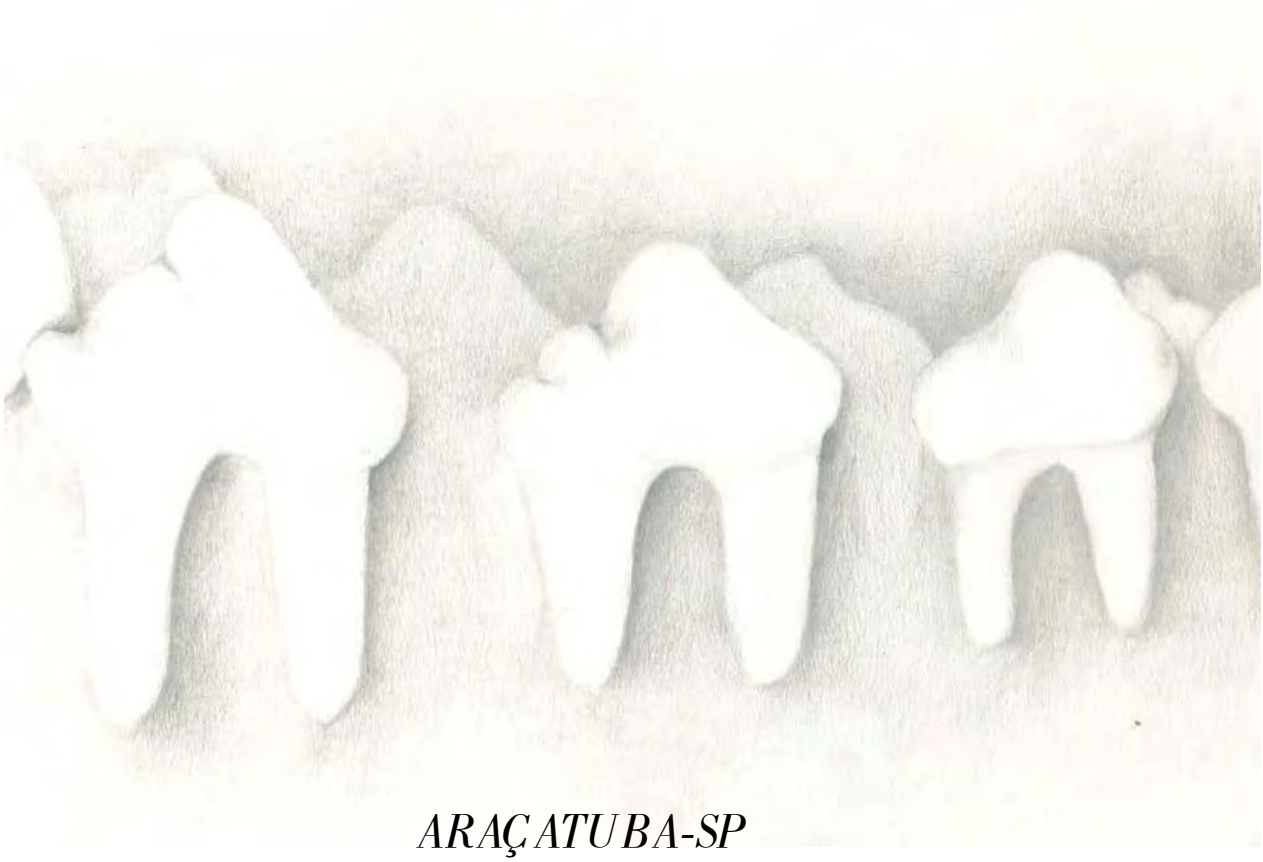
TATIANA MIRANDA DELIBERADOR

ASSOCIAÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS, NOVO VIDRO BIOATIVO E SULFATO DE CÁLCIO NO TRATAMENTO DE DEFEITOS DE FURCA CLASSE II: ESTUDO HISTOLÓGICO E HISTOMÉTRICO EM CÃES.



ARAÇATUBA-SP
2007

TATIANA MIRANDA DELIBERADOR

ASSOCIAÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS, NOVO VIDRO BIOATIVO E SULFATO DE CÁLCIO NO TRATAMENTO DE DEFEITOS DE FURCA CLASSE II: ESTUDO HISTOLÓGICO E HISTOMÉTRICO EM CÃES.

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP, para obtenção do Título de "DOUTOR EM ODONTOLOGIA" - Área de Concentração em Periodontia.

Orientadora: Professora Adjunto Maria José Hitomi Nagata

ARAÇATUBA-SP
2007

Dados Curriculares

Nascimento:	29.11.1976 – Curitiba/PR
Filiação:	Rui Paulo Gradowski Miranda Beatriz Teixeira de Melo Miranda
1998-2001:	Curso de Graduação em Odontologia Universidade Paranaense – UNIPAR
2002-2003:	Professora da Disciplina de Periodontia do Curso de Odontologia da Universidade Paranaense – UNIPAR
2003-2005:	Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Periodontia, da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – UNESP
2005-2007:	Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Periodontia, da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – UNESP
2006 - Atual:	Professora e Vice-coordenadora da Clínica Integrada da UFPR, Professora do Curso de Especialização em Periodontia da UFPR, Professora do Curso de Especialização e Aperfeiçoamento em Periodontia do Centro Universitário Positivo – UNICENP

Dedicatória

Ao meu grande amor ***Max:***

Max,

Nunca vou esquecer do dia que saiu o resultado da prova do doutorado. Você foi a primeira pessoa a dizer: "Parabéns e boa sorte porque você vai fazer o doutorado". Aquele incentivo e apoio, naquele momento, foram fundamentais para eu iniciar o curso e alcançar esta vitória.

Marido como você é raro e por isso eu te digo:

É muito bom te amar e ter você em meu coração,
É muito bom poder contar com você nos momentos difíceis, fáceis, alegres e tristes,
É muito bom ter sempre o seu apoio na vida pessoal e profissional,
É muito bom ter sempre sua compreensão, seu incentivo e sua confiança.

Aprendi muito com você nos nossos 5 anos de namoro e mais 10 anos de casamento. Já são 15 anos juntos. Podemos dizer que somos uma só pessoa. Crescemos juntos e construímos um casal unido, amigo, companheiro e MUITO FELIZ!!

Quando somos felizes na vida pessoal é muito mais fácil sermos felizes e atingirmos os nossos objetivos na vida profissional. É uma soma de fatores, sendo o apoio, incentivo e confiança fundamentais. Assim, como você é fundamental e essencial em minha vida.

Nunca vou cansar de dizer EU TE AMO!!

Muito obrigada por acreditar em meu potencial e ser uma das pessoas "chaves" para eu alcançar mais esta vitória na minha carreira. Você mais do que ninguém sabe o quanto é importante para nós e para nossas realizações.

Mais um dos objetivos cumpridos e devo a você!!

"O que importa não é o que temos na vida,
e sim quem temos na vida ao nosso lado".

Graças a Deus eu tenho você!!

Te Amo Muito!

Aos pais ***Beatriz*** *e* ***Rui Paulo*** *(in memorian):*

Mãe,

Como eu sempre te digo, você é o meu espelho. Porque você é uma mulher vencedora, corajosa, batalhadora e forte. Sempre sabe de seus objetivos e dos caminhos para alcançá-los.

Seus exemplos de vida me tornaram uma mulher com suas características.

Só tenho a agradecer muito por isso!! Os seus exemplos fizeram com que eu conseguisse alcançar meus sonhos, meus objetivos e mais esta vitória da minha carreira. Além disso, sempre pude contar com seu apoio, compreensão e muito incentivo.

VALEU MÃE, VOCÊ É UMA MÃE MUITO ESPECIAL!!

TENHO MUITO ORGULHO DE VOCÊ!!

OBRIGADA POR TUDO HOJE E SEMPRE!!

Amo muito você!

Pai,

Eu sei que você está sempre ao meu lado, guiando o meu caminho, abrindo minhas portas, me colocando ao lado das pessoas certas nas horas certas, me protegendo, me dando inspiração e coragem para eu seguir o meu destino da melhor forma possível.

Eu sei que não segui a sua profissão de dentista e docente ao acaso. Você deixou muitas saudades, mas também deixou muitos exemplos que estou podendo descobrir através de pessoas que foram seus amigos e colegas.

Eu sou uma filha muito orgulhosa do pai que tive.

Amo muito você!

*A **Deus**,*

Pela vida,
Por ter me dado um marido maravilhoso, compreensivo, companheiro e amigo,
Por ter me dado saúde, disposição e coragem,
Por ter me protegido nas minhas idas e vindas,
Por ter me iluminado e me dado inspiração,
Por abrir minhas portas e permitir que eu atingisse meus objetivos e sonhos,
Por ter me dado a oportunidade de conhecer e trabalhar com pessoas incríveis.

"Deus está sempre à nossa volta, nas coisas que nem imaginamos...."

Agradecimentos Especiais

À minha orientadora Professora Doutora ***Maria José Hitomi Nagata****,*

Querida e Admirada Professora,

Não é qualquer pessoa que tem o dom de ser professor e orientador.
Não é qualquer professor que tem o dom de inspirar o aluno a seguir seu caminho, buscar conhecimento, crescer profissionalmente e pessoalmente.
Tenho orgulho de ser sua aluna porque você é uma dessas pessoas e uma dessas professoras.

Seu grande conhecimento e sabedoria, sua responsabilidade com o ensino, sua organização, suas iniciativas, sua amizade, sua compreensão e sua grande competência em ensinar e aprender são exemplos brilhantes da pessoa especial e maravilhosa que você é!!

Sempre temos um professor que seguimos como exemplo e você é um deles.
Aprendi muito nestes anos de convivência e vou seguir sempre seus valiosos ensinamentos!! Na verdade quero ser sua eterna aluna!!
Muito obrigada pela confiança, incentivo, amizade, ensinamentos valiosos e compreensão!!

Vou ser eternamente grata!

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba - UNESP, nas pessoas do seu Diretor ***Professor Doutor Pedro Felício Estrada Bernabé*** *e Vice-Diretora* ***Professora Doutora Ana Maria Pires Soubhia,***
Pela realização deste curso e desta pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, na pessoa de seu Coordenador, o ***Professor Doutor Idelmo Rangel Garcia Júnior****,*
Por viabilizar, com sucesso, a realização deste trabalho.

Ao ***Professor Doutor*** *da Disciplina de Periodontia,* ***Alvaro Francisco Bosco****,*
QUERIDO e ADMIRADO professor: o senhor é o responsável por minha formação na prática clínica da periodontia. Tudo que eu sei hoje sobre como atender, diagnosticar tratar e operar pacientes eu aprendi com o senhor. Tenho muito orgulho de ter tido o senhor como meu professor, pois eu o considero um dos maiores periodontistas do Brasil. Sempre com muito carinho, paciência, competência e vontade durante as clínicas de pós-graduação foi transmitindo seus brilhantes conhecimentos clínicos e científicos. O senhor abriu meus olhos para eu enxergar uma periodontia diferente. Uma periodontia com indicações, contra-indicações e previsibilidades verdadeiras. Uma periodontia com responsabilidade. Muito obrigada por seus valiosos ensinamentos, pela amizade, humildade, carinho, paciência, confiança, convivência e pela competência em transmitir seus conhecimentos de maneira simples e clara que contribuíram infinitamente para o meu aprendizado profissional e pessoal.

Ao ***Professor Doutor*** *da Disciplina de Periodontia,* ***Valdir Gouveia Garcia****,*
QUERIDO e ADMIRADO professor: eu o considero dentro de sua humildade, competência, conhecimento e experiência de vida um exemplo de homem e um exemplo de professor. Sempre com muito carinho e com palavras sábias tem o dom de estimular e inspirar seus alunos a seguir um caminho brilhante cumprindo suas obrigações e seus objetivos sem medo. Sua energia, seu abraço carinhoso, sua preocupação com o andamento do curso e do tempo, sua habilidade administrativa, sua brilhante competência e o seu jeito de ser e agir em diferentes situações ficaram marcados em minha memória.
Como eu já disse uma vez ao senhor o nosso laço não acaba aqui. Eu sempre terei o senhor, o professor Alvaro e a professora Maria José como meus eternos professores. Vocês são minha referência, meu porto seguro. Vocês são os responsáveis por minha formação profissional, cada um contribuindo de uma forma diferente, especial e inesquecível.
Vou tê-los sempre nos meus pensamentos, no meu coração e na minha memória.
VOCÊS SÃO GRANDES E ADMIRÁVEIS PROFESSORES!!

Ao ***Professor Doutor Tetuo Okamoto****,*
Pelo carinho, disponibilidade e atenção. Por sua grande ajuda, pelos ensinamentos imprescindíveis e pelas dúvidas sanadas durante a realização da análise histológica deste trabalho.

À ***Professora Doutora Maria Lúcia Marçal Mazza Sundefeld****,*
Pelo auxílio e tempo dispensado para a realização da analise estatística deste trabalho.

À ***Professora Doutora Suely Regina Mogami Bomfim*** *do Laboratório Clínico Veterinário da Faculdade de Medicina Vetrinária da UNESP,*
Responsável pelas análises clínicas das amostras de sangue dos animais usados neste experimento. Obrigada pela dedicação, tranqüilidade e grande paciência demonstrada durante a realização deste difícil trabalho. A sua assistência durante os experimentos foram fundamentais para realização desta tese.

Ao ***Dr. Stephen E. Fucini*** *pelo esforço e contribuição em conseguir, juntamente com a professora Maria José, o patrocínio desta pesquisa com a BIOMET* ***3i****, Inc. Pela disponibilidade em sempre ajudar na escrita dos artigos científicos realizados durante o curso.*

À querida amiga ***Flávia Aparecida Chaves Furlaneto****,*
Companheira de Mestrado, Doutorado e moradia em todas as horas. Você é uma grande e verdadeira amiga. Uma amiga que eu pude e poderei sempre contar independente do tempo e da distância. Isto é a verdadeira amizade. Você é uma amiga especial que me apoiou, me ajudou, me fez dar risadas e me fez chorar. Compartilhamos momentos muito importantes de nossas vidas juntas. Conquistamos juntas etapas fundamentais. Eu sou muito feliz por ter tido você ao meu lado nestes momentos. Quero agradecer por sua amizade, por sua companhia, por suas sábias e verdadeiras palavras e pelos ensinamentos profissionais e pessoais.
Obrigada por tudo!
"Sempre é bom saber que temos amigos em quem confiar e que saibam que também podem contar conosco. Afinal são os amigos que tornam o nosso caminho mais feliz".

Ao querido amigo ***Michel Reis Messora****,*
Por ajudar a esclarecer muitas dúvidas, por indicar os caminhos a serem percorridos e por ensinar detalhes fundamentais para que esta pesquisa pudesse ser realizada. Muito obrigada pelas risadas, pelos valiosos ensinamentos, pela convivência agradável, pela companhia e pela amizade! Você é um grande amigo e mora em meu coração.

Ao amigo ***Alex Semenoff Segundo****,*
Pela valiosa amizade, companheirismo, ensinamentos, trabalhos realizados em conjunto e adorável convivência durante o curso de Doutorado.

Aos colegas de mestrado e doutorado **Luiz Gustavo, Danielle, Samara, Juliano, Valmir, Sérgio, Thiago, Luciana e Leandro**.
O aprendizado em equipe e o respeito entre seus participantes são muito importantes. Quero agradecer a cada um de vocês pela amizade, pelo companheirismo, pelos ensinamentos e pelo carinho.

À amiga **Larissa Juhas Jorge**,
Amiga de moradia, na verdade uma irmãzinha mais nova que eu e a Flávia tivemos que cuidar e orientar. Um amiga especial, carinhosa, divertida, risonha que fez com que o clima de nossa casa ficasse alegre e descontraído.
La, obrigada por tudo. Te adoro!!

Aos funcionários do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada, **Odair, Bernadete, Cleide, Dirce e Gilmar**,
Pela disponibilidade em sempre ajudar no que fosse preciso.
Agradecimentos especiais à **Dirce** *e* **Bernadete**, *pela perseverança, competência e destreza em todo o processamento laboratorial deste trabalho.*
Agradecimento mais que especial ao **ODAIR**, *um funcionário extremamente dedicado, que ama o seu trabalho e por isso sempre nos ajuda com muito prazer, com muita alegria e com muita competência. Obrigada por participar e ser um dos responsáveis do sucesso do procedimento experimental. Sem você, não seria possível realizar o trabalho com os cães. Vou ser eternamente grata a você por tudo e, principalmente, pela grande amizade, carinho e dedicação que sempre teve para comigo no Mestrado e Doutorado.*

Aos funcionários do Biotério da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – UNESP, **Camilo, José Lúcio e João Batista**,
Pela valiosa ajuda para a realização dos procedimentos cirúrgicos e cuidados pré e pós-operatórios dos animais e pela disponibilidade dispensada durante toda pesquisa. Pelos momentos alegres, pelas risadas, pelo cafezinho, pela amizade, pela convivência agradável e pelos ensinamentos a mim transmitidos.

Às funcionárias da Seção de Pós-Graduação **Marina, Valéria** *e* **Diogo**,
Pela competência, pela atenção dispensada, pela simpatia e pronto atendimento em todos os momentos necessários.

Aos funcionários da Biblioteca **Izamar, Cláudio Matsumoto, Maria Cláudia, Ana Cláudia, Ivone, Luzia, Cláudio Maciel Júnior, Fernando e Ana Paula,**
Pela alegria diária, pela disposição, pela paciência, pelo carinho, pela atenção e pela grande ajuda.

À minha auxiliar de consultório **Luciana da Silva**,
Pela dedicação, pela responsabilidade e competência. Obrigado por ser meu "braço direito" em Curitiba.

*À **Vera** e **Rute**,*
Pela valiosa ajuda prestada a mim, à minha família e às minhas casas.

*Ao amigo, colega e professor **Tertuliano Ricardo Lopes**,*
Agradeço do fundo do meu coração pela confiança depositada em mim e por abrir minhas portas profissionais no Centro Universitário Positivo – UNICENP permitindo que eu faça parte da equipe de PERIODONTIA desta grande Universidade. Deus coloca pessoas maravilhosas e certas em nosso caminho. Você foi uma dessas pessoas!! Vou ser eternamente grata!! Obrigada!!

*Às minhas colegas, professoras e amigas de trabalho do UNICENP **Carmen L. Mueller Storrer e Andréa Maria Sousa**, pela adorável convivência e trabalho em equipe. Nós juntos (Andréa, Carmen, Tatiana e Tertuliano) conquistaremos nossos objetivos porque somos uma verdadeira equipe de periodontia. O trabalho em equipe é fundamental!!*

A MINHA SINCERA GRATIDÃO.....

Às pessoas especiais que moram em meu coração:

*Ao meu amado avô **Ruy**,*
Um grande homem, um grande médico e um grande pesquisador que dedicou sua vida à Hansenítase. Um homem além de seu tempo. Uma referência na medicina nacional e internacional. Um exemplo de vida, competência, conhecimento e sabedoria. Com seus 94 anos ainda trabalha, pesquisa, escreve e ensina. Um avô carinhoso e atencioso, sempre dizendo suas sábias palavras nos momentos que mais precisamos, sempre vibrando com minhas vitórias e conquistas. Muito Obrigada por ser meu avô!!

*À minha amada avó **Hespéria** (in memorian),*
Você estava ao meu lado quando iniciei o curso de doutorado e infelizmente não está mais presente fisicamente. Porém, espiritualmente eu sei que continua perto de mim. Agradeço pela força, pela inspiração e por junto com meu pai abrir as portas do meu caminho profissional. Você sempre acreditou em mim, sabiam quais eram meus sonhos e objetivos e falava que eu conseguiria atingi-los. E hoje aqui estou. Muito obrigada pelo incentivo que sempre me deu e pelo carinho que sempre teve por mim!

*À minha amada avó **Hilária**,*
Uma grande mulher e uma grande professora. É na família que buscamos exemplos para seguir nossos objetivos e graças a Deus eu tenho uma família que só me ofereceu bons exemplos. Muito Obrigada pelo grande carinho, pelas orações valiosas que contribuíram para esta vitória. Pelo apoio, presença e felicidade nas etapas por mim cumpridas.

Aos meus avós **Neuza e Joacyr**,
Avós por parte do meu marido, porém verdadeiros avós mesmo antes do meu casamento. Avós amados, companheiros, que moram em meu coração. Muito obrigada pelo grande carinho, pela agradável companhia, pelas risadas, pelo convívio, pelos almoços e jantares juntos. Enfim, por tudo que contribuiu para esta vitória. Porque vocês fazem parte dela. AMO VOCÊS!!

À tia **Nena**,
Pela proteção, pelo carinho, por minha formação, por cuidar de mim fazendo as vezes de minha avó. Pela felicidade por minhas vitórias e por estar sempre ao meu lado.

Ao **Palmquist**,
Pelo carinho paterno, apoio e adorável convivência em família.

À minha sogra **Ana**,
Pelo apoio e incentivo em todos os momentos e pelo carinho que sempre teve por mim. Ainda, pelo dom da arte, representado no belo desenho que está ilustrando este trabalho. Na verdade de sogra você não tem nada. Pode ser considerada uma grande amiga e uma segunda mãe, que eu sei que sempre poderei contar. Muito obrigada por tudo e por ser esta pessoa maravilhosa!

Ao meu sogro **José**,
Pelo exemplo de pessoa digna e correta. Pelo carinho e apoio.

Aos meus cunhados e irmãos de coração, **Alexandre e Frederico**,
Pelos momentos alegres, pelas risadas, pelos abraços carinhosos e pela adorável convivência. Conheço vocês desde pequenos e vocês realmente são os irmãos que eu não tive. Contem sempre comigo, assim como eu sempre contarei com vocês. Lequinho e Fredinho, AMO VOCÊS DE CORAÇÃO!

Epígrafe

"Ser feliz, ter objetivos, ter sonhos, ter fé e sempre pensar positivo é o caminho mais rápido para alcançar o que você deseja".

(Tatiana Miranda Deliberador)

Resumo

DELIBERADOR, T.M. Associação do plasma rico em plaquetas, novo vidro bioativo e sulfato de cálcio no tratamento de defeitos de furca Classe II: estudo histológico e histométrico em cães. Tese (Doutorado em Periodontia) - Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2007.

O objetivo do presente estudo foi avaliar, histologicamente, o processo de cicatrização de defeitos de furca Classe II, criados cirurgicamente e tratados com a associação do Plasma Rico em Plaquetas (PRP), partículas esféricas de Novo Vidro Bioativo (NVB) e Sulfato de Cálcio (SC). Os segundos e quartos pré-molares mandibulares de 8 cães foram usados neste estudo. Defeitos de furca Classe II (5 mm de altura x 2 mm de profundidade) foram criados cirurgicamente e imediatamente tratados. Usando o modelo de boca dividida, os dentes foram aleatoriamente divididos em 2 grupos: Grupo C (controle): o defeito foi preenchido somente com coágulo sanguíneo e Grupo T (teste): o defeito foi preenchido com a associação de PRP, NVB e SC. Os retalhos foram reposicionados para cobrir totalmente os defeitos. A eutanásia dos animais foi realizada aos 90 dias pós-operatórios. Foram obtidos cortes histológicos seriados mésio-distais, corados com Hematoxilina e Eosina. Foram realizadas análises histométrica, usando um software analisador de imagens, e histológica. Foram avaliadas medidas lineares e de área da cicatrização periodontal, calculadas como porcentagem do defeito original. Os dados percentuais foram transformados em arcoseno para análise estatística (análise de variância, $p < 0,05$). A regeneração óssea e de tecido conjuntivo nos defeitos de furca foi incompleta na maioria dos espécimes. O Grupo C apresentou quantidade de neoformação óssea e regeneração periodontal significativamente maior que o Grupo T. Quantidade considerável de partículas remanescentes de NVB foi observada na maioria dos espécimes do Grupo T. Dentro dos limites do presente estudo, pode-se concluir que a associação do PRP, NVB e SC não foi mais efetiva que o debridamento cirúrgico somente no tratamento de defeitos de furca Classe II.

Palavras-chave: Defeitos da Furca; Sulfato de Cálcio; Vidro; Plasma Rico em Plaquetas; Modelos Animais.

Abstract

DELIBERADOR, T. M. Combination of platelet-rich plasma, new bioactive glass and calcium sulfate in the treatment of Class II furcation defects: a histologic and histometric study in dogs. Thesis (Periodontics) - Dental School of Araçatuba, São Paulo State University - UNESP, Araçatuba, 2007.

The purpose of this study was to histologically evaluate the healing of surgically created Class II furcation defects treated using a combination of platelet-rich plasma (PRP), new spherical bioactive glass (NBG) particles and calcium sulfate (CS). The second and fourth mandibular premolars of eight mongrel dogs were used in this study. Class II furcation defects (5 mm in height x 2 mm in depth) were surgically created and immediately treated. Using a split-mouth design, teeth were randomly divided into two groups: group C (control) - defect filled with blood clot only; and group T (test) - defect filled with a combination of PRP, NBG and CS. Flaps were repositioned to cover all defects. The animals were euthanized 90 days post-surgery. Mesio-distal serial sections were obtained and stained with either hematoxylin and eosin. Histometric, using image-analysis software, and histologic analyses were performed. Linear and area measurements of periodontal healing were evaluated and calculated as a percentage of the original defect. Percentage data were transformed into arccosine for statistical analysis (analysis of variance; $P<0.05$). Regeneration of bone and connective tissue in the furcation defects was incomplete in most of the specimens. Group C had significantly more bone formation and periodontal regeneration than group T. A considerable amount of remaining NBG particles was observed in most specimens of group T. Within the limits of this study, it can be concluded that the combination of PRP, NBG and CS was not more effective than the surgical debridement alone in the treatment of Class II furcation defects.

Key words: Furcation Defects; Calcium Sulfate; Glass; Platelet-Rich Plasma; Models, Animal.

Lista de Figuras

Figura 1 - Ilustração esquemática representando as medidas histométricas realizadas na área de furca. Medidas de área (descritas no texto) são as seguintes: AO, AOT, AV e ANVBR (AT= AO + AOT + AV + ANVBR). Medidas lineares (descritas no texto) são as seguintes: LFC, LTC, LME, LSL, LA (LET = LFC + LTC + LME + LSL + LA) e LRP. LP = ligamento periodontal; M = marcação radicular; C = cemento. 57

Figura 2A - Grupo C. Visão panorâmica da área da furca, com novo osso (NO) e novo tecido conjuntivo (NTC) no terço médio do defeito de furca (H&E, aumento original 16x). 57

Figura 2B - Grupo C. Visão panorâmica da área da furca, com novo osso (NO) e novo tecido conjuntivo (NTC) estendendo-se até parte do teto da furca (H&E, aumento original 16x). 57

Figura 3A - Grupo T. Visão panorâmica da área da furca, com novo osso (NO) e novo tecido conjuntivo (NTC) estendendo-se até parte do teto da furca (H&E, aumento original 16x). NVB = novo vidro bioativo. 58

Figura 3B - Grupo T. Visão panorâmica da área da furca, com partículas remanescentes de NVB e fechamento ósseo completo do defeito de furca (H&E, aumento original 16x). NO = novo osso. 58

Figura 4A - Grupo T. Novo osso (NO) circundando a partícula de NVB (H&E, aumento original 160x). 58

Figura 4B - Grupo T. Novo osso (NO) dentro da partícula de NVB (H&E, aumento original 160x). 58

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Valores Percentuais Médios e Desvios-Padrão das Medidas Lineares, com Comparação Entre os Grupos. 56

Tabela 2 - Valores Percentuais Médios e Desvios-Padrão das Medidas de Área, com Comparação Entre os Grupos. 56

Lista de Anexos

Anexo A -	Parecer da Comissão de Ética na Experimentação Animal	60
Anexo B -	Normas para Publicação segundo o Periódico - "Journal of Periodontology"	62

Lista de Abreviaturas e Siglas

ACD-A	=	Ácido Citrato Dextrose-A
µl	=	Microlitro
µm	=	Micrometro
ANOVA	=	Análise de Variância
ANVBR	=	Área Novo Vidro Bioativo Remanescente
AO	=	Área Óssea
AOT	=	Área de Outros Tecidos
ASCR	=	Área de Sulfato de Cálcio Remanescente
AT	=	Área Total
AV	=	Área Vazia
C	=	Controle
CEEA	=	Comissão de Ética na Experimentação Animal
DFDBA	=	Aloenxerto Ósseo Desmineralizado Seco e Congelado (Decalcified Freeze-Dried Bone Allografts)
Dp	=	Desvio-padrão
Fig	=	Figura
g	=	Gramas
HE	=	Hematoxilina e Eosina
IM	=	Intramuscular
IV	=	Intravenoso
kg	=	Quilograma
LA	=	Medida Linear de Anquilose
LET	=	Extensão Radicular Total do Defeito
LFC	=	Medida Linear de Formação Cementária

LME	=	Medida Linear de Migração Epitelial
LPB	=	Medida Linear de Placa Bacteriana
LRP	=	Medida Linear de Regeneração Periodontal
LSL	=	Medida Linear de Superfície Livre
LTC	=	Medida Linear de Tecido Conjuntivo
mg	=	Miligrama
ml	=	Mililitro
mm	=	Milímetro
mm^2	=	Milímetro quadrado
NVB	=	Novo Vidro Bioativo
P2	=	2º Pré-Molar
P4	=	4º Pré-Molar
PCCS II	=	Platelet Concentrate Collection System
PDGF	=	Fator de Crescimento derivado das plaquetas
PRP	=	Plasma Rico em Plaquetas
rpm	=	Rotações por minuto
RTG	=	Regeneração Tecidual Guiada
SC	=	Sulfato de Cálcio
T	=	Teste
TGF-β	=	Fator de Crescimento Transformador-β
VB	=	Vidro Bioativo

Lista de Símbolos

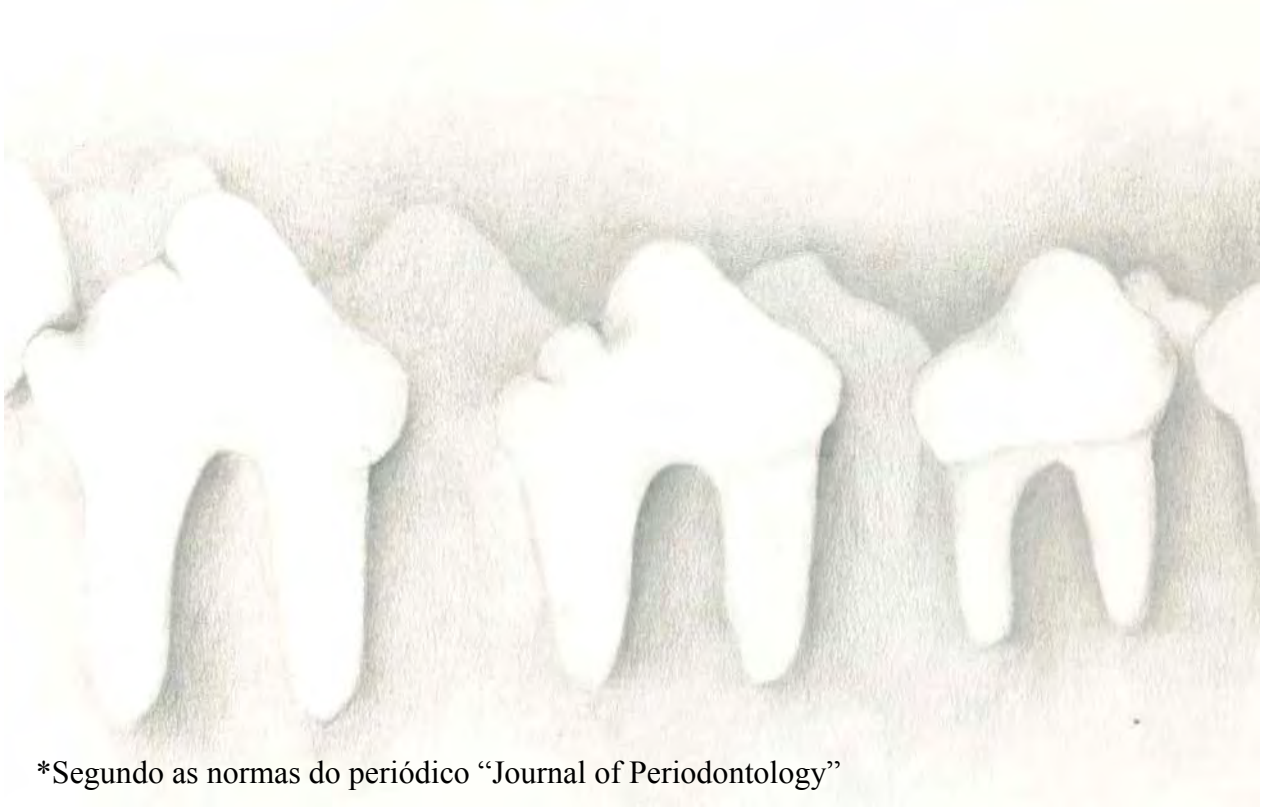
%	=	Por cento
<	=	Menor
>	=	Maior
F	=	Valor do teste da análise de variância
N	=	Tamanho da amostra
n^o	=	Número
ºC	=	Graus Celsius
P	=	Probabilidade do valor do teste
x	=	Vezes
β	=	Beta

Sumário

Manuscrito para Publicação 30

Anexos 59

*Manuscrito para Publicação**



*Segundo as normas do periódico “Journal of Periodontology”

Associação do Plasma Rico em Plaquetas, Novo Vidro Bioativo e Sulfato de Cálcio no Tratamento de Defeitos de Furca Classe II: Estudo Histológico e Histométrico em Cães

TATIANA M. DELIBERADOR, DDS, MS*

MARIA J. H. NAGATA, DDS, PhD*

* *Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada, Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba, Universidade Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP, Brasil.*

Autora responsável pela correspondência:

Maria J. H. Nagata

Telefone: +55 18 3636 3271

Fax: +55 18 3636-3332

Rua José Bonifácio, 1193

CEP: 16015 - 050 Araçatuba, SP, Brasil

e-mail: mjnagata@foa.unesp.br (Endereço eletrônico pode ser publicado)

Fonte de apoio: Estudo totalmente patrocinado pela empresa BIOMET ***3i***, Inc.

Número de Palavras: 4870

Número de Figuras: 4

Número de Tabelas: 2

Título Resumido: Defeitos de furca com PRP/vidro bioativo/sulfato de cálcio

Achados-Chaves do Estudo: A associação do PRP, NVB e SC não foi mais efetiva que o debridamento cirúrgico somente no tratamento de defeitos de furca Classe II cirurgicamente criados em cães.

RESUMO

Objetivos: O objetivo do presente estudo foi avaliar, histologicamente, o processo de cicatrização de defeitos de furca Classe II, criados cirurgicamente e tratados com a associação do Plasma Rico em Plaquetas (PRP), partículas esféricas de Novo Vidro Bioativo (NVB) e Sulfato de Cálcio (SC).

Métodos: Os segundos e quartos pré-molares mandibulares de 8 cães foram usados neste estudo. Defeitos de furca Classe II (5 mm de altura x 2 mm de profundidade) foram criados cirurgicamente e imediatamente tratados. Usando o modelo de boca dividida, os dentes foram aleatoriamnete divididos em 2 grupos: grupo C (controle): o defeito foi preenchido somente com coágulo sanguíneo e grupo T (teste): o defeito foi preenchido com a associação de PRP, NVB e SC. Os retalhos foram reposicionados para cobrir totalmente os defeitos. A eutanásia dos animais foi realizada aos 90 dias pós-operatórios. Foram obtidos cortes histológicos seriados mésio-distais, corados com Hematoxilina e Eosina. Foram realizadas análises histométrica, usando um software analisador de imagens, e histológica. Foram avaliadas medidas lineares e de área da cicatrização periodontal, calculadas como porcentagem do defeito original. Os dados percentuais foram transformados em arcoseno para análise estatística (análise de variância, $p < 0,05$).

Resultados: A regeneração óssea e de tecido conjuntivo nos defeitos de furca foi incompleta na maioria dos espécimes. O Grupo C apresentou quantidade de neoformação óssea e regeneração periodontal significativamente maior que o Grupo T. Quantidade considerável de partículas remanescentes de NVB foi observada na maioria dos espécimes do grupo T.

Conclusões: A associação do PRP, NVB e SC não foi mais efetiva que o debridamento cirúrgico somente no tratamento de defeitos de furca Classe II.

PALAVRAS-CHAVE: Defeitos da furca; sulfato de cálcio; vidro bioativo 45S5; substitutos ósseos; plasma rico em plaquetas; modelos animais.

INTRODUÇÃO

O objetivo ideal da terapia periodontal não é somente impedir a progressão da doença, mas também obter a regeneração previsível dos tecidos periodontais de suporte previamente perdidos pela doença periodontal. Embora a regeneração das lesões de furca Classe II seja possível com vários tipos de terapias, esta não é totalmente previsível, principalmente em relação ao completo preenchimento ósseo.[1] Numerosas técnicas cirúrgicas têm sido testadas com o objetivo de alcançar a regeneração dos defeitos de furca. O uso de enxertos e substitutos ósseos, Regeneração Tecidual Guiada (RTG) e a aplicação de fatores de crescimento na ferida cirúrgica são algumas das técnicas comumente usadas para promover a regeneração periodontal.[2] Entre os fatores de crescimento, destacam-se o Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas (PDGF) e o Fator de Crescimento Transformador-β (TGF-β). Estudos clínicos e em animais concluíram que a ação destes fatores pode intensificar significativamente a regeneração dos tecidos periodontais.[3-5] Marx et al.[6] propuseram o uso do plasma rico em plaquetas (PRP) autólogo como uma técnica economicamente viável para obter-se uma alta concentração de fatores de crescimento, especificamente PDGF e TGF-β. A racionalidade para o uso local do PRP está, sobretudo, no aumento do nível de fatores de crescimento no sítio da ferida após a degranulação das plaquetas.

A combinação de uma ou mais técnicas, atualmente disponíveis, para alcançar a regeneração periodontal, tem o potencial de melhorar os resultados clínicos quando comparada a qualquer técnica usada sozinha.[7-10] Estudos clínicos que avaliaram os efeitos da terapia combinada empregando PRP e enxertos ósseos associados ou não à RTG no tratamento de defeitos de furca Classe II[7] e de defeitos infra-ósseos[8-10] concluíram que a combinação das técnicas foi uma modalidade efetiva de tratamento desses defeitos, com melhora dos resultados clínicos. Contudo, outros estudos clínicos não constataram benefícios adicionais do uso do PRP

quando este foi associado ao fosfato tricálcio e RTG,[11] ao osso bovino mineralizado inorgânico e RTG[12] e ao vidro bioativo (VB)[13] no tratamento de defeitos infra-ósseos.

Vários tipos de materiais aloplásticos têm sido usados no tratamento de defeitos periodontais. Além de serem osteocondutivas,[14,15] as partículas de VB têm demonstrado efeito osteoestimulatório.[14,16] Estudos clínicos mostraram um efeito benéfico do uso do VB no tratamento de defeitos periodontais infra-ósseos.[17-19] Contudo, outro estudo não observou diferenças significativas com o uso deste material quando comparado a debridamento somente.[20] Os poucos estudos clínicos realizados para avaliar o efeito do VB no tratamento de defeitos de furca Classe II apresentaram resultados favoráveis.[17,21,22] Resultados satisfatórios com o uso do VB no tratamento de defeitos ósseos periodontais e defeitos de furca também foram observados em estudos histológicos. Foram relatadas maior neoformação óssea e de cemento, bem como inibição do crescimento do epitélio juncional quando o VB foi usado.[23,24]

Várias modificações têm sido testadas para acelerar as reações das partículas de VB.[25,26] Um novo VB (NVB; Biogran II®) foi desenvolvido e, atualmente, está disponível somente para uso experimental. Quando as formas granular e esféricas do Biogran II® foram usadas para preencher defeitos de tamanho crítico ao redor de implantes em tíbias de coelhos, o volume total de osso bem como o desenvolvimento de novo osso dentro das partículas foi maior quando comparado a outros estudos onde o Biogran® foi usado.[27]

O sulfato de cálcio (SC) é outro material aloplástico, osteocondutivo, totalmente absorvível e biocompatível.[28] Além disso, é muito versátil, podendo ser usado como agente carreador de medicamentos, material de implante associado ou não a enxertos ósseos e barreira na técnica da RTG.[29] Resultados satisfatórios foram observados quando o SC foi usado como material de implante no tratamento de defeitos periodontais infra-ósseos em humanos[30] e em animais.[31] O SC agiu como um preenchedor de espaço, prevenindo a migração de tecido

epitelial e possibilitou a regeneração de novo cemento e novo osso.[31] O uso combinado do SC a outros materiais sintéticos, a enxertos ósseos ou PRP, ao redor de implantes de titânio ou no tratamento de defeitos periodontais e ósseos, também tem sido avaliado em estudos clínicos[32-34] e animais,[35,34] com resultados satisfatórios.

A combinação das técnicas regenerativas tem o potencial de melhorar os resultados clínicos no tratamento de defeitos de furca. Tem sido mostrado que o PRP, VB e SC são promissores no tratamento de defeitos periodontais e o NVB parece apresentar qualidades superiores ao VB na formação óssea. O objetivo do presente estudo foi avaliar, histologicamente, o processo de cicatrização de defeitos de furca Classe II, criados cirurgicamente e tratados com a associação do PRP, NVB e SC.

MATERIAL E MÉTODO

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP. Todas as diretrizes relativas aos cuidados com a pesquisa animal foram estritamente seguidas. Para o presente estudo, foram utilizados oito cães adultos, machos, de raça indefinida, com peso entre 15 a 20 Kg (Biotério da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – UNESP). Todos os animais apresentavam-se em bom estado de saúde geral. No exame intra-oral, que incluiu radiografias e sondagem periodontal, constatou-se ausência de perda óssea e de sinais clínicos de doença periodontal destrutiva.

Os dentes utilizados para criar os defeitos de furca Classe II foram os 2os e 4os pré-molares (P2 e P4) mandibulares direitos e esquerdos de cada cão. Usando o modelo de boca dividida e seguindo uma randomização bloqueada, os dentes foram distribuídos em dois grupos: grupo C (controle) – o defeito foi preenchido somente com coágulo sanguíneo e grupo T (teste) – o

defeito foi preenchido com a associação de plasma rico em plaquetas (PRP), partículas esféricas de novo vidro bioativo (NVB)[†] e sulfato de cálcio (SC)[‡].

Para todos os procedimentos experimentais, os animais receberam como medicação pré-anestésica o sulfato de atropina[§] (0,04 mg/kg de peso corporal - IM) e foram anestesiados com xilazina[‖] (1 mg/Kg de peso corporal- IM) e cloridrato de tiletamina associado a cloridrato de zolazepam[¶] (50 mg/kg de peso corporal - IM).

Uma semana antes da realização dos procedimentos cirúrgicos, raspagem supragengival e subgengival foi realizada com curetas Gracey e instrumentos ultrassônicos em todos os dentes, seguida de polimento dental. O controle de placa bacteriana foi mantido pela aplicação tópica diária de solução de digluconato de clorexidina a 0,2%.

Procedimentos Cirúrgicos

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados pelo mesmo operador. A área a ser operada recebeu anestesia local infiltrativa com mepivacaína a 2%, contendo epinefrina (1:100.000) para reduzir o sangramento. Incisões intrasulculares foram realizadas da mesial do canino à distal do 2º molar e um retalho mucoperiosteal foi levantado para expor as tábuas ósseas vestibular e lingual. Defeitos de furca Classe II, com 5 mm de altura e 2 mm de profundidade, foram cirurgicamente criados na superfície vestibular dos dentes P2 e P4.[36] Os defeitos foram criados usando brocas esféricas carbide nº 4 acopladas em contra-ângulo de baixa rotação sob contínua irrigação com soro fisiológico e microcinzéis de Ochsenbein nº 1 e 2. As dimensões dos defeitos foram verificadas com sonda periodontal milimetrada[#]. As superfícies radiculares foram cuidadosamente raspadas e alisadas com instrumentos rotatórios

[†] Biogran II®, BIOMET ***3i***, Inc., Palm Beach Gardens, FL, EUA.
[‡] Calcigen™ Oral, BIOMET ***3i***, Inc., Palm Beach Gardens, FL, EUA.
[§] Atropion®, Ariston Industrias Químicas e Farmacêuticas Ltda, São Paulo, SP, Brasil.
[‖] Coopazine®, Coopers Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil.
[¶] Zoletil 50, Virbac, São Paulo, SP, Brasil.
[#] Sonda PCPUNC15BR, Hu-Friedy do Brasil, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

e curetas para remover todo o cemento. Em seguida, usando uma broca esférica carbide nº ½, foram feitas marcações nas raízes mesial e distal, na altura da crista óssea cirurgicamente criada, para auxiliar na delimitação do defeito durante as análises histológica e histométrica.

No grupo C, os defeitos de furca foram preenchidos somente com coágulo sanguíneo. No grupo T, os defeitos foram preenchidos com a associação de PRP (0,133 ml), NVB (0,1875g) e SC (0,1875g). Os retalhos foram posicionados coronalmente e suturados. Nas áreas interproximais, foram realizadas suturas colchoeiro vertical modificada e simples. Além disso, suturas colchoeiro horizontal, cada uma envolvendo a base de ambos os retalhos vestibular e lingual, foram colocadas circunferencialmente ao redor de cada dente para auxiliar na estabilização dos tecidos moles. Os animais receberam amoxicilina (33,3 mg/kg de peso corporal), via oral, de 12 em 12 horas, durante sete dias, com início duas horas antes do procedimento cirúrgico.

Procedimentos Pós-Cirúrgicos

Todos os animais receberam analgésico Ketorolac (0,15 mg/kg de peso corporal), via oral, de 12 em 12 horas, durante três dias. Eles foram alimentados com dieta macia até a eutanásia. O controle da placa bacteriana foi mantido durante todo o período experimental com aplicação tópica de digluconato de clorexidina a 0,2%, 5 vezes por semana. As suturas foram removidas aos 10 dias pós-operatórios. Uma semana após a remoção das suturas, os animais foram sedados com a associação de aceprozina a 0,2%[**] (0,1 mg/kg - IM) e cloridrato de quetamina[††] (6,66 mg/kg - IM) para a realização de profilaxia cuidadosa com instrumentos ultrassônicos e polimento dental. Este procedimento foi repetido semanalmente até o período da eutanásia. Em cada procedimento pós-operatório, as áreas cirúrgicas foram cuidadosamente examinadas para assegurar que os materiais implantados não foram expostos

[**] Acepran, Univet S. A. – Indústria Veterinária, São Paulo, SP, Brasil.
[††] Vetaset®, Fort Dodge Animal Health, Charles City, Iowa, EUA.

e subseqüentemente perdidos. A eutanásia dos animais foi realizada, por perfusão, 90 dias após a realização dos procedimentos cirúrgicos, sob sedação com xilazina[‡‡] (2 mg/kg de peso corporal - IM) e anestesia geral com Tiopental Sódico[§§] (12,5 mg/kg de peso corporal - IV).

Preparo do PRP e associação dos materiais

Quarenta ml de sangue foram coletados de cada animal, via punção da veia jugular, com auxílio de uma cânula adaptada a uma seringa contendo 5 ml do anticoagulante ácido citrato dextrose (ACD-A). O preparo do PRP foi feito de acordo com as instruções do fabricante para uso do sistema PCCS II[‖‖] . Cada amostra de sangue foi centrifugada a 3200 rpm por 12 minutos e 0,133 ml de PRP foram ativados com 0,00665 ml de solução de cloreto de cálcio a 10%[¶¶]. O pó do SC (0,1875g) e o NVB (0, 1875g) foram misturados e 0,1 ml do componente líquido do SC foi adicionado. A esta mistura foi acrescentado o PRP, em início de coagulação. Esta associação de materiais foi, então, imediatamente colocada no defeito cirúrgico.

Contagem de Plaquetas

O líquido de Brecher foi usado para lisar os eritrócitos e diluir as amostras de sangue periférico e de PRP. As plaquetas nas amostras diluídas foram, então, contadas manualmente em uma câmara de Neubauer. A contagem de plaquetas foi realizada por uma veterinária hematologista.

[‡‡] Coopazine®, Coopers Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil.
[§§] Thiopentax Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., Itaparica, SP, Brasil.
[‖‖] PCCS II™, BIOMET ***3i***, Inc., Palm Beach Gardens, FL, EUA.
[¶¶] Calcium Chloride 10% Solution, ScienceLab.com Inc., Houston, TX, EUA.

Processamento Tecidual (Procedimentos Laboratoriais)

Os blocos contendo um dente e os tecidos circunjacentes foram removidos e fixados em solução de formol neutro a 10%. Cada espécime (dente) foi descalcificado em solução de Morse (ácido fórmico a 50% e citrato de sódio a 20% na proporção de 1:1) e processado rotineiramente para inclusão em parafina.

Foram realizados cortes seriados com 6 μm de espessura, no plano mésio-distal, corados pela técnica da Hematoxilina e Eosina (HE) para análises histológica e histométrica em microscopia de luz.

Análises Histológica e Histométrica

Foram selecionados cinco cortes de cada dente, correspondendo ao primeiro e último cortes que evidenciavam, em ambas as raízes, as marcações feitas durante o procedimento cirúrgico, e aos três cortes intermediários eqüidistantes. Assim, foram obtidos cortes representativos das porções inicial (mais externa), intermediária e final (mais interna) dos defeitos de furca, no sentido vestíbulo-lingual.[37]

Na análise histológica descritiva, foram avaliados a presença ou ausência de reabsorção radicular e/ou anquilose dento-alveolar, a formação de tecido conjuntivo, novo cemento e novo osso, a orientação das fibras do ligamento periodontal, o grau de migração epitelial e de reação inflamatória dos tecidos, bem como a quantidade de material implantado remanescente. O fechamento ósseo completo do defeito de furca foi considerado quando tecido ósseo neoformado foi visto por toda a extensão do defeito criado previamente em todos os 5 cortes histológicos.

Para a análise histométrica, as imagens dos 5 cortes histológicos selecionados foram capturadas com uma câmera digital[##] acoplada a um estereomicroscópio,[***] com aumento

[##] AxioCam MRc 5, Carl Zeiss Microlmaging GmbH, Göttingen, Germany.

original de 16x e transferidas para um computador. As medidas foram realizadas com o auxílio de um "software" analisador de imagens[†††]. Todas as medidas foram realizadas por um mesmo pesquisador, diferente daquele que fez as cirurgias. Este pesquisador foi submetido a um processo de calibração inicial rigoroso. Um segundo processo de calibração foi conduzido, onde as medidas foram realizadas 3 vezes em cada um dos cortes histológicos analisados. Uma média foi calculada com estes 3 valores. As medidas consideradas no presente estudo foram comparadas aos valores médios obtidos na segunda calibração usando Análise de Variância (ANOVA). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas (p = 0,9220). Isto confirma que o pesquisador estava bem calibrado. Portanto, não houve um erro significativo nas medidas usadas no presente estudo.

As seguintes medidas lineares e de área foram avaliadas na análise histométrica (Fig. 1):

1. **MEDIDAS LINEARES: 1a) Extensão Radicular Total do Defeito (LET):** extensão linear da superfície radicular do defeito que se estende do limite apical de uma marcação radicular até o limite apical da outra; **1b) Formação Cementária (LFC):** soma das extensões lineares da superfície radicular do defeito recobertas por novo cemento; **1c) Tecido Conjuntivo (LTC):** soma das extensões lineares da superfície radicular do defeito em contato direto com o tecido conjuntivo; **1d) Migração Epitelial (LME):** soma das extensões lineares da superfície radicular do defeito cobertas por tecido epitelial; **1e) Anquilose (LA):** soma das extensões lineares da superfície radicular do defeito em contato direto com o tecido ósseo; **1f) Superfície Livre (LSL):** soma das extensões lineares da superfície radicular do defeito não ocupadas por qualquer tipo de tecido ou placa bacteriana; **1g) Regeneração Periodontal (LRP):** soma das extensões lineares da superfície radicular do defeito recobertas por novo cemento adjacente a novo osso; **1h) Placa Bacteriana (LPB):** soma das extensões lineares da superfície radicular do defeito cobertas com placa bacteriana.

[***] STEMI 2000-C, Carl Zeiss Microlmaging GmbH, Göttingen, Germany.
[†††] Jandel Corporation®, Version 2.0, San Rafael, CA, EUA.

2. MEDIDAS DE ÁREA: **2a) Área Total do Defeito (AT):** área da furca delimitada apicalmente por uma reta unindo o limite apical das duas marcações radiculares; **2b) Área de Tecido Ósseo (AO):** porção da área total do defeito preenchida por novo osso; **2c) Área de Outros Tecidos (AOT):** porção da área total do defeito preenchida por cemento e tecidos não mineralizados; **2d) Área de Região Vazia (AV):** porção da área total do defeito sem a presença de qualquer tipo de tecido ou placa bacteriana; **2e) Área de NVB remanescente (ANVBR):** porção da área total do defeito preenchida por partículas de NVB remanescente; **2f) Área de SC remanescente (ASCR):** porção da área total do defeito preenchida por SC remanescente.

Análise Estatística

A avaliação das variáveis para cada dente correspondeu a um valor médio calculado das medidas obtidas dos 5 cortes de cada dente. As medidas lineares (LFC, LTC, LME, LA e LSL) foram calculadas como uma porcentagem da Extensão Radicular Total do Defeito (LET). As extensões lineares destas variáveis não se sobrepõem umas às outras. Assim, a soma destas variáveis corresponde a 100% de LET. As variáveis LRP e LPB também foram avaliadas separadamente como porcentagem da LET. Os valores de LPB foram zero. Em relação à medida LSL, somente 1 espécime do grupo C apresentou valor diferente de zero e, portanto, não foi possível analisá-la estatisticamente. Também não foi possível analisar estatisticamente os valores da variável LME, por apresentarem poucos valores diferentes de zero, e coeficiente de variação muito alto, permitindo somente a aplicação de parâmetros de estatística descritiva. As medidas de área (AO, AOT, AV, ANVBR e ASCR) foram calculadas como uma porcentagem da Área Total do Defeito (AT). Em relação à medida AV, somente 2 espécimes do grupo C apresentaram valores diferentes de zero e, portanto, também

não foi possível aplicar testes estatísticos. Foi realizada a análise estatística descritiva dos valores de ANVBR. Os valores de ASCR foram zero.

O animal foi usado como unidade estatística (n = 8). Foram feitos os testes de normalidade dos resíduos, sendo confirmadas a aproximação para a distribuição normal e a homocedasticidade dos dados entre os grupos. A significância das diferenças entre os grupos foi determinada por uma análise de variância, com transformação em arcoseno, ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$), analisando cada variável separadamente.

Teste-t pareado foi usado para verificar a existência da relação entre a contagem de plaquetas das amostras do sangue periférico e do plasma rico em plaquetas.

RESULTADOS

Observações Clínicas

Os animais toleraram bem os procedimentos cirúrgicos. O pós-operatório ocorreu sem incidentes. Não foi observada a presença de recessão gengival em nenhum dente de ambos os grupos.

Estudo da contagem de plaquetas

A contagem de plaquetas confirmou que a técnica de preparação do PRP usada no presente estudo produziu amostras com alta concentração de plaquetas. Esfregaços de amostras de PRP exibiram maior concentração de plaquetas do que esfregaços de amostras do sangue periférico. A quantidade média de plaquetas presentes nas amostras de sangue periférico dos animais foi $302,5 \pm 39,05 \times 10^3$ plaquetas/µl, enquanto que as amostras de PRP apresentaram a média de $1152,08 \pm 127,23 \times 10^3$ plaquetas/µl, com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$). Portanto, a concentração de plaquetas nas amostras de PRP foi aumentada em aproximadamente 4 vezes.

Análise Histológica

A maioria dos espécimes dos grupos C e T não apresentou fechamento ósseo completo do defeito de furca. O novo cemento apresentou-se variável em espessura, revestindo parcialmente ou totalmente as superfícies radiculares do defeito. A maioria dos espécimes apresentou revestimento parcial das superfícies radiculares com cemento. O ligamento periodontal neoformado mostrou-se bem organizado, vascularizado e celularizado, com feixes de fibras orientadas perpendicularmente ou obliquamente à superfície radicular, inseridas no novo cemento e no novo osso. Áreas de anquilose dento-alveolar foram observadas na maioria dos espécimes de ambos os grupos.

Grupo C. Em alguns espécimes, observou-se osso neoformado restrito às marcações radiculares, estendendo-se levemente coronal a elas ou preenchendo o terço médio do defeito de furca (Fig. 2A). Em outros espécimes, o osso neoformado estendia-se até parte do teto da furca (Fig. 2B). As áreas remanescentes da furca estavam preenchidas por tecido conjuntivo fibroso com infiltrado inflamatório crônico variando de leve a intenso. O fechamento ósseo completo do defeito de furca foi observado em dois espécimes. Em 3 espécimes, os cortes histológicos iniciais (lado vestibular) mostraram migração epitelial no teto da furca. Em dois espécimes, o epitélio estendeu-se ao terço médio do defeito, sendo que em um deles, projeções epiteliais foram observadas no tecido conjuntivo subjacente, que exibia intenso infiltrado inflamatório crônico. Embora áreas de reabsorção radicular tenham sido observadas na maioria dos espécimes, estas estavam reparadas por novo cemento. Em um espécime, discretas áreas com características de reabsorção ativa foram observadas.

Grupo T. Em alguns dos espécimes, o osso neoformado foi observado na área entre as marcações radiculares, estendendo-se até o terço médio do defeito de furca. Em outros espécimes, o osso neoformado estendia-se até parte do teto da furca (Fig. 3A). As áreas remanescentes da furca estavam ocupadas por tecido conjuntivo fibroso com infiltrado

inflamatório crônico variando de leve a intenso. A maioria dos espécimes apresentou grande quantidade de partículas remanescentes de NVB, distribuídas predominantemente na área das marcações radiculares e no terço médio do defeito de furca (Fig. 3B). A maioria das partículas de NVB apresentou-se com fissuras. Algumas delas mostraram invaginação de tecido conjuntivo em suas fissuras e centros escavados. Em outras partículas, observou-se material amorfo e células nesses centros. Em muitas áreas, as partículas de NVB estavam circundadas por tecido conjuntivo rico em células, bem vascularizado e organizado. Em outras, o tecido conjuntivo circunjacente estava frouxo e desorganizado. Na maioria dos espécimes, observou-se formação óssea circundando poucas partículas de NVB (Fig. 4A). Em alguns espécimes, observou-se osso dentro das mesmas (Fig. 4B). O fechamento ósseo completo do defeito de furca foi observado em quatro espécimes (Fig. 3B). Em 4 espécimes, os cortes histológicos iniciais (lado vestibular) mostraram migração epitelial no teto da furca. Em um espécime, o epitélio estendeu-se ao terço médio do defeito. Embora pequenas áreas de reabsorção radicular tenham sido observadas na maioria dos espécimes, as mesmas encontravam-se reparadas por novo cemento. Em dois espécimes, no entanto, foi possível detectar discretas áreas apresentando características de reabsorção ativa. Remanescentes de SC não foram observados em nenhum dos espécimes.

Histometria e Análise Estatística

Os valores percentuais médios e desvios-padrão das medidas lineares, com comparação entre os grupos, estão apresentados na Tabela 1. Os valores percentuais médios e desvios-padrão da LME foram de 2,19% ± 3,06% para o grupo C e de 2,70% ± 4,46% para o grupo T. Esses valores foram calculados considerando-se os valores de 3 espécimes do grupo C e 4 espécimes do grupo T, pois os demais foram zero. Os valores percentuais médios e desvios-padrão das medidas de área, com comparação entre os grupos, estão apresentados na Tabela

2. A Área Total do Defeito (AT) de ambos os grupos, em mm^2, foram comparadas através da análise de variância, não sendo encontrada diferença estatisticamente significativa, com F = 0,56 e *p* = 0,4785. O mesmo ocorreu com a Extensão Radicular Total do Defeito (LET), com F = 0,33 e *p* = 0,5829. O valor percentual médio e desvios-padrão da ANVBR foi 11,13% ± 5,92%.

DISCUSSÃO

A avaliação histológica dos resultados das técnicas regenerativas é essencial para estabelecer se as mesmas estimularam a regeneração ou algum tipo de reparo. Devido à dificuldade óbvia em obter espécimes humanos para processamento histológico, modelos de experimentação animal são normalmente usados. No presente trabalho, usou-se um modelo experimental agudo. Tem sido demonstrado que o debridamento radicular convencional elimina a maior parte ou todo o cemento na doença de ocorrência natural ou nos defeitos crônicos, resultando em condições da superfície radicular similares aos dos defeitos agudos.[38] Em defeitos agudos, algum nível de regeneração espontânea é esperado e, assim, a única desvantagem deste modelo é que ele reduz a sensibilidade de interpretação das técnicas regenerativas.[39] Contudo, apresenta várias vantagens tais como economia de tempo, padronização do tamanho do defeito[40] e um bom custo-benefício devido ao menor tempo necessário para manutenção dos animais.[39] De acordo com Soares et al.,[39] este modelo deveria ser selecionado para a investigação de novos materiais, drogas ou substâncias para determinar sua segurança e para estabelecer o risco de reações adversas durante o processo de cicatrização periodontal.

No grupo C do presente estudo, observou-se considerável regeneração periodontal, com significativa formação de novo osso em alguns espécimes. Resultados semelhantes também foram observados por Soares et al.[39] Recessões gengivais não foram observadas em ambos os grupos deste estudo durante a fase de cicatrização. Os retalhos mucoperiosteais que cobriam

os defeitos foram mantidos em posição, permitindo que o coágulo formado dentro do defeito permanecesse estável e livre de infecção, favorecendo assim, a regeneração periodontal.[41] Os animais receberam antibióticos sistêmicos antes e após os procedimentos cirúrgicos, em combinação com terapia antimicrobiana local, para prevenir infecção e conseqüente alteração do coágulo recentemente formado. Isto deve ter certamente contribuído para os resultados positivos observados.[39]

No presente estudo, a combinação das técnicas regenerativas usadas no grupo T não foi mais efetiva que o debridamento cirúrgico somente. A maioria dos espécimes do grupo T apresentou quantidade considerável de partículas remanescentes de NVB. Isto demonstra o lento processo de reabsorção do Biogran II®, que também foi observado em estudos histológicos em humanos[16] e em animais[15] quando o Biogran® foi usado. O Biogran® foi modificado para criar o Biogran II® em uma tentativa de acelerar suas reações in vivo.[25] Contudo, isto não foi observado no modelo animal usado no presente estudo. Este resultado difere do relatado por Veis et al.,[27] que também avaliaram o Biogran II® usando outro modelo experimental. Schepers et al.[42] demonstraram que a remodelação das partículas de VB é influenciada pela atividade de remodelação do osso circunjacente. As reações químicas das partículas procederão mais rapidamente em um sítio com alta atividade de remodelação do que em um sítio com uma atividade menor. Esta poderia ser uma das explicações para a diferença de resultados observada entre o presente estudo e o de Veis et al.,[27] que avaliaram o reparo ósseo ao redor de implantes, uma área com alta atividade de remodelação.[42] A presença de uma quantidade considerável de partículas remanescentes de NVB pode ser uma das razões para explicar a significativa menor quantidade de novo osso nos defeitos de furca do grupo T quando comparados aos do grupo C (Tabela 2). Segundo MacNeill et al.,[43] materiais de enxerto que requerem períodos longos de tempo para completa reabsorção reduzem a quantidade total de osso neoformado devido a sua presença contínua.

No presente trabalho, a presença de tecido conjuntivo fibroso foi observada circundando as partículas de NVB em muitas áreas. Estas fibras colágenas podem indicar desenvolvimento de matriz para futura mineralização e formação óssea.[44] De fato, no presente estudo, observou-se formação óssea circundando algumas partículas de NVB, confirmando suas propriedades osteocondutivas. A mineralização e a formação óssea poderiam ter sido observadas mais extensivamente se o presente estudo tivesse incluído um período mais longo de cicatrização. Tem sido demonstrado, em estudos clínicos, que o VB pode demorar 8 a 9 meses para tornar-se completamente incorporado dentro dos tecidos[18] e a remodelação óssea completa pode demorar ainda muito mais tempo.[20] Além de mostrarem-se osteocondutivas, as partículas de NVB apresentaram também, em alguns espécimes deste estudo, a propriedade osteoestimulatória, já descrita em estudo histológicos realizados em humanos e animais com partículas de VB.[14,16]

Estudos histológicos indicaram maior formação de novo cemento e inibição ou retardo da migração do epitélio juncional em defeitos ósseos periodontais tratados com VB em comparação aos tratados apenas com debridamento cirúrgico.[23,24] No grupo T do presente estudo, formação considerável de novo cemento foi observada. Contudo, sem diferença estaticamente significativa em relação ao grupo C (Tabela 1). Em alguns espécimes de ambos os grupos, observou-se migração epitelial para o interior do defeito de furca, o que não corrobora os achados de Karatzas et al.,[24] que verificaram significativa inibição da migração epitelial com o uso do VB. Apesar de ambos os grupos terem apresentado quantidades similares de novo cemento, o grupo T apresentou quantidade significativamente menor de regeneração periodontal que o grupo C (Tabela 1). Este achado poderia ser explicado, em parte, pela quantidade significativamente menor de novo osso devido à presença de quantidade considerável de partículas remanescentes de NVB na maioria dos espécimes. Portanto, os resultados do presente estudo não suportam os achados de estudos clínicos que

mostraram que o uso do VB proporcionou resultados significativamente melhores no tratamento de defeitos de furca Classe II quando comparados ao debridamento cirúrgico somente.[17,21] Contudo, estão em concordância com os resultados observados em estudo clínico que não mostrou diferenças significativas quando o uso do VB foi comparado ao debridamento cirúrgico somente no tratamento de defeitos periodontais infra-ósseos.[20] A propriedade regenerativa limitada do VB no tratamento desse tipo de defeito também foi constatada em uma avaliação histológica realizada em humanos.[45]

As alterações qualitativas e/ou quantitativas das plaquetas podem afetar o potencial regenerativo do PRP. Portanto, a seleção de uma técnica adequada para o preparo do PRP é um aspecto de fundamental importância para uma avaliação confiável dos efeitos deste biomaterial. No presente trabalho, o PRP foi preparado segundo o protocolo do sistema PCCS II™. A primeira versão deste sistema, o PCCS™, demonstrou características ideais para o preparo do PRP, pois concentra as plaquetas em níveis adequados, requer um volume reduzido de sangue, é semi-automatizado e não danifica mecanicamente as plaquetas durante a centrifugação.[46,47] Assim como o sistema PCCS™, recomendado por Marx[48] por proporcionar uma concentração de plaquetas considerada terapêutica, o sistema PCCS II™ utilizado no presente estudo manteve esta propriedade, como constatado pelo aumento constante do número de plaquetas nas amostras de PRP em relação às do sangue periférico.

Há poucas publicações sobre a influência do uso isolado do PRP no tratamento de defeitos periodontais e estas apresentaram resultados favoráveis.[49,50] Vários estudos clínicos avaliaram a combinação do PRP a enxertos ósseos associados ou não à RTG e concluíram que a terapia combinada usando o PRP foi mais efetiva que o uso isolado de uma terapia regenerativa ou apenas o debridamento.[7-10] Contudo, no presente estudo, a terapia combinada usando o PRP não foi mais efetiva que o debridamento cirúrgico somente. A ação positiva do PRP nas terapias combinadas tem sido contestada por outros estudos clínicos que não constataram

benefícios adicionais do uso do PRP quando este foi associado ao fosfato tricálcio e RTG,[11] ao osso bovino mineralizado inorgânico e RTG[12] e ao VB[13] no tratamento de defeitos infra-ósseos. O exato mecanismo do PRP na regeneração periodontal ainda não está bem compreendido[12] e necessita ser melhor investigado.

O uso combinado do SC a outros materiais aloplásticos, enxertos ósseos ou PRP, ao redor de implantes de titânio ou no tratamento de defeitos periodontais, tem sido avaliado em estudos clínicos[32-34] e animais,[31,35] apresentando resultados satisfatórios. Tem sido demonstrado que o SC pode ser usado como agente carreador de medicamentos[29] e pode constituir um sistema de liberação biocompatível para fatores de crescimento.[34] Contudo, no presente estudo, o uso combinado do SC ao NVB e PRP não se mostrou como uma técnica vantajosa. Talvez as reações químicas das partículas de NVB tenham interferido na liberação e manutenção dos fatores de crescimento relacionados ao PRP no sítio cirúrgico. Essa hipótese é suportada pelo recente estudo clínico de Demir et al.[13] que não observaram um efeito adicional positivo do PRP quando combinado ao VB no tratamento de defeitos periodontais infra-ósseos.

Dentro dos limites do presente estudo, pode-se concluir que a associação do PRP, NVB e SC não foi mais efetiva que o debridamento cirúrgico somente no tratamento de defeitos de furca Classe II.

AGRADECIMENTOS

A BIOMET ***3i***, Inc. (Palm Beach Gardens, FL, USA) por ter patrocinado este estudo e a Prof[a]. Dr[a]. Suely Regina Mogami Bomfim da Faculdade de Medicina Veterinária e ao Prof. Dr. Tetuo Okamoto da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – UNESP, pela assessoria técnica prestada.

REFERÊNCIAS

1. Garret S. Periodontal regeneration around natural teeth. *Ann Periodontol* 1996;1:621-666.

2. Demir B, Demiralp B, Güncü GN, Uyanik MÖ, Çaglayan F. Intentional replantation of a hopeless tooth with the combination of platelet rich plasma, bioactive glass graft material and non-resorbable membrane: a case report. *Dent Traumatol* 2007; 23:190-194.

3. Park J-B, Matsuura M, Han K-Y, et al. Periodontal regeneration in class III furcation defect of beagle dogs using Guided tissue regenerative therapy with platelet-derived growth factor. *J Periodontol* 1995;66:462-477.

4. Howell TH, Fiorellini JP, Paquette DW, Offenbacher S, Giannobile WV, Lynch SE. A phase I/II clinical trial to evaluate a combination of recombinant human platelet-derived growth factor-BB and recombinant human insulin-like growth factor-I in patients with periodontal disease. *J Periodontol* 1997;68:1186-1193.

5. Mohammed S, Park ARC, Kardos TB. The effect of transforming growth factor beta one (TGF-β_1) on wound healing, with or without barrier membranes, in a Class II furcation defects in shepp. *J Periodontal Res* 1998;33:335-344.

6. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998;85:638-646.

7. Lekovic V, Camargo PM, Weinlaender M, Vasilic N, Aleksic Z, Kenny EB. Effectiveness of a combination of platelet-rich plasma, bovine porous bone mineral and guided tissue regeneration in the treatment of mandibular grade II molar furcation in humans. *J Clin Periodontol* 2003;30:746-751.

8. Hanna R, Trejo PM, Weltman RL. Treatment of infrabony defects with bovine-derive xenograft alone and in combination with platelet-rich plasma: a randomized clinical trial. *J Periodontol* 2004;75:1668-1677.

9. Camargo PM, Lekovic V, Weinlaender M, Vasilic N, Madzarevic M, Kenny EB. A reentry study on the use of bovine porous bone mineral, GTR, andplatelet-rich plasma in the regenerative treatment of intrabony defects in humans. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2005;25:49-59.

10. Ilgenli T, Dündar N, Kal BI. Demineralized freeze-dried bone allograft and platelet-rich plasma vs platelet-rich plasma alone in infrabony defects: a clinical and radiographic evaluation. *Clin Oral Investig* 2007;11:51-59.

11. Yassibag-Berkman Z, Tuncer O, Subasioglu T, Kantarci A. Combined use of platelet-rich plasma and bone grafting with or without guided tissue regeneration in the treatment of anterior interproximal defects. *J Periodontol* 2007;78:801-809.

12. Döri F, Huszár T, Nikolidakis D, Arweiler NB, Gera I, Sculean A. Effect of platelet-rich plasma on the healing of intrabony defects treated with an anorganic bovine bone mineral and expanded polytetrafluorethylene membranes. *J Periodontol* 2007;78:983-990.

13. Demir B, Sengün D, Berberoglu A. Clinical evaluation of platelet-rich plasma and bioactive glass in the treatment of infra-bony defects. *J Clin Periodontol* 2007;34:709-715.

14. Schepers E, De Clercq M, Ducheyne P, Kempeneers R. Bioactive glass particulate material as a filler for bone lesions. *J Oral Rehabil* 1991;18:439-452.

15. Furlaneto FAC, Nagata MJH, Fucini SE, Deliberador TM, Okamoto T, Messora MR. Bone healing in critical-size defects treated with bioactive glass/calcium sulfate. A histologic and histometric study in rat calvaria. *Clin Oral Implants Res* 2007;18: 311-318.

16. Norton MR, Wilson J. Dental implants placed in extraction sites implanted with bioactive glass: human histology and clinical outcome. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002;17:249-257.

17. Froum SJ, Weinberg MA, Tarnow D. Comparision of bioactive glass synthetic bone graft particles and open debridement in the treatment of human periodontal defects. A clinical study. *J Periodontol* 1998;69:698-709.

18. Lovelace TB, Mellonig JT, Meffert RM, Jones AA, Nummikoski PV, Cochran DL. Clinical evaluation of bioactive glass in the treatment of periodontal osseous defects in humans. *J Periodontol* 1998;69:1027-1035.

19. Mengel R, Soffner M, Flores-de-Jacoby L. Bioabsorbable membrane and bioative glass in the treatment of intrabony defects in patients with generalized aggressive periodontitis: results of a 12-month clinical and radiological study. *J Periodontol* 2003;74:899-908.

20. Ong MM, Eber RM, Korsnes MI, et al. Evaluation of a bioactive glass alloplast in treating periodontal intrabony defects. *J Periodontol* 1998;69:1346-1354.

21. Anderegg CR, Alexandre DC, Freiman M. A bioactive glass particule in the treatment of molar furcation invasions. *J Periodontol* 1999;70:384-387.

22. Yukna RA, Evans GH, Aichelmann-Reidy MB, Mayer ET. Clinical comparison of bioactive glass bone replacement graft material and expanded polytetrafluoroethylene barrier membrane in treating human mandibular molar class II furcations. *J Periodontol* 2001;72:125-133.

23. Fetner AE, Hartigan MS, Low SB. Periodontal repair using Perioglas® in nonhuman primates: clinical and histologic observations. *Compend Contin Educ Dent* 1994;15:932-938.

24. Karatzas S, Zavras A, Greenspan D, Amar S. Histologic observations of periodontal wound healing after treatment with PerioGlas in nonhuman primates. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1999;19:489-499.

25. Fang H, Neidt TM. Development of pre-reacted Biogran® Final Technical Report. Palm Beach Gardens: 3i Implants Innovation Inc; 2000.

26. Radin S, Ducheyne P, Falaize S, Hammond A. In vitro transformation of bioactive glass granules into CA-P shells. *J Biomed Mater Res* 2000;49:264-272.

27. Veis AA, Dabarakis NN, Parisis NA, Tsirlis AT, Karanikola TG, Printza DV. Bone regeneration around implants using spherical and granular forms of bioactive glass particles. *Implant Dentistry* 2006;15: 386-394.

28. Pietrzak WS, Ronk R. Calcium sulfate bone void filler: a review and a look ahead. *J Craniofac Surg* 2000;11:327-333.

29. Bier SJ, Sinensky MC. The versatility of calcium sulfate: resolving periodontal challenges. *Compend Contin Educ Dent* 1999;20: 655-661.

30. Bier SJ. Plaster of paris: a periodontal surgical dressing. *NY State DJ* 1970;36:347-352.

31. Kim C-K, Kim H-Y, Chai J-K, et al. Effect of a calcium sulfate implant with calcium sulfate barrier on periodontal healing in 3-wall infrabony defects in dogs. *J Periodontol* 1998;69:982-988.

32. Pepelassi EM, Bissada NF, Greenwell H, Farah CF. Doxycycline-Tricalcium phosfate composite graft facilitates osseous healing in advanced periodontal furcation defects. *J Periodontol* 1991;62:106-115.

33. Maragos P, Bissada NF, Wang R, Cole BP. Comparison of three methods using calcium sulfate as a graft/barrier material for treatment of Class II mandibular molar furcation defects. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2002;22:493-501.

34. Intini G, Andreana S, Intini FE, Buhite RJ, Bobek LA. Calcium sulfate and paltelet-rich plasma make a novel osteoinductive biomaterial for bone regeneration. *J Translational Medicine* 2007;5:1-13

35. Kim S-G, Chung C-H, Kim Y-K, Park J-C, Lim S-C. Use of particulate dentin-plaster of Paris combination with/ without platelet-rich plasma in the treatment of bone defects around implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002;17:86-94.

36. Novaes Jr. AB, Tamani JP, Oliveira PT, Palioto DB, Almeida ALG. Root trunk concavities as a risk factor for regenerative procedures of class II furcation lesions in dogs. *J Periodontol* 2001;72:612-619.

37. Cirelli JA, Marcantonio Jr. E, Marcantonio C, Lia RCC, Goissis G, Rossa Jr. C. Evaluation of anionic collagen membranes in the treatment of class II furcation lesions: an histometric analysis in dogs. *Biomaterials* 1997;18:1227-1234.

38. Wikesjö UME, Selvig KA, Zimmerman G, Nilvéus R. Periodontal repair in dogs: Healing in experimentally created chronic periodontal defects. *J Periodontol* 1991;62:258-263.

39. Soares FP, Hayashi F, Yorioka CW, et al. Repair of class II furcation defects after a reparative tissue graft obtained from extraction sockets treated with growth factors: A histologic and histometric study in dogs. *J Periodontol* 2005;76:1681-1689.

40. Selvig KA. Discussion: Animal models in reconstructive therapy. *J Periodontol* 1994;65:1169-1172.

41. Caton JG, Greenstein G. Factors related to periodontal regeneration. *Periodontol 2000* 1993;1:9-15.

42. Schepers E, Barbier L, Ducheyne P. Implant placement enhanced by bioactive glass particles of narrow size range**.** *Int J Oral Maxillofac Implants* 1998;13:655-665.

43. MacNeill SR, Cobb CM, Rapley JW, Glaros AG, Spencer P. In vivo comparison of synthetic osseous graft materials. A preliminary study. *J Clin Periodontol* 1999;26:239-245.

44. Wheeler DL, Stokes KE, Park HM, Hollinger JO. Evaluation of particulate Bioglass® in a rabbit radius ostectomy model. *J Biomed Mater Res* 1997;35:249-254.

45. Nevins ML, Camelo M, Nevins M, et al. Human histologic evaluation of bioactive ceramic in the treatment of periodontal osseous defects. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2000;20:459-467.

46. Weibrich G, Kleis WK, Hitzler WE, Hafner G. Comparison of the platelet concentrate collection system with the plasma-rich-in-growth-factors kit to produce platelet-rich plasma: a technical report. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2005;20:118-123.

47. Leitner GC, Gruber R, Neumuller J, et al. Platelet content and growth factor release in platelet-rich plasma: a comparison of four different systems. *Vox Sanguinis* 2006;91:135-139.

48. Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg* 2004;62:489-496.

49. Papli R, Chen S. Surgical treatment of infrabony defects with autologous platelet concentrate or bioabsorbable barrier membrane: A prospective case series. *J Periodontol* 2007;78:185-193.

50. Sammartino G, Tia M, Marenzi G, Lauro AE, D'Agostino E, Claudio PP. Use of autologous paltelet-rich plasma (PRP) in periodontal defect treatment after extraction of impacted mandibular third molars. *J Oral Maxxillofac Surg* 2005;63:766-770.

TABELAS

Tabela 1.

Valores Percentuais Médios e Desvios-Padrão das Medidas Lineares, com Comparação Entre os Grupos.

Medidas	Grupo C		Grupo T		ANOVA	
	Média (%)	Dp (%)	Média (%)	Dp (%)	Teste F	*P Valor*
LFC	56,30	14,79	54,97	19,98	0,07	0,7981
LTC	39,38	14,02	37,62	22,21	0,30	0,6020
LA	4,11	4,56	3,94	5,46	0,05	0,8344
LRP	51,56	15,94	37,97	12,31	6,07	0,0432*

* Diferença estatisticamente significativa ao nível de 5%.

Tabela 2.

Valores Percentuais Médios e Desvios-Padrão das Medidas de Área, com Comparação Entre os Grupos.

Medidas	Grupo C		Grupo T		ANOVA	
	Média (%)	Dp (%)	Média (%)	Dp (%)	Teste F	*P Valor*
AO	64,15	15,45	50,33	12,29	6,59	0,0371*
AOT	35,57	15,26	38,66	9,88	0,78	0,4064

* Diferença estatisticamente significativa ao nível de 5%.

FIGURAS

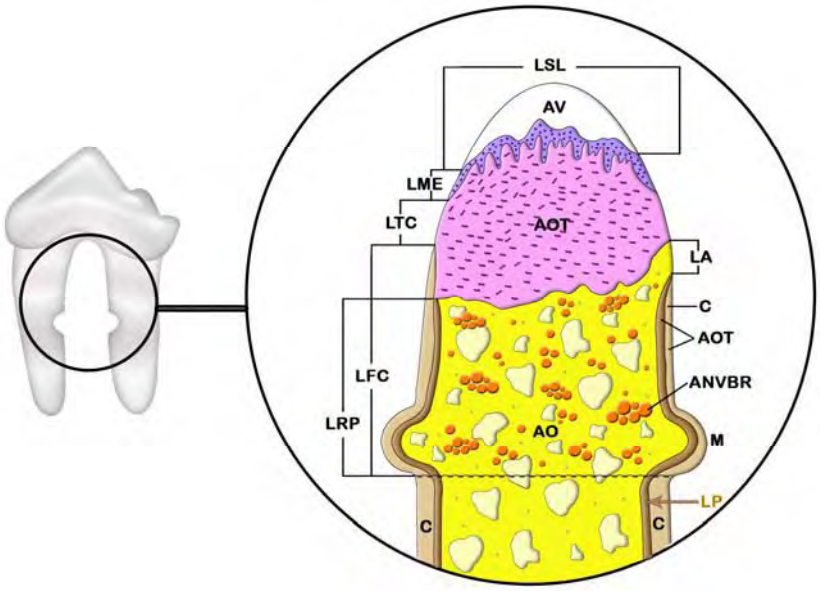


Figura 1. Ilustração esquemática representando as medidas histométricas realizadas na área de furca. Medidas de área (descritas no texto) são as seguintes: AO, AOT, AV e ANVBR (AT= AO + AOT + AV + ANVBR). Medidas lineares (descritas no texto) são as seguintes: LFC, LTC, LME, LSL, LA (LET = LFC + LTC + LME + LSL + LA) e LRP. LP = ligamento periodontal; M = marcação radicular; C = cemento.

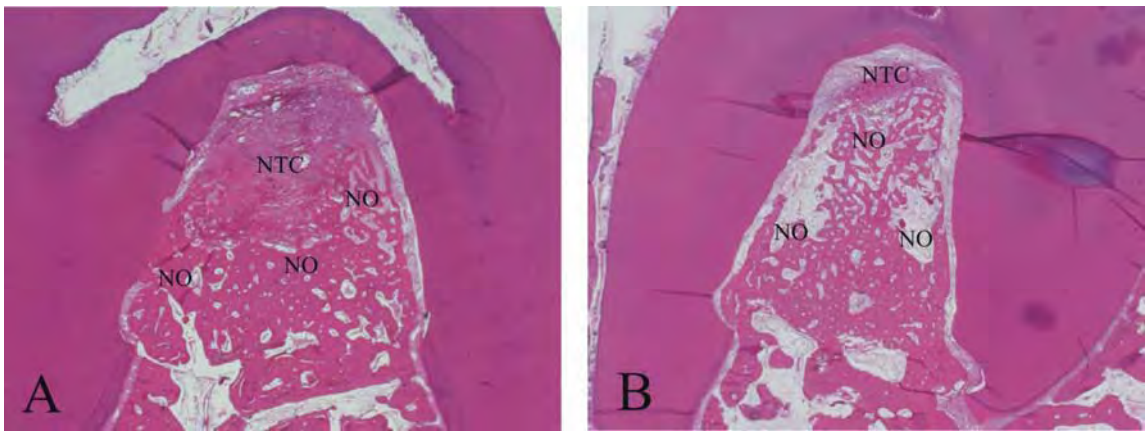


Figura 2. **A)** Grupo C. Visão panorâmica da área da furca, com novo osso (NO) e novo tecido conjuntivo (NTC) no terço médio do defeito de furca (H&E, aumento original 16x).

B) Grupo C. Visão panorâmica da área da furca, com novo osso (NO) e novo tecido conjuntivo (NTC) estendendo-se até parte do teto da furca (H&E, aumento original 16x).

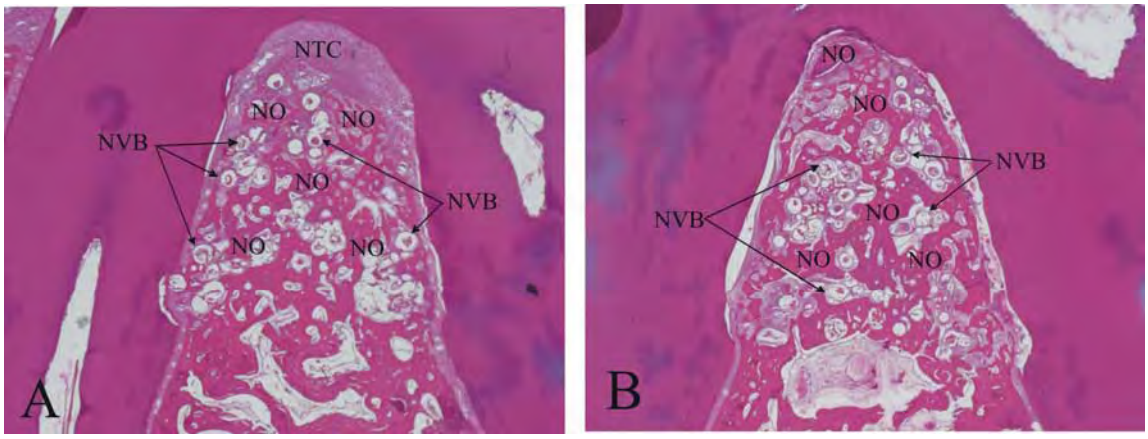


Figura 3. **A)** Grupo T. Visão panorâmica da área da furca, com novo osso (NO) e novo tecido conjuntivo (NTC) estendendo-se até parte do teto da furca (H&E, aumento original 16x). NVB = novo vidro bioativo.

B) Grupo T. Visão panorâmica da área da furca, com partículas remanescentes de NVB e fechamento ósseo completo do defeito de furca (H&E, aumento original 16x). NO = novo osso.

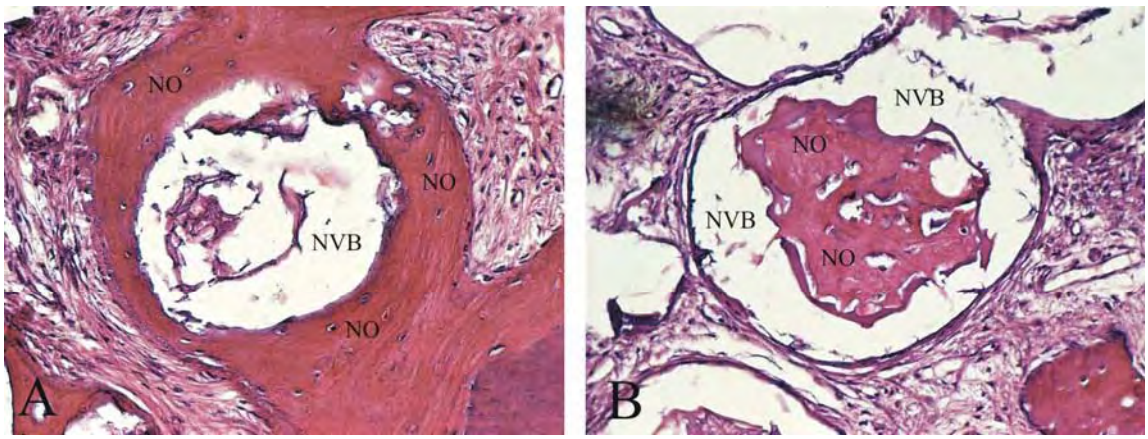
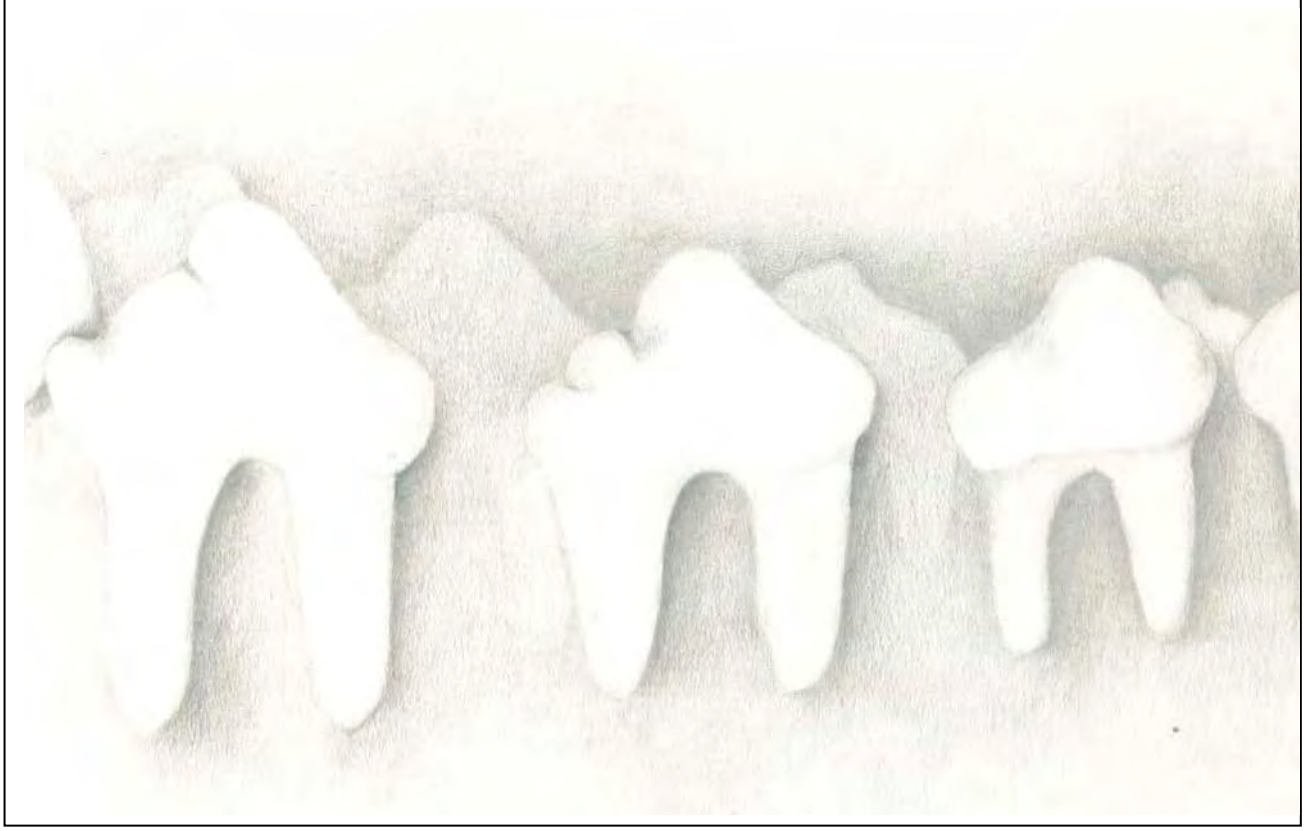


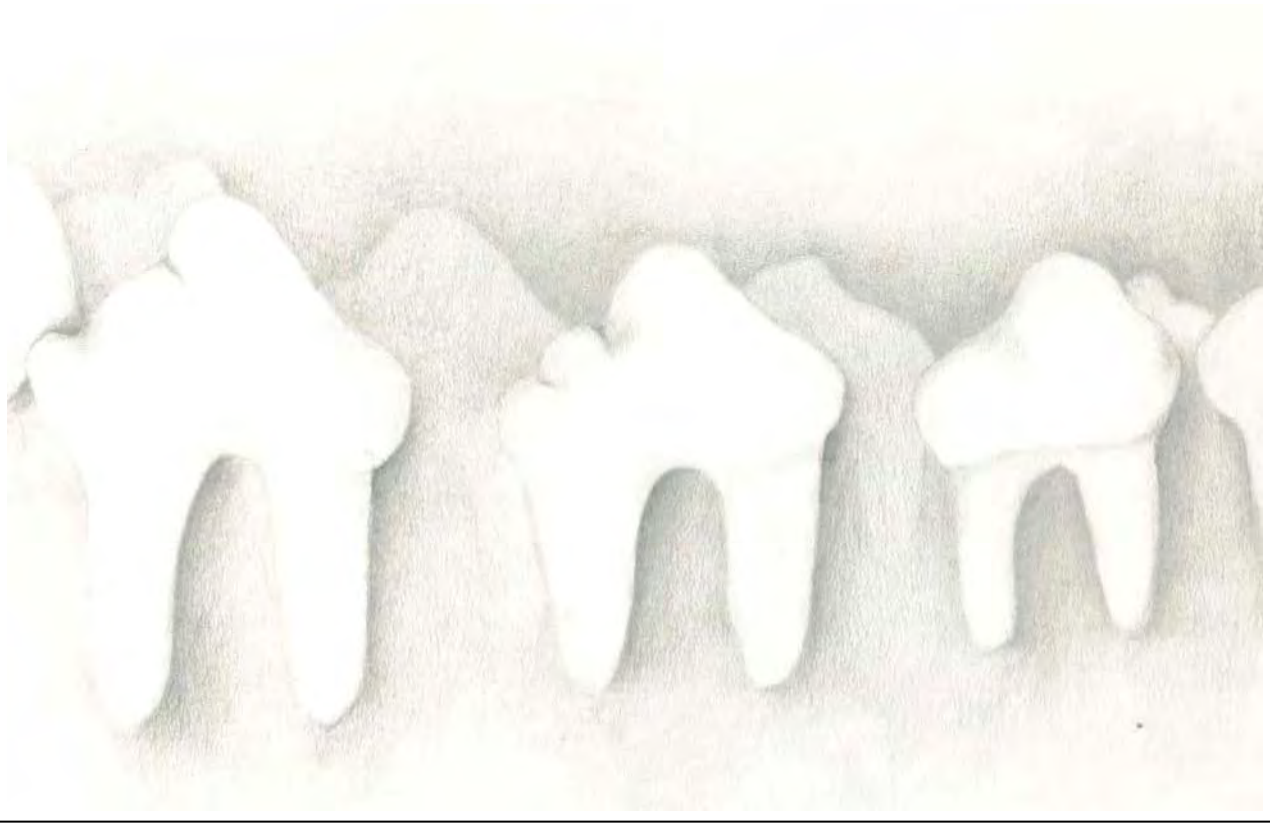
Figura 4. **A)** Grupo T. Novo osso (NO) circundando a partícula de NVB (H&E, aumento original 160x).

B) Grupo T. Novo osso (NO) dentro da partícula de NVB (H&E, aumento original 160x).

Anexos



Anexo A
Parecer da Comissão de Ética na Experimentação Animal



Anexo A – Parecer da Comissão de Ética na Experimentação Animal

unesp UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba

COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
(CEEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto **"ASSOCIAÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS, VIDRO BIOATIVO E SULFATO DE CÁLCIO NO TRATAMENTO DE DEFEITOS DE FURCA CLASSE II. ESTUDO HISTOLÓGICO E HISTOMÉTRICO EM CÃES."** sob responsabilidade de **Maria José Hitomi Nagata, Tatiana Miranda Deliberador e Flávia Aparecida Chaves Furlaneto,** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela CEEA em 19 de maio de 2005, de acordo com o protocolo **nº 64/05**.

Araçatuba, 23 de maio de 2005.

Prof.ª Ass. Dr.ª Maria Gisela Laranjeira
Presidente

Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária – DEPARTAMENTO DE CLÍNICA, CIRURGIA E REPRODUÇÃO ANIMAL – Rua Clóvis Pestana, 793 CEP 16050-680 Araçatuba – SP
Tel (18) 3636-3295 Fax (18) 3622-4542 E-mail: laranjei@fmva.unesp.br

Anexo B
Normas para Publicação segundo o Periódico - "Journal of Periodontology"



Anexo B - Normas para Publicação segundo o Periódico - "Journal of Periodontology"

Instructions to Authors

Updated July 2007

CONTENT

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

MANUSCRIPT CATEGORIES AND SPECIFIC FORMATS

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

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

ORIGINAL ARTICLES

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

Format

Original articles must be limited to 4,000 words (excluding the abstract, references, and figure legends). The reference list should not exceed 50 references, and the combined number of figures and tables must be 6 or fewer. Multi-panel figures are acceptable.

Abstract

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

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

Introduction

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

Materials and Methods

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

Results

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

Discussion

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

STATE OF THE ART REVIEWS

These are focused reviews of basic and clinical science related to periodontics and implant dentistry. These reviews should be concise and address an important and timely clinical question. The review should be based on a critical assessment of the literature, and may include data or examples from the research or clinical experience of the author(s). Authors should discuss clinical relevance and future projections. At-large submissions will be considered, but authors should contact the Editor-in-Chief before developing a manuscript to avoid duplicating a topic already in preparation. Papers should be balanced, literature-based reviews that are concise (2,000 to 3,000 words) with about 100 key references. Articles

Instructions to Authors

should be written at a level instructive to *Journal* readers. For example, clear definitions of abbreviations and a glossary of terms may be useful for defining highly technical or new terminology. Since critical reviews require selection of reports and interpretation of data, authors should not have a financial interest in the companies making products or providing services described in the review.

Format
Abstract
The abstract should summarize the main conclusions of the review in 350 words or less.

Introduction
A question or series of related questions to be addressed should be given; rationales for asking these questions and why the questions are timely should be explained.

Methods
The method of reviewing the literature should be discussed (e.g., bibliographic indexes and databases used, limits on years covered by the search, languages searched, and other important information regarding the search process should be described).

Body
A sequence of logical subsections that reflect the area being reviewed should be developed. This section should be a critical analysis of the literature, including arguments needed to support the conclusions reached; why certain papers not meeting well-described critical standards, such as randomized clinical trials, were not used as evidence; and what issues remain unresolved and need further study. Evidence tables are often useful in summarizing reviewed literature, and various statistical analyses appropriate to reviewing literature, such as meta-analysis, should be considered.

COMMENTARY

The purpose of these papers is to provide a forum for discussion of controversies and other issues as they relate to the practice of periodontics and implant dentistry. Full and balanced discussion of controversies on important issues is encouraged. This may result in several authors each presenting a relevant viewpoint. Commentary articles should be concise (2,000 to 3,000 words); however, they should be complete and balanced, which may require that the issue or controversy addressed be highly focused. Appropriate references should be cited.

Format
Introduction
This section should clearly state the clinical question or issues to be discussed and document their importance and timeliness.

Body
The body should present the information supporting all aspects of the issues. This portion of the Commentary may be subdivided as appropriate with headings. Figures, tables, and other illustrative materials may be incorporated.

Summary
The summary should place the issue in perspective and point a way for future directions in addressing the controversy.

Acknowledgments
Since these papers allow authors to express their opinions on a subject, it is extremely important that authors disclose any and all affiliations, financial position, or any other information that constitutes a real or perceived conflict of interest.

CASE REPORTS

These manuscripts emphasize clinical periodontics and related oral medicine and pathology. Unusual cases illustrating lesions affecting the orofacial structures that may be expected to influence management of periodontal and implant patients could be presented. Case reports should describe: 1) unique cases that may represent a previously undescribed condition; 2) unexpected association of two or more diseases; 3) adverse or unexpected treatment response; or 4) any other clinical observation based upon well-documented cases that provide important new information.

CASE SERIES

These papers report a sufficient number of consecutive or randomized cases to make a persuasive argument for or against the procedure, technique, or concept under discussion. Cases should be relatively homogeneous so that a systematic evaluation of one type of disease, lesion, or condition is made for the procedure under consideration. Also, treatment and documentation should be consistent and standardized for all cases. It is recognized that definitive evidence for the safety and efficacy of any procedure, drug, or device comes primarily from well-designed, randomized, controlled trials. However, well-executed case series may lead to hypotheses about the usefulness

Instructions to Authors

of new and innovative procedures, drugs, or devices and may therefore be of value to the progress of clinical science.

Format

Abstract

Case Reports and Case Series should be submitted with a structured abstract, consisting of no more than 250 words and the following four paragraphs:

* Background: Describes the clinical situation being discussed.
* Methods: Describes the clinical procedures (surgical and non-surgical) performed.
* Results: Describes the clinical results.
* Conclusions: Reports what authors have concluded, specifically clinical implications in practice situations.

Introduction

This section should include a critical review of the pertinent literature.

Case Description and Results

This section describes the case or cases, including all relevant data. For ease of presentation, tables describing longitudinal data in a chronological form may be useful. Carefully selected, high-quality clinical photographs in full color, as well as radiographs, are encouraged.

Discussion

This should include findings, put into perspective with respect to the field and literature. Unique arguments and new information gained should be summarized. Consideration of the clinical significance of the case(s) should be emphasized in all sections.

CLINICAL PRACTICE (FORMERLY INNOVATIONS IN PERIODONTICS)

These manuscripts should emphasize methods, such as the application of new technology, materials, and techniques to patient management, and should be illustrated carefully and fully, with radiographs and color clinical photographs. The innovation/method should be described in detail so that readers can duplicate the procedures.

In addition, the innovation/method should have been used on a sufficient number of cases or subjects to demonstrate its utility and any adverse effects. Also, experience in use of the technique should allow the author(s) to describe situations or conditions where the procedure may not work as effectively. Only procedures that give consistent results documented over a sufficiently large number of cases should be submitted for publication.

Manuscripts should be concise and should consist of an abstract, an introduction, a description of the innovation/method in conjunction with management of a case(s), and a discussion.

It should be noted that certain new innovations might require human subject review and informed consent. It is the responsibility of the author to obtain these.

In particular, the Editors are seeking papers describing how practitioners manage site preservation, pre-implant surgery, guided tissue regeneration, furcation preparation, root resection, suturing, and root coverage of extensively prepped teeth and/or previously restored roots, although other topics are encouraged as well.

GUEST EDITORIALS

Guest Editorials may be invited or may be submitted from authorities in certain areas as a means of offering their perspective on one or more articles published in the *Journal*, or on other items of interest to the readership.

LETTERS TO THE EDITOR

Letters may comment on articles published in the *Journal* and should offer constructive criticism. If a letter comments on a published article, the author(s) will be provided 60 days to respond to the observations.

Letters to the Editor may also address any aspect of the profession, including education and training, new modes of practice, and concepts of disease and its management.

Letters should be brief, focused on one or a few specific points or concerns, and can be signed by no more than five individuals.

Citations should be handled as standard references.

MANUSCRIPT SUBMISSION, PREPARATION, AND FORMAT

The *Journal of Periodontology* accepts manuscript submissions online at the following URL: *http://mc.manuscriptcentral.com/jperio*.

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

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

Instructions to Authors

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

SUBMISSION

Authorship

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

Once the *Journal* has received a manuscript, any changes in authorship must be faxed to the editorial office at 312/573-3225 (attn: Bethanne Wilson, Editorial Coordinator) and must contain the signature of the author who has been added or removed from the paper. Authors who are added must submit a conflict of interest and financial disclosure form (described under "Acknowledgments and Conflicts of Interest").

Letter of Submission / Conflicts of Interest

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

A template form can be found on JOP Manuscript Central™ (*http://mc.manuscriptcentral.com/jperio*) in the upper right-hand corner under "Instructions & Forms." More information on conflicts of interest can be found under "Conflicts of Interest" below.

PREPARATION

Style

Please follow the guidelines below when preparing the manuscript:

* Be sure to put the genus and species of an organism and journal names in the reference section in italics.
* The *Journal of Periodontology* does not italicize common Latin terms such as in vitro, in vivo, e.g., or i.e.
* Use a block style; do not tabulate or indent material.
* Refer to the 4th edition of the *Glossary of Periodontal Terms* published by the American Academy of Periodontology for preferred terminology.

Authors are encouraged to use the disease classification as outlined in the *Annals of Periodontology*, volume 4 (1999 International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions). A summary can be found on the American Academy of Periodontology Web site at *http://www.perio.org/resources-products/classification.htm*.

FORMAT

Manuscripts must be submitted in Microsoft Word. Margins should be at least 1" on both sides and top and bottom. Materials should appear in the following order:

Title Page
Abstract (or Introduction) and Key Words
Text
Footnotes
Acknowledgments
References
Figure Legends
Tables

Figures should not be embedded in the manuscript. Authors should retain a copy of their manuscript for their own records.

TITLE PAGE

The Title Page should contain: 1) a concise but informative title; 2) first name, middle initial, and last name of each author, with the highest academic degree and the current institutional affiliation for each; 3) name of the department(s) and institution(s) to which the work should be attributed (please use footnote symbols [in the sequence *, †, ‡, §, ‖, ¶, #, **, etc.] to identify authors and their corresponding institutions); 4) disclaimers, if any; 5) the name and address (including fax number and e-mail) of the author(s) responsible for correspondence (please indicate whether fax number and e-mail can be published); 6) sources of support in the form of grants, equipment, drugs, or other significant sources of support; 7) any financial relationships between any author and a commercial firm that may pose a conflict of interest; 8) word count and number of figures and tables in the manuscript; 9) a short running title of no more than 60 characters, including spaces; and 10) a one-sentence summary describing the key finding(s) from the study.

ABSTRACT OR INTRODUCTION

Please see specific instructions provided for each manuscript category.

KEY WORDS

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

First Review

Instructions to Authors

TEXT

Please see specific instructions provided for each manuscript category.

ACKNOWLEDGMENTS AND CONFLICTS OF INTEREST

Acknowledgments

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

Conflicts of interest

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

Authors are required to submit:

1) **A statement in the manuscript, following Acknowledgments, that includes the source of any funding for the study, and defines the commercial relationships of each author.** If an author has no commercial relationships to declare, a statement to that effect should be included. This statement should include financial relationships that may pose a conflict of interest or potential conflict of interest. These may include financial support for research (salaries, equipment, supplies, travel reimbursement); employment or anticipated employment by any organization that may gain or lose financially through publication of the paper; and personal financial interests such as shares in or ownership of companies affected by publication of the research, patents or patent applications whose value may be affected by this publication, and consulting fees or royalties from organizations which may profit or lose as a result of publication. An example is shown below.
2) **A conflict of interest and financial disclosure form for each author.** This form can be found on JOP Manuscript Central™ (*http://mc.manuscriptcentral.com/jperio*) in the upper right-hand corner under "Instructions & Forms." The form should be completed by each author and provided to the corresponding author. The corresponding author is responsible for submitting these forms from each author when the manuscript is submitted. These forms should be sent to Bethanne Wilson, Editorial Coordinator, either via e-mail at bethanne@perio.org or fax at 312/573-3225. These forms can also be uploaded in the cover letter area during the manuscript submission process.

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

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

REFERENCES

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

All references are identified, whether they appear in the text, tables, or legends, by Arabic numbers in superscript. Journal title abbreviations should be those used by the U.S. National Library of Medicine. If you are uncertain about the correct abbreviation for a journal title, please refer to the NLM's comprehensive listing at *ftp://nlmpubs.nlm.nih.gov/online/journals/ljiweb.pdf*.

The use of abstracts as references is strongly discouraged. Manuscripts accepted for publication may be cited. Material submitted, but not yet accepted, should be cited in text as "unpublished observations." Written and oral personal communications may be referred to in text, but not cited as references. Please provide the date of the communication and indicate whether it was in a written or oral form. In addition, please identify the individual

Instructions to Authors

and his/her affiliation. Authors should obtain written permission and confirmation of accuracy from the source of a personal communication. Presented papers, unless they are subsequently published in a proceedings or peer-reviewed journal, may not be cited as references. In addition, Wikipedia.org may not be cited as a reference. For most manuscripts, authors should limit references to materials published in peer-reviewed professional journals. In addition, authors should verify all references against the original documents. References should be typed double-spaced. Examples of references are given below. Authors are encouraged to consult EndNote for the *Journal of Periodontology*'s preferred reference style.

Journals

1. Standard journal reference. Note: list all authors if six or fewer; when seven or more, list only first three and add et al. Glass DA, Mellonig JT, Towle HJ. Histologic evaluation of bone inductive proteins complexed with coralline hydroxyapatite in an extraskeletal site of the rat. *J Periodontol* 1989;60:121-125.
2. Corporate author. Federation Dentaire Internationale. Technical report no. 28. Guidelines for antibiotic prophylaxis of infective endocarditis for dental patients with cardiovascular disease. *Int Dent J* 1987;37:235.
3. Journal paginated by issue. Card SJ, Caffesse RG, Smith BA, Nasjleti CE. New attachment following the use of a resorbable membrane in the treatment of periodontitis in dogs. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1989;9(1):59-69.
4. Non-English-language titles translated into English. Buchmann R, Khoury F, Hesse T, Müller RF, Lange DE. Antimicrobial therapy of peri-implant disease (in German). *Z Zahnärztl Implantol* 1996; 12:152-157.

Books and Other Monographs

5. Personal author(s). Tullman JJ, Redding SW. *Systemic Disease in Dental Treatment*. St. Louis: The CV Mosby Company; 1983:1-5.
6. Chapter in a book. Rees TD. Dental management of the medically compromised patient. In: McDonald RE, Hurt WC, Gilmore HW, Middleton RA, eds. *Current Therapy in Dentistry*, vol. 7. St. Louis: The CV Mosby Company; 1980:3-7.
7. Agency publication. Miller AJ, Brunelle JA, Carlos JP, Brown LJ, Löe H. Oral Health of United States Adults. Bethesda, MD: National Institute of Dental Research; 1987. NIH publication no. 87-2868.
8. Dissertation or thesis. Teerakapong A. Langerhans' cells in human periodontally healthy and diseased gingiva. [Thesis]. Houston, TX: University of Texas; 1987. 92 p.

Electronic Citations

9. Online journals without volume and page information. Berlin JA, Antman EM. Advantages and limitations of meta-analytic regressions of clinical trials data. ***Online J Curr Clin Trials*** [serial online]. June 4, 1994; doc 134. Accessed July 20, 2000.
10. Online journals with volume and page information. Fowler EB, Breault LG. Ridge augmentation with a folded acellular dermal matrix allograft: A case report. *J Contemp Dent Pract* [serial online]. 2001;2(3):31-40. Available from: Procter & Gamble Company, Cincinnati, OH. Accessed December 15, 2001.
11. Web sites. Centers for Disease Control and Prevention. Preventing emerging infectious diseases: Addressing the problem of antimicrobial resistance. Available at: http://www.cdc.gov/ncidod/emergplan/antiresist/. Accessed November 5, 2001.

TABLES

Tables should be numbered consecutively in Arabic numbers in the order of their appearance in the text. A brief descriptive title should be supplied for each. Explanations, including abbreviations, should be listed as footnotes, not in the heading. Every column should have a heading. Statistical measures of variations such as standard deviation or standard error of the mean should be included as appropriate in the footnotes. Do not use internal horizontal or vertical rules.

FIGURE LEGENDS

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

FIGURES

Digital files must be submitted for all figures.

Instructions to Authors

Submit one file per figure. Multiple panels should be labeled and combined in a single file. Photomicrographs should have internal scale markings. Human subjects must not be identifiable in photographs, unless written permission is obtained and accompanies the photograph. Lettering, arrows, or other identifying symbols should be large enough to permit reduction and must be embedded in the figure file. Figure file names must include the figure number.

Clinical color photographs are encouraged. There is no charge to the author for publication of any figure. Authors are asked to use shades of green, blue, or purple in color graphs. Yellow, red, and orange should be avoided unless scientifically necessary (e.g., to depict species of the orange complex, red complex, etc.).

Authors are strongly encouraged to prepare basic, simple designs that can be clearly understood when reproduced; use of "3-dimensional" graphics is not recommended. Unnecessarily complex designs may be returned for simplification before publication.

Details of programs used to prepare digital images must be given to facilitate use of the electronic image. Use solid or shaded tones for graphs and charts. Patterns other than diagonal lines may not reproduce well.

DIGITAL FILE SPECIFICATIONS

To ensure the highest quality reproduction of your figures, please observe the following recommendations.

Resolution

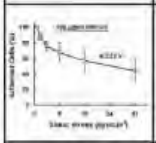
Proper resolution is very important to preserve the quality of your printed figures. The following resolutions must be submitted for your files.

Please do not reduce your figures below a readable size to achieve higher resolution. These files will not be usable.

Format

TIFF or EPS files at the proper resolution (see above) will give the best results. If you cannot produce these files, do not send low-resolution conversions. With all figures, please also send a PDF that can be rasterized in the event your files are not usable.

Word, Excel, PS, and JPEG files can sometimes be acceptable alternatives. Send these along with a PDF if you cannot achieve the proper results in TIFF or EPS format. For graphs and charts, do not use patterned fills. Solid tones or colors are recommended instead.

Line Art (type and line only)	**All Color Images and B/W Combination Halftones** (images and type)	**B/W Halftones** (grayscale with no type or lettering)
		
1000 dpi	**600 dpi**	**300 dpi**

Color Space

Figures should be saved as CMYK, not RGB. Files submitted in RGB will be converted to CMYK, and significant color shift may occur.

Font

Files other than TIFF or JPEG must be saved with fonts embedded. Acceptable fonts include Helvetica, Times New Roman, Symbol, Mathematical PI, and European PI. All other fonts may be replaced, resulting in data loss or realignment.

Other

Please send a PDF with all figure submissions and verify that the PDF and digital versions of your figures are identical. If you have any questions concerning the creation or submission of digital art, please visit the Dartmouth Journal Services Web site at *http://www.dartmouthjournals.com/digart.html* or send an e-mail to perio@dartmouthjournals.com.

UNITS OF MEASUREMENT

Measurements of length, height, weight, and volume should be reported in metric units or their decimal multiples. Temperatures should be given in degrees Celsius and blood pressure in millimeters of mercury. All hematologic and clinical chemistry measurements should be reported in the metric system in terms of the International System of Units (SI). Description of teeth should use the American Dental Association (i.e., Universal/National) numbering system.

STATISTICS

Statistical methods should be described such that a knowledgeable reader with access to the original

Instructions to Authors

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

ANIMAL AND HUMAN TRIALS

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

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

FOOTNOTES

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

IDENTIFICATION OF PRODUCTS

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

REVIEW PROCESS AND PUBLICATION PROCEDURES

Peer Review

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

Copyright

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

Reprints

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

Instructions to Authors

Web Uploading Policies and Instructions

The following information will help in preparing and submitting your manuscript to the *Journal of Periodontology* Web-based peer review system, JOP Manuscript Central™. Also refer to the previous pages for guidelines on preparing and formatting manuscripts.

Submit manuscripts at *http://mc.manuscriptcentral.com/jperio*. You will be able to monitor the progress of your manuscript through the peer review process.

PREPARING AND FORMATTING ELECTRONIC MANUSCRIPTS

Text file: Submission of manuscripts must be in Microsoft Word (.doc). This applies to both Windows and Macintosh platforms. If you are using any other word processing program, you must save the text file as .rtf.

Use basic fonts such as Arial, Courier, Times, or Times New Roman. Special or mathematical characters and Greek letters that are not on a standard keyboard must be created using the Symbol font.

Tables: The system will easily read tables created with Word's table utility or when inserted into Word from Excel.

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

Figures and illustrations: To prevent problems during the review process, figures and illustrations should be submitted only in the following formats:

EPS or TIFF, and at the highest resolution possible (at least 600 dpi for CMYK or halftones [grayscale mode] and 1,000 dpi for line art [bitmap mode]). Any other format might not be readable by a reviewer. Illustrations and graphics for revised manuscripts should be submitted in EPS or TIFF only.

Submit only one file per figure (combine and label panels). If panels are in different formats, save the entire file at the highest applicable resolution (see page 6). Save figures and illustrations with clear and simple file names, such as "Figure 1.tif" or "Fig1.tif." File names should match the labeling that appears in the legends in the text document.

SUBMITTING

For user account information, log on to *Journal of Periodontology* Manuscript Central™ at *http://mc.manuscriptcentral.com/jperio*. Here, you will be able to either create an account or enter an existing account. If you believe you may already have an account, enter your e-mail address in the Password Help box on the right-hand side of the page. If the address you entered is found in the account records, an e-mail will be sent to you at that address containing your User ID and a temporary password.

If you do not have an account in the system, click "Create Account" in the upper right-hand corner. Please fill in all fields accurately. All fields with "req" are required. If a required field does not apply to you, enter "none" or "N/A" in the space provided. When you are finished with a screen, click "Next" to continue to the next screen. When you reach the final screen and all information is entered, click "Finish" to submit your information.

Author Center: To start the submission process, go to the Author Center and click "Click here to submit a new manuscript." The following are explanations of the 7 steps required to submit a manuscript:

Screen 1 – Type, Title, & Abstract. Select a manuscript type from the pull-down menu. Enter the title, running head, and abstract for your manuscript in the appropriate boxes. You can either copy-and-paste your information from your manuscript text file into the box or type it directly into the box. Use the "Special Characters" button for special characters such as Greek letters and mathematical symbols or for formatting such as italics, boldface, or superscript. For example, when you click on the lowercase alpha, the appropriate code for the character appears where your cursor was placed on the previous screen. You can also use the "Preview" button to make sure all the codes are placed in the correct locations. If you are submitting a manuscript that does not require an abstract, please type "N/A" in the abstract box.

Click "Next" when you are finished with this screen.

Screen 2 – Attributes. Enter a minimum of 3 or a maximum of 6 key words or short phrases, drawn from MeSH documentation, into the box. You can either copy-and-paste the key words from your manuscript text file into the box or type them directly into the box. Use the "Special Characters" button for special characters such as Greek letters and mathematical symbols or for formatting such as italics, boldface, or superscript.

Instructions to Authors

Click "Next" when you are finished with this screen or "Previous" to return to the previous screen.

Screen 3 – Authors & Institutions. Your name and institution should be completed and located at the top of the page. Click "Edit" if you need to make any changes to your information. Once your information is correct, you may add co-authors to the paper. Fill in the information under "Add a New Author" for each co-author. After typing in an e-mail address, you may search to see if that person's information is already in the database by clicking "Find." If an e-mail is matched, the information for that author will be displayed. You may make any necessary changes to the institutional information and click "Add to My Authors" to add this author to your paper. If an incorrect author is found, click the "Clear" button to search again. If a match is not found, fill in the required information and click "Add to My Authors." If a specific author has more than one affiliation, follow the link at the bottom of the "Add a New Author" box to add more affiliations. You must click the "+ Add" button for each affiliation. Make sure to click the "Save" checkmark before closing the "Add More Affiliations" screen. Once all authors have been added to the manuscript, click "Next" to proceed to the next screen or "Previous" to return to the previous screen.

Please note that once the *Journal of Periodontology* has received a manuscript, any changes in authorship must be faxed to the editorial office at 312/573-3225 (attn: Bethanne Wilson, Editorial Coordinator) and must contain the signature of the author who has been added or removed from the paper. Authors who are added must submit a conflict of interest and financial disclosure form.

Screen 4 – Reviewers. This step requests you to identify preferred or non-preferred reviewers but is not a mandatory part of the submission process. Fill in the required information and select "Designate as Preferred Reviewer" or "Designate as Non-Preferred Reviewer" as applicable. Once you have entered all information about reviewers, click "Next" to proceed to the next screen or "Previous" to return to the previous screen.

Screen 5 – Details and Comments. In the box provided, you should either copy-and-paste your cover letter/comments or type them directly into the field. Also, you can upload your cover letter/comments by clicking the "Browse" button and selecting a file on your computer. Click the "Attach this Cover Letter" button to attach it to your manuscript. You may also upload your conflict of interest and financial disclosure forms here. Do not attach any files from your manuscript itself in this section.

In the boxes provided, fill in the total number of figures and tables. If there are no figures or tables in your manuscript, please enter "0" in the appropriate box. Your word count should also be entered in this area.

Be sure to read the submission statement and select "yes" from the pull-down menu.

The *Journal of Periodontology* also requires the signatures of all authors on the conflict of interest and financial disclosure form as part of the submission process. If these forms were not uploaded in the previous cover letter area, they may be e-mailed to bethanne@perio.org or faxed to the editorial office at 312/573-3225 (attn: Bethanne Wilson, Editorial Coordinator). You must check the box next to this explanation to acknowledge that you have read it and will provide conflict of interest and financial disclosure forms for each author. This form can be found on JOP Manuscript Central™ (*http://mc.manuscriptcentral.com/jperio*) in the upper right-hand corner under "Instructions & Forms."

Click "Next" to proceed to the next screen or "Previous" to return to the previous screen.

Screen 6 – File Upload. When you upload your manuscript in Microsoft Word format (.doc), the file will automatically be converted to both .PDF and HTML formats. Any figure or illustration will also be converted to .PDF and HTML. A .PDF and HTML proof will be created, combining your document and images.

Follow steps 1 through 4 to upload your manuscript files:

1. Browse to find the desired file.
2. Select the file designation: image file (includes color and grayscale figures; color and black & white line art); main document (includes title page, abstract, key words, text, footnotes, acknowledgments, references, figure legends, and tables); or supplemental file (multimedia or other necessary documents).
3. You may upload as many as 5 files at a time. Repeat steps 1 and 2 for each file.
4. Click "Upload Files." You will see a "file details" window for each file that you have uploaded. On this screen, you are able to write a file tag or caption (if it is an image). Please note that if you have uploaded an image in EPS, TIFF, or JPEG format, it is recommended to place "Fig. 1, Fig. 2," etc. in the captions area for ease of viewing. Once you have done this, click "Save."

Instructions to Authors

You will be brought back to the File Upload (Screen 6), where you can continue uploading files. When you have no additional files to upload, click "Next" to proceed to the final screen or "Previous" to return to the previous screen.

Screen 7 – Review & Submit. Please verify that all screens have been completed (a green checkmark will appear if all required information is completed). You must also preview your .PDF proof before submitting your manuscript. Click the .PDF button at the bottom of the page (Step 7) to preview your manuscript. An option to preview your submission in HTML is also available, but not required. After you have confirmed that all information is correct and have previewed your .PDF proof, click "Submit." Confirmation of your submission will be noted. Print your manuscript ID number. Please include this number on any correspondence you send to the editorial office.

If for any reason you exit the system before completing any screen, you can continue where you left off by logging in, going to the Author Center, and clicking the "Continue Submission" button under "Unsubmitted Manuscripts."

FINALIZING SUBMISSION

If you did not upload a conflict of interest and financial disclosure form for each author during the online submission process, please fax these forms to the editorial office at 312/573-3225 (attn: Bethanne Wilson, Editorial Coordinator).

CHECKING THE STATUS OF YOUR MANUSCRIPT

You can return to your Author Center at any time to check the status of your manuscript (click "Submitted Manuscripts"). Once a decision has been made, you will be notified by e-mail. No hard copy letters will be mailed.

SUBMITTING REVISED MANUSCRIPTS

To submit a revised paper, log on to JOP Manuscript Central™ at *http://mc.manuscriptcentral.com/jperio*. Select Author Center, then "Manuscripts with Decisions." Under the Actions column, click "create a revision" to begin your revision. The manuscript will now be moved to the "Revised Manuscripts in Draft" queue.

Once you have begun your revision, you will be prompted through the following screens:

Screen 1 – View and Respond to Decision Letter. Here you will be able to view the decision letter and comments from the reviewers. In the box below, please place a detailed response to each reviewer comment for the original manuscript. Your response to reviewers should also describe what changes were made in the manuscript to address each comment in the reviews.

Screens 2 – 5 – Please see the above explanations under "Submitting."

Screen 6 – Please upload your revised manuscript files. All files uploaded with your original submission will be included on this screen. Include only the latest set of files. If you have updated a file, please delete the original version and upload the revised file. Please note that even if your figures have not been revised, they should be resubmitted with your revised manuscript.

Screen 7 – Please confirm that all information is correct and that you have previewed your .PDF proof before submitting.

Once you have submitted your revised manuscript, you will receive a confirmation e-mail message from the system when your revised paper has been successfully uploaded and received in the editorial office.

MANUSCRIPTS ACCEPTED FOR PUBLICATION

If your manuscript is accepted for publication, all authors must complete a copyright form, which can be found at *http://mc.manuscriptcentral.com/jperio* under "Instructions & Forms" in the upper right-hand corner of the screen. A file containing this form also accompanies the acceptance e-mail. Please fax this form to the editorial office at 312/573-3225 (attn: Bethanne Wilson, Editorial Coordinator). You will be notified about a publication date by the Managing Editor.