



Sormani Bento Fernandes de Queiroz

“AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA FIBRINA RICA EM PLAQUETAS (FRP) COMPARADA A UM ANTI- INFLAMATÓRIO NÃO ESTEROIDAL (AINE) NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA E REPARADORA DE DEFEITOS CRÍTICOS EM CALOTA DE RATOS“

"EVALUATION OF THE EFFECTS OF PLATELET RICH FIBRIN (PRF) COMPARED TO A NON-STEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY (NSAID) IN THE INFLAMMATORY RESPONSE AND REPAIR OF CRITICAL DEFECTS IN THE RAT'S CALVARIA”

Araçatuba-SP

2019

Sormani Bento Fernandes de Queiroz

“AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA FIBRINA RICA EM PLAQUETAS (FRP) COMPARADA A UM ANTI-INFLAMATÓRIO NÃO ESTEROIDAL (AINE) NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA E REPARADORA DE DEFEITOS CRÍTICOS EM CALOTA DE RATOS”

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” UNESP, para obtenção do Título de “DOUTOR EM ODONTOLOGIA” – Área de concentração em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial.

Orientadora: Prof. Adj. Leonardo Perez Faverani

Coorientador: Prof. Adj. Osvaldo Magro Filho

Araçatuba-SP

2019

Catálogo na Publicação (CIP)
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

Q3a Queiroz, Sormani Bento Fernandes de.
Avaliação dos efeitos da fibrina rica em plaquetas (FRP) comparada a um anti- inflamatório não esteroideal (AINE) na resposta inflamatória e reparadora de defeitos críticos em calota de ratos / Sormani Bento Fernandes de Queiroz. - Araçatuba, 2019
88 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientador: Prof. Leonardo Perez Faverani
Coorientador: Prof. Osvaldo Magro Filho

1. Células sanguíneas 2. Inflamação 3. Plaquetas 4. Fibrina rica em plaquetas 5. Regeneração óssea I. T.

Black D7
CDD 617.64

DEDICATÓRIA

Dedico esta conquista aos grandes amores da minha vida, aqueles que são o real motivo para que eu tenha garra e determinação para seguir em frente lutando pelos meus sonhos: **a minha família.**

Aos meus pais **Almir Fernandes de Queiroz e Maria José Bento de Queiroz,**

Por serem sempre meu porto seguro, por me guiarem pelos caminhos da retidão de caráter e honestidade e por me ensinarem o significado verdadeiro da expressão “Amor ao Próximo”. Também, sempre me mostraram o valor da educação para se alcançar os objetivos na vida. Muito obrigado, amo vocês infinitamente!

À minhas irmãs **Sânzia, Synara e Symoni,**

Pela convivência de amor e carinho que me deram o suporte emocional, o carinho e amor que ajudaram a moldar quem sou hoje. Agradeço também pelos lindos sobrinhos e sobrinhas que vocês me deram e que iluminam tanto a nossa vida.

À minha esposa **Jannice de Queiroz Fernandes ,**

Por todo amor, apoio e incentivo. Por tolerar as viagens constantes e as noites em claro e principalmente por cuidar da nossa Alícia nos muitos momentos de minha ausência durante essa jornada. Amo vocês profundamente!

AOS meus filhos **Lucas, Gabriel e Alícia,**

Por me mostrarem o significado do verdadeiro amor incondicional. Em vocês enxergo o melhor de mim. Me sinto feliz em vê-los seguir o caminho da retidão de caráter, educação e do amor ao próximo. Não poderia ter filhos melhores. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Deus,

Gratidão é a palavra que resume o maior sentimento neste momento. Gratidão pela vida, pela família, pelos amigos e por esta conquista profissional. Pois o tempo de Deus sempre chega e a sua justiça também. O Senhor não age do nosso jeito, mas tudo que faz por nós é justo e perfeito.

Ao meu orientador Prof. Dr. Leonardo Perez Faverani

Pelo carinho, apoio, inestimável ajuda, disponibilidade e paciência. Seu entusiasmo e amor pela pesquisa e docência me inspiraram profundamente nessa jornada. Muito obrigado por todo aprendizado, pelas conversas produtivas, pela humildade, por dividir o centro cirúrgico comigo. Você dignifica a palavra “Professor”.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Osvaldo Magro Filho

Acima de tudo, pelas oportunidades que me foram dadas. Seu jeito humilde, sua voz tranquila e sua personalidade calma deixam transparecer o ser humano maravilhoso que você é. Aprendi muito com você não só sobre cirurgia, mas sobre a vida e sobre solidariedade. Meu sincero muito obrigado!

Aos professores membros da Banca Examinadora

Prof. Dra. Ana Paula Farnezi Bassi,

Pela convivência sempre cordial, pela disposição em ajudar, pelo sorriso sempre presente e pelo entusiasmo contagiante. Sua capacidade intelectual como professora e pesquisadora me servem de inspiração. É uma honra ter você em minha banca mais de 20 anos depois de termos nos conhecido em Araraquara, ainda no início de nossas jornadas acadêmica e profissional. Sinto orgulho de ver até onde você chegou e só consigo imaginar um futuro brilhante e vitorioso pela frente!

Prof. Dra. Roberta Okamoto

Foi e é, sem dúvida, um grande privilégio conviver com você durante meu período em Araçatuba. Surpreendente foi descobrir que por trás da professora com uma capacidade intelectual incrível e da pesquisadora prolífica existe um ser humano maravilhoso. A maneira como você cuida dos seus orientados chega a ter algo de maternal. Obrigado pela maneira respeitosa com que sempre me tratou, educação e classe a definem. É realmente uma honra tê-la em minha banca.

Prof. Dr. Roberto Henrique Barbeiro,

Nenhum outro professor ou cirurgião tiveram tanta influência em minha formação quanto você. Você me mostrou que é possível ensinar cirurgia, sem precisar perder a calma e a educação. Você me ensinou a importância de respeitar,

para ser respeitado. A tratar o aluno, o paciente, o colega, com cordialidade e respeito. Conheci poucos cirurgiões na minha vida com a habilidade e destreza manual que você tem. Carrego seus ensinamentos comigo cada vez que entro em um centro cirúrgico. Obrigado por tudo, Beto!

Prof. Dr. José Sandro Pereira da Silva,

O mais cientista dos cirurgiões, o mais cirurgião dos cientistas...começamos essa jornada juntos há 25 anos, dois recém formados buscando a formação em cirurgia no Estado de São Paulo. Foi muito bom contar com sua amizade e apoio durante esse período. Fico feliz em ver onde chegamos e o que conquistamos e principalmente em ver o cirurgião e pesquisador respeitado que você se tornou. É especial ter você aqui nesse momento meu amigo J.

Prof. Dr. Adriano da Rocha Germano,

Pela amizade, disponibilidade e apoio. Viemos da mesma faculdade e estivemos juntos vivendo o sonho da formação como cirurgiões e professores de cirurgia desde o início. Ver o que tem feito pelo crescimento da especialidade dentro do Colégio Brasileiro de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial é muito gratificante. Meu sincero muito obrigado.

Profª. Drª. Marisa Aparecida Cabrini Gabrielli

Pela simplicidade e simpatia em todos os momentos que nos encontramos. Admiro muito a sua competência e dedicação à Cirurgia e Traumatologia Buco Maxilo Facial. Obrigado pelo carinho com que sempre me tratou, pelo incentivo e disponibilidade.

Prof^a. Dr^a. Daniela Ponzoni

Agradeço a convivência agradável durante a minha pós graduação. Admiro sua competência e dedicação aos seus alunos. Foi um prazer imenso poder conviver e aprender com você. Obrigado por tudo!

Aos professores da Faculdade de Odontologia de Araçatuba,

Prof. Dr. Idelmo Rangel Garcia Júnior,

Pelas oportunidades abertas, pelas conversas sempre francas e produtivas, pela convivência sempre tão agradável e respeitosa. Um grande cirurgião, uma personalidade forte e marcante e uma grande pessoa.

Prof. Dr. Francisley Ávila Souza,

Pela disponibilidade, pelo apoio e pelos ensinamentos durante meu período em Araçatuba. Foram muitos plantões e cirurgias que dividimos, sempre se mostrando disposto a ensinar um pouco mais. Sua presença foi muito importante nessa jornada.

Prof. Dr. Wilson Roberto Poi,

Uma das pessoas mais incríveis que tive o prazer de conhecer pessoalmente durante minha estadia em Araçatuba. A definição perfeita das palavras “Mestre” e “Professor”. Tivesse eu conhecido e cursado sua disciplina há mais tempo, certamente eu teria sido um melhor professor e ser humano. Agradeço de fundo do meu coração pela forma respeitosa com que me tratou durante nossa breve convivência.

Profa. Dra. Alessandra Marcondes Aranega,

Uma pessoa formidável que conheci há muito tempo atrás e que tive a sorte de reencontrar durante o doutorado. Sempre gentil e simpática, seu entusiasmo como professora e sua dedicação ao CAUE são dignos de grande admiração. Meu muito obrigado!

Ao meu grande amigo **Valthierre Nunes de Lima**, sem o qual eu não teria chegado até esse momento. Você foi fundamental na minha entrada nesse Programa de Pós-Graduação, assim como em todas as fases de elaboração e execução dos projetos. Agradeço a você e Fernanda por terem me hospedado em sua casa durante minha estadia em Araçatuba (e também Maria Tereza por ter me cedido o quarto dela!). Fico orgulhoso e emocionado de acompanhar sua jornada desde a graduação até o momento atual como Doutorando na FOA. O seu futuro será ainda mais brilhante do que o presente. Sempre digo que poucas pessoas têm o privilégio de ensinar alguém e depois ser ensinado por ele. Obrigado pela amizade e pela disponibilidade de sempre!

A minha querida amiga **Juliana Zorzi**, uma pessoa muito especial que Deus me deu a graça de conhecer em Araçatuba. Ju, você é uma das pessoas mais doces e amigas que já conheci na vida. Sempre disposta a me ajudar em tudo relacionado à tese, sempre com uma palavra amiga e de incentivo. Iniciamos uma parceria profissional que já rendeu e renderá ainda muitos frutos. Uma amiga da PG para a vida! Deus lhe abençoe e proteja sempre.

Ao amigo **Gabriel Mulinari**, pela amizade e companheirismo e por ser tão prestativo sempre que precisei. Que a parceria profissional e a amizade se continuem por muito tempo!

A todos os amigos e colegas de pós-graduação em Araçatuba: **Gustavo Momesso, Erik Neiva, Tárik Polo, André Oliva, João Paulo Bonardi, Sabrina Ferreira, Laís Sara, André Fabris, Thiago Machado, Luara Colombo, Lara**

Cervantes, Rodrigo Capalbo, Ciro Duailibe, Fábio Batista, Paulo Zupelari, Jonathan Ribeiro, Leonardo de Freitas, Julierme Ferreira, Pilar Rodriguez, Jaqueline Assumi, Willam Ricardo, , Monica Palacio, Igor Putini, Yasmin Bantim, Bruna Junger. Cada um de vocês, de algum modo, me ajudou nessa conquista. Amizades para o resto da vida!

À Pró-Reitoria de Pesquisa (PROPe-UNESP) pela oportunidade de realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da Bolsa de doutorado e pelo auxílio financeiro à pesquisa, sem o qual não seria possível a realização dessa pesquisa.

A aluna de Iniciação Científica do departamento de Ciências Básicas, **Jaqueline Hassumi**, sem você fazendo as punções cardíacas, esse trabalho não teria saído! Muito obrigado pela colaboração e sucesso na sua PG que se inicia.

Ao Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada, representado pelos docentes da Disciplina de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial, Prof. Dr. Idelmo Rangel Garcia Junior, Prof. Dr. Osvaldo Magro filho, Prof. Dra. Alessandra Marcondes Aranega, Prof. Dra. Ana Paula Farnezi Bassi, Prof. Dra. Daniela Ponzoni, Prof. Dr. Francisley Ávila Souza e Prof. Dr. Leonardo Faverani, pela oportunidade ímpar de fazer parte dessa casa.

A todos os colegas da PG FOA-UNESP,

Pelos momentos agradáveis que passamos juntos na pós-graduação.

Aos funcionários e amigos da FOA-UNESP,

Que com tanto carinho me receberam. Pelo trabalho extremamente competente que desempenharam. A vocês o meu carinho e eterna admiração.

Aos funcionários da Pós-graduação: Valéria, Lilian e Cristiane,

Pela disponibilidade, atenção e educação. Obrigada por me ajudarem com tanta dedicação e competência.

EPÍGRAFE

*“ Se consegui enxergar mais longe,
é porque me apoiei
sobre os ombros de gigantes”.*

Isaac Newton

De Queiroz, SBF. Avaliação dos efeitos da Fibrina Rica em Plaquetas (FRP) comparada a um anti-inflamatório não esteroidal (AINE) na resposta inflamatória e reparadora de defeitos críticos em calotas de ratos [Tese]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2019.

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da Fibrina Rica em Plaqueta (FRP) no processo inflamatório em defeitos críticos em calotas de ratos e sua consequente reparação tecidual. Foram utilizados 128 (cento e vinte e oito) ratos (*Rattus norvegicus*, *albinus*, Wistar), adultos, com peso corporal entre 450 e 500g. Os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos equitativos que compuseram a amostra do trabalho, onde no grupo coágulo (GC) foi realizado o defeito ósseo de tamanho crítico preenchido com coágulo sanguíneo; grupo anti-inflamatório não esteroidal (AINE) que teve os defeitos de tamanho crítico preenchidos com coágulo sanguíneo e administrado cetoprofeno (10mg/kg dia); o grupo fibrina rica em plaquetas (FRP) com defeitos de tamanho crítico preenchidos com preparado de fibrina rica em plaquetas autóloga; e o grupo fibrina rica em plaquetas mais AINE (FRP + AINE) com defeitos de tamanho crítico preenchidos com preparado de fibrina rica em plaquetas autóloga e administrado cetoprofeno (10mg/kg dia). Cada grupo foi avaliado nos períodos de 2, 7, 14 e 28 dias e os espécimes analisados através da histometria, micro-CT e teste ELISA para presença de TNF α . Os dados quantitativos foram submetidos aos testes estatísticos ANOVA 1/2 fatores ou Kruskal-Wallis e pos Tukey e Dunn ($p < 0,01$). Os resultados histométricos e microtomográficos evidenciaram maior formação óssea para o grupo PRF em comparação aos demais grupos ($p < 0,05$) e menor presença de TNF-alfa no período inicial no grupo PRF com-

parado ao grupo controle ($p < 0,05$). Conclui-se que o PRF foi favorável desde os períodos iniciais até os mais tardios, auxiliando na resposta inflamatória e neoformação óssea.

Palavras-chave: Células sanguíneas, Inflamação, Plaquetas, Fibrina Rica em Plaquetas, Regeneração óssea, Sangue.

De Queiroz,SBF. Evaluation of the effects of Platelet Rich Fibrin (PRF) compared to an Non-Steroidal (NSAID) in the inflammatory and repair of critical defects in rat's calvaria . [Thesis]. Araçatuba: School of Dentistry, State University of São Paulo; 2019.

Abstract

The objective of this study was to evaluate the influence of Platelet Rich Fibrin (PRF) on the inflammatory process in critical defects in rat calvaria and its consequent tissue repair. One hundred twenty-eight adult rats (*Rattus norvegicus*, *albinus*, Wistar) with body weight between 450 and 500g were used for the study. The animals were randomly divided into 4 equitable groups that composed the work sample. In the clot group (GC) the critical size defect was filled with blood clot; the non-steroidal anti-inflammatory group (NSAID) had the critical size defects filled with blood clot and ketoprofen was given post-operatively (10mg / kg day); the platelet-rich fibrin group (FRP) had the critical-size defects filled with autologous platelet-rich fibrin preparation; and platelet-rich fibrin group plus NSAIDs (FRP + NSAID) had the critical-size defects filled with autologous platelet-rich fibrin preparation and administered ketoprofen post-operatively (10mg / kg day). Each group was evaluated at 2, 7, 14 and 28 days after the surgical procedures. The samples were evaluated through histometry, micro-CT and ELISA for the presence of TNF α . The quantitative data were submitted to the statistical test ANOVA 1/2 factors or Kruskal-Wallis and post Tukey and Dunn ($p < 0.01$). The histometric and microtomographic results showed higher bone formation for the PRF group compared to the other groups ($p < 0.05$) and lower TNF-alpha in the initial period in the PRF group compared to the control group ($p < 0.05$). It was concluded that the PRF was favorable since

the beginning through the later periods, aiding in the inflammatory response and bone neoformation.

Key words: Blood cells, Inflammation, Platelets, Platelet Rich Fibrin, Bone regeneration, Blood.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- Representação esquemática dos grupos e tempos experimentais utilizados.....	57
FIGURA 2- Tricotomia da região fronto-parietal e anti-sepsia com PVPI.....	58
FIGURA 3- Acesso cirúrgico em formato de “V” com exposição de osso parietal e cortical interna e DTC de 5mm de diâmetro.....	58
FIGURA 4 – Obtenção da FRP para preenchimento de DTC.....	59
FIGURA 5 - Representação esquemática das referências do defeito crítico....	59
FIGURA 6- Fotomicrografias representativas dos grupos GC 2 dias (A), 7 dias (B), 14 dias (C) e 28 dias (D). (HE, Aumento original 25x).....	60
FIGURA 7- Fotomicrografias representativas dos grupos AINE 2 dias (A), 7 dias (B), 14 dias (C) e 28 dias (D). (HE, Aumento original 25x).....	61
FIGURA 8- Fotomicrografias representativas dos grupos PRF 2 dias (A), 7 dias (B), 14 dias (C) e 28 dias (D). (HE, Aumento original 25x).....	62
FIGURA 9 - Fotomicrografias representativas dos grupos PRF + AINE 2 dias (A), 7 dias (B), 14 dias (C) e 28 dias (D). (HE, Aumento original 25x).....	63

GRÁFICOS E TABELAS

GRÁFICO 1: Valores médios e desvio padrão representativos da área de osso neoformado (AON) para os grupos experimentais AINE, GC, FRP, AINE + FRP aos 2 dias.....	65
GRÁFICO 2: Valores médios e desvio padrão representativos da área de osso neoformado (AON) para os grupos experimentais AINE, GC,FRP , AINE + FRP aos 7 dias.....	65
GRÁFICO 3: Valores médios e desvio padrão representativos da área de osso neoformado (AON) para os grupos experimentais AINE, GC, FRP, AINE + FRP aos 14 dias.....	66
GRÁFICO 4: Valores médios e desvio padrão representativos da área de osso neoformado (AON) para os grupos experimentais AINE, GC, FRP, AINE + FRP aos 28 dias.....	66
GRÁFICO 5: Valores médios e desvio padrão representativos de TNF-alfa para os grupos experimentais AINE, GC, PRF, AINE + PRF aos 2 dias.....	67
GRÁFICO 6: Valores médios e desvio padrão representativos de TNF-alfa para os grupos experimentais AINE, GC, PRF, AINE + PRF aos 7 dias.....	67
GRÁFICO 7: Valores médios e desvio padrão representativos de TNF-alfa para os grupos experimentais AINE, GC, PRF, AINE + PRF aos 14 dias.....	68
GRÁFICO 8: Valores médios e desvio padrão representativos de TNF-alfa para os grupos experimentais AINE, GC, PRF, AINE + PRF aos 28 dias.....	68

GRÁFICO 9: Valores médios e desvio padrão representativos do parâmetro microtomográfico BV para os grupos experimentais AINE, GC, PRF, AINE + PRF aos 28 dias.....	69
GRÁFICO 10: Valores médios e desvio padrão representativos do parâmetro microtomográfico BV/TV para os grupos experimentais AINE, GC, PRF, AINE + PRF aos 28 dias.....	69
GRÁFICO 11: Valores médios e desvio padrão representativos do parâmetro microtomográfico Tb.N para os grupos experimentais AINE, GC, PRF, AINE + PRF aos 28 dias.....	70
GRÁFICO 12: Valores médios e desvio padrão representativos do parâmetro microtomográfico Tb.Th para os grupos experimentais AINE, GC, PRF, AINE + PRF aos 28 dias.....	70
GRÁFICO 13: Valores médios e desvio padrão representativos do parâmetro microtomográfico Tp.sp para os grupos experimentais AINE, GC, PRF, AINE + PRF aos 28 dias.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS

FRP	Fibrina rica em plaquetas
PRP	Plasma rico em plaquetas
AINE	Anti-inflamatório não esteroideal
GC	Grupo coágulo
AON	Área de osso neoformado
PVPI	Polivinilpirrolidona
DTC	Defeito de tamanho crítico
PI	Processo inflamatório
COX	Ciclooxigenase

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	25
2.PROPOSIÇÃO.....	31
3.MATERIAL A MÉTODOS.....	33
3.1 Preparo da FRP.....	35
3.2 Processamento Laboratorial.....	36
3.3 Histometria.....	37
3.4 Análise Estatística.....	38
4.RESULTADOS.....	40
4.1 Descrição da análise histológica.....	40
4.2 Análise estatística da área de osso neoformado (AON).....	41
4.3 Resultados do ELISA para TNF-alfa.....	42
4.4 Resultados da Micro-CT.....	43
5.DISSCUSSÃO.....	46
6.CONCLUSÕES.....	50
7.REFERÊNCIAS.....	52
LISTA DE FIGURAS.....	57
LISTA DE GRÁFICOS E TABELAS.....	65
ANEXOS.....	73

INTRODUÇÃO

1. Introdução

Os derivados de plaquetas surgiram como uma ferramenta terapêutica promissora para periodontia, cirurgia bucomaxilofacial, ortopedia e dermatologia devido suas propriedades auxiliarem na reparação tecidual.(1, 2) Diversos estudos foram desenvolvidos para verificar a eficácia do plasma rico em plaquetas (PRP) na prática reconstrutiva odontológica. No entanto, é possível observar divergências e resultados conflitantes, sendo questionável seu efeito devido os diversos protocolos de obtenção.(1, 3)

Uma segunda geração de concentrados plaquetários, proposta por Choukroun em 2001, realizada através do preparo do sangue autólogo com centrifugação única e sem adição de antiagregante plaquetários, vem sendo utilizado em trabalhos clínicos(4-7) e laboratoriais(8-11). A centrifugação é obtida de acordo com o protocolo proposto por Choukron, realizando a coleta sanguínea através do tubo de vidro revestidos de plástico estéril é colocado na centrífuga à 2700 rpm durante 12 minutos(12, 13). Apesar de menor número, quando comparado com o PRP, os estudos elucidando os efeitos do FRP apresentam mais homogeneidade, com os indicadores convergindo-se à melhora da reparação tecidual e neoformação óssea com o uso do FRP(4). Por causa de resultados encorajadores de vários estudos clínicos(9, 10, 14-16) o número de pesquisas que visam elucidar as nuances envolvidas na utilização de plaquetas em pacientes vem crescendo de forma expressiva(2). A diferença de resultado do FRP comparado ao PRP pode ser justificada devido ao processamento do primeiro formar uma rede de fibrina complexa com encarceramento de células, plaquetas e componentes sanguíneos que são responsáveis pela

liberação de citocinas e fatores de crescimento de maneira mais lenta do que o PRP. A presença destes fatores nos primeiros momentos inflamatórios podem influenciar o processo de reparação do sítio ósseo afetado(4)(17-19).

Para que ocorra a reparação tecidual são necessários três estágios do processo de reparação em que o primeiro é constituído inicialmente pelo estágio inflamatório que deve durar de 3 a 5 dias, em que ocorrerá duas fases, a vascular e a celular. Inicialmente a vascular age causando vasoconstricção minimizando o efeito hemorrágico, em seguida na fase celular, histaminas e prostaglandinas liberadas por leucócitos iniciam a liberação de mediadores quimiotáxicos, causando vasodilatação e abrindo pequenos espaços entre as células endoteliais, o que permite o extravasamento de plasma e a migração de leucócitos para o interior do tecido intersticial, causando edema. A migração de leucócitos polimorfonucleares tem como função primordial a eliminação de corpos estranhos e microorganismos invasores. Por apresentar estas características o estágio inflamatório se torna indispensável para reparação tecidual, mas quando ele ocorre de forma exacerbada leva ao atraso da cicatrização elevando a morbidade da ferida(20-24).

Um evento fundamental observado durante o processo inflamatório é a liberação de ácido araquidônico a partir de membranas celulares danificadas, mediante exposição à enzima fosfolipase A2(25). Essa etapa pode ser inibida indiretamente pela ação de um grupo de potentes agentes anti-inflamatórios conhecidos como glicocorticoides. A partir desse ponto, o metabolismo oxidativo do ácido araquidônico pode prosseguir ao longo de duas vias divergentes. Uma dessas vias utiliza a enzima cicloxigenase (COX). A outra via utiliza a enzima lipoxigenase. Virtualmente todas as células do organismo, exceto as he-

mácias, possuem COX, enquanto a lipoxigenase parece limitar-se às células inflamatórias (neutrófilos, mastócitos, eosinófilos e macrófagos)(26-30).

Atualmente está bem estabelecido que existem duas isoformas de COX. A COX- 1 é considerada uma isoforma constitutiva ou “de manutenção” (housekeeping), sendo a principal isoforma encontrada em tecidos normais. Essa isoforma está sempre presente em todos os tecidos, incluindo sistema nervoso central (SNC), mucosa gástrica, plaquetas e rins. Na mucosa gástrica, a COX-1 desempenha papel importante na síntese de PGs envolvidas na formação da barreira muco-protetora contra a ação do ácido gástrico(26, 27, 29). Nas plaquetas, a COX-1 é fundamental para a produção de tromboxana e suas subsequentes propriedades agregantes plaquetárias necessárias a uma adequada homeostasia(26, 31). A maior parte da COX-2 corresponde a uma isoforma induzível que é suprarregulada (upregulated) por citocinas, fatores de crescimento e mitógenos, entre outros produtos, os monócitos, macrófagos, células endoteliais, condrócitos, sinoviócitos e osteoblastos humanos(31, 32). Essa isoforma está associada às elevadas concentrações de PGs observadas durante a inflamação, dor e febre. Embora inicialmente se esperasse que os produtos da COX-2 participassem somente na inflamação e em outros processos patológicos, atualmente sabe-se que os produtos de oxidação dessa isoforma auxiliam na regulação de alguns processos fisiológicos normais, tais como a manutenção da adequada eliminação de água e sódio (Na⁺) através dos rins, a inibição da agregação plaquetária em excesso e a dilatação de certos leitos vasculares(33-35).

As PGs e outros metabólitos ativos dos endoperóxidos intermediários (p. ex., PGI₂ e tromboxana A₂ [TXA₂]) exercem uma multiplicidade de efeitos em

quase todos os processos biológicos examinados até o momento. Esses processos incluem a contração e o relaxamento da musculatura lisa, a permeabilidade vascular, o transporte renal de eletrólitos e água, a secreção gastrintestinal (GI) e pancreática, diversas funções do SNC e do sistema nervoso autônomo (SNA), liberação de hormônios (p. ex., hormônio do crescimento, esteroides e gonadotropinas), luteólise e parto, lipólise, reabsorção óssea e agregação plaquetária. Não só os processos afetados são diversos e os efeitos complexos, mas também as diferentes PGs e moléculas relacionadas parecem ocasionalmente exercer ações antagônicas. Assim, a PGE2 e a PGI2 geralmente causam vasodilatação e inibem a agregação plaquetária, enquanto a TXA2 provoca vasoconstrição e induz agregação plaquetária(36).

Os antiinflamatórios não esteroidais (AINES) são metabolizados no fígado e excretados nos rins, além disso, os não seletivos para ciclooxigenase 2 (COX-2) possui ação de inibição da proteção gástrica fisiológica. Em pacientes hígidos, sua utilização no curto período pós-cirúrgico não representa risco no desenvolvimento de efeitos colaterais de suas funções normais, porém, em pacientes descompensados dos sistemas gástrico, renal, hepático e cardiológicos podem representar risco de agravamento de sua condição(37).

A resposta inflamatória acarreta consequente morbidade devido aos sinais flogísticos que geram desconforto no período pós-cirúrgico que se resumem em dor, perda funcional e edema ao paciente. As citocinas endógenas presentes na FRP teoricamente poderiam servir de moduladores locais da resposta inflamatória pós- traumática através da liberação de fatores que influenciam na quimiotaxia(8).

Quando inserido nos alvéolos pós exodontia de terceiros molares inferiores, além da melhora do reparo ósseo e cicatrização gengival, a FRP também proporcionou considerável diminuição da dor, indicando influência deste no controle de mediadores químicos da inflamação.(5) Dohan et al, afirma que a FRP apresenta o potencial de ação antiinflamatório, mas apenas estudos in vitro até então foram conduzidos com o objetivo de avaliar o seu potencial efeito. (38, 39)

A membrana confeccionada através da FRP tem uma rede semelhante a fibrina que leva a migração e proliferação celular mais eficiente, gerando assim a reparação tecidual mais rápida. Estudos recentes têm descrito a capacidade do aumento na proliferação de osteoblastos em ratos e humanos, causada pelo aumento da expressão osteoprotegerina e fosfatase alcalina(4, 40). A melhoria de cicatrização de feridas, diminuição da dor e aumento da densidade óssea destaca o uso de FRP como um método válido para a promoção e aceleração da reparação tecidual. Estudos mais abrangentes são necessários para entender os aspectos fisiológicos e histológicos da FRP na cicatrização de tecido mole e duro.(2, 5, 8).

As citocinas e fatores de crescimento presentes na FRP possuem grande influência na resposta inflamatória. Infelizmente seu impacto tem sido quase completamente negligenciado na literatura.(41) Apesar de encontrarmos o aumento das pesquisas acerca da resposta celular e metabólica da FRP, estes se concentram quase que exclusivamente no potencial de reparo ósseo, epitelial e antimicrobiano ignorando o efeito de modulador da resposta inflamatória de tais citocinas e fatores de crescimento(8).

PROPOSIÇÃO

2. Proposição

O presente trabalho teve como proposta avaliar o efeito da FRP no processo inflamatório e reparo ósseo em defeitos críticos em calvária de ratos, associada ou não a um anti-inflamatório não esteroideal (AINE).

MATERIAL E MÉTODOS

3. Material e Métodos

Foram utilizados para a realização deste estudo 128 (cento e vinte e oito) ratos (*Rattus norvegicus*, *albinus*, Wistar), adultos, com peso corporal entre 450 e 500g. Os animais foram cedidos pelo Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA, UNESP onde foram mantidos em gaiolas individuais, em ambiente climatizado, e foram alimentados com ração sólida padrão e água “ad Libitum”, durante todo o experimento. Os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos equitativos que compuseram a amostra do trabalho (Figura 1):

- Grupo coágulo (GC): defeito de tamanho crítico preenchido com coágulo sanguíneo;
- Grupo anti-inflamatório não esteroideal (AINE): defeitos de tamanho crítico preenchidos com coágulo sanguíneo e administrado cetoprofeno (10mg/kg dia).
- Grupo fibrina rica em plaquetas (FRP): defeitos de tamanho crítico preenchidos com preparado de fibrina rica em plaquetas autóloga.
- Grupo fibrina rica em plaquetas (FRP + AINE): defeitos de tamanho crítico preenchidos com preparado de fibrina rica em plaquetas autóloga e administrado cetoprofeno no pós-operatório (10mg/kg dia).

Cada grupo foi avaliado em nos períodos de 2, 7, 14 e 28 dias.

Após jejum de 12 horas os animais foram submetidos à sedação, por meio da administração via intramuscular de Cloridrato de Ketamina a 1% (Ve-

taset® – Fort Dodge, Saúde Animal LTDA, Campinas, São Paulo, Brasil Farmacêuticos LTDA, Campinas, Brasil), na dosagem de 10mg/Kg, e do Cloridrato de Xilazina a 2% (Dopaser® – Laboratório Calier do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), 5mg/Kg. Após indução anestésica, foi realizada tricotomia na região fronto-parietal, posicionamento do animal em decúbito ventral, anti-sepsia da área com polivinilpirrolidona (PVPI) tópico e aposição de campos estéreis. Em seguida foi realizado o acesso cirúrgico por incisão em formato de “V”. O retalho total foi rebatido e foi realizado o afastamento com os descoladores para exposição do osso parietal de ambos os lados.

Com uma trefina cirúrgica de diâmetro interno de 4 mm e externo de 5 mm, e com auxílio de um motor de baixa rotação foi realizada a osteotomia na região mediana entre os parietais até a cortical interna. Uma marcação no formato de “L” foi feita 2 mm anterior e outra 2 mm posterior às margens do defeito cirúrgico utilizando uma broca carbide tronco-cônica e um guia cirúrgico. As marcações foram preenchidas com amálgama. Estas marcações foram usadas para identificação do centro do defeito cirúrgico original(41). O osso parietal osteotomizado foi removido e a dura-máter mantida intacta, deixando um defeito de tamanho crítico (DTC) de 5mm de diâmetro.

O defeito ósseo foi realizado em 128 animais, divididos em 4 grupos, e preenchidos com coágulo sanguíneo ou FRP de acordo com o grupo que se enquadra, já o grupo dos (AINES) e (FRP + AINE) recebeu no pós-operatório cetoprofeno (10mg/kg dia) por quatro dias (42). Finalizado o enxerto, o retalho total foi reposicionado, a sutura foi realizada com fio de Nylon 5-0 (ETHILON Nylon Suture®, Ethicon, Johnson, São José dos Campos, Brasil) por pontos interrompidos simples.

Preparo da FRP

Foram coletados 1,5 ml de sangue de cada animal via punção cardíaca, utilizando uma seringa descartável de 5 ml, sem a adição de anticoagulante.

O preparo da FRP foi realizado de acordo com uma adaptação do protocolo de Dohan et al. Cada amostra coletada foi imediatamente centrifugada a 400 G durante 12 minutos, a 22°C (Hermle Z323K, Hermle Labortechnik GmbH., Wehingen, Baden- Württemberg, Alemanha). Um coágulo de fibrina (FRP) foi obtido na porção intermediária do tubo, entre os corpúsculos vermelhos localizados na porção inferior e o plasma acelular (PPP) localizado na porção superior. O PPP foi descartado e a FRP foi pinçada do interior do tubo e separada da porção de corpúsculos vermelhos com o uso de uma lâmina de bisturi número 15.

Protocolos de aplicação do FRP

A FRP foi utilizada imediatamente após a centrifugação ter sido finalizada, para evitar que esta sofra retração. Esta matriz de FRP, foi aplicada no defeito cirúrgico com o auxílio de uma pinça clínica.

Em seguida as peças foram descalcificadas e submetidas ao processamento para coloração com Hematoxilina e Eosina.

A eutanásia dos espécimes foi realizada nos períodos de 2, 7, 14 ou 28 dias, sendo 8 animais por período. A eutanásia foi por dose excessiva de anestésico, foi removido o osso parietal com margem de no mínimo 3mm de tecido ósseo ao redor do defeito que foi fixado em formol neutro a 10% tamponado.

Histometria

A área do defeito cirúrgico original e os tecidos circunjacentes foram removidos em bloco. Após descalcificação inicial em solução de Ácido Etilenodiaminotetracético (EDTA) a 10%, cada espécime foi dividido longitudinalmente em dois blocos, exatamente ao longo do centro do defeito cirúrgico original, usando-se os maiores eixos de cada marcação em formato de “L” como referência. Cortes transversais foram então realizados usando o menor eixo de cada marcação em “L” como referência, permitindo a identificação precisa das margens do defeito cirúrgico original durante os procedimentos de análises de imagens(41). Após um período de descalcificação adicional, as peças foram processadas e incluídas em parafina. Foram realizados cortes semi-seriados com 5 µm de espessura na direção longitudinal, corados com Hematoxilina e Eosina (H&E) para análise histomorfométrica ou submetidos à técnica da imunoperoxidase indireta.

Os cortes foram montados em lâminas histológicas e fixados com lamínula e resina permont. Estas lâminas foram fotomicrografadas em microscópio óptico acoplado a uma câmera fotográfica. As imagens foram obtidas com a objetiva de 1.6x e 40x, para imagens panorâmica do defeito e uma imagem ampliada na porção central do defeito crítico. Foram gravadas em arquivo TIF e analisadas em programa computacional IMAGE J (Programa Analisador de Imagens, Ontário, Canadá).

Para o cálculo histométrico da área de osso neoformado (AON) na região do defeito crítico, inicialmente o programa foi calibrado por meio de régua fotomicrografada nas magnificações utilizadas (1.6x e 40x) na ferramenta “set scale”. Posteriormente, as imagens foram abertas no programa e assim, pela ferra-

menta “free hands” foi calculada a AON em μm^2 . Os dados obtidos foram tabulados e aplicados testes estatísticos.

ELISA

A concentração do $\text{TNF}\alpha$ plasmático foi determinada pelo método de ELISA - enzima imunoenensaio. Nos Kits comerciais para dosagem dessas citocinas, os 96 poços foram recobertos e incubados com os respectivos anticorpos anti durante 15-18h a 4°C . Após esse tempo de incubação, a placa foi lavada com PBS, contendo 0,5% de Tween 20 e incubada com solução bloqueadora (PBS contendo 1% de BSA), em temperatura ambiente. A placa, então, foi lavada e logo a seguir, incubada com os padrões e as amostras de plasma em temperatura ambiente. Após este período, a placa foi lavada e incubada com anticorpo biotinilado à 25°C . A placa foi lavada, o conjugado Streptavidina-HRP foi adicionado e submetido à agitação (300 rpm) à 25°C .

A placa foi lavada e incubada com a solução de substrato (Tetrametilbenzidina). O tampão “stop” foi adicionado para interromper a reação de coloração. A leitura foi realizada em espectrofotômetro ajustado para o comprimento de onda conforme as orientações do fabricante.

Avaliação radiográfica tridimensional (Micro-Ct)

As peças foram lavadas por 48 horas em água corrente e armazenadas em álcool 70%, a fim de serem submetidas à análise por varredura de feixe de raios-X em um sistema de microtomografia digital computadorizada (FOAr/UNESP). As peças foram escaneadas pelo microtomógrafo SkyScan (SkyScan 1176 Bruker MicroCT, Aatselaar, Bélgica, 2003) utilizando cortes de $9\ \mu\text{m}$ de espessura (50Kv e $500\ \mu$), com filtro de Cobre e Alumínio e passo de rotação de 0.3

mm. As imagens obtidas pela projeção dos raios-X nas amostras foram armazenadas e reconstituídas determinando a área de interesse pelo software NRecon (SkyScan, 2011; Versão 1.6.6.0). No software Data Viewer (SkyScan, Versão 1.4.4 64-bit) as imagens foram reconstruídas para adequação do posicionamento padrão para todas as amostras, podendo ser observada em três planos (transversal, longitudinal e sagital). Em seguida, utilizando o software CTAnalyser – CTAn (2003-11SkyScan, 2012 Bruker MicroCT Versão 1.12.4.0) foi definida a área de interesse para avaliação tridimensional. (ROI). O software CTAn analisa e mede a imagem de acordo com a escalas de cinza (threshold). O threshold utilizado na análise foi de 25-90 tons de cinza, que possibilitará obter o volume de osso formado (BV), a porcentagem de osso formado em relação a quantidade de trabéculas (BV/TV), o número de trabéculas ósseas (Tb.N), a espessura das trabéculas (Tb.Th) e o espaço formado entre as trabéculas (Tb.sp).

Todos os dados quantitativos (AON, TNF α , BV, BV/TV, Tb.N, Tb.Th e Tb.sp) foram submetidos ao teste estatístico de homocedasticidade e normalidade. Para os parâmetros microtomográficos BV, BV/TV, Tp.Th e Tp.sp foram realizados o teste ANOVA 1 fator e pós-teste Tukey quando $p < 0,05$. Para o parâmetro Tb.N, foi aplicado Kruskal-Wallis e pós-teste Dunn. Para variáveis histométricas AON e TNF-alfa foram aplicado teste ANOVA 2 fatores e pós-teste Tukey.

RESULTADOS

4- Resultados

4.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA

4.1.2 TEMPO DE ANÁLISE DE 2 DIAS (Figura 6-A, 7-A, 8A, 9A):

GC – Presença de tecido conjuntivo fibroso e infiltrado inflamatório.

GC + AINE – Presença predominante de tecido conjuntivo fibroso

FRP – Áreas de intenso infiltrado inflamatório e área amorfa compatível com membrana de FRP

FRP + AINE - Áreas de intenso infiltrado inflamatório, tecido conjuntivo fibroso e área amorfa compatível com membrana de FRP

4.1.2 TEMPO DE ANÁLISE DE 7 DIAS (Figura 6-B, 7-B, 8-B, 9-B):

GC – Predomínio de intenso infiltrado inflamatório e tecido conjuntivo fibroso.

GC + AINE – Presença de tecido conjuntivo fibroso com pouca área de infiltrado inflamatório.

FRP – Observou-se tecido conjuntivo fibroso, área de intenso infiltrado inflamatório e início da degradação da área amorfa compatível com membrana de FRP

FRP + AINE- Área de infiltrado inflamatório, pequena presença de tecido conjuntivo fibroso e início da degradação de área amorfa compatível com membrana de FRP.

4.1.2 TEMPO DE ANÁLISE DE 14 DIAS(Figura 6-C,7-C,8-C,9-C):

GC- Observou presença de grande quantidade de tecido conjuntivo fibroso.

GC+AINE- Observou-se presença de infiltrado inflamatório com pequenas áreas de tecido conjuntivo fibroso

FRP- Pode-se observar continuidade de degradação da membrana compatível com membrana de FRP, tecido conjuntivo fibroso e área de neoformação óssea.

FRP + AINE- Pode-se observar presença de infiltrado inflamatório , tecido conjuntivo fibroso e início de neoformação óssea.

4.1.2 TEMPO DE ANÁLISE DE 14 DIAS:

GC- Pode-se observar presença de tecido conjuntivo fibroso e área de infiltrado inflamatório

GC + AINE – Pode-se observar apenas presença de tecido conjuntivo fibroso

FRP- Pode-se observar área extensa de neoformação óssea á caminho do fechamento completo da ferida e osteoblastos em atividade

FRP + AINE – Pode-se observar presença de infiltrado inflamatório, tecido conjuntivo e áreas de neoformação óssea.

1. Histometria:

1.1 Análise de 2 dias (GRÁFICO 1):

Houve uma tendência a maior quantidade de osso neoformado no grupo PRF em comparação ao grupo PRF+AINE. Quando comparamos esses dois grupos (PRF e PRF +AINE) aos grupos AINE e Controle, os resultados mostraram uma maior quantidade de osso neoformado nos dois primeiros em relação aos dois últimos, com diferença estatística significativa ($P < 0,01$) na comparação entre grupos PRF com AINE, PRF+AINE com AINE, PRF com Controle e PRF+AINE com Controle.

1.2 Análise de 7 dias (GRÁFICO 2):

Houve uma tendência a maior quantidade de osso neoformado no grupo PRF em comparação ao grupo PRF+AINE. Comparando-se esses dois grupos (PRF e PRF +AINE) aos grupos AINE e Controle, os resultados mostraram uma maior quantidade de osso neoformado nos dois primeiros em relação aos dois últimos, com diferença estatística significativa ($P < 0,01$) na comparação entre os grupos PRF com AINE e PRF com Controle.

1.3 Análise de 14 dias (GRÁFICO 3):

Houve uma maior quantidade de osso neoformado no grupo PRF em comparação ao grupo PRF+AINE, com diferença estatística entre eles ($p < 0,01$). Com-

parando-se esses dois grupos (PRF e PRF +AINE) aos grupos AINE e Controle, os resultados mostraram uma maior quantidade de osso neoformado nos dois primeiros em relação aos dois últimos, com diferença estatística significativa ($P < 0,01$) na comparação entre grupos PRF com AINE, PRF com Controle.

1.4 Análise de 28 dias (GRÁFICO 4):

Houve uma maior quantidade de osso neoformado no grupo PRF em comparação ao grupo PRF+AINE, com diferença estatística entre eles ($p < 0,05$). Comparando-se esses dois grupos (PRF e PRF +AINE) aos grupos AINE e Controle, os resultados mostraram uma maior quantidade de osso neoformado nos dois primeiros em relação aos dois últimos, com diferença estatística significativa ($P < 0,01$) na comparação entre grupos PRF com AINE, PRF com Controle.

2. ELISA para TNF-alfa:

2.1 Análise de 2 dias (GRÁFICO 5):

O grupo no qual foi utilizado apenas PRF apresentou uma tendência a uma menor quantidade de TNF-alfa dentre as amostras analisadas nesse período de tempo. O grupo com maior quantidade de TNF-alfa foi o grupo controle, seguido do grupo PRF+ AINES e do grupo AINES. Houve diferença estatística ($P < 0,05$) entre os grupos Controle e PRF.

2.2 Análise de 7 dias (GRÁFICO 6):

O grupo no qual foi utilizado apenas PRF apresentou uma tendência a uma menor quantidade de TNF-alfa dentre as amostras analisadas nesse período de tempo. O grupo com maior quantidade de TNF-alfa foi o grupo AINE, seguido do grupo PRF+ AINES e do grupo controle. Não houve diferença estatística entre os grupos.

2.2 Análise de 14 dias (GRÁFICO 7):

O grupo no qual foi utilizado apenas PRF apresentou tendência a uma maior quantidade de TNF-alfa dentre as amostras analisadas nesse período de tem-

po, seguido dos grupos AINE+PRF, Controle e AINE. Não houve diferença estatística entre esses grupos.

2.2 Análise de 28 dias (GRÁFICO 8):

O grupo no qual foi utilizado apenas PRF apresentou tendência a uma maior quantidade de TNF-alfa dentre as amostras analisadas nesse período de tempo, seguido dos grupos AINE, Controle e PRF+AINE. Não houve diferença estatística entre esses grupos.

3. Micro-CT:

3.1 Volume Ósseo (BV) (GRÁFICO 9):

O grupo PRF mostrou uma tendência a um maior volume ósseo (BV) do que os grupos Controle, AINE e PRF+ AINE, quando avaliado esse parâmetro na Micro-CT. Houve diferença estatística ($p < 0,05$) na comparação dos grupos PRF com AINE e PRF com PRF+AINE.

3.2 Fração do Volume Ósseo (BV/TV) (GRÁFICO 10)

Não houve diferença estatística entre os grupos nesse parâmetro avaliado, com uma forte tendência a uma porcentagem de volume ósseo em relação a área de interesse (BV/TV) igual entre os grupos.

3.3 Número médio de trabéculas por unidade de área (Tb.N) (GRÁFICO 11):

O Tb.N foi maior, com significância estatística ($p < 0,01$), na comparação do grupo AINE com o Grupo Controle, PRF+AINE com o Grupo Controle e PRF+AINE com o PRF.

3.4 Espessura Média das Trabéculas (Tb.Th) (GRÁFICO 12):

A Espessura Média das Trabéculas Ósseas (Tb.Th) mostrou uma tendência a ser maior no grupo PRF do que os grupos Controle, AINE e PRF+AINE, no entanto não houve diferença estatística significativa entre os grupos nesse parâmetro avaliado.

3.5 Separação entre as Trabéculas (Tb.Sp) (GRÁFICO 13):

Houve uma tendência a uma maior separação entre as trabéculas (Tb.Sp) entre dos grupos AINE e PRF+ AINE em comparação aos grupos Controle e PRF, no entanto não houve diferença estatística significativa entre os grupos nesse parâmetro avaliado.

DISCUSSÃO

5. Discussão

A fibrina rica em plaquetas (PRF) surgiu no início da década de 2.000 como uma alternativa para a melhora da resposta reparatória em defeitos ósseos, como descrito por Choukroun et (2006). O sangue é coletado do próprio indivíduo, por punção venosa periférica, passando por um protocolo de centrifugação de modo que se obtém um coágulo de fibrina com alta concentração de plaquetas e leucócitos, sendo esse coágulo prensado em uma caixa chamada de PRF BOX, obtendo-se membranas ou plugs de fibrina, que podem ser colocados diretamente sobre o defeito ósseo ou em conjunto com biomateriais substitutos ósseos.

Rapidamente o uso do PRF se popularizou em diversas aplicações clínicas na Odontologia, principalmente na reconstrução de defeitos ósseos em áreas de colocação de implantes (Simmonpieri et al, 2012; Sing,2012; Tatulo et al.,2012). No entanto, pouco se sabe sobre os mecanismos biológicos responsáveis pelas ações clínicas do PRF.

Sabe-se que a densa rede de fibrina obtida pelo coágulo prensado acaba encarcerando em seu interior os fatores de crescimento derivados da degranulação das plaquetas e leucócitos presentes em altas concentrações nos coágulos (Dohan,2010). Esses fatores de crescimento, principalmente PDGF-AB, TGF-beta, VEGF e IGF, além de citocinas como IL-1B, IL-6,IL-4 e TNF-alfa) são liberados por aproximadamente 7 dias após a implantação da membrana no sítio receptor, exercendo sua atividade mitogênica, quimiotática, e proliferativa durante esse período de tempo (Ganhati et al., 2014).

No presente estudo, utilizou-se o ELISA para avaliação da quantidade de TNF-alfa presente nos ratos nos períodos de tempo avaliados. Nos ratos em que foi

utilizado somente o PRF nos defeitos críticos da calota, a quantidade de TNF-alfa foi significativamente menor do que no grupo controle ($p < 0,05$). Também observou-se uma tendência a uma menor quantidade quando comparado aos grupos nos quais se administrou AINE no pós-operatório. Esse é um achado importante, pois já foi postulado na literatura que o PRF apresentaria uma ação antiinflamatória (Dohan et al.,2010), no entanto nunca isso havia sido demonstrado in vitro ou in vivo, seja em nível experimental ou clínico.

Na presente pesquisa, o PRF inibiu a produção do TNF-alfa nos estágios iniciais do processo de reparo. É sabido que o TNF-alfa é uma quimiocina pró-inflamatória produzida por macrófagos e linfócitos ainda no início da cascata de reparo tecidual, tendo a sua expressão aumentada na fase inflamatória desse processo. Além disso, altos níveis de TNF-alfa foram relacionados com processo de reabsorção óssea em situações de inflamação crônica, como a doença periodontal (Schaar,2015). Logo, uma diminuição da expressão do TNF-alfa nas fases iniciais do processo de reparo ósseo, pode ser benéfica ao processo de reparo como um todo.

A capacidade osteoindutora do PRF tem sido motivo de estudos na literatura (Simon,2011; Messora et al.,20018). Tal capacidade se daria pela ação regulatória das citocinas liberadas lentamente pelo PRF sobre o recrutamento e proliferação de células osteogênicas e osteoclastogênicas, principalmente IL1, IL6 e TNF-alfa, assim como IL-4. Também há a presença de fatores de crescimento, como PDGF, VEGF e BMP-2(Dohan et al.,2006).

No presente estudo, a análise histométrica em todos os períodos de tempo avaliado o grupo no qual foi utilizado apenas PRF em comparação com os grupos controle e AINE, houve diferença estatística a favor do grupo

($p < 0,01$), evidenciando que houve uma maior neoformação óssea no grupo PRF. Quando comparados os grupos PRF e PRF+AINE entre si, houve diferença estatística nos períodos de 14 dias ($p < 0,01$) e 28 dias ($p < 0,05$) a favor do grupo PRF. Nos períodos de avaliação de 2 e 7 dias houve uma tendência a maior neoformação óssea no grupo PRF.

Quando confrontamos esses dados com os dados da Micro-CT, verificamos que o volume ósseo no grupo PRF foi maior do que os outros grupos, com diferença estatística ($p < 0,05$) na comparação com o grupo AINE e PRF+AINE, portanto corroborando os resultados entre os dois diferentes métodos de avaliação. Importante notar também que correlacionando-se os dados da avaliação expressão de TNF-alfa, com os dados de histometria e da micro-ct, pode-se inferir que o PRF modulou a resposta inflamatória, apresentando um efeito antiinflamatório que foi benéfico para o processo de reparo ósseo como um todo. Essa ação antiinflamatória do PRF já foi citada anteriormente na literatura, no entanto jamais foi demonstrada, seja em estudos in vitro ou in vivo.

CONCLUSÃO

6. Conclusão

Conclui-se que a FRP foi favorável desde os períodos iniciais até os mais tardios, auxiliando na resposta inflamatória e neoformação óssea. Entretanto, a administração de AINE de forma isolada ou associada a FRP não limitou o processo inflamatório e atrasou o reparo ósseo.

REFERÊNCIAS

7. Referências Bibliográficas

1. De Pascale MR, Sommesse L, Casamassimi A, Napoli C. Platelet derivatives in regenerative medicine: an update. *Transfus Med Rev.* 2015;29(1): 52-61.
2. Simonpieri A, Del Corso M, Vervelle A, Jimbo R, Inchingolo F, Sammartino G, et al. Current knowledge and perspectives for the use of platelet-rich plasma (PRP) and platelet-rich fibrin (PRF) in oral and maxillofacial surgery part 2: Bone graft, implant and reconstructive surgery. *Curr Pharm Biotechnol.* 2012;13(7):1231-56.
3. Del Fabbro M, Bortolin M, Taschieri S. Is autologous platelet concentrate beneficial for post-extraction socket healing? A systematic review. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2011;40(9):891-900.
4. He L, Lin Y, Hu X, Zhang Y, Wu H. A comparative study of platelet-rich fibrin (PRF) and platelet-rich plasma (PRP) on the effect of proliferation and differentiation of rat osteoblasts in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009;108(5):707-13.
5. Singh A, Kohli M, Gupta N. Platelet rich fibrin: a novel approach for osseous regeneration. *J Maxillofac Oral Surg.* 2012;11(4):430-4.
6. Sammartino G, Dohan Ehrenfest DM, Carile F, Tia M, Bucci P. Prevention of hemorrhagic complications after dental extractions into open heart surgery patients under anticoagulant therapy: the use of leukocyte- and platelet-rich fibrin. *J Oral Implantol.* 2011;37(6):681-90.
7. Tatullo M, Marrelli M, Cassetta M, Pacifici A, Stefanelli LV, Scacco S, et al. Platelet Rich Fibrin (P.R.F.) in reconstructive surgery of atrophied maxillary bones: clinical and histological evaluations. *Int J Med Sci.* 2012;9(10):872-80.
8. Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, Girard MO, Schoeffler C, Dohan SL, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part IV: clinical effects on tissue healing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;101(3):e56-60.
9. Dohan Ehrenfest DM, Lemo N, Jimbo R, Sammartino G. Selecting a relevant animal model for testing the in vivo effects of Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF): rabbit tricks and traps. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010;110(4):413-6; author reply 6-8.
10. Kim TH, Kim SH, Sándor GK, Kim YD. Comparison of platelet-rich plasma (PRP), platelet-rich fibrin (PRF), and concentrated growth factor (CGF) in rabbit-skull defect healing. *Arch Oral Biol.* 2014;59(5):550-8.
11. Acar AH, Yolcu Ü, Gül M, Keleş A, Erdem NF, Altundag Kahraman S. Micro-computed tomography and histomorphometric analysis of the effects of platelet-rich fibrin on bone regeneration in the rabbit calvarium. *Arch Oral Biol.* 2015;60(4):606-14.

12. Ghanaati S, Booms P, Orlowska A, Kubesch A, Lorenz J, Rutkowski J, et al. Advanced platelet-rich fibrin: a new concept for cell-based tissue engineering by means of inflammatory cells. *J Oral Implantol*. 2014;40(6):679-89.
13. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006;101(3):e37-44.
14. Dohan Ehrenfest DM, Del Corso M, Inchingolo F, Sammartino G, Charrier JB. Platelet-rich plasma (PRP) and platelet-rich fibrin (PRF) in human cell cultures: growth factor release and contradictory results. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010;110(4):418-21; author reply 21-2.
15. Dohan Ehrenfest DM, Bielecki T, Jimbo R, Barbé G, Del Corso M, Inchingolo F, et al. Do the fibrin architecture and leukocyte content influence the growth factor release of platelet concentrates? An evidence-based answer comparing a pure platelet-rich plasma (P-PRP) gel and a leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Curr Pharm Biotechnol*. 2012;13(7):1145-52.
16. Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, Girard MO, Schoeffler C, Dohan SL, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part V: histologic evaluations of PRF effects on bone allograft maturation in sinus lift. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006;101(3):299-303.
17. Schär MO, Diaz-Romero J, Kohl S, Zumstein MA, Nesic D. Platelet-rich Concentrates Differentially Release Growth Factors and Induce Cell Migration In Vitro. *Clin Orthop Relat Res*. 2015;473(5):1635-43.
18. Giannini S, Cielo A, Bonanome L, Rastelli C, Derla C, Corpaci F, et al. Comparison between PRP, PRGF and PRF: lights and shadows in three similar but different protocols. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2015;19(6):927-30.
19. Ranganathan AT, Chandran CR. Platelet-rich fibrin in the treatment of periodontal bone defects. *J Contemp Dent Pract*. 2014;15(3):372-5.
20. Dinarello CA. Therapeutic strategies to reduce IL-1 activity in treating local and systemic inflammation. *Curr Opin Pharmacol*. 2004;4(4):378-85.
21. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:519-50.
22. Hinz B. The extracellular matrix and transforming growth factor- β 1: Tale of a strained relationship. *Matrix Biol*. 2015.
23. Kizil C, Kyritsis N, Brand M. Effects of inflammation on stem cells: together they strive? *EMBO Rep*. 2015;16(4):416-26.
24. Scholtyssek C, Krönke G, Schett G. Inflammation-associated changes in bone homeostasis. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2012;11(3):188-95.

25. Flower RJ, Blackwell GJ. The importance of phospholipase-A2 in prostaglandin biosynthesis. *Biochem Pharmacol.* 1976;25(3):285-91.
26. Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB, et al. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J.* 1998;12(12):1063-73.
27. Brune K, Patrignani P. New insights into the use of currently available non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Pain Res.* 2015;8:105-18.
28. Patrignani P, Patrono C. Cyclooxygenase inhibitors: From pharmacology to clinical read-outs. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1851(4):422-32.
29. Capone ML, Tacconelli S, Di Francesco L, Sacchetti A, Sciulli MG, Patrignani P. Pharmacodynamic of cyclooxygenase inhibitors in humans. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2007;82(1-4):85-94.
30. Capone ML, Tacconelli S, Sciulli MG, Patrignani P. Clinical pharmacology of selective COX-2 inhibitors. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2003;16(2 Suppl):49-58.
31. Crofford LJ. COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. *J Rheumatol Suppl.* 1997;49:15-9.
32. Yuan C, Smith WL. A Cyclooxygenase-2-dependent Prostaglandin E2 Biosynthetic System in the Golgi Apparatus. *J Biol Chem.* 2015;290(9):5606-20.
33. Pairet M, van Ryn J. Experimental models used to investigate the differential inhibition of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Inflamm Res.* 1998;47 Suppl 2:S93-101.
34. Pairet M, Netter P. [Selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors: importance and limitations]. *Therapie.* 1999;54(4):433-45.
35. Pairet M, van Ryn J. Measurement of differential inhibition of COX-1 and COX-2 and the pharmacology of selective inhibitors. *Drugs Today (Barc).* 1999;35(4-5):251-65.
36. Hersh EV, Lally ET, Moore PA. Update on cyclooxygenase inhibitors: has a third COX isoform entered the fray? *Curr Med Res Opin.* 2005;21(8):1217-26.
37. Hawkey C, Kahan A, Steinbrück K, Alegre C, Baumelou E, Bégaud B, et al. Gastrointestinal tolerability of meloxicam compared to diclofenac in osteoarthritis patients. International MELISSA Study Group. Meloxicam Large-scale International Study Safety Assessment. *Br J Rheumatol.* 1998;37(9):937-45.
38. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part III: leucocyte activation: a new feature for platelet concentrates? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;101(3):e51-5.

39.Simon BI, Gupta P, Tajbakhsh S. Quantitative evaluation of extraction socket healing following the use of autologous platelet-rich fibrin matrix in humans. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2011;31(3):285-95.

40.Bielecki T, Dohan Ehrenfest DM. Leukocyte- and platelet-rich Plasma (L-PRP)/fibrin (L-PRF) in medicine - past, present, future. *Curr Pharm Biotechnol*. 2012;13(7):i-ii.

41.Messora MR, Nagata MJ, Dornelles RC, Bomfim SR, Furlaneto FA, de Melo LG, et al. Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma activated by two different methods. A histologic and histometric study in rat calvaria. *J Periodontal Res*. 2008;43(6):723-9.

42.Aguilar-Carrasco JC, Rodríguez-Silverio J, Jiménez-Andrade JM, Carrasco-Portugal MeC, Flores-Murrieta FJ. Relationship between blood levels and the anti-hyperalgesic effect of ketoprofen in the rat. *Drug Dev Res*. 2014;75(3):189-94.

FIGURAS

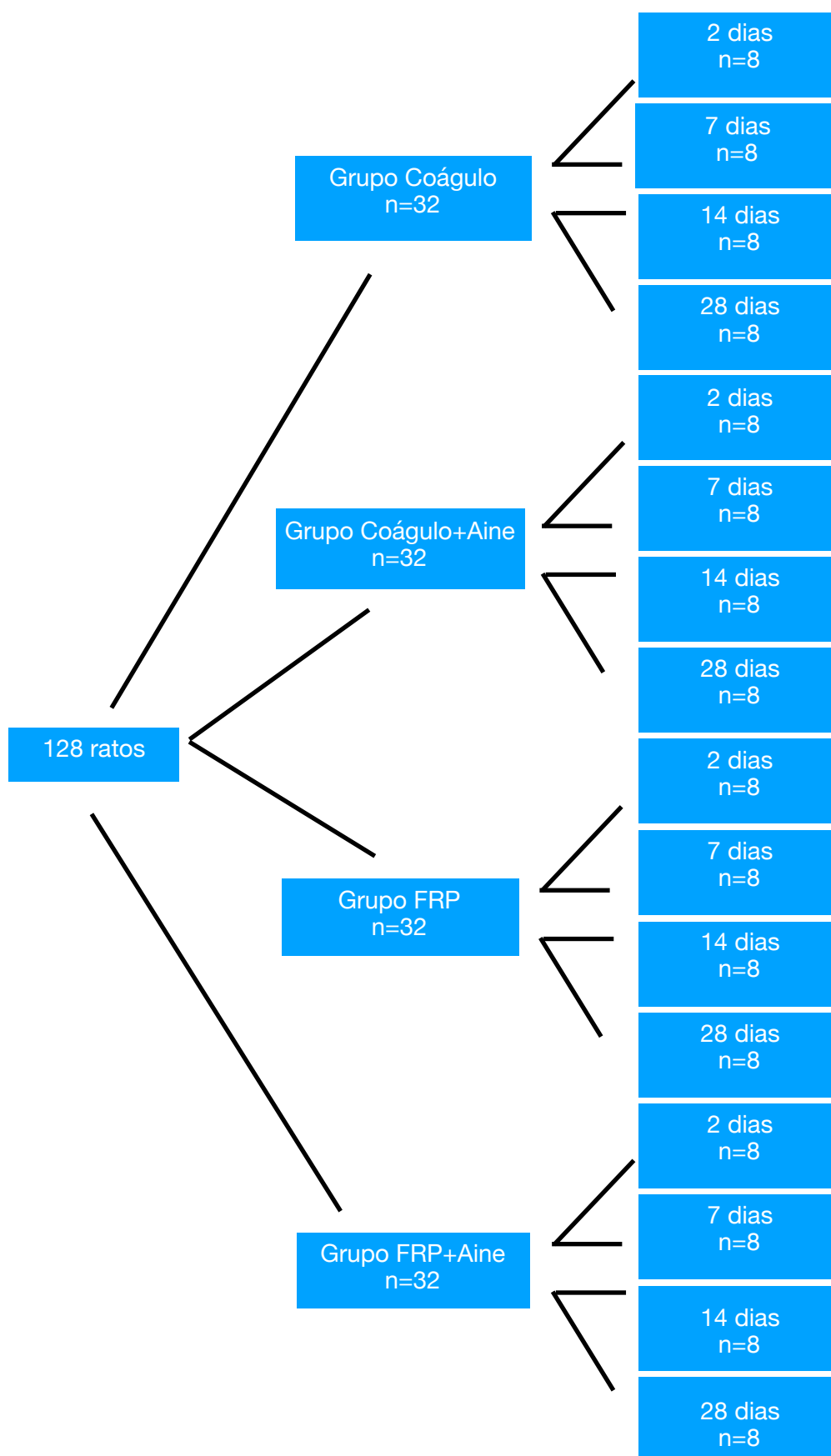


Figura 1: Representação esquemática dos grupos e tempos experimentais utilizados.



Figura 2- Tricotomia da região fronto-parietal e anti-sepsia com PVPI.

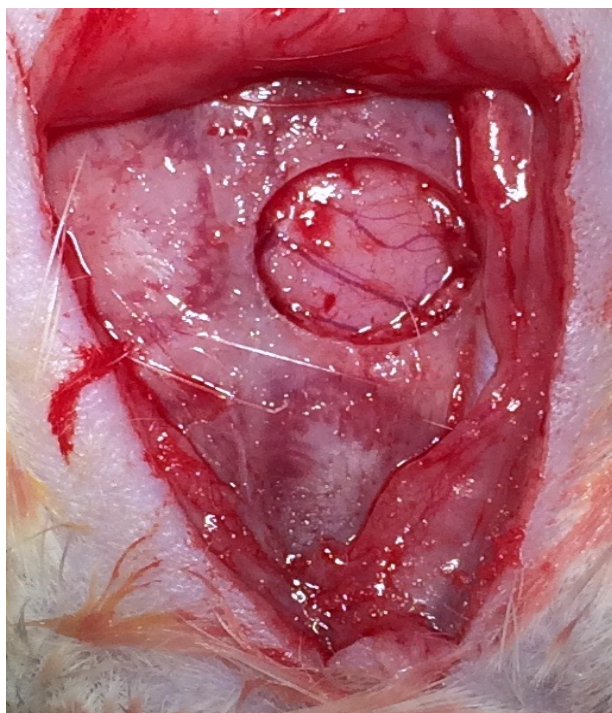


Figura 3 – Acesso cirúrgico em formato de “V” com exposição de osso parietal e cortical interna e DTC de 5mm de diâmetro.

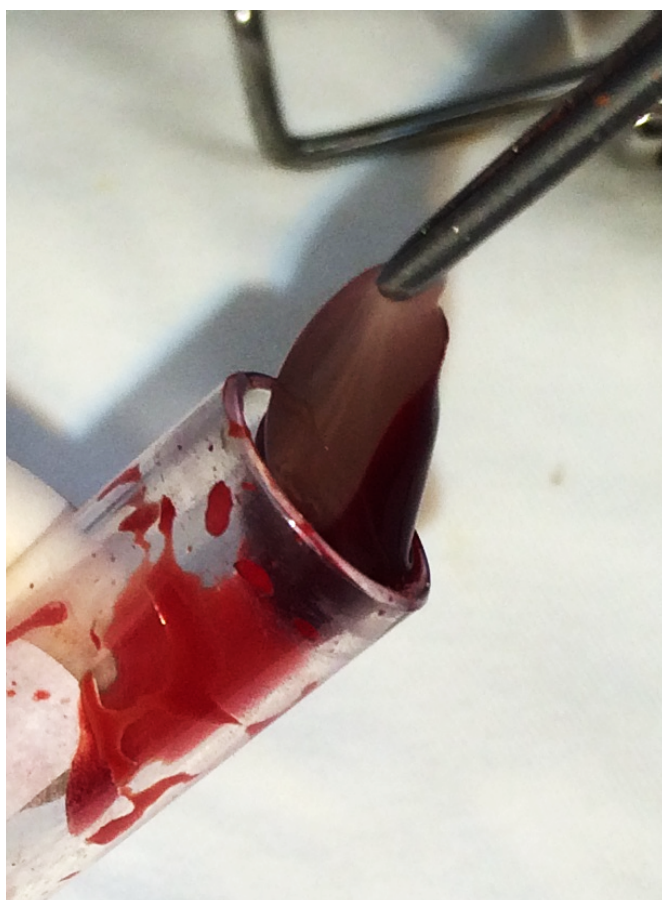


Figura 4- Obtenção da FRP para preenchimento de DTC.

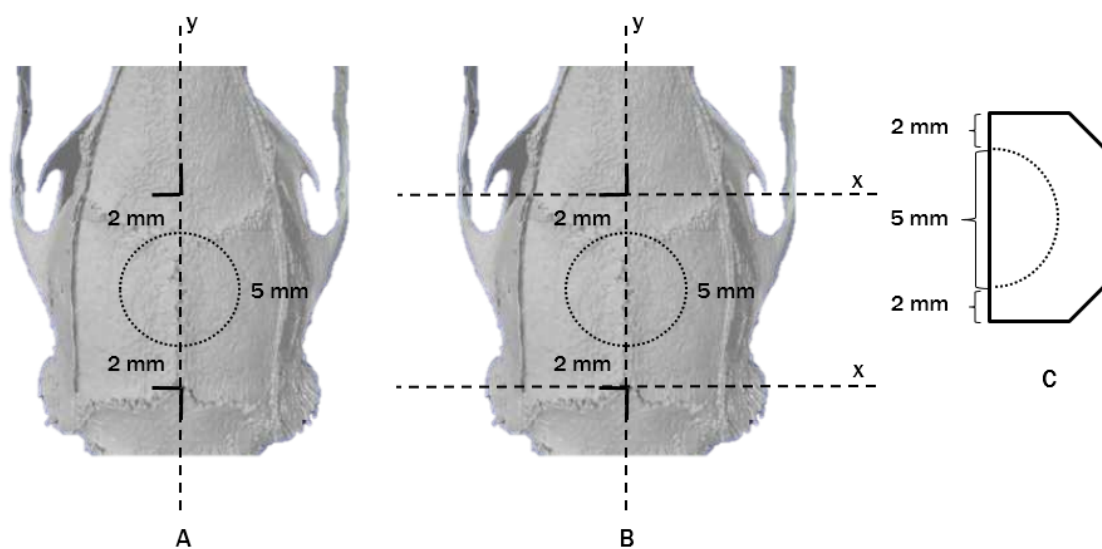


Figura 5: Representação esquemática das referências do defeito crítico.

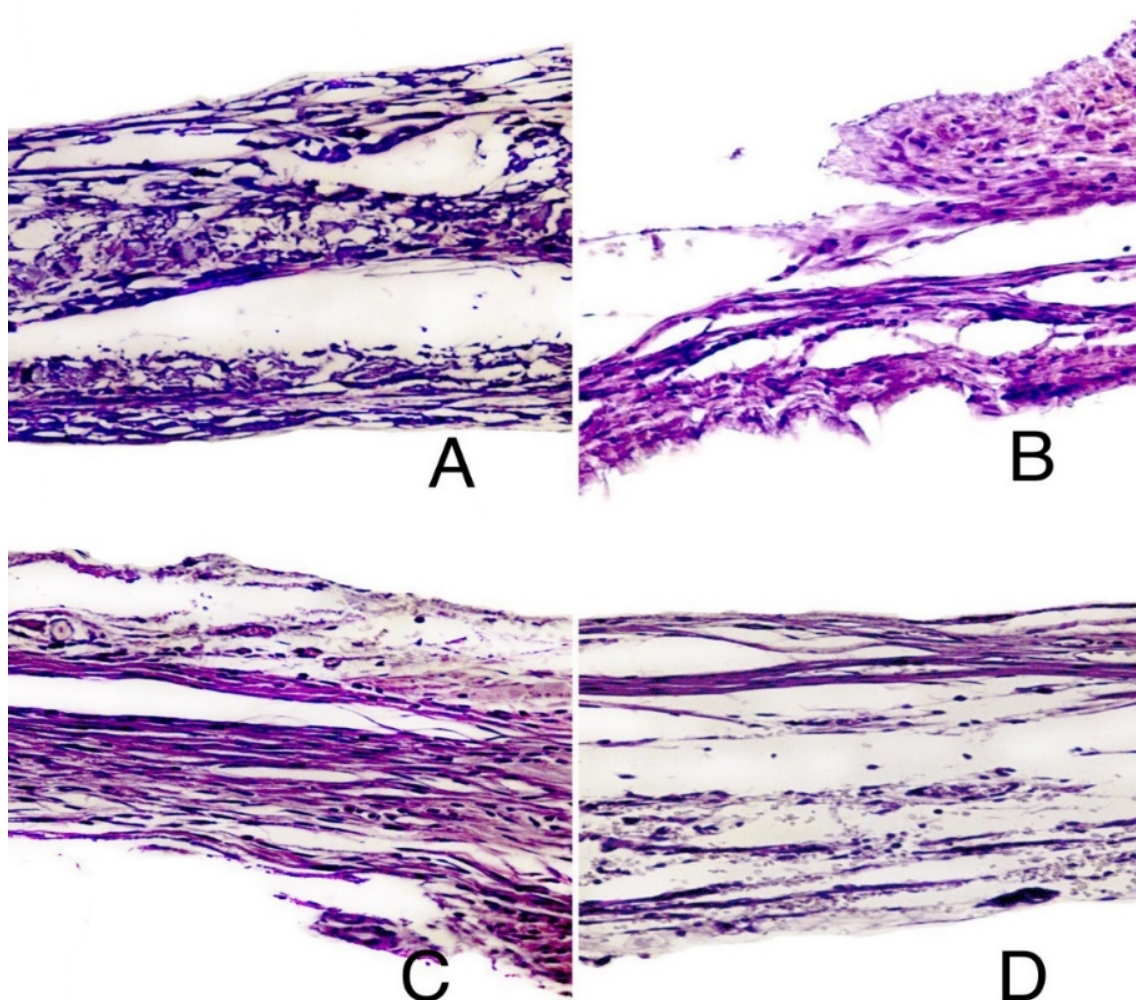


Figura 6: Fotomicrografias representativas dos grupos GC 2 dias (A), 7 dias (B), 14 dias (C) e 28 dias (D). (HE, Aumento original 25x).

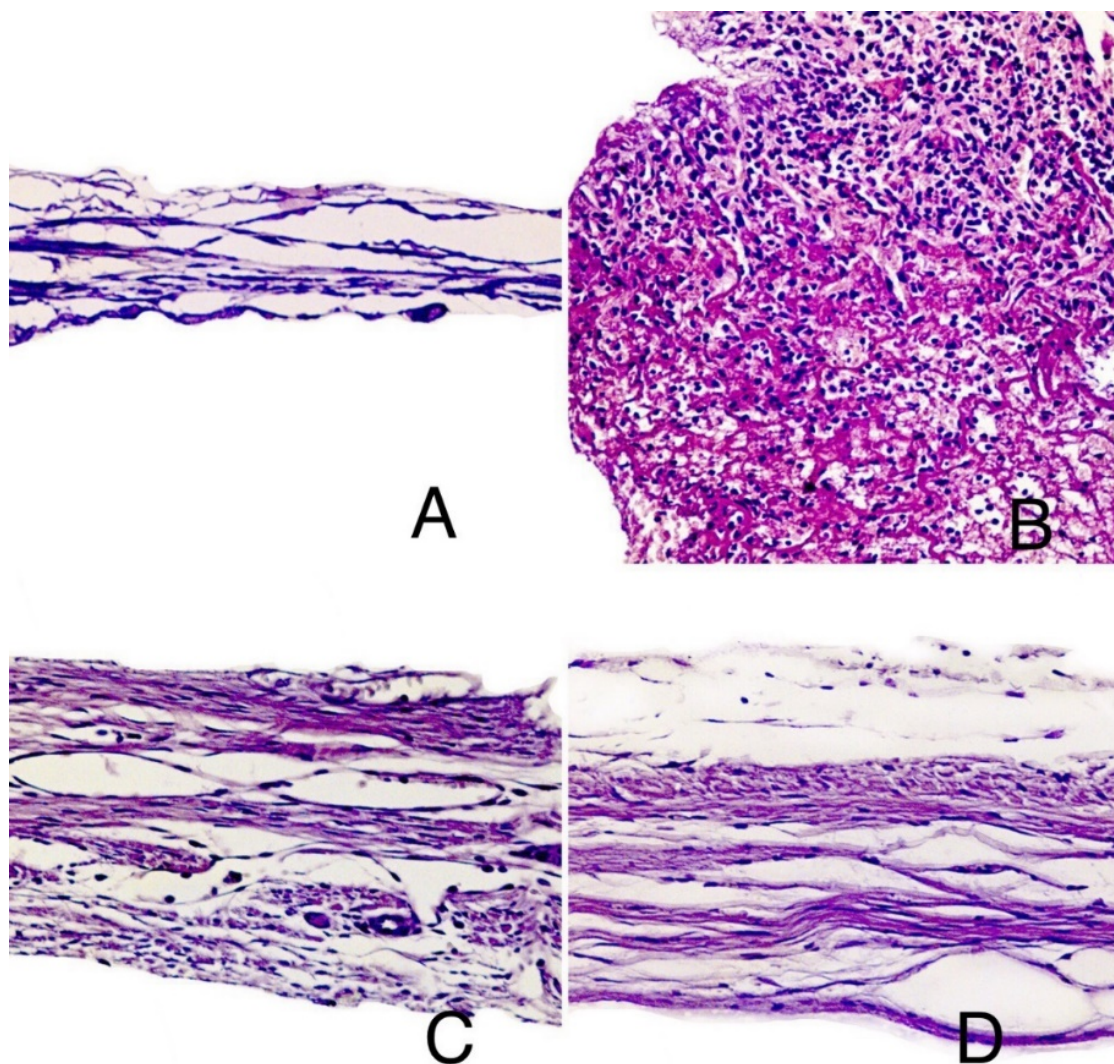


Figura 7: Fotomicrografias representativas dos grupos GC + AINE 2 dias (A), 7 dias (B), 14 dias (C) e 28 dias (D). (HE, Aumento original 25x).

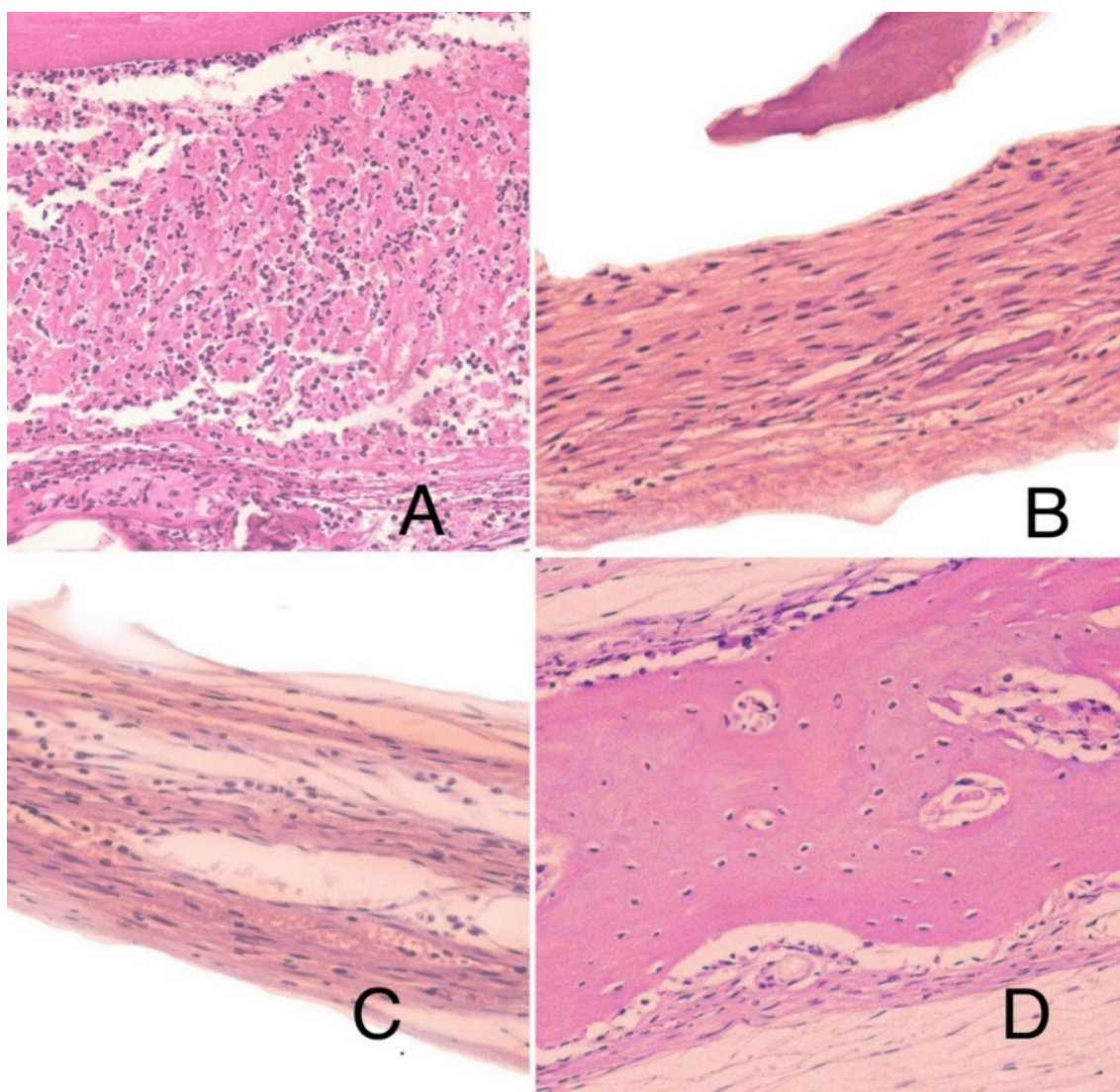


Figura 8: Fotomicrografias representativas dos grupos FRP 2 dias (A), 7 dias (B), 14 dias (C) e 28 dias (D). (HE, Aumento original 25x).

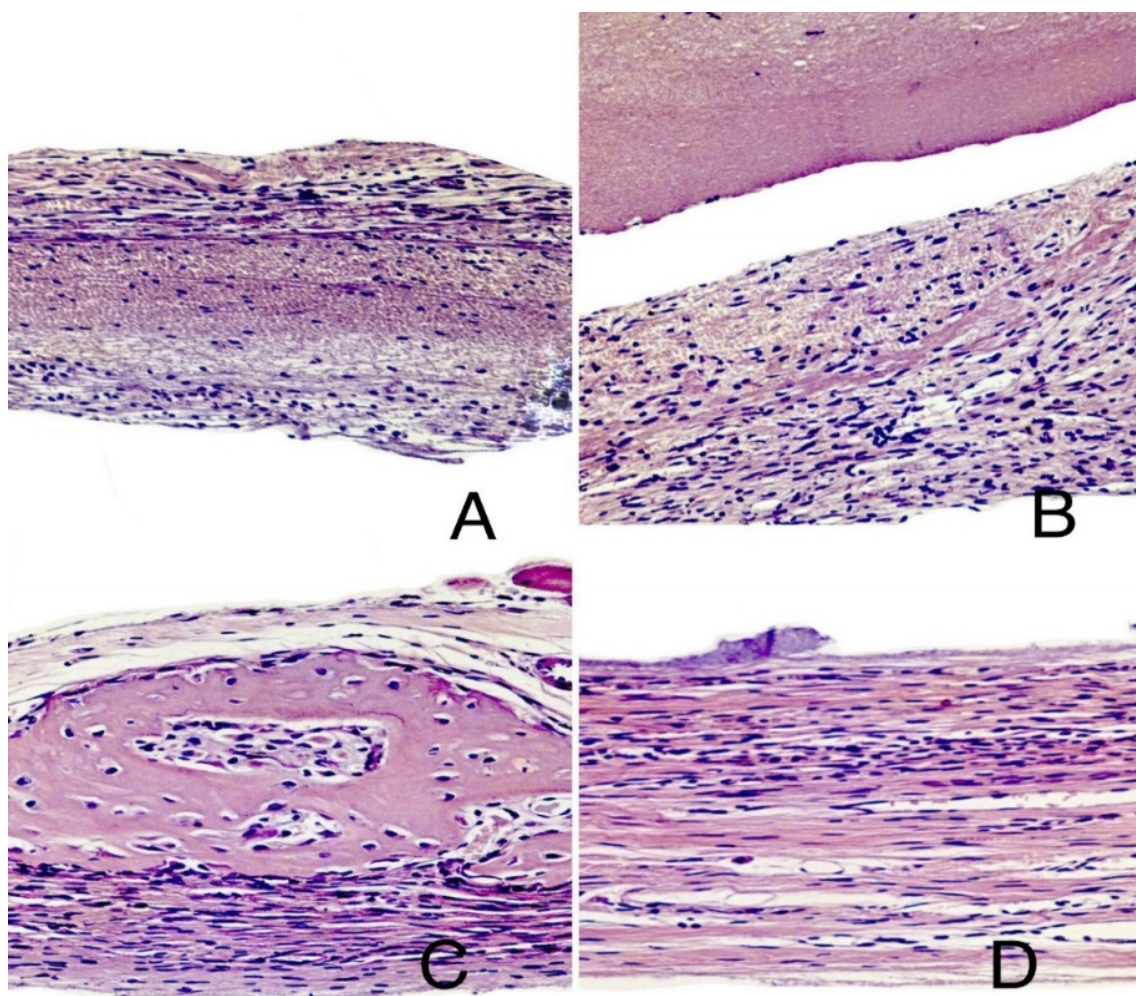


Figura 9: Fotomicrografias representativas dos grupos FRP + AINE 2 dias (A), 7 dias (B), 14 dias (C) e 28 dias (D). (HE, Aumento original 25x).

TABELAS E GRÁFICOS

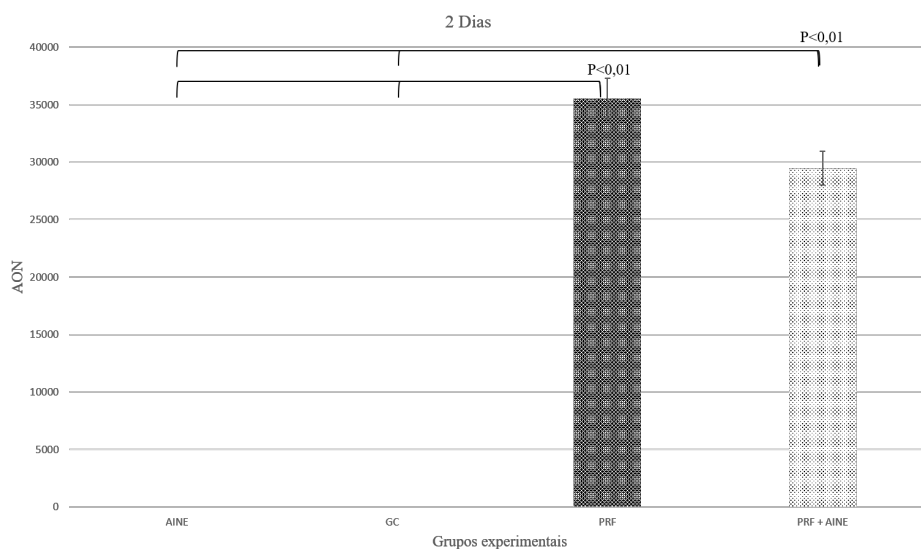


GRÁFICO 1: Valores médios e desvio padrão representativos da área de osso neoformado (AON) para os grupos experimentais AINE, GC, PRF, AINE + PRF aos 2 dias.

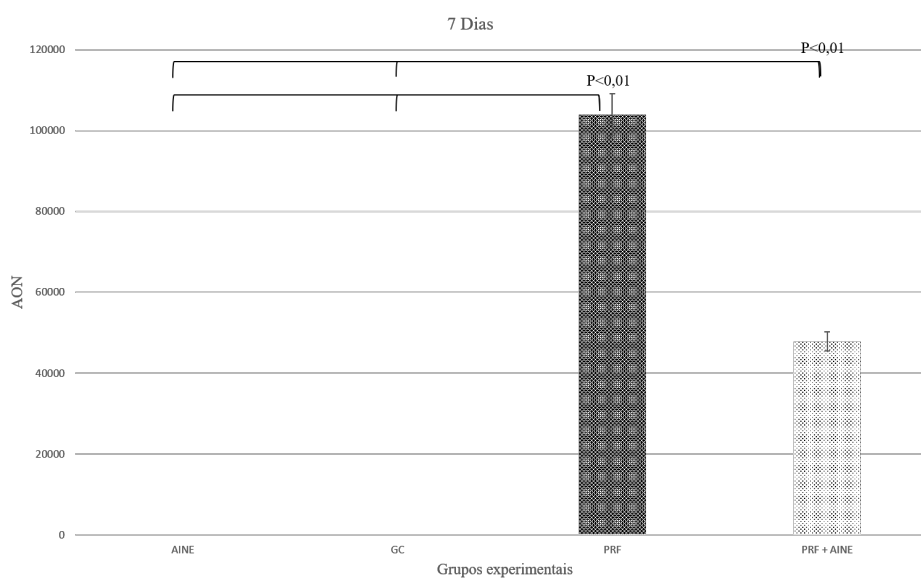


GRÁFICO 2: Valores médios e desvio padrão representativos da área de osso neoformado (AON) para os grupos experimentais AINE, GC, PRF, AINE + PRF aos 7 dias.

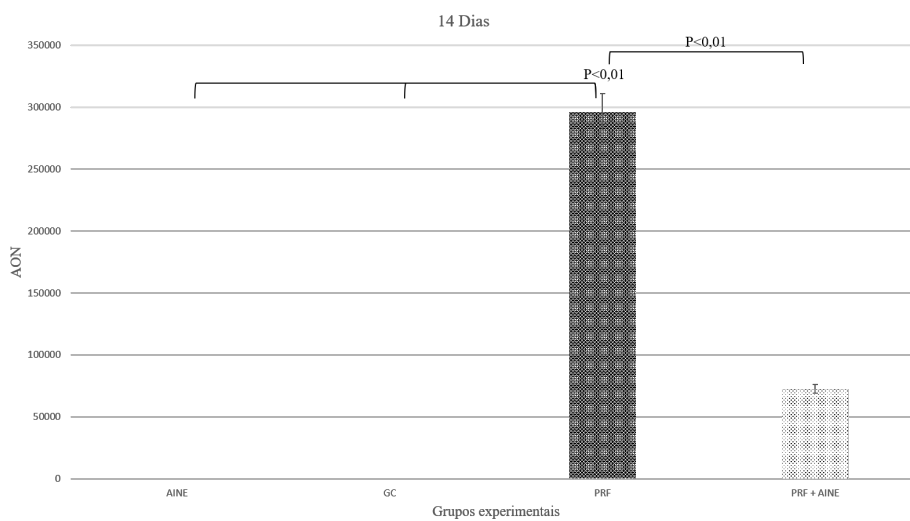


GRÁFICO 3: Valores médios e desvio padrão representativos da área de osso neoformado (AON) para os grupos experimentais AINE, GC, PRF, AINE + PRF aos 14 dias.

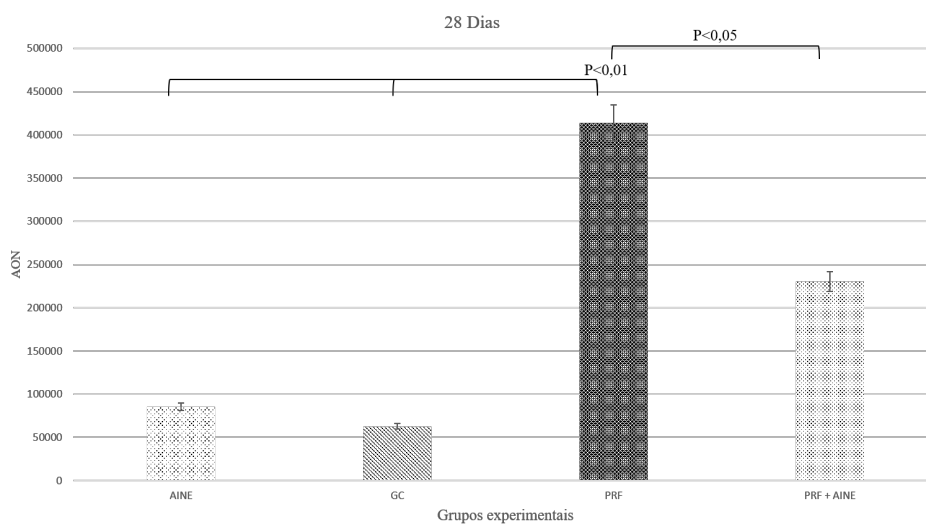


GRÁFICO 4: Valores médios e desvio padrão representativos da área de osso neoformado (AON) para os grupos experimentais AINE, GC, PRF, AINE + PRF aos 28 dias.

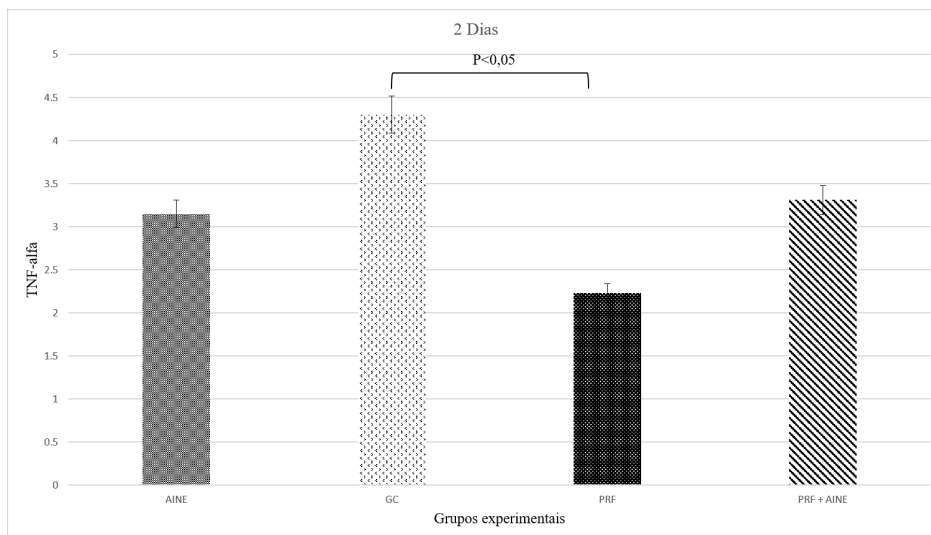


GRÁFICO 5: Valores médios e desvio padrão representativos de TNF-alfa para os grupos experimentais AINE, GC, PRF, AINE + PRF aos 2 dias.

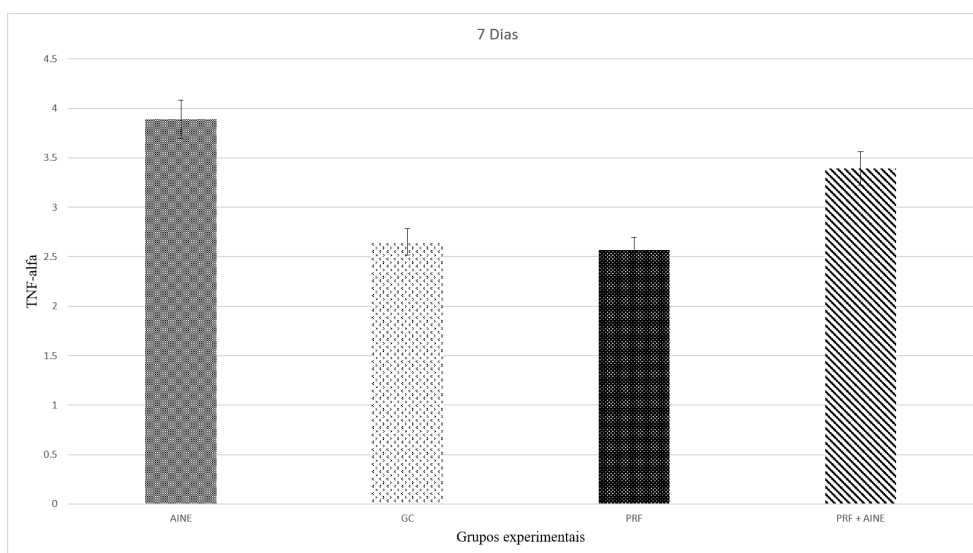


GRÁFICO 6: Valores médios e desvio padrão representativos de TNF-alfa para os grupos experimentais AINE, GC, PRF, AINE + PRF aos 7 dias.

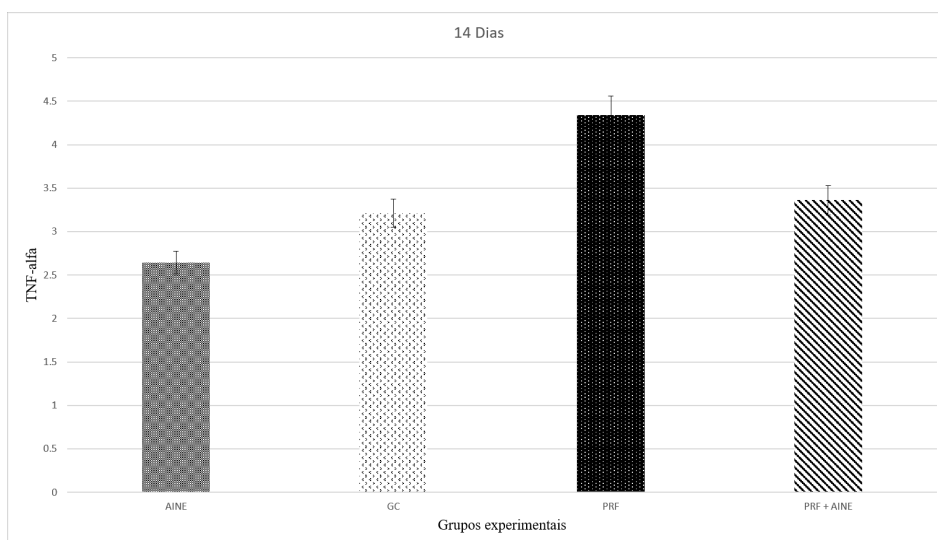


GRÁFICO 7: Valores médios e desvio padrão representativos de TNF-alfa para os grupos experimentais AINE, GC, PRF, AINE + PRF aos 14 dias.

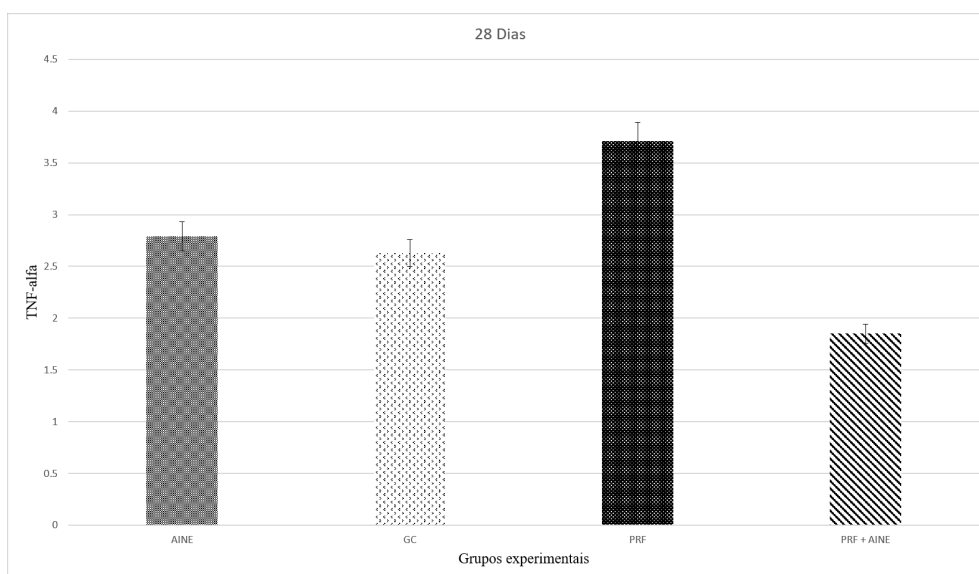


GRÁFICO 8: Valores médios e desvio padrão representativos de TNF-alfa para os grupos experimentais AINE, GC, PRF, AINE + PRF aos 28 dias.

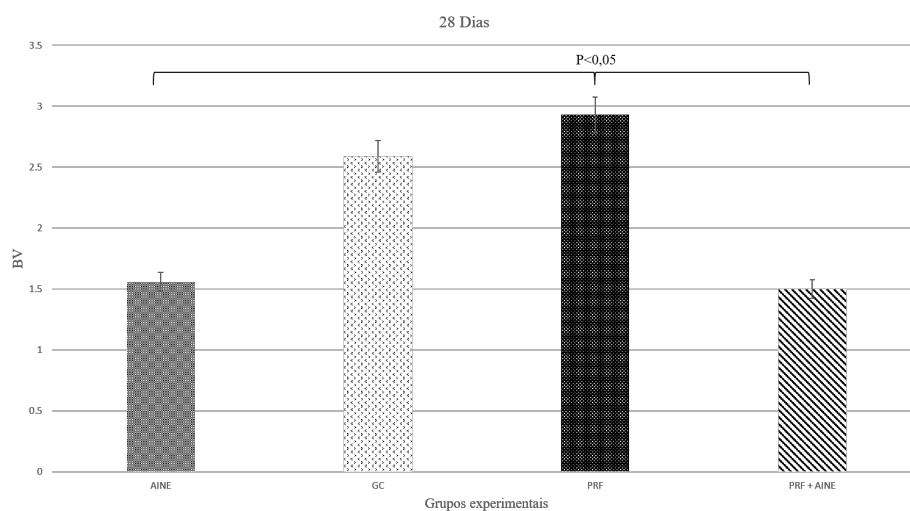


GRÁFICO 9: Valores médios e desvio padrão representativos do parâmetro microtomográfico BV para os grupos experimentais AINE, GC, PRF, AINE + PRF aos 28 dias.

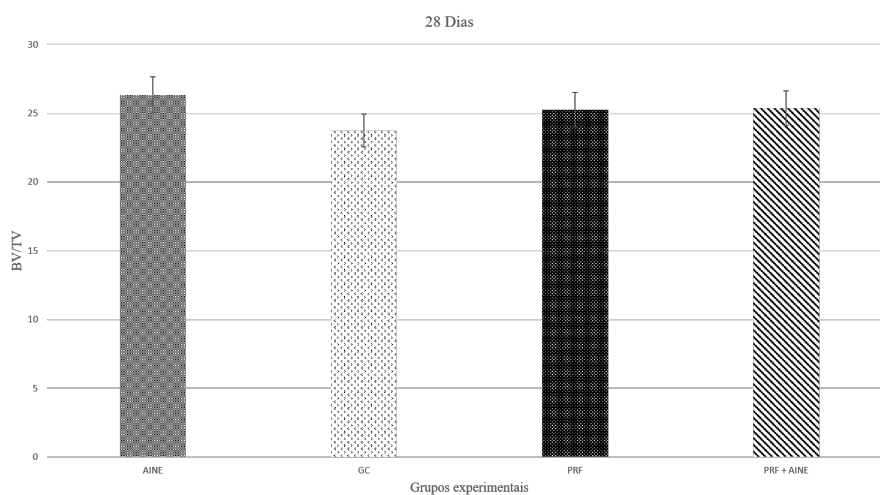


GRÁFICO 10: Valores médios e desvio padrão representativos do parâmetro microtomográfico BV/TV para os grupos experimentais AINE, GC, PRF, AINE + PRF aos 28 dias.

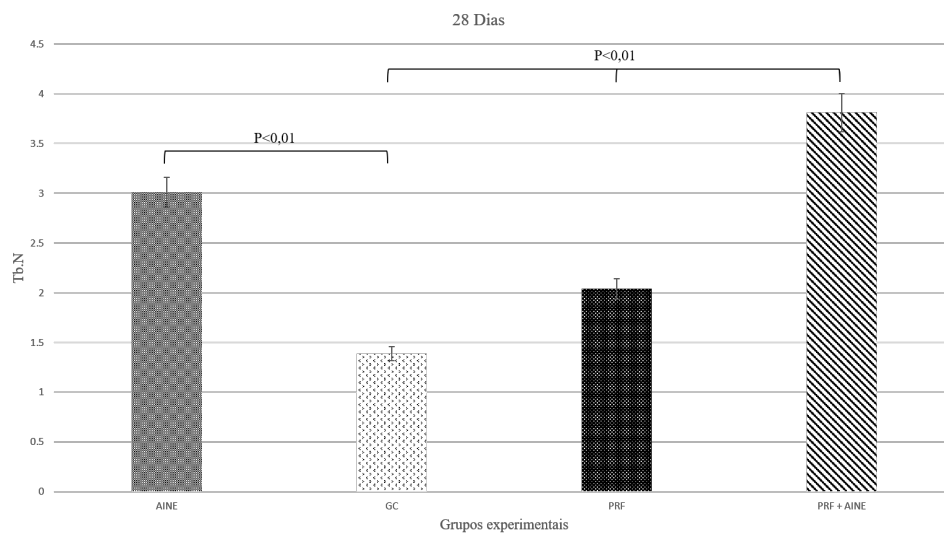


GRÁFICO 11: Valores médios e desvio padrão representativos do parâmetro microtomográfico Tb.N para os grupos experimentais AINE, GC, PRF, AINE + PRF aos 28 dias.

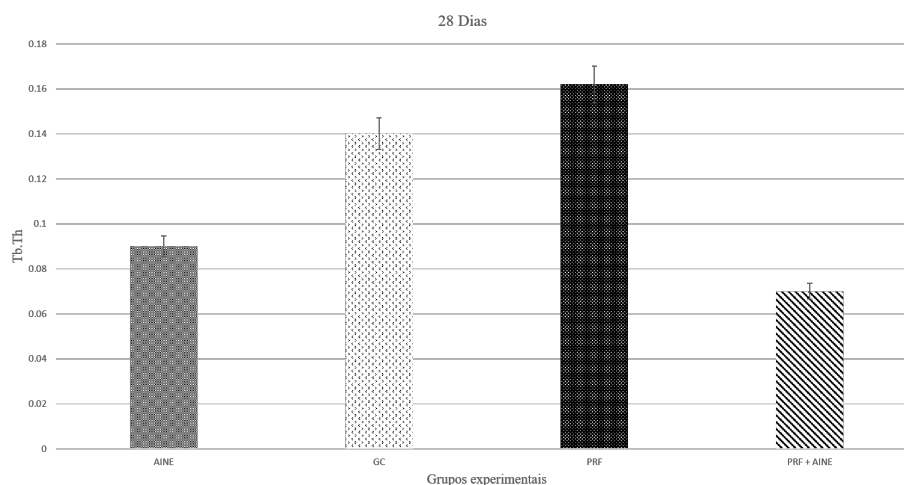
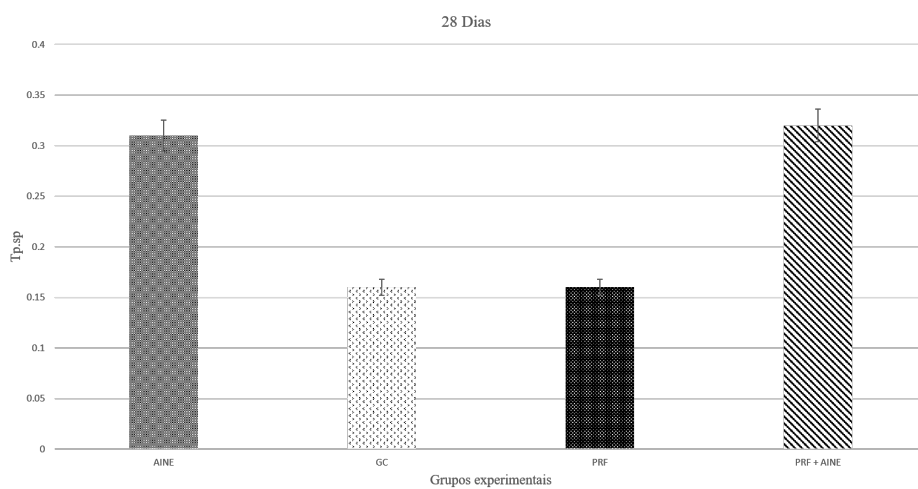


GRÁFICO 12: Valores médios e desvio padrão representativos do parâmetro microtomográfico Tb.Th para os grupos experimentais AINE, GC, PRF, AINE + PRF aos 28 dias.



GRÁ-
FICO 13: Valores médios e desvio padrão representativos do parâmetro microtomográfico $Tp.sp$ para os grupos experimentais AINE, GC, PRF, AINE + PRF aos 28 dias.

ANEXOS

ANEXO 1 – Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "Avaliação dos efeitos da fibrina rica em plaquetas (FRP) comparada a um anti-inflamatório não esteroidal (AINE) na resposta inflamatória e reparadora de defeitos críticos em calota de ratos", Processo FOA nº 2015-00693, sob responsabilidade de Osvaldo Magro Filho apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 14 de Outubro de 2015.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 31 de Agosto de 2016.

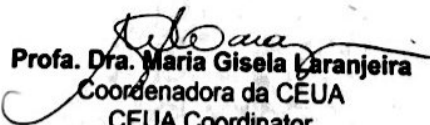
DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 30 de Setembro de 2016.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "Evaluation of the effects of platelet rich fibrin (PRF) compared to nonsteroidal anti-inflammatory (NSAIDs) in inflammatory response and regeneration of critical defect in rats calvaria", Protocol FOA nº 2015-00693, under the supervision of Osvaldo Magro Filho presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on October 14, 2015.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: August 31, 2016.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: September 30, 2016.


Prof. Dra. Maria Gisela Karanjeira
Coordenadora da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br

ANEXO 2 – Normas para publicação na Revista Clinical Oral Implant Research.

1. GENERAL

Clinical Oral Implants Research conveys scientific progress in the field of implant dentistry and its related areas to clinicians, teachers and researchers concerned with the application of this information for the benefit of patients in need of oral implants. The journal addresses itself to clinicians, general practitioners, periodontists, oral and maxillofacial surgeons and prosthodontists, as well as to teachers, academicians and scholars involved in the education of professionals and in the scientific promotion of the field of implant dentistry.

Clinical Oral Implants Research publishes:

Original research articles of high scientific merit in the field of material sciences, physiology of wound healing, biology of tissue integration of implants, diagnosis and treatment planning, prevention of pathologic processes jeopardizing the longevity of implants, clinical trials on implant systems, stoma-tognathic physiology related to oral implants, new developments in therapeutic concepts and prosthetic rehabilitation.

Review articles by experts on new developments in basic sciences related to implant dentistry and clinically applied concepts.

Case reports and case series only if they provide or document new fundamental knowledge.

Novel developments if they provide a technical novelty for any implant system.

Short communications of important research findings in a concise format and for rapid publication.

Treatment rational by experts with evidence-based treatment approach.

Please read the instructions below carefully for details on the submission of manuscripts, the journal's requirements and standards as well as information concern-

ing the procedure after a manuscript has been accepted for publication in *Clinical Oral Implants Research*. Authors are encouraged to visit Wiley-Blackwell Author Services for further information on the preparation and submission of articles and figures.

2. ETHICAL GUIDELINES

Clinical Oral Implants Research adheres to the below ethical guidelines for publication and research.

2.1. Authorship and Acknowledgements

Authors submitting a paper do so on the understanding that the manuscript have been read and approved by all authors and that all authors agree to the submission of the manuscript to the Journal. ALL named authors must have made an active contribution to the conception and design and/or analysis and interpretation of the data and/or the drafting of the paper and ALL must have critically reviewed its content and have approved the final version submitted for publication. Participation solely in the acquisition of funding or the collection of data does not justify authorship.

Clinical Oral Implants Research adheres to the definition of authorship set up by The International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). According to the ICMJE authorship criteria should be based on 1) substantial contributions to conception and design of, 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. Authors should meet conditions 1, 2 and 3.

Up to 6 authors are accepted without need for justification. In the case of a specific and detailed justification of the role of every author, up to 8 authors may be mentioned. It is a requirement that all authors have been accredited as appropriate upon submission of the manuscript. Contributors who do not qualify as authors should be mentioned under Acknowledgements.

Acknowledgements: Under acknowledgements please specify contributors to the article other than the authors accredited. Acknowledge only persons who have

made substantive contributions to the study. Authors are responsible for obtaining written permission from everyone acknowledged by name because readers may infer their endorsement of the data and conclusions.

2.2. Ethical Approvals

Experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association Declaration of Helsinki (version, 2008) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included. Editor reserve the right to reject papers if there are doubts as to whether appropriate procedures have been used.

When experimental animals are used the methods section must clearly indicate that adequate measures were taken to minimize pain or discomfort. Experiments should be carried out in accordance with the Guidelines laid down by the National Institute of Health (NIH) in the USA regarding the care and use of animals for experimental procedures or with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and in accordance with local laws and regulations.

2.3 Clinical Trials

Clinical trials should be reported using the CONSORT guidelines available at www.consort-statement.org. A CONSORT checklist should also be included in the submission material.

Clinical Oral Implants Research encourages authors submitting manuscripts reporting from a clinical trial to register the trials in any of the following free, public clinical trials registries: www.clinicaltrials.gov, <http://clinicaltrials.ifpma.org/clinicaltrials>,

<http://isrctn.org/>. The clinical trial registration number and name of the trial register will then be published with the paper.

2.4 Conflict of Interest and Source of Funding

Clinical Oral Implants Research requires that sources of institutional, private and corporate financial support for the work within the manuscript be fully acknowledged, and any potential conflicts of interest noted. Suppliers of materials should be named and their location (town, state/county, country) included. Information concerning conflict of interest and sources of funding should be included under Acknowledgements.

2.5 Appeal of Decision

The decision on a paper is final and cannot be appealed.

2.6 Permissions

If all or parts of previously published illustrations are used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. It is the author's responsibility to obtain these in writing and provide copies to the Publishers.

2.7 Copyright Assignment

Authors submitting a paper do so on the understanding that the work and its essential substance have not been published before and is not being considered for publication elsewhere. The submission of the manuscript by the authors means that the authors automatically agree to assign copyright to Wiley-Blackwell if and when the manuscript is accepted for publication. The work shall not be published elsewhere in any language without the written consent of the publisher. The articles published in this journal are protected by copyright, which covers translation rights and the exclusive right to reproduce and distribute all of the articles printed in the journal. No material published in the journal may be stored on microfilm or videocassettes or in electronic

database and the like or reproduced photographically without the prior written permission of the publisher.

Correspondence to the journal is accepted on the understanding that the contributing author licences the publisher to publish the letter as part of the journal or separately from it, in the exercise of any subsidiary rights relating to the journal and its contents.

Upon acceptance of a paper, authors are required to assign the copyright to publish their paper to Wiley-Blackwell. Assignment of the copyright is a condition of publication and papers will not be passed to the publisher for production unless copyright has been assigned. (Papers subject to government or Crown copyright are exempt from this requirement; however, the form still has to be signed). A completed Copyright Transfer Agreement must be sent before any manuscript can be published. Authors must send the completed Copyright Transfer Agreement upon receiving notice of manuscript acceptance, i.e., do not send the Copyright Transfer Agreement at submission. Please return your completed form to:

3. SUBMISSION OF MANUSCRIPTS

Manuscripts should be submitted electronically via the online submission site <http://mc.manuscriptcentral.com/coir>. The use of an online submission and peer review site enables immediate distribution of manuscripts and consequentially speeds up the review process. It also allows authors to track the status of their own manuscripts. Complete instructions for submitting a paper is available online and below. Further assistance can be obtained from the Editorial Assistant Ms. Brigitte Baur. E-mail: coir@zmk.unibe.ch

3.1. Getting Started

Launch your web browser (supported browsers include Internet Explorer 6 or higher, Netscape 7.0, 7.1, or 7.2, Safari 1.2.4, or Firefox 1.0.4) and go to the journal's online Submission Site: <http://mc.manuscriptcentral.com/coir>

- Log-in or click the 'Create Account' option if you are a first-time user.
- If you are creating a new account.
 - After clicking on 'Create Account', enter your name and e-mail information and click 'Next'. Your e-mail information is very important.
 - Enter your institution and address information as appropriate, and then click 'Next.'
 - Enter a user ID and password of your choice (we recommend using your e-mail address as your user ID), and then select your area of expertise. Click 'Finish'.
- If you have an account, but have forgotten your log in details, go to Password Help on the journals online submission system <http://mc.manuscriptcentral.com/coir> and enter your e-mail address. The system will send you an automatic user ID and a new temporary password.

- Log-in and select Corresponding Author Center.

3.2. Submitting Your Manuscript

- After you have logged in, click the 'Submit a Manuscript' link in the menu bar.
- Enter data and answer questions as appropriate. You may copy and paste directly from your manuscript and you may upload your pre-prepared covering letter.
- Click the 'Next' button on each screen to save your work and advance to the next screen.
- You are required to upload your files.
 - Click on the 'Browse' button and locate the file on your computer.
 - Select the designation of each file in the drop-down menu next to the Browse button.

- When you have selected all files you wish to upload, click the 'Upload Files' button.

- Review your submission (in HTML and PDF format) before sending to the Journal. Click the 'Submit' button when you are finished reviewing.

3.3. Manuscript Files Accepted

Manuscripts should be uploaded as Word (.doc) or Rich Text Format (.rft) files (not write-protected) plus separate figure files. GIF, JPEG, PICT or Bitmap files are acceptable for submission, but only high-resolution TIF or EPS files are suitable for printing. The files will be automatically converted to HTML and PDF on upload and will be used for the review process. The text file must contain the entire manuscript including title page, abstract, text, references, tables, and figure legends, but no embedded figures. In the text, please reference figures as for instance 'Figure 1', 'Figure 2' etc to match the tag name you choose for the individual figure files uploaded. Manuscripts should be formatted as described in the Author Guidelines below. Please note that any manuscripts uploaded as Word 2007 (.docx) will be automatically rejected. Please save any .docx file as .doc before uploading.

3.4. Blinded Review

All manuscripts submitted to Clinical Oral Implants Research will be reviewed by two experts in the field. Clinical Oral Implants Research uses single blinded review. The names of the reviewers will thus not be disclosed to the author submitting a paper.

3.5. Suggest a Reviewer

Clinical Oral Implants Research attempts to keep the review process as short as possible to enable rapid publication of new scientific data. In order to facilitate this process, please suggest the names and current email addresses of one potential international reviewer whom you consider capable of reviewing your manuscript. In addition to your choice the journal editor will choose one or two reviewers as well.

3.6. Suspension of Submission Mid-way in the Submission Process

You may suspend a submission at any phase before clicking the 'Submit' button and save it to submit later. The manuscript can then be located under 'Unsubmitted Manuscripts' and you can click on 'Continue Submission' to continue your submission when you choose to.

3.7. E-mail Confirmation of Submission

After submission you will receive an e-mail to confirm receipt of your manuscript. If you do not receive the confirmation email after 24 hours, please check your e-mail address carefully in the system. If the e-mail address is correct please contact your IT department. The error may be caused by some sort of spam filtering on your e-mail server. Also, the e-mails should be received if the IT department adds our email server (uranus.scholarone.com) to their whitelist.

3.8. Manuscript Status

You can access ScholarOne Manuscripts (formerly known as Manuscript Central) any time to check your 'Author Centre' for the status of your manuscript. The Journal will inform you by e-mail once a decision has been made.

3.9. Submission of Revised Manuscripts

To submit your revised manuscript, locate your manuscript under 'Manuscripts with Decisions' and click on 'Submit a Revision' . Please remember to delete any old files uploaded when you upload your revised manuscript.

4. MANUSCRIPT TYPES ACCEPTED

Original research articles of high scientific merit in the field of material sciences, physiology of wound healing, biology of tissue integration of implants, diagnosis and treatment planning, prevention of pathologic processes jeopardizing the longevity of implants, clinical trials on implant systems, stomatognathic physiology related to oral implants, new developments in therapeutic concepts and prosthetic rehabilitation.

Review articles by experts on new developments in basic sciences related to implant dentistry and clinically applied concepts. Reviews are generally by invitation only and have to be approved by the Editor-in-Chief before submission.

Case reports and case series, but only if they provide or document new fundamental knowledge and if they use language understandable to the clinician.

Novel developments if they provide a technical novelty for any implant system.

Short communications of important research findings in a concise format and for rapid publication. Treatment rational by experts with evidence-based treatment approach. Proceedings of international meetings may also be considered for publication at the discretion of the Editor.

5. MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

5.1. Page Charge

Articles exceeding 10 published pages are subject to a charge of USD 160 per additional page. One published page amounts approximately to 5,500 characters (excluding figures and tables).

5.2. Format

Language: The language of publication is English. Authors for whom English is a second language might choose to have their manuscript professionally edited by an English speaking person before submission to make sure the English is of high quality. A list of independent suppliers of editing services can be found at http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication

Abbreviations, Symbols and Nomenclature: The symbol % is to be used for percent, h for hour, min for minute, and s for second. *In vitro*, *in vivo*, *in situ* and other Latin expressions are to be italicised. Use only standard abbreviations. All units will be met-

ric. Use no roman numerals in the text. In decimals, a decimal point and not a comma will be used. Avoid abbreviations in the title. The full term for which an abbreviation stands should precede its first use in the text unless it is a standard unit of measurement. In cases of doubt, the spelling orthodoxy of Webster's third new international dictionary will be adhered to.

Scientific Names: Proper names of bacteria should be binomial and should be singly underlined on the typescript. The full proper name (e.g., *Streptococcus sanguis*) must be given upon first mention. The generic name may be abbreviated thereafter with the first letter of the genus (e.g., *S. sanguis*). If abbreviation of the generic name could cause confusion, the full name should be used. If the vernacular form of a genus name (e.g., streptococci) is used, the first letter of the vernacular name is not capitalised and the name is not underlined. Use of two letters of the genus (e.g., Ps. for *Peptostreptococcus*) is incorrect, even though it might avoid ambiguity. With regard to drugs, generic names should be used instead of proprietary names. If a proprietary name is used, it must be attached when the term is first used.

5.2. Structure

All manuscripts submitted to Clinical Oral Implants Research should include Title Page, Abstract, Main Text and Acknowledgements, Tables, Figures and Figure Legends as appropriate.

Title Page: should contain the title of the article, full name(s) of the authors (no more than 6) and institutional affiliation(s), a running title not exceeding 60 letters and spaces, and the name, telephone and fax numbers, email and complete mailing address of the author responsible for correspondence. The author must list appropriate key words for indexing purposes.

Abstract: should not to exceed 250 words. This should be structured into: objectives, material and methods, results, conclusions, and no other information.

Main Text of Original Research Article should include Introduction, Material and Methods, Results and Discussion.

Introduction: Summarise the rationale and purpose of the study, giving only strictly pertinent references. Do not review existing literature extensively. State clearly the working hypothesis.

Material and Methods: Material and methods should be presented in sufficient detail to allow confirmation of the observations. Published methods should be referenced and discussed only briefly, unless modifications have been made. Indicate the statistical methods used, if applicable.

Results: Present your results in a logical sequence in the text, tables, and illustrations. Do not repeat in the text all data in the tables and illustrations. The important observations should be emphasised.

Discussion: Summarise the findings without repeating in detail the data given in the Results section. Relate your observations to other relevant studies and point out the implications of the findings and their limitations. Cite other relevant studies.

Main Text of Short Communications: Short communications are limited to two printed pages including illustrations and references and need not follow the usual division into material and methods, etc., but should have an abstract.

Acknowledgements: Acknowledge only persons who have made substantive contributions to the study. Authors are responsible for obtaining written permission from everyone acknowledged by name because readers may infer their endorsement of the data and conclusions. Sources of financial support should be acknowledged.

5.3. References

References should quote the last name(s) of the author(s) and the year of publication (Black & Miller 1988). Three or more authors should always be referred to as, for example, (Fox et al. 1977).

A list of references should be given at the end of the paper and should follow the recommendations in *Units, symbols and abbreviations: a guide for biological and medical editors and authors* (1988), p. 52, London: The Royal Society of Medicine.

a) The arrangement of the references should be alphabetical by author's surname.

b) The order of the items in each reference should be:

(i) for journal references:

name(s) of author(s), year, title of paper, title of journal, volume number, first and last page numbers.

(ii) for book references:

name(s) of author(s), year, title of book, edition, volume, chapter and/ or page number, town of publication, publisher.

c) Author's names should be arranged thus: Daniels, J.A., Kelly, R.A. & Til, T.C.

Note the use of the ampersand and omission of comma before it. Author's names when repeated in the next reference are always spelled out in full.

d) The year of publication should be surrounded by parentheses: (1966).

c) The title of the paper should be included, without quotation marks

f) The journal title should be written in full, italicised, and followed by volume number in bold type, and page numbers.

Examples:

Tonetti, M. S., Schmid, J., Hämmerle, C. H. & Lang, N. P. (1993) Intraepithelial antigen-presenting cells in the keratinized mucosa around teeth and osseointegrated implants. *Clinical Oral Implants Research* 4: 177-186.

Poole, B., Ohkuma, S. & Warburton, M. (1978) Some aspects of the intracellular breakdown of erogenous and endogenous proteins. In: Segal, H.S. & Doyle, D.J., eds. Protein turnover and lysosome function, 1st edition, p. 43. New York: Academic Press.

We recommend the use of a tool such as EndNote or Reference Manager for reference management and formatting. EndNote reference styles can be searched for here: www.endnote.com/support/enstyles.asp . Reference Manager reference styles can be searched for here: www.refman.com/support/rmstyles.asp

5.4. Tables, Figures and Figure Legends

Tables: Tables should be numbered consecutively with Arabic numerals. Type each table on a separate sheet, with titles making them self-explanatory. Due regard should be given to the proportions of the printed page.

Figures: All figures should clarify the text and their number should be kept to a minimum. Details must be large enough to retain their clarity after reduction in size. Illustrations should preferably fill a single-column width (81 mm) after reduction, although in exceptional cases 120mm (double-column) and 168 mm (full page) widths will be accepted. Micrographs should be designed to be reproduced without reduction, and they should be dressed directly on the micrograph with a linear size scale, arrows, and other designators as needed. Each figure should have a legend

Preparation of Electronic Figures for Publication: Although low quality images are adequate for review purposes, print publication requires high quality images to prevent the final product being blurred or fuzzy. Submit EPS (lineart) or TIFF (halftone/photographs) files only. MS PowerPoint and Word Graphics are unsuitable for printed pictures. Do not use pixel-oriented programmes. Scans (TIFF only) should have a resolution of 300 dpi (halftone) or 600 to 1200 dpi (line drawings) in relation to the reproduction size (see below). EPS files should be saved with fonts embedded (and with a TIFF preview if possible). For scanned images, the scanning resolution (at final image size) should be as follows to ensure good reproduction: lineart: >600 dpi; half-tones

(including gel photographs): >300 dpi; figures containing both halftone and line images: >600 dpi.

Permissions: If all or parts of previously published illustrations are used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. It is the author's responsibility to obtain these in writing and provide copies to the Publishers.

6. AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of a paper for publication, the manuscript will be forwarded to the Production Editor who is responsible for the production of the journal.

6.1 Proof Corrections

The corresponding author will receive an email alert containing a link to a web site. A working email address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF (portable document format) file from this site. Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following Web site: www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html . This will enable the file to be opened, read on screen, and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof. Hard copy proofs will be posted if no e-mail address is available; in your absence, please arrange for a colleague to access your e-mail to retrieve the proofs. Proofs must be returned to the Production Editor within three days of receipt.

Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetting errors, will be charged separately. Other than in exceptional circumstances, all illustrations are retained by the publisher. Please note that the author is responsible for all statements made in his work, including changes made by the copy editor.

Articles should not normally exceed 10 printed pages, including illustrations and references. Additional pages will be charged to the author(s) at the rate of USD 160 per page.

6.2 Early View (Publication Prior to Print)

Clinical Oral Implants Research is covered by Wiley-Blackwell's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

6.3 Author Services

Online production tracking is available for your article through Wiley-Blackwell's Author Services. Author Services enables authors to track their article - once it has been accepted - through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor/> for more details on online production tracking and for a wealth of resources including.

