarecer nossas dúvidas. Muito obrigada por tudo!

À Professora Drª. **Rita de Cássia Dorneles**

Agradeço por sempre poder contar com os equipamentos do laboratório da senhora. Muito obrigada!

Às queridas Professoras Drª. **Fabiana Straiotto** e Drª. **Graziela Galhano Avila**

**Logar**

Agradeço pelo estímulo desde a graduação, para que eu conhecesse melhor a vida acadêmica e desejasse ser uma professora dedicada com o aprendizado integral dos meus alunos, assim como vocês foram para mim. Que Deus continue abençoando a carreira de vocês, e que vocês continuem impulsionando o sucesso e realização dos alunos. Vocês são especiais para mim!

Aos queridos amigos de infância **Thais, Roberta e Victor**

Muito obrigada por todos esses anos de amizade! Sou extremamente grata pelo carinho que vocês demonstram mesmo eu estando tão ausente, devido aos compromissos com a pós-graduação. Vocês são a prova viva da amizade concreta, pois mesmo distantes se fazem tão presentes, sempre se preocupando com o meu bem-estar! Deus foi muito amoroso por ter me confiado a amizade de vocês e que nada separe os nossos corações! Amo vocês!

Às queridas amigas da graduação **Daniele e Ana Cláudia**

As nossas amizades se iniciaram em um tempo maravilhoso de nossas vidas e em pouco tempo se tornaram eternas, pois o carinho que tenho por vocês é imenso e não pode ser correlacionado com o tempo que passamos juntas e sim com a intensidade de cada obstáculo que vencemos! Onde vocês estiverem saibam que podem sempre contar comigo! A nossa amizade é um bem muito precioso! Amo vocês!

À querida amiga **Mayara**

Agradeço pelo carinho e compreensão com todas as minhas fraquezas! Você foi para mim um ponto de equilíbrio, pois mesmo com suas dificuldades nunca deixou de me ouvir e com seu olhar de fé transmitir uma mensagem de esperança e confiança em Deus! Você é o exemplo de amiga que todos queremos ter, pois nunca mediu esforços para me ajudar! Fico feliz por não ter

somente uma cunhada, mas sim uma amiga em que posso confiar! Deus continue te guiando no testemunho fiel de carinho com as pessoas que necessitam de Deus! Te Amo Má!

Ao amigo **Victor Fabrício**

Agradeço pelo companheirismo! Você foi para mim nestes anos intensos de pós-graduação o irmão mais velho que nunca tive. Você tem um olhar otimista sobre todas as coisas e isso em muitas situações me fez refletir e me deu ânimo para prosseguir. Nós passamos por muitos momentos difíceis nestes anos, mas tenho fé em Deus que tudo aconteceu da melhor maneira para que adquiríssemos compreensão sobre muitas coisas! Que a nossa amizade possa durar para o resto da vida! Que você seja abençoado por Deus em todas as coisas que fizer! Saiba que sempre poderá contar comigo!

Ao amigo **Régis**

Agradeço pela cumplicidade! Você foi um amigo que ganhei com a pós-graduação, e que quero manter para o resto da vida! Com um olhar crítico e ao mesmo tempo compreensivo você me ajudou a vivenciar as experiências deste período de maneira intensa e assim alcançar entendimento de muitas coisas. Você me acompanhou nos dias mais complicados e também nos mais divertidos, sou grata a Deus por cada instante que passamos juntos! Você é muito especial!

À amiga **Eduarda**

Agradeço pela disponibilidade em ajudar! Você foi uma pessoa extremamente disposta a colaborar tanto com os experimentos da pesquisa, como também no “happy hour” após os experimentos. Através de seu respeito frente às diferenças das pessoas me deu um testemunho muito grande de humanidade e assim se tornou muito especial para mim! Que você alcance todos os seus objetivos e seja muito feliz em sua jornada!

À amiga **Naida**

Agradeço pela parceria! Você foi uma irmã que adquiri com o mestrado, e quero levar para a vida toda. Em cada situação que passamos procuramos dar suporte uma à outra e tudo isso foi muito valioso nos dias difíceis que tivemos juntas! Desejo que você continue essa pessoa alegre e dinâmica que sempre foi comigo! Saiba que você pode sempre contar comigo!

À amiga **Mariéllen**

Agradeço pelo companheirismo! Você é uma pessoa muito especial, que ao longo deste período alcançou cada dia mais um espaço maior no meu coração. Com sua maneira dedicada de realizar as coisas foi se aproximando cada dia mais, e assim se tornou uma companheira para todas as horas aqui em Araçatuba! Saiba que pode sempre contar comigo! Estarei sempre torcendo por você!

À colega **Natália Campos**

Agradeço por toda a ajuda que me concedeu, principalmente no início do mestrado, onde eu com minha inexperiência necessitei de um olhar compreensivo a me ensinar a fazer as coisas e você esteve lá me orientando em tudo! Que Deus abençoe você em todos os seus sonhos!

Aos queridos amigos de pós-graduação **Vanessa, Maurício, Ana Paula, Rafael e Júlio**

Muito obrigada pela oportunidade de fazer desse período único de nossas vidas, um período mais agradável, de troca de experiências e de alegrias! Que vocês sigam iluminados por Deus em todos os seus empreendimentos!

Aos amigos de vizinhança **Renan, Juliane, Giovana e Luciene**

Agradeço pelo carinho e compreensão que tiveram comigo neste período. O tempo que passamos juntos foi pequeno, mas o suficiente para vocês se tornarem muito especiais. Estarei torcendo por vocês!

Aos colegas da Periodontia **Paula, Vivian, Márcio, Alessandra, Erivan, Nati Pola, David, Natália** e todos os alunos de iniciação científica em especial às alunas **Nayara e Michele**

Cada um de vocês participou desse período de minha vida e em cada momento me transmitiram ensinamentos que levarei para a vida toda. Que cada um possa alcançar seus objetivos!

Ao doutorando **Breno**

Agradeço por mesmo não participando diretamente da minha pesquisa, sempre estar muito disposto a nos ajudar na realização dos experimentos com medula óssea, tornando estes experimentos uma experiência enriquecedora. Sou muito grata aos conhecimentos compartilhados.

Aos doutorandos **Samuel e Camila**

Agradeço pelo tempo dispensado para me auxiliar nas análises da coloração Picrosirius. Que Deus os recompense pela dedicação em ajudar!

A todos **os familiares**

Que com muita compreensão entenderam minha ausência em muitos momentos, mas que nunca deixaram de caminhar ao meu lado, dando suporte aos meus sonhos! Sou imensamente grata pelo amor que vocês têm por mim!

Ao Dr. **Stephen Fucini**

Agradeço pelos aprendizados valiosos, principalmente na área clínica. O tempo que estivemos juntos foi pequeno, mas de grande valor, pois o senhor não mediu

esforços para me dar o máximo de atenção e transmitir os valores clínicos adquiridos através de sua experiência. Nunca esquecerei dos ensinamentos transmitidos! Que Deus o abençoe grandiosamente!

Ao Sr. **Odair**

Agradeço pelo carinho com que o senhor cativa as pessoas! O senhor é uma pessoa cheia de vida e alegria que transmite sentimentos muito bons e por isso é querido por todos. Muito obrigada!

Ao funcionário e amigo **Joilson**

Agradeço pela dedicação em fazer todas as coisas darem certo! Você sempre foi muito comprometido com tudo que faz e por isso é muito querido por mim, pois sei do seu esforço e assim te admiro cada dia mais. Desejo que você seja muito feliz em sua vida e assim alcance todos os seus sonhos!

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, nas pessoas de sua Diretora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. **Ana Maria Pires Soubhia** e Vice-Diretor Dr. **Wilson Roberto Poi**.

Ao Programa de Pós-graduação em Odontologia, nas pessoas de sua Coordenadora Profa. Dr<sup>a</sup>. **Maria José Hitomi Nagata**, Vice-Coordenador Prof. Dr<sup>o</sup>. **Celso Koogi Sonoda** e de todo corpo docente.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES**, pela concessão da Bolsa de Mestrado à pós-graduanda Adrieli de Paula Neves.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP**, pela concessão da Bolsa de Mestrado (Processo Nº 2013/15380-3) a pós-graduanda Adrieli de Paula Neves.

A todos os funcionários da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP por sempre estarem dispostos a ajudar!

Aos funcionários e professores do Departamento de Ciências Básicas, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, pelo acolhimento.

Aos funcionários do Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, em especial o Sr. **Camilo** pela disponibilização dos animais deste experimento.

Ao funcionário **Arnaldo** pela a ajuda na manutenção dos animais deste experimento.



A todos os alunos de graduação pela convivência tão agradável e enriquecedora!

A todos os pacientes, pela confiança depositada em cada atendimento.

Aos animais que doaram suas vidas.

*Epígrafe*

**“O êxito da vida não se mede pelo  
caminho que você conquistou, mas sim  
pelas dificuldades que você superou”**

*Abraham Lincoln*

*Resumo*

## *Resumo*

---

Neves, AP. **Avaliação da influência do plasma rico em plaquetas, da terapia com laser em baixa intensidade ou da associação de ambos na cicatrização de defeitos de fenestração periodontal em ratos. Estudo histoquímico e imunoistoquímico** [dissertação]. Araçatuba: UNESP – Univ. Estadual Paulista; 2015.

Este estudo avaliou, histoquimicamente e imunoistoquimicamente, a influência do plasma rico em plaquetas (PRP), da terapia com laser em baixa intensidade (LLLT) ou da associação de ambos na cicatrização de defeitos de fenestração periodontal (DFP) em ratos. DFP foram criados cirurgicamente na mandíbula de 80 ratos. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos: 1) C (controle) e 2) PRP – defeitos preenchidos com coágulo sanguíneo ou PRP, respectivamente; 3) LLLT e 4) PRP/LLLT – defeitos receberam aplicação da LLLT, foram preenchidos com coágulo sanguíneo ou PRP, respectivamente e irradiados novamente. Os animais foram submetidos à eutanásia aos 10 ou 30 dias pós-operatórios. As fibras colágenas imaturas e maduras foram avaliadas por análise histoquímica e suas porcentagens calculadas. Foram realizadas reações imunoistoquímicas para fator de transcrição relacionado à Runt (Runx2), osteocalcina (OCN), osteopontina (OPN) e fosfatase alcalina (ALP). Células Runx2-positivas foram quantificadas. Um método semi-quantitativo foi usado para avaliar a imunomarcagem de OCN, OPN e ALP. Os dados foram analisados estatisticamente. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nas porcentagens de fibras colágenas imaturas e maduras dos grupos experimentais quando comparadas ao grupo controle. Aos 10 dias, os grupos PRP e PRP/LLLT apresentaram número de células Runx2-positivas significativamente maior que o controle; o grupo PRP/LLLT apresentou padrões de imunomarcagem de OCN e OPN significativamente maiores que o controle e não houve diferenças estatisticamente significativas no padrão de imunomarcagem de ALP. Aos 30 dias, diferenças estatisticamente significativas não foram

observadas nos padrões de imunomarcção de OCN, OPN e ALP entre os grupos experimentais. Conclui-se que a associao PRP/LLLT apresentou maior nvel de maturao dos tecidos periodontais mineralizados quando comparada ao controle em defeitos de fenestrao em ratos.

**Palavras-chave:** Plasma rico em plaquetas; terapia a laser de baixa intensidade; periodontia; colágeno; imuno-histoqumica; ratos.

*Abstract*

## *Abstract*

---

Neves, AP. **Influence of platelet-rich plasma, low-level laser therapy or their combination on the healing of periodontal fenestration defects in rats. A histochemical and immunohistochemical study** [dissertation]. Araçatuba: UNESP – Univ. Estadual Paulista; 2015.

This study histochemically and immunohistochemically evaluated the influence of platelet-rich plasma (PRP), low-level laser therapy (LLLT), or their combination on the healing of periodontal fenestration defects (PFD) in rats. PFD were surgically created in the mandible of 80 rats. The animals were randomly divided into 4 groups: 1) C (Control) and 2) PRP - defects were filled with blood clot or PRP, respectively; 3) LLLT and 4) PRP/LLLT - defects received laser irradiation, were filled with blood clot or PRP, respectively, and then irradiated again. Animals were euthanized at either 10 or 30 days post-operative. Immature and mature collagen fibers were histochemically evaluated and their percentages were calculated. Runx2-related transcription factor 2 (Runx2), osteocalcin (OCN), osteopontin (OPN) and alkaline phosphatase (ALP) immunohistochemical staining were performed. Runx2-positive cells were quantified. A semi-quantitative method was used to evaluate OCN, OPN, and ALP immunolabeling pattern. Data were statistically analyzed. Statistically significant differences were not observed in the percentages of immature and mature collagen fibers when each experimental group was compared to control. At 10 days, PRP and PRP/LLLT groups presented a significantly higher number of Runx2-positive cells than control; PRP/LLLT presented significantly higher OCN and OPN immunolabeling than control; and statistically significant differences were not observed in the ALP immunolabeling. At 30 days, statistically significant differences were not observed in the OCN, OPN and ALP immunolabeling among the experimental groups. It was concluded that PRP/LLLT presented a greater level of maturation of periodontal mineralized tissues when compared to control in fenestration defects in rats.



**Key words:** Platelet-rich plasma; laser therapy, low-level; periodontics; collagen; immunohistochemistry; rats.

*Lista de  
Figuras*

## *Lista de Figuras*

---

- Figura 1 - Nível de maturação das fibras colágenas. Fotomicrografias 71  
evidenciando as fibras colágenas imaturas e fibras colágenas maduras nos grupos C (A), LLLT (B), PRP (C), PRP/LLLT (D), aos 10 dias pós-operatórios. Fotomicrografias evidenciando as fibras colágenas imaturas e fibras colágenas maduras nos grupos C (E), LLLT (F), PRP (G), PRP/LLLT (H), aos 30 dias pós-operatórios (coloração com vermelho picosirius visualizado em microscopia de luz polarizada; 200x).
- Figura 2 - Proporção de fibras colágenas imaturas e maduras. Gráfico 72  
mostrando as médias e desvios-padrão das porcentagens de fibras colágenas imaturas, com comparações inter-grupos e intra-grupos, aos 10 e 30 dias pós-operatórios (A). Gráfico mostrando as médias e desvios-padrão das porcentagens de fibras colágenas maduras, com comparações inter-grupos e intra-grupos, aos 10 e 30 dias pós-operatórios (B). \* =  $p < 0.05$ .
- Figura 3 - Padrão de imunomarcção para Runx2. Gráfico mostrando as 73  
médias e desvios-padrão do número de células Runx2-positivas, com comparação inter-grupos e intra-grupos, aos 10 e 30 dias pós-operatórios (A). Fotomicrografias evidenciando as células Runx2-positivas nos grupos (cabeças de seta vermelhas) C (B), LLLT (C), PRP (D), PRP/LLLT (E), aos 10 dias pós-operatórios. \* =  $p < 0.05$ ; de = dentina; tc = tecido conjuntivo (contra-coloração com fast green; 1500x).

## *Lista de Figuras*

---

- Figura 4 - Padrão de imunomarcção para OCN. Gráfico mostrando as medianas e desvios interquartil dos escores para OCN, com comparação inter-grupos e intra-grupos, aos 10 e 30 dias pós-operatórios (A). Fotomicrografias evidenciando as células OCN-positivas (cabeças de seta azuis, pretas e vermelhas) nos grupos C (B), LLLT (C), PRP (D), PRP/LLLT (E), aos 10 dias pós-operatórios. \* =  $p < 0.05$ ; de = dentina; cabeças de seta azuis = células OCN-positivas sobre o tecido ósseo; cabeças de seta pretas = células OCN-positivas sobre a dentina; cabeças de seta vermelhas = células OCN-positivas no tecido conjuntivo; tc = tecido conjuntivo (contra-coloração com hematoxilina de harris; 1000x). 74
- Figura 5 - Padrão de imunomarcção para OPN. Gráfico mostrando as medianas e desvios interquartil dos escores para OPN, com comparação inter-grupos e intra-grupos, aos 10 e 30 dias pós-operatórios (A). Fotomicrografias evidenciando as células OPN-positivas (cabeças de seta azuis, pretas e vermelhas) nos grupos C (B), LLLT (C), PRP (D), PRP/LLLT (E), aos 10 dias pós-operatórios. \* =  $p < 0.05$ ; de = dentina; cabeças de seta azuis = células OPN-positivas sobre o tecido ósseo; cabeças de seta pretas = células OPN-positivas sobre a dentina; cabeças de seta vermelhas = células OPN-positivas no tecido conjuntivo; tc = tecido 75

## *Lista de Figuras*

---

conjuntivo (contra-coloração com hematoxilina de harris; 1000x).

- Figura 6 - Padrão de imunomarcção para ALP. Gráfico mostrando as medianas e desvios interquartil dos escores para ALP, com comparação inter-grupos e intra-grupos, aos 10 e 30 dias pós-operatórios (A). Fotomicrografias evidenciando as células ALP-positivas (cabeças de seta vermelhas) nos grupos C (B), LLLT (C), PRP (D), PRP/LLLT (E), aos 10 dias pós-operatórios. de = dentina; tc = tecido conjuntivo (contra-coloração com hematoxilina de harris; 1000x). 76

*Lista de  
Anexos*

## *LISTA DE ANEXOS*

---

- Anexo A - Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal 78  
(CEEA)
- Anexo B - Normas para publicação segundo o periódico *Journal of* 79  
*Periodontology*

*Lista de  
Abreviaturas  
e Siglas*



# *LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS*

---

ALP	=	Fosfatase alcalina
ANOVA	=	Análise de variância
APN	=	Adrieli de Paula Neves
ATD	=	Área total do defeito
C	=	Controle
CAPES	=	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CEEA	=	Comissão de Ética na Experimentação Animal
cm <sup>2</sup>	=	Centímetro quadrado
DFP	=	Defeito de fenestração periodontal
DNO	=	Densidade do novo osso
EDTA	=	Ácido etilenodiaminotetracético
EE	=	Edilson Ervolino
EGF	=	Fator de crescimento epidermal
ERD	=	Extensão remanescente do defeito
FAPESP	=	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
<i>et al.</i>	=	<i>et alii</i>
Fig.	=	Figura
FOA	=	Faculdade de Odontologia de Araçatuba
GFs	=	Fatores de crescimento
J	=	Joule
J/cm <sup>2</sup>	=	Joule por centímetro quadrado
LLLT	=	Terapia com laser em baixa intensidade
Ltda	=	Limitada
M	=	Molar
mm <sup>2</sup>	=	Milímetro quadrado

mg/Kg	=	Miligrama por quilograma
min.	=	Minuto
ml	=	Mililitro
mm	=	Milímetro
NC	=	Novo cimento
nm	=	Nanômetro
NO	=	Novo osso
OCN	=	Osteocalcina
OPN	=	Osteopontina
PDGF	=	Fator de crescimento derivado de plaquetas
pH	=	Potencial hidrogeniônico
PPP	=	Plasma pobre em plaquetas
Prof.	=	Professor
PRP	=	Plasma rico em plaquetas
Runx2	=	Fator de transcrição relacionado à Runt
TGF- $\beta$	=	Fator de crescimento transformador- $\beta$
UI	=	Unidades internacionais
UNESP	=	Universidade Estadual Paulista
VEGF	=	Fator de crescimento endotelial vascular
W	=	Watts
$\mu$ l	=	Microlitro
$\mu$ m	=	Micrometro

*Lista de  
Símbolos*

# *LISTA DE SÍMBOLOS*

---

$\beta$	=	Beta
@	=	Arroba
n	=	Tamanho da amostra
$p$	=	Probabilidade do valor do teste
°C	=	Graus Celsius
%	=	Por cento
$G$	=	Gravidade
X	=	Vezes
<	=	Menor
=	=	Igual
*	=	Asterisco
®	=	Marca Registrada
+	=	Mais
-	=	Menos
™	=	Trademark

# *Sumário*

# *SUMÁRIO*

---

Manuscrito para publicação	44
Página de título	45
Resumo	46
Introdução	47
Materiais e Métodos	49
Resultados	54
Discussão	56
Agradecimentos	61
Referências	61
Anexos	77

*Manuscrito para  
Publicação\**

---

\*Segundo as normas do periódico *Journal of Periodontology* – Anexo B

**Avaliação da influência do plasma rico em plaquetas, da terapia com laser em baixa intensidade ou da associação de ambos na cicatrização de defeitos de fenestração periodontal em ratos. Estudo histoquímico e imunoistoquímico**

Adrieli de Paula Neves, DDS\* ; Maria J. H. Nagata, DDS, PhD\*

\*Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP – Univ. Estadual Paulista, Araçatuba, São Paulo, Brasil.

**Autora responsável pela correspondência:**

Maria José Hitomi Nagata

Telefone: +55 18 3636 3271

Fax: +55 18 3636 3332 (fax pode ser publicado)

Rua: José Bonifácio, 1193

CEP: 16015-050 - Araçatuba, SP, Brasil

E-mail: [mjnagata@foa.unesp.br](mailto:mjnagata@foa.unesp.br) (e-mail pode ser publicado)

**Fonte de apoio:** Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP: 2013/15380-3) – São Paulo, SP, Brasil

**Contagem de palavras:** 3.575

**Número de figuras:** 6

**Número de tabelas:** 0

**Running title:** Plasma rico em plaquetas e laser em fenestração periodontal

**Key findings:** A associação PRP/LLLT apresentou maior nível de maturação dos tecidos periodontais mineralizados quando comparada ao controle em defeitos de fenestração em ratos.



## **Resumo**

**Objetivo:** Este estudo avaliou, histoquimicamente e imunoistoquimicamente, a influência do plasma rico em plaquetas (PRP), da terapia com laser em baixa intensidade (LLLT) ou da associação de ambos na cicatrização de defeitos de fenestração periodontal (DFP) em ratos.

**Métodos:** DFP foram criados cirurgicamente na mandíbula de 80 ratos. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos: 1) C (controle) e 2) PRP – defeitos preenchidos com coágulo sanguíneo ou PRP, respectivamente; 3) LLLT e 4) PRP/LLLT – defeitos receberam aplicação da LLLT, foram preenchidos com coágulo sanguíneo ou PRP, respectivamente e irradiados novamente. Os animais foram submetidos à eutanásia aos 10 ou 30 dias pós-operatórios. As fibras colágenas imaturas e maduras foram avaliadas por análise histoquímica e suas porcentagens calculadas. Foram realizadas reações imunoistoquímicas para fator de transcrição relacionado à Runt (Runx2), osteocalcina (OCN), osteopontina (OPN) e fosfatase alcalina (ALP). Células Runx2-positivas foram quantificadas. Um método semi-quantitativo foi usado para avaliar a imunomarcção de OCN, OPN e ALP. Os dados foram analisados estatisticamente. **Resultados:** Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nas porcentagens de fibras colágenas imaturas e maduras dos grupos experimentais quando comparadas ao grupo controle. Aos 10 dias, os grupos PRP e PRP/LLLT apresentaram número de células Runx2-positivas significativamente maior que o controle; o grupo PRP/LLLT apresentou padrões de imunomarcção de OCN e OPN significativamente maiores que o controle e não houve diferenças estatisticamente significativas no padrão de imunomarcção de ALP. Aos 30 dias, diferenças estatisticamente significativas não foram observadas nos padrões de imunomarcção de OCN, OPN e ALP entre os grupos experimentais. **Conclusão:** Conclui-se que a associação PRP/LLLT apresentou maior nível de maturação dos tecidos periodontais mineralizados quando comparada ao controle em defeitos de fenestração em ratos.

**Palavras-chave:** Plasma rico em plaquetas; terapia a laser de baixa intensidade; periodontia; colágeno; imuno-histoquímica; ratos.

## INTRODUÇÃO

A regeneração periodontal envolve a formação de novo osso alveolar, cemento e ligamento periodontal funcional. Modalidades terapêuticas mais recentes para aumentar a regeneração incluem o uso do plasma rico em plaquetas (PRP) e a terapia com laser em baixa intensidade (LLLT).<sup>1,2</sup>

O uso da LLLT para aumentar a regeneração periodontal é baseado em estudos que têm demonstrado o seu potencial para promover a cicatrização de feridas<sup>3</sup> e a regeneração óssea,<sup>4-7</sup> bem como para aumentar os efeitos da regeneração tecidual guiada no tratamento de defeitos periodontais.<sup>8</sup> Estudos *in vitro* têm demonstrado efeitos positivos do laser em baixa intensidade sobre a proliferação de osteoblastos,<sup>9,10</sup> de células-tronco do ligamento periodontal humano,<sup>11</sup> bem como de fibroblastos gengivais e do ligamento periodontal.<sup>12-14</sup> Tem sido demonstrado, também, que a LLLT aumenta a expressão gênica do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e do fator de crescimento transformador- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), que são os mais importantes GFs nos tecidos periodontais.<sup>15</sup> Além disso, a irradiação com laser induz a degranulação das plaquetas e a liberação de substâncias estocadas em grânulos específicos.<sup>16,17</sup> Há um crescente interesse no uso do PRP para o tratamento de defeitos periodontais.<sup>18-21</sup> O PRP contém  $\alpha$ -grânulos, dos quais múltiplos fatores de crescimento, tais como o PDGF, TGF- $\beta$ , fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de crescimento epidermal (EGF), podem ser liberados após ativação,<sup>22</sup> modulando a resposta de cicatrização de tecidos moles e duros.<sup>23-25</sup> Estudos *in vitro* têm demonstrado que o PRP exerce

efeitos positivos em fibroblastos gengivais,<sup>26,27</sup> osteoblastos orais<sup>28,29</sup> e fibroblastos do ligamento periodontal.<sup>30</sup>

Em um estudo publicado recentemente por nosso grupo de pesquisa,<sup>1</sup> o processo de cicatrização de defeitos de fenestração periodontal, em ratos, foi avaliado histomorfometricamente após o emprego da LLLT (grupo LLLT), do PRP (grupo PRP) ou da associação de ambas as terapias (grupo PRP/LLLT). Deve-se ressaltar que, segundo o nosso conhecimento, este foi o primeiro estudo in vivo em que esta abordagem terapêutica foi proposta. Neste estudo, aos 10 dias, o grupo PRP apresentou extensão remanescente do defeito (ERD) significativamente menor que o controle. Aos 30 dias, o grupo PRP apresentou quantidade de novo osso (NO) e densidade do novo osso (DNO) significativamente maiores que o controle. Os grupos LLLT, PRP e PRP/LLLT apresentaram significativa formação de novo cemento (NC) aos 30 dias, com fibras colágenas inseridas obliquamente ou perpendicularmente à superfície radicular. A formação de NC não foi observada em nenhum espécime do grupo controle. Concluiu-se que a LLLT, o PRP ou a associação de ambos promoveram a formação de NC com ligamento periodontal funcional. Considerando esses excelentes resultados obtidos com essas modalidades terapêuticas na regeneração periodontal, torna-se de fundamental importância a realização de análises adicionais para melhor compreensão dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos neste processo.

O propósito deste estudo foi avaliar histoquimicamente e imunoistoquimicamente a influência do PRP, da LLLT ou da associação de ambos na cicatrização de defeitos de fenestração periodontal em ratos.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Modelo Experimental**

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista- UNESP (nº 00900-2013). Foram utilizados 80 ratos machos (*Rattus norvegicus*, *albinus*, Wistar), de 5 a 6 meses de idade. Um único defeito de fenestração foi criado em cada animal. Os animais foram, então, divididos nos seguintes grupos experimentais usando amostragem aleatória simples: controle (C), PRP, LLLT e PRP/LLLT. Estes grupos foram divididos em 2 subgrupos (n=10), que foram submetidos à eutanásia aos 10 e 30 dias pós-operatórios.

### **Preparo do PRP**

Os ratos dos grupos PRP e PRP/LLLT foram anestesiados por injeção intramuscular de quetamina<sup>#</sup> (70 mg/kg de peso corporal) e xilazina<sup>\*\*</sup> (6 mg/kg de peso corporal). Imediatamente antes da realização dos procedimentos cirúrgicos, 3,15 ml de sangue autólogo foi coletado de cada animal, via punção cardíaca, em uma seringa contendo 0,35 ml de citrato de sódio a 3,2 % para prevenir a coagulação. As amostras de sangue foram centrifugadas<sup>††</sup> a 160 G por 20 minutos a 22 °C, para separar o plasma contendo as plaquetas das células vermelhas. O plasma foi pipetado da parte superior do tubo e centrifugado a 400 G por 15 minutos a 22 °C, para separar as plaquetas do plasma pobre em plaquetas (PPP). O PPP foi pipetado da parte superior do tubo, deixando o PRP e o “buffy coat” no fundo do mesmo.

### **Procedimento Cirúrgico**

Os ratos dos grupos C e LLLT foram anestesiados usando o mesmo protocolo descrito anteriormente para os grupos PRP e PRP/LLLT. Após preparação anti-séptica, uma incisão

foi feita e um retalho total foi rebatido sobre o corpo da mandíbula, coronariamente à borda inferior do lado direito da mandíbula. Foram criados defeitos de fenestração periodontal (3 mm em extensão horizontal, 2 mm em altura e aproximadamente 1 mm de profundidade) através da remoção do osso superficial usando uma broca esférica nº 2, acoplada em uma peça de mão de alta rotação e sob irrigação abundante com solução salina estéril. Foi realizada, então, raspagem e alisamento da região vestibular da raiz distal do primeiro molar mandibular com um cinzel, removendo-se ligamento periodontal, cimento e dentina superficial. O reposicionamento do retalho foi feito simplesmente pela remoção dos afastadores cirúrgicos seguida do fechamento por camadas da incisão.<sup>31,32</sup>

No Grupo C, o defeito cirúrgico foi preenchido somente com coágulo sangüíneo. No Grupo PRP, o defeito cirúrgico foi preenchido com 25 µl de PRP. No Grupo LLLT, o defeito recebeu a aplicação da LLLT, foi preenchido com coágulo sanguíneo e, então, irradiado novamente. No Grupo PRP/LLLT, o defeito recebeu a aplicação da LLLT, foi preenchido com 25 µl de PRP e, então, foi irradiado novamente. Cada animal recebeu uma injeção intramuscular de 24,000 UI de penicillina G-benzathine<sup>††</sup> no pós-operatório.

### **Protocolo de Aplicação do PRP**

No momento da aplicação clínica, 25 µl de PRP foi ativado com 1,25 µl de solução de cloreto de cálcio<sup>§§</sup> usando uma proporção de 0,05 ml de cloreto de cálcio para cada 1 ml de PRP.

### **Protocolo de Aplicação da LLLT**

Um laser de índio-gálio-alumínio-fósforo<sup>||</sup>, com comprimento de onda de 660 nm e área de spot de 0,0283 cm<sup>2</sup> foi utilizado neste estudo. Imediatamente após o preparo do defeito de fenestração periodontal, a LLLT foi aplicada em sua porção interna com o modo varredura, de tal forma que todo o defeito recebesse a irradiação de laser. O laser terapêutico foi aplicado no

modo contínuo, não-contato, com potência de 0,035 W por 5 segundos, com 0,17 J de energia e 6 J/cm<sup>2</sup> de densidade de energia. O defeito foi preenchido com coágulo sanguíneo (Grupo LLLT) ou com PRP (Grupo PRP/LLLT) e, então, foi novamente irradiado usando o mesmo protocolo descrito acima.

### **Análises Qualitativa e Quantitativa de Plaquetas**

O líquido de Brecher foi usado para lisar os eritrócitos e diluir as amostras de sangue periférico e PRP. A contagem do número total de plaquetas nas amostras de sangue periférico e PRP foi realizada em contador automático de células.<sup>¶¶</sup> Além disso, esfregaços de sangue periférico e de PRP foram corados com “Panótico Rápido LB”<sup>##</sup> para avaliar a morfologia das plaquetas.

### **Processamento Tecidual**

Os animais foram submetidos à eutanásia aos 10 e 30 dias pós-operatórios. A área do defeito cirúrgico original e dos tecidos circunjacentes foram removidos em bloco. As peças foram fixadas em solução de formoldeído a 4%, lavadas em água corrente e descalcificadas em solução de Ácido Etilenodiaminotetracético (EDTA) a 4,13%. Após descalcificação, as peças foram processadas e incluídas em parafina. Cortes transversais seriados (cortados horizontalmente em um plano perpendicular ao eixo longitudinal do dente), com 6 µm de espessura, foram obtidos em uma sequência corono-apical e corados com vermelho picrosirius para a análise histoquímica ou submetidos ao método da imunoperoxidase indireta. Para as reações imunoistoquímicas, os cortes histológicos foram desparafinizados e reidratados em série decrescente de etanol. Para a recuperação antigênica, as lâminas foram incubadas em solução tampão<sup>\*\*\*</sup> em uma câmara pressurizada<sup>†††</sup> a 95°C por 10 min. Ao final de cada passo da reação imunoistoquímica, as lâminas histológicas foram lavadas em tampão

fosfato salino (0,1 M; pH 7,4). Subsequentemente, as lâminas foram imersas em peróxido de hidrogênio a 3% por 1 hora e, então, em soro de albumina bovina a 1% por 12 horas, para bloqueio da peroxidase endógena e dos sítios inespecíficos, respectivamente. Lâminas histológicas contendo amostras de cada grupo experimental foram divididas em quatro lotes, e cada lote foi submetido à incubação com um dos seguintes anticorpos primários: anti-Runx2 (1:100) do rato gerado em coelho,<sup>†††</sup> anti-OCN (1:100) do rato gerado em cabra,<sup>†††</sup> anti-OPN (1:100) do rato gerado em cabra,<sup>†††</sup> e anti-ALP (1:100) do rato gerado em coelho.<sup>†††</sup> Os cortes histológicos foram incubados com um anticorpo secundário biotilado por 2 horas e subsequentemente tratados com estreptavidina conjugada com a peroxidase da raiz forte<sup>§§§</sup>, por 1 hora. A reação foi revelada usando o cromógeno 3,3'- tetracloridrato de diaminobenzidina<sup>|||</sup> e a contracoloração foi realizada com hematoxilina de Harris (para OCN, OPN e ALP) ou fast green (para Runx2). Todas as amostras foram acompanhadas por um controle negativo (os espécimes foram submetidos aos procedimentos descritos anteriormente, suprimindo-se a utilização dos anticorpos primários).

### **Procedimento de Análise Microscópica**

Foram selecionados cinco cortes histológicos, representando o centro do defeito cirúrgico original em uma direção ápico-coronal, para as análises histoquímica (um corte) e imunoistoquímica (quatro cortes). Elas foram realizadas por examinadores (EE e APN) calibrados e que desconheciam o tratamento realizado.

Para a análise histoquímica, os cortes histológicos submetidos à coloração com vermelho picrossírius foram visualizados em microscópio de luz polarizada,<sup>¶¶¶</sup> simultaneamente acoplado a uma câmera digital<sup>¶¶¶</sup> e a um microcomputador com sistema de análise de imagens,<sup>###</sup> a partir dos quais foram obtidas as imagens a serem analisadas. A área de interesse foi capturada com um aumento de 100x. Tal área apresentava uma dimensão de 600 µm x 800

$\mu\text{m}$  ( $0,48 \text{ mm}^2$ ) e englobava parte da raiz desnuda e sítio cirúrgico periodontal em processo de regeneração. A proporção das fibras colágenas imaturas e maduras foi avaliada usando a função de limite de cor do sistema de análise de imagens,<sup>###</sup> o que permitiu a quantificação da área ocupada pelas diferentes cores. As colorações variando do verde ao amarelo representavam as fibras colágenas imaturas, enquanto que as colorações variando do vermelho ao laranja representavam as fibras colágenas maduras.<sup>33,34</sup> A área ocupada por todas as cores (verde, amarelo, laranja e vermelho) consistia na área total ocupada por fibras colágenas. A partir da área total, calculou-se a porcentagem ocupada por fibras colágenas imaturas e fibras colágenas maduras.

Crítérios baseados no trabalho de Nagata et al.<sup>35</sup> foram utilizados para padronizar a análise imunoistoquímica. Resumidamente, a Área Total do Defeito (ATD) correspondeu à área inteira do defeito cirúrgico original. Células Runx2-positivas foram quantificadas dentro dos limites da ATD. Para a análise da imunomarcção para OCN, OPN e ALP, escores foram atribuídos com base no trabalho de Hawthorne et al.<sup>36</sup>: 0 - ausência de imunomarcção; 1 - baixo padrão de imunomarcção; 2 - moderado padrão de imunomarcção; 3 - alto padrão de imunomarcção.

### **Análise Estatística**

A normalidade e homocedasticidade dos dados foram verificadas. Cada parâmetro foi avaliado separadamente. Para a porcentagem de fibras colágenas imaturas e maduras e o número de células Runx2-positivas, a significância das diferenças entre os grupos foi determinada por uma análise de variância com dois fatores (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey post hoc quando a ANOVA sugeriu uma diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ). Para os escores de OCN, OPN e ALP, a significância das diferenças entre os grupos foi determinada pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn post hoc



quando o teste de Kruskal-Wallis sugeriu uma diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

## **RESULTADOS**

### **Acompanhamento Clínico**

Os animais toleraram bem o procedimento cirúrgico e mantiveram-se saudáveis durante todo o período experimental.

### **Análises Qualitativa e Quantitativa das Plaquetas**

As plaquetas exibiram morfologia normal. A quantidade média de plaquetas nas amostras de sangue periférico foi  $626,61 \pm 120,50 \times 10^3$  plaquetas/ $\mu$ l, enquanto que nas amostras de PRP foi  $2.719,08 \pm 784,82 \times 10^3$  plaquetas/ $\mu$ l. Portanto, a concentração de plaquetas nas amostras de PRP foi mais que 4 vezes maior do que aquela observada nas amostras de sangue periférico.

### **Análise Histoquímica**

Devido a problemas de padronização dos defeitos de fenestração periodontal, foram excluídos desta análise alguns espécimes dos grupos de 10 dias pós-operatórios (C: 3 espécimes; LLLT: 3 espécimes; PRP: 2 espécimes; PRP/LLLT: 1 espécime) e 30 dias pós-operatórios (C: 5 espécimes; LLLT: 4 espécimes; PRP: 2 espécimes).

Em todos os espécimes analisados, a área de interesse mostrou-se ocupada por fibras colágenas, tanto imaturas como maduras, com variadas proporções entre os níveis de maturação (Fig. 1).

As médias e os desvios-padrão das porcentagens de fibras colágenas imaturas e maduras, aos 10 e 30 dias pós-operatórios, com comparações inter-grupos e intra-grupos estão apresentados na Figura 2.

### **Análise Imunoistoquímica**

Devido a problemas no processamento laboratorial e foram excluídos 5 espécimes de cada grupo experimental, tanto aos 10 como aos 30 dias-operatórios.

A técnica imunoistoquímica utilizada para detectar Runx2, OPN, OCN e ALP mostrou alta especificidade na detecção destas proteínas, como evidenciado pela ausência total de imunomarcção nos controles negativos para as reações imunoistoquímicas. As células imunorreativas apresentaram coloração acastanhada que estava confinada ao compartimento nuclear (Runx2) ou ao citoplasma e matriz extracelular (OCN, OPN, ALP).

Todos os grupos apresentaram imunomarcações para Runx2, OCN, OPN e ALP aos 10 e 30 dias pós-operatórios. As células Runx2-positivas (Fig. 3) foram observadas nas adjacências da matriz óssea, no tecido conjuntivo, sobre a raiz desnuda ou sobre o tecido semelhante ao cimento. As imunomarcações para OCN, OPN e ALP (Figs. 4-6) foram observadas na matriz extracelular, em osteoblastos, em células do tecido conjuntivo, em células sobre a raiz desnuda, ou em células sobre o tecido semelhante ao cimento.

Em relação à análise de escores, os seguintes resultados foram observados nos espécimes de 10 dias: a) OCN - C (escore 1); LLLT (escore 1), PRP (predominância de escore 2); PRP/LLLT (escore 2); b) OPN - C (escore 1); LLLT (predominância de escore 1), PRP (predominância de escore 2); PRP/LLLT (escore 2); c) ALP - C (escore 1); LLLT (predominância de escore 1), PRP (predominância de escore 2); PRP/LLLT (predominância de escore 2).

Os seguintes resultados foram observados nos espécimes de 30 dias: a) OCN - C (predominância de escore 1); LLLT (predominância de escore 1), PRP (predominância de escore 2); PRP/LLLT (predominância de escore 2); b) OPN - C (predominância de escore 1); LLLT (predominância de escore 1), PRP (predominância de escore 2); PRP/LLLT (escore 2); c) ALP - C (predominância de escore 1); LLLT (predominância de escore 2), PRP (escore 2); PRP/LLLT (escore 2).

As médias e os desvios-padrão do número de células Runx2-positivas aos 10 e 30 dias pós-operatórios, com comparação inter-grupos e intra-grupos estão apresentados na Figura 3. As medianas e os desvios interquartil dos escores de OCN, OPN e ALP aos 10 e 30 dias pós-operatórios, com comparação inter-grupos e intra-grupos estão apresentados nas Figuras 4-6.

## **DISCUSSÃO**

Modelos animais oferecem a oportunidade para observações histológicas que podem contribuir para uma melhor compreensão da biologia da cicatrização após diferentes procedimentos reconstrutivos.<sup>37</sup> Defeitos experimentais comumente considerados para terapia reconstrutiva incluem defeitos causados por doença periodontal natural ou defeitos induzidos por ligaduras retentoras de placa bacteriana colocadas nos sulcos gengivais (defeitos crônicos). Uma abordagem alternativa é o uso imediato de defeitos cirurgicamente induzidos (agudos). Os defeitos de doença periodontal natural resultam da destruição gradual, variável e da redução do periodonto, e incluem a infestação de endotoxinas bacterianas no cimento radicular.<sup>38</sup> Espera-se que superfícies radiculares de defeitos induzidos por ligaduras ou outros tipos de defeitos crônicos apresentem qualidades similares.<sup>39</sup> Contudo, o debridamento radicular convencional elimina a maioria, se não todo, o cimento nos defeitos crônicos ou de doença natural, resultando em condições de superfície radicular similares a aquelas de

defeitos agudos.<sup>39,40</sup> Assim, considerando-se a perspectiva das características da superfície radicular, a racionalidade para selecionar-se os modelos de doença natural ou crônicos parece perder consistência.<sup>37</sup> Tem sido comprovado que o modelo de defeito periodontal usado no presente estudo é um modelo confiável para estudar a cicatrização periodontal, sem contaminação por bactérias bucais ou invasão de epitélio gengival.<sup>31,32,41,42</sup>

No presente estudo, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nas porcentagens de fibras colágenas imaturas e maduras dos grupos experimentais quando comparadas ao grupo controle, em ambos os períodos de análise. Estudos *in vitro* e *in vivo* têm mostrado que o uso isolado do PRP<sup>43</sup> e da LLLT,<sup>44,45</sup> bem como da associação de ambas as terapias,<sup>46,47</sup> são capazes de aumentar a proliferação de fibroblastos e estimular a produção de elementos da matriz extracelular, especialmente do colágeno. Contudo, os resultados do presente estudo indicaram que os grupos tratados com PRP, LLLT ou a terapia combinada (PRP/LLLT) apresentaram níveis de maturação de fibras colágenas similares ao grupo controle. Apesar do uso de diferentes metodologias, os resultados do presente estudo podem ser confrontados com aqueles observados no estudo de Barbosa et al.<sup>47</sup> que avaliaram o uso de PRP, da LLLT (2 protocolos distintos) e da terapia combinada (PRP com 2 protocolos distintos de LLLT) na cicatrização de tendão de calcâneo de ratos, após realização de tenotomia parcial. Contrariamente aos resultados observados no presente estudo, Barbosa et al.<sup>47</sup> mostraram que o uso de PRP, de ambos os protocolos de LLLT e de ambos os protocolos de terapia combinada (PRP/LLLT) aceleraram a maturação do colágeno em tendões do calcâneo, quando comparados ao controle (tenotomia parcial sem tratamento), aos 13 dias pós-operatórios. Uma das hipóteses que poderia explicar essa divergência de resultados seria a diferença no turnover do colágeno dos tecidos avaliados no presente estudo e naquele de Barbosa et al.<sup>47</sup>, pois o turnover do colágeno dos tecidos periodontais é muito mais alto que o de outros tecidos conjuntivos.<sup>48</sup> Assim, como a renovação e maturação do colágeno dos

tecidos periodontais é muito acelerada, provavelmente o período de observação de 10 dias pós-operatórios utilizado no presente estudo foi tardio para detectar diferenças significativas nos níveis de maturação das fibras colágenas. Considerando esses resultados, seria interessante, portanto, realizar este tipo de análise em períodos mais precoces do processo de cicatrização deste tipo de defeito experimental.

Em relação à análise imunoistoquímica, os grupos PRP e PRP/LLLT apresentaram número de células Runx2-positivas significativamente maior que o grupo controle aos 10 dias pós-operatórios. Sabe-se que a Runx2 é um importante fator de transcrição para a osteogênese e cementogênese, e está presente no fenótipo celular proliferativo precoce do osteoblasto/cementoblasto, um estágio de desenvolvimento no qual a proliferação celular é ainda requerida para obter-se um número suficiente de células comprometidas para a formação da matriz.<sup>49</sup> Portanto, pode-se inferir que as terapias com PRP promoveram aumento da osteoblastogênese e cementoblastogênese nos estágios iniciais da cicatrização periodontal. O grupo PRP/LLLT apresentou, ainda, aos 10 dias pós-operatórios, padrões de imunomarcagem de OCN e OPN significativamente maiores que o grupo controle. Observou-se também, neste grupo, uma predominância de escore 2 na análise da ALP enquanto o grupo controle apresentou somente escore 1, apesar dessa diferença não ter sido estatisticamente significativa. Esses resultados indicam uma maior maturação dos tecidos periodontais mineralizados<sup>49,50</sup> nesse grupo de terapia combinada PRP/LLLT. Neste contexto, é importante considerar que o grupo PRP também mostrou predominância de escore 2 nas análises de OCN, OPN e ALP, enquanto o grupo controle apresentou somente escore 1, apesar dessas diferenças não terem sido estatisticamente significativas. Deve-se considerar, ainda, que o grupo LLLT apresentou escores 1 e 2, tanto na análise de OPN, como na análise de ALP, enquanto o grupo controle apresentou somente escore 1. Tomados em conjunto e, considerando os resultados do estudo histomorfométrico realizado anteriormente por nosso

grupo,<sup>1</sup> os resultados do presente estudo parecem indicar uma aceleração no processo de maturação dos tecidos periodontais mineralizados no grupos tratados quando comparados ao grupo controle (sem tratamento), principalmente no grupo PRP/LLLT.

Aos 30 dias pós-operatórios, a análise estatística não mostrou diferenças significativas nos padrões de imunomarcção de OCN, OPN e ALP entre os grupos experimentais. Contudo, importantes aspectos observados na avaliação detalhada desses padrões de imunomarcção devem ser ressaltados. O grupo PRP apresentou predominância de escore 2 nas análises de OCN e OPN, além de totalidade de escore 2 na análise de ALP, enquanto o grupo controle apresentou predominância de escore 1 nas análises dessas três proteínas. No grupo PRP/LLLT, os escores de OCN variaram de 2 a 3, sendo que o escore 3 não foi observado nos demais grupos experimentais, além de apresentar totalidade de escore 2 nas análises de OPN e ALP, sugerindo um estágio mais avançado de mineralização dos tecidos periodontais neste grupo. Sabe-se que a OCN é um marcador para maturação de osteoblastos e cementoblastos, que pode regular a extensão da mineralização.<sup>50</sup>

No estudo prévio realizado por nosso grupo de pesquisa,<sup>1</sup> utilizando os mesmos grupos experimentais e metodologia, concluiu-se que a LLLT, PRP ou a associação destas terapias promoveram formação de novo cimento com ligamento periodontal funcional. A associação PRP/LLLT não mostrou efeitos adicionais quando comparada ao uso de cada terapia isoladamente. É importante ressaltar, contudo, que essas conclusões foram feitas com base em análise histomorfométrica. No presente estudo, as análises realizadas permitiram avaliar a qualidade dos tecidos periodontais neoformados após a realização dos diferentes tratamentos, sendo que os resultados sugeriram uma maior maturação dos tecidos periodontais mineralizados no grupo da associação PRP/LLLT. No entanto, deve-se exercer muita cautela na extrapolação desses resultados para a prática clínica, pois vários fatores deverão ser

considerados na seleção da terapia mais adequada para o paciente, entre os quais a relação custo-benefício e as reais vantagens clínicas proporcionadas pela terapia selecionada.

Dentro dos limites deste estudo, pode-se concluir que a associação PRP/LLLT apresentou maior nível de maturação dos tecidos periodontais mineralizados quando comparada ao controle em defeitos de fenestração em ratos.

## FOOTNOTES

# Vetaset®, Fort Dodge Animal Health, Charles City, IA

\*\* Coopazine®, Coopers Brasil Ltda., São Paulo, Brasil

†† Hermle Z323K Centrifuge, Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Alemanha

‡‡ Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge® Saúde Animal Ltda., Campinas, Brasil

§§ Cloreto de Cálcio a 10%, ScienceLab.com Inc., Houston, TX

|| TheraLase, DMC Equipamentos, São Carlos, SP, Brazil.

¶¶ Animal Blood Counter Vet, ABX Diagnostics, Montpellier, France

## LaborClin, Pinhais, Brasil

\*\*\* Diva Decloaker, Biocare Medical, Concord, CA

††† Decloaking Chamber™, Biocare Medical, Concord, CA

‡‡‡ Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA

§§§ Universal Dako Labeled HRP Streptavidin–Biotin Kit®, Dako Laboratories, Carpinteria, CA

||| DAB chromogen Kit®, Dako Laboratories, Carpinteria, CA

¶¶¶ Leica DM400 B LED, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha

#### LAS V4.2, Leica Application Suite V4, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha

## **AGRADECIMENTOS E FONTE DE FINANCIAMENTO**

Os autores agradecem à “Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP” (FAPESP - São Paulo, SP, Brasil), pela concessão de Bolsa de Mestrado (Processo 2013/15380-3-4) à Adrieli de Paula Neves. Os autores agradecem, também, à professora Suely Regina Mogami Bomfim, da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba – UNESP, pela assistência nos procedimentos experimentais; ao professor Edilson Ervolino, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, pela assessoria prestada nas análises histoquímica e imunoistoquímica deste estudo e ao professor Michel Reis Messoro, da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, pela assessoria prestada na análise estatística deste estudo.

## **CONFLITO DE INTERESSE**

Os autores declaram que não possuem nenhum conflito de interesse.

## **REFERÊNCIAS**

1. Nagata MJ, de Campos N, Messoro MR, et al. Platelet-rich plasma, low-level laser therapy or their combination promotes periodontal regeneration in fenestration defects. A preliminary in vivo study. *J Periodontol* 2014;85(6):770-778.
2. Izumi Y, Aoki A, Yamada Y, et al. Current and future periodontal tissue engineering. *Periodontol 2000* 2011;56(1):166-187.



3. Prabhu V, Rao SB, Chandra S, et al. Spectroscopic and histological evaluation of wound healing progression following Low Level Laser Therapy (LLLT). *J Biophotonics* 2012;5(2):168-184.
4. Altan AB, Bicakci AA, Avunduk MC, Esen H. The effect of dosage on the efficiency of LLLT in new bone formation at the expanded suture in rats. *Lasers Med Sci* 2015;30(1):255-262.
5. Sella VR, do Bomfim FR, Machado PC, da Silva Morsoleto MJ, Chohfi M, Plapler H. Effect of low-level laser therapy on bone repair: a randomized controlled experimental study. *Lasers Med Sci* 2015;30(3):1061-1068.
6. Fávaro-Pípi E, Ribeiro DA, Ribeiro JU, et al. Low-level laser therapy induces differential expression of osteogenic genes during bone repair in rats. *Photomed LaserSurg* 2011; 29(5):311-317.
7. Merli LA, Santos MT, Genovese WJ, Faloppa F. Effect of low-intensity laser irradiation on the process of bone repair. *Photomed Laser Surg* 2005;23(2):212-215.
8. Doğan GE, Demir T, Orbak R. Effect of low-level laser on guided tissue regeneration performed with equine bone and membrane in the treatment of intrabony defects: a clinical study. *Photomed Laser Surg* 2014;32(4):226-231.
9. Grassi FR, Ciccolella F, D'Apolito G, et al. Effect of low-level laser irradiation on osteoblast proliferation and bone formation. *J Biol Regul Homeost Agents* 2011;25(4):603-614.

10. Stein E, Koehn J, Sutter W, et al. Initial effects of low -level laser therapy on growth and differentiation of human osteoblast-like cells. *Wien Klin Wochenschr* 2008;120 (3-4):112-117.
11. Soares DM, Ginani F, Henriques ÁG, Barboza CA. Effects of laser therapy on the proliferation of human periodontal ligament stem cells. *Lasers Med Sci* 2015;30(3):1171-1174.
12. Ogita M, Tsuchida S, Aoki A, et al. Increased cell proliferation and differential protein expression induced by low-level Er:YAG laser irradiation in human gingival fibroblasts: proteomic analysis [published online ahead of print Nov 28, 2014] *Lasers Med Sci*; doi: 10.1007/s10103-014-1691-4.
13. Saygun I, Karacay S, Serdar M, Ural AU, Sencimen M, Kurtis B. Effects of laser irradiation on the release of basic fibroblast growth factor (bFGF), insulin like growth factor-1 (IGF-1), and receptor of IGF-1 (IGFBP3) from gingival fibroblasts. *Lasers Med Sci* 2008;23(2):211-215.
14. Kreisler M, Christoffers AB, Willershausen B, d'Hoedt B. Effect of low-level GaAlAs laser irradiation on the proliferation rate of human periodontal ligament fibroblasts: an in vitro study. *J Clin Periodontol* 2003;30(4):353-358.
15. Safavi SM, Kazemi B, Esmaeili M, Fallah A, Modarresi A, Mir M. Effects of low-level He-Ne laser irradiation on the gene expression of IL-1beta, TNF-alpha, IFN-gamma, TGF-beta, bFGF, and PDGF in rat's gingiva. *Lasers Med Sci* 2008;23(3):331-335.
16. Olban M, Wachowicz B, Koter M, Bryszewska M. The biostimulatory effect of red laser irradiation on pig blood platelet function. *Cell Biol Int* 1998;22(3):245-248.

17. Gresner P, Wata1a C, Sikurová L. The effect of green laser light irradiation on whole blood platelets. *J Photochem Photobiol B* 2005;79(1):43-50.
18. Smith PC, Martínez C, Cáceres M, Martínez J. Research on growth factors in periodontology. *Periodontol 2000* 2015;67(1):234-50.
19. Del Fabbro M, Bortolin M, Taschieri S, Weinstein R. Is platelet concentrate advantageous for the surgical treatment of periodontal diseases? A systematic review and meta-analysis. *J Periodontol* 2011;82(8):1100-1111.
20. Palmer RM, Cortellini P, Group B of European Workshop on Periodontology. Periodontal tissue engineering and regeneration: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol* 2008;35(8):83-86.
21. Plachokova AS, Nikolidakis D, Mulder J, Jansen JA, Creugers NH. Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in dentistry: a systematic review. *Clin Oral Implants Res* 2008;19(6):539-545.
22. Liao HT, Marra KG, Rubin JP. Application of platelet-rich plasma and platelet-rich fibrin in fat grafting: basic science and literature review. *Tissue Eng Part B Rev* 2014; 20(4):267-276.
23. Bertrand-Duchesne MP, Grenier D, Gagnon G. Epidermal growth factor released from platelet-rich plasma promotes endothelial cell proliferation in vitro. *J Periodontal Res* 2010;45(1):87-93.
24. Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg* 2004;62(4):489-496.

25. Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent* 2001;10(4):225-228.
26. Anitua E, Troya M, Orive G. Plasma rich in growth factors promote gingival tissue regeneration by stimulating fibroblast proliferation and migration and by blocking transforming growth factor- $\beta$ 1-induced myodifferentiation. *J Periodontol* 2012; 83(8):1028-1037.
27. Cáceres M, Martínez C, Martínez J, Smith PC. Effects of platelet-rich and -poor plasma on the reparative response of gingival fibroblasts. *Clin Oral Implants Res* 2012;23(9):1104-1111.
28. Casati L, Celotti F, Negri-Cesi P, Sacchi MC, Castano P, Colciago A. Platelet derived growth factor (PDGF) contained in Platelet Rich Plasma (PRP) stimulates migration of osteoblasts by reorganizing actin cytoskeleton. *Cell Adh Migr* 2014;8(6):595-602.
29. Anitua E, Tejero R, Zalduendo MM, Orive G. Plasma rich in growth factors promotes bone tissue regeneration by stimulating proliferation, migration, and autocrine secretion in primary human osteoblasts. *J Periodontol* 2013;84(8):1180-1190.
30. Anitua E, Troya M, Orive G. An autologous platelet-rich plasma stimulates periodontal ligament regeneration. *J Periodontol* 2013;84(11):1556-1566.
31. King GN, King N, Cruchley AT, Wozney JM, Hughes FJ. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 promotes wound healing in rat periodontal fenestration defects. *J Dent Res* 1997;76(8):1460-1470.

32. Nagata MJ, de Campos N, Messori MR, et al. Platelet-rich plasma derived from bone marrow aspirate promotes new cementum formation. *J Periodontol* 2014;85(12):1702-1711.
33. Coen M, Menegatti E, Salvi F, et al. Altered collagen expression in jugular veins in multiple sclerosis. *Cardiovasc Pathol* 2013;22(1):33-38.
34. Binnebösel M, Klink CD, Otto J, et al. Impact of mesh positioning on foreign body reaction and collagenous ingrowth in a rabbit model of open incisional hernia repair. *Hernia* 2010;14(1):71-77.
35. Nagata MJ, Santinoni CS, Pola NM, et al. Bone marrow aspirate combined with low level laser therapy: A new therapeutic approach to enhance bone healing. *J Photochem Photobiol B* 2013;121:6-14.
36. Hawthorne AC, Xavier SP, Okamoto R, Salvador SL, Antunes AA, Salata LA. Immunohistochemical, tomographic, and histological study on onlay bone graft remodeling. Part III: allografts. *Clin Oral Implants Res* 2013;24(10):1164-1172.
37. Wikesjö UM, Selvig KA. Periodontal wound healing and regeneration. *Periodontol 2000* 1999;19:21-39.
38. Haney JM, Zimmerman GJ, Wikesjö UM. Periodontal repair in dogs: evaluation of the natural disease model. *J Clin Periodontol* 1995;22(3):208-213.
39. Wikesjö UM, Selvig KA, Zimmerman G, Nilvéus R. Periodontal repair in dogs: healing in experimentally created chronic periodontal defects. *J Periodontol* 1991;62(4):258-263.

40. Jones WA, O'Leary TJ. The effectiveness of in vivo root planing in removing bacterial endotoxin from the roots of periodontally involved teeth. *J Periodontol* 1978;49(7):337-342.
41. Zhang Y, Wei L, Wu C, Miron RJ. Periodontal regeneration using strontium-loaded mesoporous bioactive glass scaffolds in osteoporotic rats. *PLoS One* 2014;9(8):e104527.
42. Yang Y, Rossi FM, Putnins EE. Periodontal regeneration using engineered bone marrow mesenchymal stromal cells. *Biomaterials* 2010;31(33):8574-8582.
43. Jo CH, Kim JE, Yoon KS, Shin S. Platelet-rich plasma stimulates cell proliferation and enhances matrix gene expression and synthesis in tenocytes from human rotator cuff tendons with degenerative tears. *Am J Sports Med* 2012;40(5):1035-1045.
44. Chen MH, Huang YC, Sun JS, Chao YH, Chen MH. Second messengers mediating the proliferation and collagen synthesis of tenocytes induced by low-level laser irradiation. *Lasers Med Sci* 2015;30(1):263-272.
45. Massotti FP, Gomes FV, Mayer L, et al. Histomorphometric assessment of the influence of low-level laser therapy on peri-implant tissue healing in the rabbit mandible. *Photomed Laser Sur* 2015;33(3):123-128.
46. Allahverdi A, Sharifi D, Takhtfooladi MA, Hesaraki S, Khansari M, Dorbeh SS. Evaluation of low-level laser therapy, platelet-rich plasma, and their combination on the healing of Achilles tendon in rabbits. [published online ahead of print Mar 11, 2015]. *Lasers Med Sci*; doi: 10.1007/s10103-015-1733-6.

47. Barbosa D, de Souza RA, de Carvalho WR, et al. Low-level laser therapy combined with platelet-rich plasma on the healing calcaneal tendon: a histological study in a rat model. *Lasers Med Sci* 2013;28(6):1489-1494.
48. Hinz B. Matrix mechanics and regulation of the fibroblast phenotype. *Periodontol 2000* 2013;63(1):14-28.
49. Arzate H, Zeichner-David M, Mercado-Celis G. Cementum proteins: role in cementogenesis, biomineralization, periodontium formation and regeneration. *Periodontol 2000* 2015;67(1):211-233.
50. Nanci A, Bosshardt DD. Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontol 2000* 2006; 40:11-28.

## LEGENDA DE FIGURAS

**Figura 1.** Nível de maturação das fibras colágenas. Fotomicrografias evidenciando as fibras colágenas imaturas e fibras colágenas maduras nos grupos C (A), LLLT (B), PRP (C), PRP/LLLT (D), aos 10 dias pós-operatórios. Fotomicrografias evidenciando as fibras colágenas imaturas e fibras colágenas maduras nos grupos C (E), LLLT (F), PRP (G), PRP/LLLT (H), aos 30 dias pós-operatórios (coloração com vermelho picosirius visualizado em microscopia de luz polarizada; 200x).

**Figura 2.** Proporção de fibras colágenas imaturas e maduras. Gráfico mostrando as médias e desvios-padrão das porcentagens de fibras colágenas imaturas, com comparações inter-grupos e intra-grupos, aos 10 e 30 dias pós-operatórios (A). Gráfico mostrando as médias e desvios-padrão das porcentagens de fibras colágenas maduras, com comparações inter-grupos e intra-grupos, aos 10 e 30 dias pós-operatórios (B). \* =  $p < 0.05$ .

**Figura 3.** Padrão de imunomarcação para Runx2. Gráfico mostrando as médias e desvios-padrão do número de células Runx2-positivas, com comparação inter-grupos e intra-grupos, aos 10 e 30 dias pós-operatórios (A). Fotomicrografias evidenciando as células Runx2-positivas nos grupos (cabeças de seta vermelhas) C (B), LLLT (C), PRP (D), PRP/LLLT (E), aos 10 dias pós-operatórios. \* =  $p < 0.05$ ; de = dentina; tc = tecido conjuntivo (contra-coloração com fast green; 1500x).

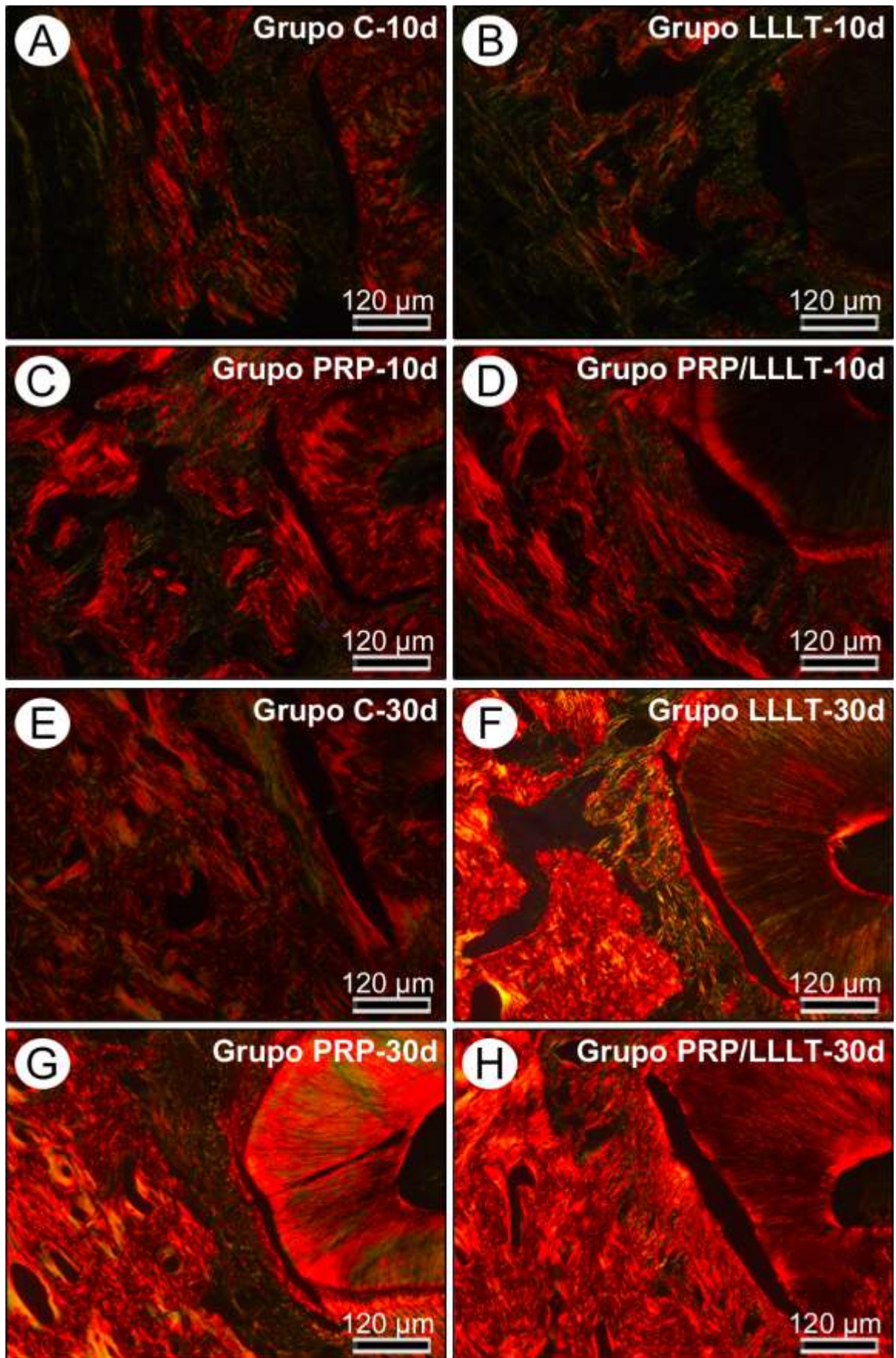
**Figura 4.** Padrão de imunomarcação para OCN. Gráfico mostrando as medianas e desvios interquartil dos escores para OCN, com comparação inter-grupos e intra-grupos, aos 10 e 30 dias pós-operatórios (A). Fotomicrografias evidenciando as células OCN-positivas (cabeças de seta azuis, pretas e vermelhas) nos grupos C (B), LLLT (C), PRP (D), PRP/LLLT (E), aos 10 dias pós-operatórios. \* =  $p < 0.05$ ; de = dentina; cabeças de seta azuis = células OCN-positivas sobre o tecido ósseo; cabeças de seta pretas = células OCN-positivas sobre a

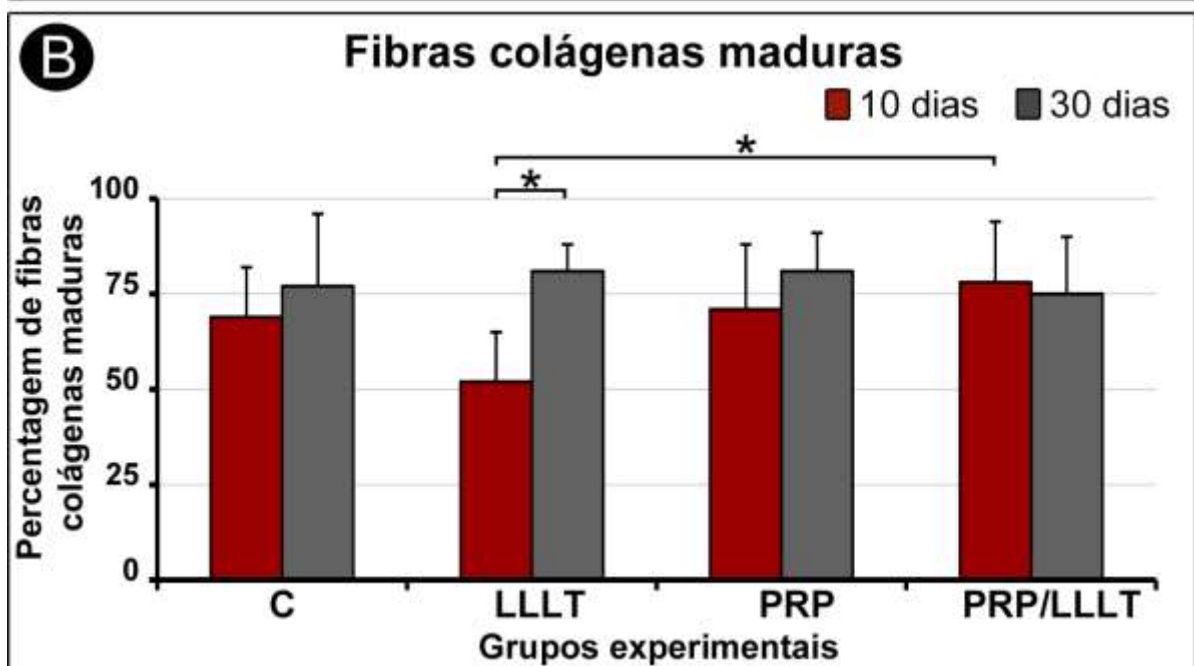
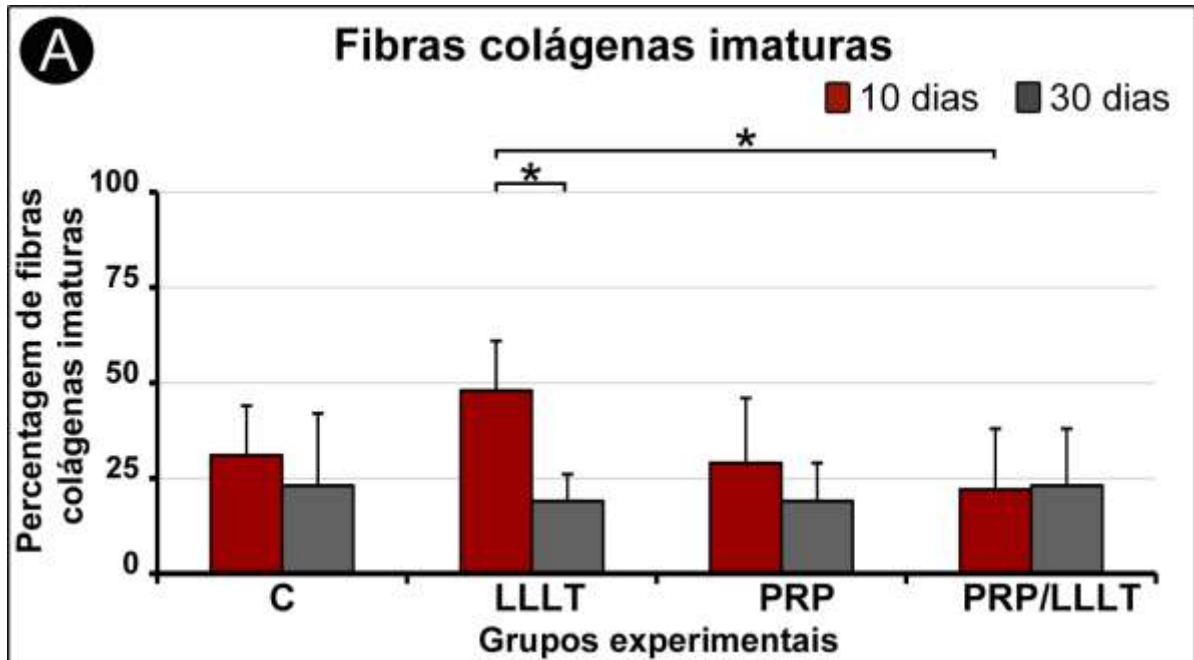


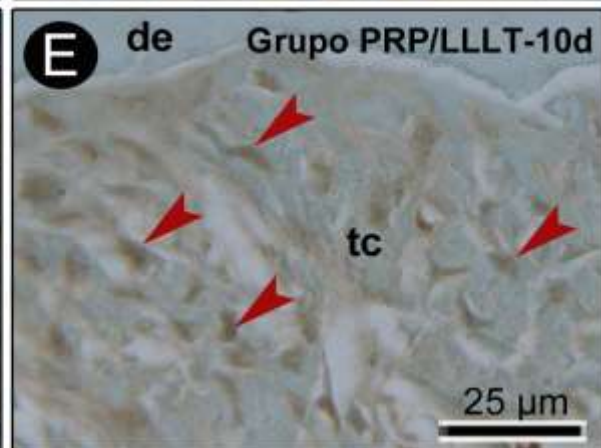
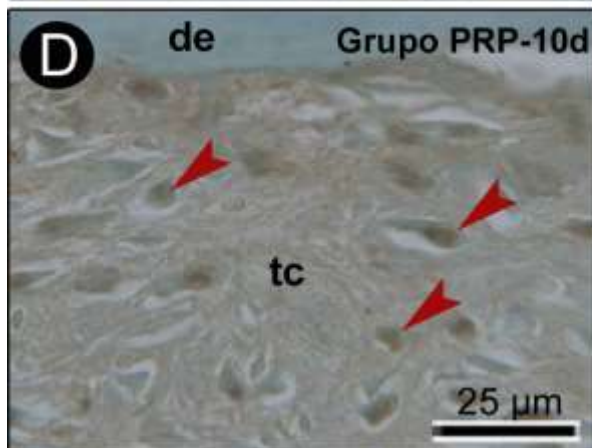
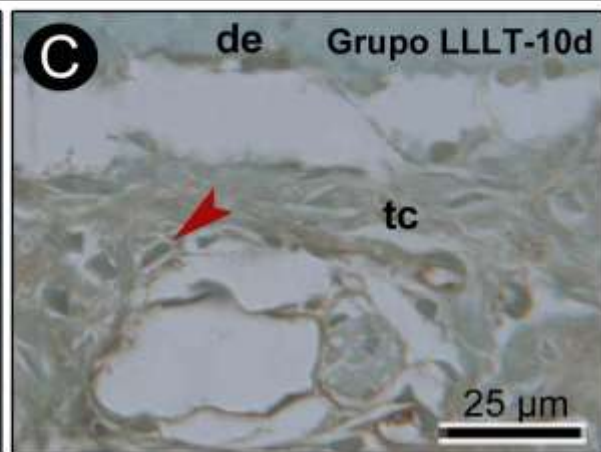
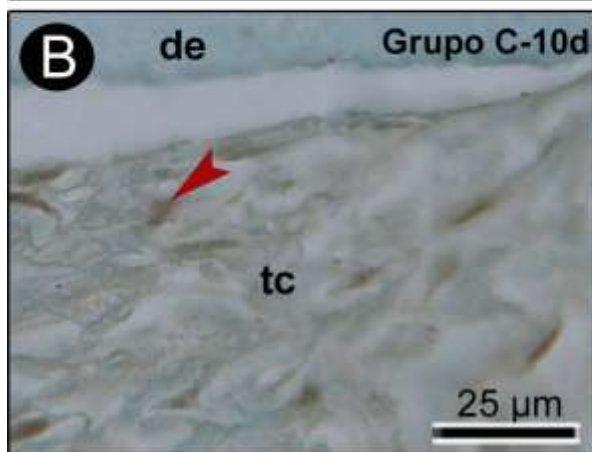
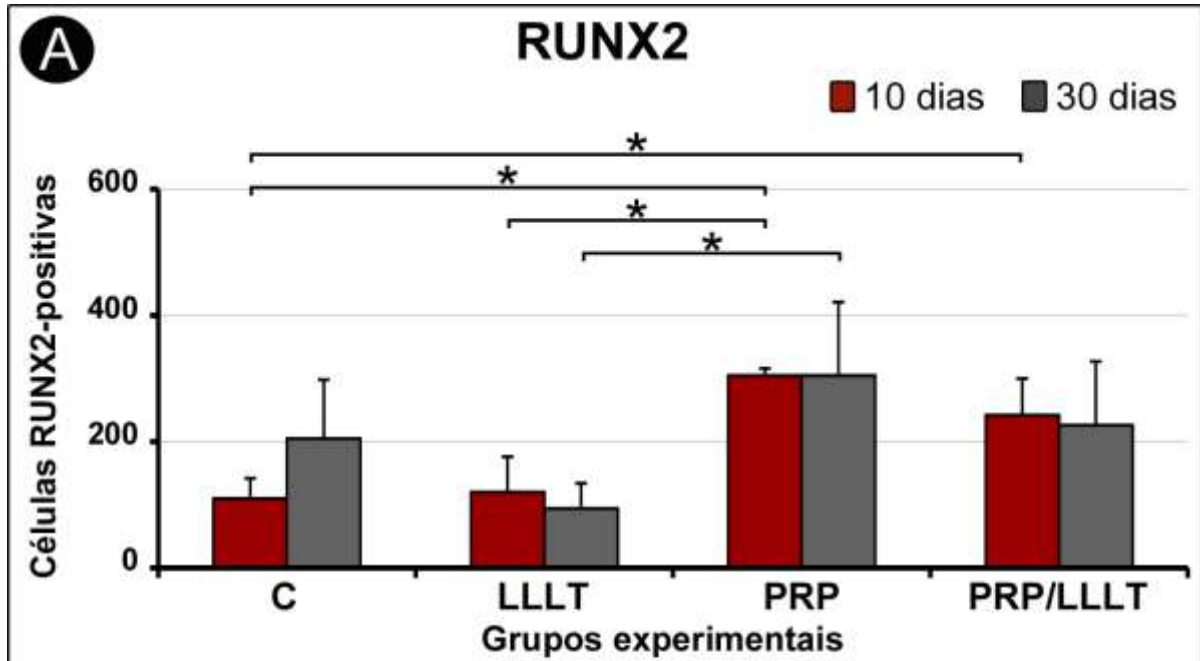
dentina; cabeças de seta vermelhas = células OCN-positivas no tecido conjuntivo; tc = tecido conjuntivo (contra-coloração com hematoxilina de harris; 1000x).

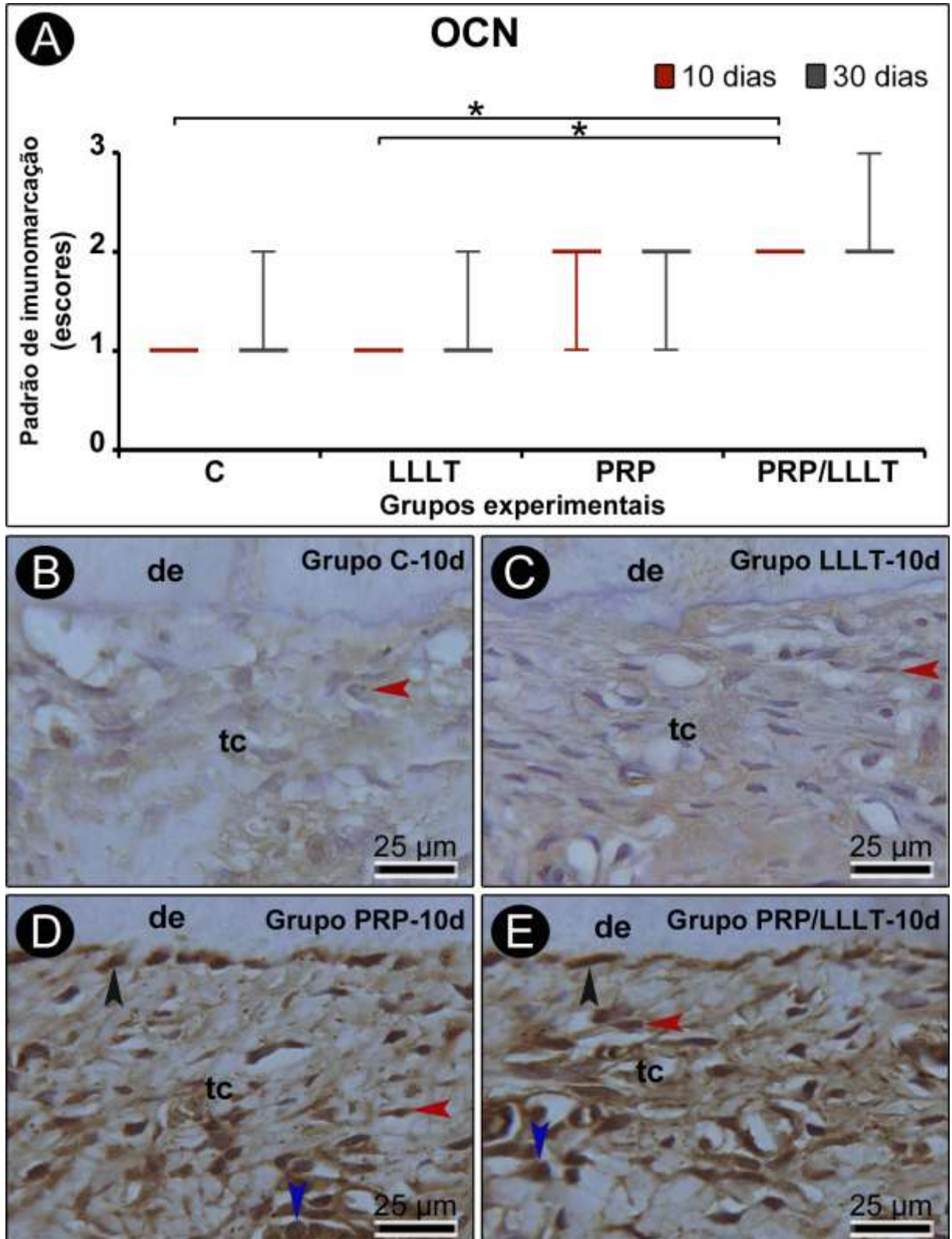
**Figura 5.** Padrão de imunomarcção para OPN. Gráfico mostrando as medianas e desvios interquartil dos escores para OPN, com comparação inter-grupos e intra-grupos, aos 10 e 30 dias pós-operatórios (A). Fotomicrografias evidenciando as células OPN-positivas (cabeças de seta azuis, pretas e vermelhas) nos grupos C (B), LLLT (C), PRP (D), PRP/LLLT (E), aos 10 dias pós-operatórios. \* =  $p < 0.05$ ; de = dentina; cabeças de seta azuis = células OPN-positivas sobre o tecido ósseo; cabeças de seta pretas = células OPN-positivas sobre a dentina; cabeças de seta vermelhas = células OPN-positivas no tecido conjuntivo; tc = tecido conjuntivo (contra-coloração com hematoxilina de harris; 1000x).

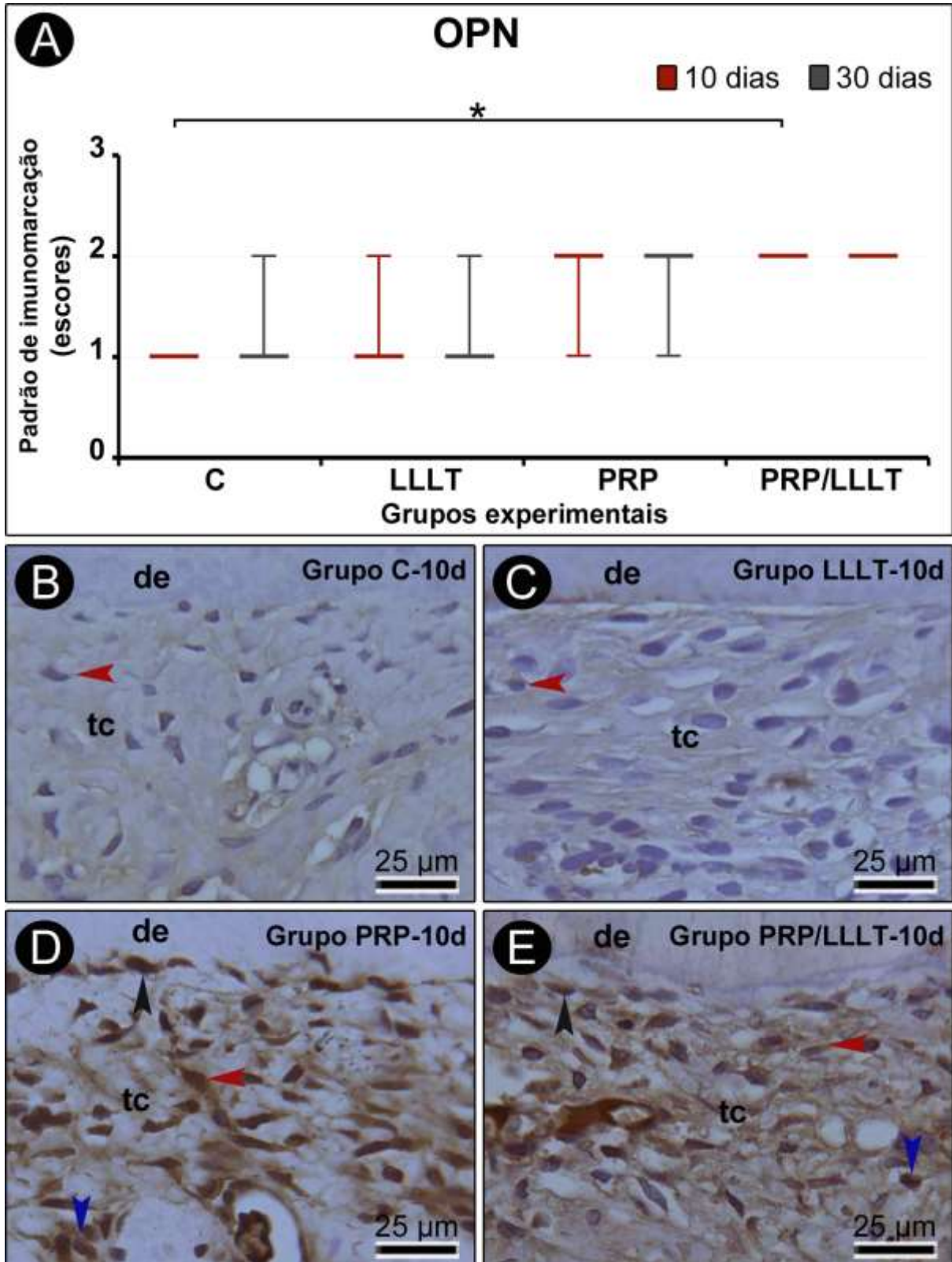
**Figura 6.** Padrão de imunomarcção para ALP. Gráfico mostrando as medianas e desvios interquartil dos escores para ALP, com comparação inter-grupos e intra-grupos, aos 10 e 30 dias pós-operatórios (A). Fotomicrografias evidenciando as células ALP-positivas (cabeças de seta vermelhas) nos grupos C (B), LLLT (C), PRP (D), PRP/LLLT (E), aos 10 dias pós-operatórios. de = dentina; tc = tecido conjuntivo (contra-coloração com hematoxilina de harris; 1000x).

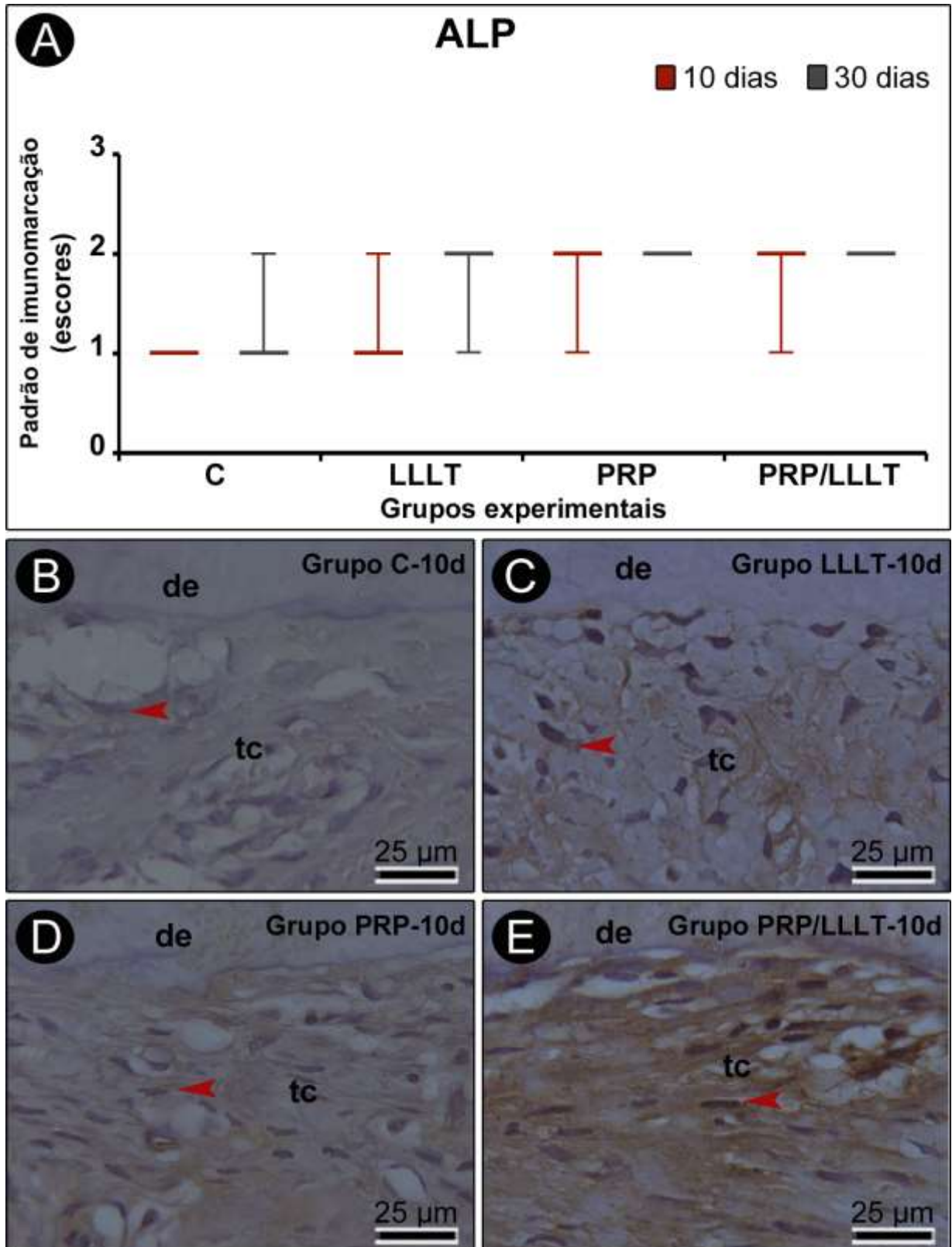












# *Anexos*



# Anexo A – Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)

78




Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)  
Committee for Ethical Use of Animals (CEUA)

## CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "Avaliação da influência do plasma rico em plaquetas, da terapia com laser em baixa intensidade ou da associação de ambos na cicatrização de defeitos de fenestração periodontal em ratos. Estudo histoquímico e imunoistoquímico" sob responsabilidade da Pesquisadora **MARIA JOSÉ HITOMI NAGATA** e colaboração de Adrieli de Paula Neves, Carolina Santinoni, Natália de Campos, Edison Ervolino e Valdir Gouveia Garcia está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo CEUA, de acordo com o processo FOA-00900-2013.

## CERTIFICATE

We certify that the research "Influence of platelet-rich plasma, low-level laser therapy or their combination on the healing of periodontal fenestration defects in rats. A histochemical and immunohistochemical study", process number FOA-00900-2013, under responsibility of **MARIA JOSÉ HITOMI NAGATA** and with collaboration of Adrieli de Paula Neves, Carolina Santinoni, Natália de Campos, Edison Ervolino and Valdir Gouveia Garcia agree with Ethical Principles in Animal Research (COBEA) and was approved by CEUA.



Prof. Dr. **EDILSON ERVOLINO**  
Coordenador da CEUA  
CEUA Coordinator

Faculdade de Odontologia e Faculdade de Medicina Veterinária  
Rua José Bonifácio, 1193 CEP 16015-050 - Vila Mendonça  
Tel (18) 3536-3234 Fax (18) 3636-3333 E-mail: ervolino@foa.unesp.br

# Anexo B – Normas para Publicação segundo o Periódico *Journal of Periodontology*

79



Instructions to Authors

Updated January 2013

This update removes the Case Reports section, as the Journal is no longer accepting these papers. Authors are encouraged to submit Case Reports to *Clinical Advances in Periodontics*. Figure guidelines have been replaced with a more extensive guide. Please see the *Journal of Periodontology* Digital Art Guidelines for more information. Other revisions and important items are highlighted in boldface type.

Please see page 8 for requirements when submitting clinical trials to the *Journal of Periodontology*.

## CONTENT

The *Journal of Periodontology* publishes articles relevant to the science and practice of periodontics and related areas. Manuscripts are accepted for consideration with the understanding that text, figures, photographs, and tables have not appeared in any other publication, except as an abstract prepared and published in conjunction with a presentation by the author(s) at a scientific meeting, and that material has been submitted only to this journal.

## MANUSCRIPT CATEGORIES AND SPECIFIC FORMATS

Submissions to the *Journal of Periodontology* should be limited to one of the categories defined below. Specific information regarding length and format is provided for each category. Please also refer to the instructions provided under Manuscript Submission, Preparation, and Format.

All manuscripts will be reviewed by the Editors for novelty, potential to extend knowledge, and relevance to clinicians and researchers in the field. Some manuscripts will be returned without review, based on the Editors' judgment of the appropriateness of the manuscript for the *Journal of Periodontology*.

## ORIGINAL ARTICLES

These are papers that report significant clinical or basic research on the pathogenesis, diagnosis, and treatment of the different forms of periodontal disease. Papers dealing with design, testing, and other features of dental implants are also included.

### Format

Original articles must be limited to 4,000 words (excluding the abstract, references, and figure legends). The reference list should not exceed 50 references, and the combined number of figures and tables must be six or fewer. Multi-panel figures are acceptable.

### Abstract

All original articles should be submitted with a structured abstract, consisting of no more than 250 words and the following four paragraphs:

- \* Background: Describes the problem being addressed.
- \* Methods: Describes how the study was performed.
- \* Results: Describes the primary results.
- \* Conclusions: Reports what authors have concluded from these results, and notes their clinical implications.

#### Introduction

The Introduction contains a concise review of the subject area and the rationale for the study. More detailed comparisons to previous work and conclusions of the study should appear in the Discussion section.

#### Materials and Methods

This section lists the methods used in the study in sufficient detail so that other investigators would be able to reproduce the research. When established methods are used, the author need only refer to previously published reports; however, the authors should provide brief descriptions of methods that are not well known that have been modified. Identify all drugs and chemicals used, including both generic and, if necessary, proprietary names and doses. The populations for research involving humans should be clearly defined and enrollment dates provided.

#### Results

Results should be presented in a logical sequence with reference to tables, figures, and illustrations as appropriate.

#### Discussion

New and possible important findings of the study should be emphasized, as well as any conclusions that can be drawn. The Discussion should compare the present data to previous findings. Limitations of the experimental methods should be indicated, as should implications for future research. New hypotheses and clinical recommendations are appropriate and should be clearly identified. Recommendations, particularly clinical ones, may be included when appropriate.

### **MANUSCRIPT SUBMISSION, PREPARATION, AND FORMAT**

The Journal of Periodontology accepts manuscript submissions online at: <http://mc.manuscriptcentral.com/jperio>.

Authors should prepare manuscripts in accordance with both the instructions below and the preceding instructions provided for each manuscript category.

Detailed instructions for online submission are described under “Web Uploading Policies and Instructions.”

Inquiries regarding current submissions should be sent to: Managing Editor, Journal of Periodontology, 737 North Michigan Avenue, Suite 800, Chicago, IL 60611-6660. Telephone: 312/573-3224; e-mail: [julie@perio.org](mailto:julie@perio.org).

### **SUBMISSION**

#### Authorship

Individuals identified as authors must meet the following criteria established by the International Committee of Medical Journal Editors: 1) substantial contributions to conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data; 2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content; and 3) final approval of the version to be published.

Once the Journal has received a manuscript, any changes in authorship must be faxed to the editorial office at 312/573-3225 (attn: Jerry Eberle, Editorial Coordinator) or e-mailed to [jerry@perio.org](mailto:jerry@perio.org) and must contain the signature of the author who has been added or removed from the paper. Authors who are added must submit a conflict of interest and financial disclosure form (described under “Acknowledgments and Conflicts of Interest”).

#### Conflict of Interest and Financial Disclosure Forms

A conflict of interest and financial disclosure form must be submitted for each author.

The form can be found on ScholarOne Manuscripts (<http://mc.manuscriptcentral.com/jperio>) in the upper right-hand corner under “Instructions & Forms.” More information on conflicts of interest can be found under “Conflicts of Interest” below.

### **PREPARATION**

#### Style

Please follow the guidelines below when preparing the manuscript:

- \* Be sure to put the genus and species of an organism and the journal names in the reference section in italics.
- \* The Journal of Periodontology does not italicize common Latin terms such as *in vitro*, *in vivo*, e.g., or i.e.
- \* Use a block style; do not tabulate or indent material.

\* Refer to the 4th edition of the *Glossary of Periodontal Terms* published by the American Academy of Periodontology for preferred terminology.

\* Authors are encouraged to use the disease classification as outlined in the *Annals of Periodontology, volume 4* (1999 International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions).

## FORMAT

**Manuscripts must be submitted in Microsoft Word.**

Margins should be at least 1” on both sides and top and bottom. Materials should appear in the following order:

Title Page

Abstract (or Introduction) and Key Words

Text

Footnotes

Acknowledgments

References

Figure Legends

Tables

**Figures should not be embedded in the manuscript.** Please see the *Journal of Periodontology Digital Art Guidelines* for more information on submitting your figures.

Authors should retain a copy of their manuscript for their own records.

## TITLE PAGE

The Title Page should contain: 1) a concise but informative title; 2) first name, middle initial, and last name of each author, with the highest academic degree and the current institutional affiliation, including department for each (please use footnote symbols in the sequence \*, †, ‡, §, k, ¶, #, \*\*, etc. to identify authors and their corresponding institutions); 3) disclaimers, if any; 4) the name and address (including fax number and e-mail) of the author(s) responsible for correspondence (please indicate whether fax number and e-mail can be published); 5) word count and number of figures and tables in the manuscript; 6) a short running title of no more than 60 characters, including spaces; and 7) a one-sentence summary describing the key finding(s) from the study.

## ABSTRACT OR INTRODUCTION

Please see specific instructions provided for each manuscript category.

## KEY WORDS

A maximum of six key words or short phrases, drawn from MeSH documentation, to facilitate indexing should be listed below the abstract.

## TEXT

Please see specific instructions provided for each manuscript category.

## ACKNOWLEDGMENTS AND CONFLICTS OF INTEREST

Acknowledgments(s)

Following the Discussion, acknowledgments may be made to individuals who contributed to the research or the manuscript preparation at a level that did not qualify for authorship. This may include technical help or participation in a clinical study. Authors are responsible for obtaining written permission from persons listed by name. Acknowledgments must also include a statement that includes the source of any funding for the study, and defines the commercial relationships of each author.

Conflicts of Interest

In the interest of transparency and to allow readers to form their own assessment of potential biases that may have influenced the results of research studies, the *Journal of Periodontology* requires that all authors declare potential competing interests relating to papers accepted for publication. Conflicts of interest are defined as those influences that may potentially undermine the objectivity or integrity of the research, or create a perceived conflict of interest.

Authors are required to submit:

1) A statement in the acknowledgments section of the manuscript that includes the source of any funding for the study, and defines the commercial relationships of each author. If an author has no commercial relationships to declare, a statement to that effect should be included. This statement should include financial relationships that may pose a conflict of interest or potential conflict of interest. These may include financial support for research (salaries, equipment, supplies, travel reimbursement); employment or anticipated employment by any organization that may gain or lose financially through publication of the paper; and personal financial interests

such as shares in or ownership of companies affected by publication of the research, patents or patent applications whose value may be affected by this publication, and consulting fees or royalties from organizations which may profit or lose as a result of publication. An example is shown below.

2) A conflict of interest and financial disclosure form for each author. This form can be found on Scholar- One Manuscripts (<http://mc.manuscriptcentral.com/jperio>) in the upper right-hand corner under “Instructions & Forms.” The form should be completed by each author and provided to the corresponding author. The corresponding author is responsible for submitting these forms from each author when the manuscript is submitted. These forms should be sent to Jerry Eberle, Editorial Coordinator, either via e-mail at [jerry@perio.org](mailto:jerry@perio.org) or fax at 312/573-3225. These forms can also be uploaded in the cover letter area during the manuscript submission process.

Conflict of interest information will not be used as a basis for suitability of the manuscript for publication.

Example of Conflict of Interest Statement:

This study was supported by a grant from the Acme Implant Corporation, Seoul, Korea. Dr. Lee is on the scientific advisory board for Acme Implant Corporation and gives lectures sponsored by the company. Dr. Smith is a consultant and shareholder of the Brownstone Implant Corporation, Boston, Massachusetts. Dr. Wang is employed full-time as chief technical officer of the Acme Implant Corporation. Drs. Able, Kim, and Bruce report no conflicts of interest related to this study.

## REFERENCES

References should be numbered consecutively in the order in which they appear in the text. A journal, magazine, or newspaper article should be given only one number; a book should be given a different number each time it is mentioned, if different page numbers are cited.

All references are identified, whether they appear in the text, tables, or legends, by Arabic numbers in superscript. Journal title abbreviations should be those used by the U.S. National Library of Medicine. If you are uncertain about the correct abbreviation for a journal title, please search for the journal at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog>.

The use of abstracts as references is strongly discouraged. Manuscripts accepted for publication may be cited and should include the manuscript’s DOI, if known. Material submitted, but not yet accepted, should be cited in text as “unpublished observations.” Written and oral personal communications may be referred to in text, but not cited as references. Please provide the date of the communication and indicate whether it was in a written or oral form. In addition, please identify the individual and his/her affiliation. Authors should obtain written permission and confirmation of accuracy from the source of a personal communication. Presented papers, unless they are subsequently published in a proceedings or peer-reviewed journal, may not be cited as references. In addition, Wikipedia.org may not be cited as a reference. For most manuscripts, authors should limit references to materials published in peer-reviewed professional journals. In addition, authors should verify all references against the original documents. References should be typed double-spaced. Examples of references are given below. Authors are encouraged to consult EndNote for the *Journal of Periodontology*’s preferred reference style.

### Journals

1. Standard journal reference. Note: list all authors if six or fewer; when seven or more, list only first three and add et al. Kurita-Ochiai T, Seto S, Suzuki N, et al. Butyric acid induces apoptosis in inflamed fibroblasts. *J Dent Res* 2008;87:51-55.
2. Corporate author. Federation Dentaire Internationale. Technical report no. 28. Guidelines for antibiotic prophylaxis of infective endocarditis for dental patients with cardiovascular disease. *Int Dent J* 1987;37:235.
3. Journal paginated by issue. Card SJ, Caffesse RG, Smith BA, Nasjleti CE. New attachment following the use of a resorbable membrane in the treatment of periodontitis in dogs. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1989;9(1):59-69.
4. Non-English-language titles translated into English. Buchmann R, Khoury F, Hesse T, Müller RF, Lange DE. Antimicrobial therapy of peri-implant disease (in German). *Z Zahna`rztl Implantol* 1996;12:152-157.

### Books and Other Monographs

5. Personal author(s). Tullman JJ, Redding SW. *Systemic Disease in Dental Treatment*. St. Louis: The CV Mosby Company; 1983:1-5.
6. Chapter in a book. Rees TD. Dental management of the medically compromised patient. In: McDonald RE, Hurt WC, Gilmore HW, Middleton RA, eds. *Current Therapy in Dentistry*, vol. 7. St. Louis: The CV Mosby Company; 1980:3-7.
7. Agency publication. Miller AJ, Brunelle JA, Carlos JP, Brown LJ, Lo`e H. *Oral Health of United States Adults*. Bethesda, MD: National Institute of Dental Research; 1987. NIH publication no. 87-2868.

8. Dissertation or thesis. Teerakapong A. Langerhans’ cells in human periodontally healthy and diseased gingiva. [Thesis]. Houston, TX: University of Texas; 1987. 92 p.

#### Electronic Citations

Note: DOIs are preferred for journal articles. If a DOI is not available, please provide a URL and access date.

9. Online-only article. Rasperini G, Acunzo R, Limiroli E. Decision making in gingival recession treatment: Scientific evidence and clinical experience. *Clin Adv Periodontics* 2011;1:41-52. doi:10.1902/cap.2011.100002.

10. Ahead of print. McGuire MK, Scheyer ET, Nevins M, et al. Living cellular construct for increasing the width of keratinized gingiva. Results from a randomized, within-patient, controlled trial [published online ahead of print March 29, 2011]. *J Periodontol*; doi:10.1902/jop.2011.100671.

11. Web sites. Web sites. Centers for Disease Control and Prevention. Periodontal Disease. Available at: [http://www.cdc.gov/OralHealth/topics/periodontal\\_disease.htm](http://www.cdc.gov/OralHealth/topics/periodontal_disease.htm). Accessed September 29, 2010.

#### TABLES

Tables should be numbered consecutively in Arabic numbers in the order of their appearance in the text. A brief descriptive title should be supplied for each. Explanations, including abbreviations, should be listed as footnotes, not in the heading. Every column should have a heading. Statistical measures of variations such as standard deviation or standard error of the mean should be included as appropriate in the footnotes. Do not use internal horizontal or vertical rules. The system will easily read tables created with Word’s table utility or when inserted into Word from Excel.

#### FIGURE LEGENDS

Legends should be typed double-spaced with Arabic numbers corresponding to the figure. When arrows, symbols, numbers, or letters are used, explain each clearly in the legend; also explain internal scale, original magnification, and method of staining as appropriate. Panel labels should be in capital letters. Legends should not appear on the same page as the actual figures.

#### FIGURES

Please see the *Journal of Periodontology* [Digital Art Guidelines](#) for detailed instructions on submitting high quality images to the Journal of Periodontology.

#### EQUATIONS

Create an equation as text, treating any mathematical symbols as special characters and assigning them the Symbol font.

#### SUPPLEMENTAL MATERIAL

The *Journal of Periodontology* includes supplemental material in the online *Journal* ([www.joponline.org](http://www.joponline.org)). All supplemental material should be called out in the text.

#### Supplemental Figures and Tables

Journal of Periodontology articles are limited to a combined total of six figures and tables in the print publication. Any additional figures and tables should be submitted as supplemental files. Each supplemental figure or table should be submitted as a separate file. Please follow the guidelines regarding resolution, format, etc. for printed figures (see Digital Art Guidelines) and tables (see above) when preparing supplemental figures and tables. In summary, each figure, table, or multimedia file should be uploaded separately and the file names should clearly identify the file (i.e., SupplementalFigure1.tif, SupplementalTable1.xls, etc.). If file size limitations prevent you from uploading your supplemental material, please e-mail [bethanne@perio.org](mailto:bethanne@perio.org).

#### Supplemental Videos

The Journal of Periodontology publishes short videos to supplement a paper when appropriate. Most standard video formats are accepted. Videos should be edited to remove extraneous material. Authors should adhere to OSHA regulations when preparing their videos. Please e-mail [bethanne@perio.org](mailto:bethanne@perio.org) for information on how to submit videos. If your video is accepted for publication, all authors will need to submit a video copyright form. This form can be found on ScholarOne Manuscripts (<http://mc.manuscriptcentral.com/jperio>) in the upper right-hand corner under “Instructions & Forms.”

#### UNITS OF MEASUREMENT

Measurements of length, height, weight, and volume should be reported in metric units or their decimal multiples. Temperatures should be given in degrees Celsius and blood pressure in millimeters of mercury. All hematologic and clinical chemistry measurements should be reported in the metric system in terms of the

International System of Units (SI). Description of teeth should use the American Dental Association (i.e., Universal/National) numbering system.

### **STATISTICS**

Statistical methods should be described such that a knowledgeable reader with access to the original data could verify the results. Wherever possible, results should be quantified and appropriate indicators of measurement error or uncertainty given. Sole reliance on statistical hypothesis testing or normalization of data should be avoided. Data in as close to the original form as reasonable should be presented. Details about eligibility criteria for subjects, randomization, methods for blinding of observations, treatment complications, and numbers of observations should be included. Losses to observations, such as dropouts from a clinical trial, should be indicated. General-use computer programs should be listed. Statistical terms, abbreviations, and symbols should be defined. Detailed statistical, analytical procedures can be included as an appendix to the paper if appropriate.

### **ANIMAL AND HUMAN TRIALS**

All manuscripts reporting the use of human subjects must include a statement that the protocol was approved by the author’s institutional review committee for human subjects AND that the study was conducted in accordance with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 2000. Do not use any designation in tables, figures, or photographs that would identify a patient, unless express written consent from the patient is submitted.

For research involving the use of animals, it is necessary to indicate that the protocol was approved by the author’s institutional experimentation committee or was in accordance with guidelines approved by the Council of the American Psychological Society (1980) for the use of animal experiments.

### **FOOTNOTES**

Footnotes should be used only to identify author affiliation; to explain symbols in tables and illustrations; and to identify manufacturers of equipment, medications, materials, and devices. Use the following symbols in the sequence shown: \*, †, ‡, §, k, ¶, #, \*\*, ††, etc.

### **IDENTIFICATION OF PRODUCTS**

Use of brand names within the title or text is not acceptable, unless essential when the paper is comparing two or more products. When identification of a product is needed or helpful to explain the procedure or trial being discussed, a generic term should be used and the brand name, manufacturer, and location (city/state/country) cited as a footnote.

### **REVIEW PROCESS AND PUBLICATION PROCEDURES**

#### **Peer Review**

The *Journal of Periodontology* is a peer-reviewed publication. All manuscripts, including State of the Art Reviews, Commentaries, Case Reports, Case Series, and Clinical Practice, are submitted to a minimum of two reviewers and, when appropriate, to a statistical reviewer. Authors are given reviewer comments and additional information or observations as the Editor believes would be helpful. Revised manuscripts are due within 30 days of receipt of the Editor’s communication.

#### **Copyright**

All manuscripts accepted for publication become the property of the American Academy of Periodontology. A copyright form must be signed by all authors and returned to the Managing Editor. A file containing this form always accompanies the acceptance e-mail.

#### **Reprints**

Corresponding authors may purchase reprints at the time pages are received for proofreading. Reprints can be purchased in 4-color or black and white. Electronic reprints are also available.