

Natália de Campos

***Influência do plasma rico em plaquetas
derivado do aspirado de medula óssea na
cicatrização de defeitos periodontais.
Estudo histológico, histométrico e
imunoistoquímico em ratos***

ARAÇATUBA –SP

2014

Natália de Campos

***Influência do plasma rico em plaquetas
derivado do aspirado de medula óssea na
cicatrização de defeitos periodontais.
Estudo histológico, histométrico e
imunoistoquímico em ratos***

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

Orientadora: Professora Adjunto Maria José Hitomi Nagata

ARAÇATUBA - SP

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da FOA / UNESP

C198i	Campos, Natália de. Influência do plasma rico em plaquetas derivado do aspirado de medula óssea na cicatrização de defeitos periodontais : estudo histológico, histométrico e imunoistoquímico em ratos / Natália de Campos. - Araçatuba, 2014 88 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba Orientadora: Profa. Maria José Hitomi Nagata 1. Plasma rico em plaquetas 2. Medula óssea 3. Cimento dentário 4. Periodontia 5. Cicatrização I. T. Black D7 CDD 617.64
-------	--

Dados Curriculares

Natália de Campos

Nascimento: 09.12.1984 – Araçatuba/SP

Filiação: Edson Luiz de Campos
Rosmeire Aparecida Mir de Campos

2004-2008: Curso de Graduação em Odontologia
Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP

2008-2010: Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área
de Periodontia – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho” – UNESP

2011-2014: Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia,
Área de Periodontia, Faculdade de Odontologia de Araçatuba –
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP

Dedicatória

À Deus

Agradeço em primeiro lugar à Deus por todas as minhas conquistas, pois sem as suas bênçãos eu jamais poderia alcançá-las. Também quero agradecer por todas as pessoas que o Senhor enviou-me e que muito me ensinaram no decorrer da minha vida.

Quero agradecer ao Senhor também por ter colocado tantas barreiras na minha vida, embora muitas vezes as considere injustas e até mesmo muito cruéis, mas de alguma forma eu sempre senti a presença do Senhor.

Sempre estive ao meu lado, me dando forças para que eu pudesse continuar...mesmo em momentos que parecia que eu não seria capaz, o Senhor nunca me deixou perder a esperança!

Não tenho palavras para expressar meu amor por Ti...

O Senhor me mostrou que milagres existem, mostrando-os em minha família! Jamais poderei esquecer os seus ensinamentos! O Senhor me ensinou o valor e a grandeza da vida! Embora eu achasse que eu a tivesse, o Senhor me ensinou o que é ter fé! O Senhor me ensinou o que é o verdadeiro amor incondicional.

Obrigada também por abençoar sempre as minhas mãos, para que na profissão de Cirurgiã-dentista eu seja capaz de cuidar de meus pacientes.

Obrigada por me dar saúde, força, responsabilidade e uma família maravilhosa que permitiu que eu estudasse. Hoje estou concluindo meu curso de Doutorado com a Tua graça. Sem Ti hoje nada eu seria!

“Existem apenas duas maneiras de ver a vida. Uma é pensar que não existem milagres e a outra é pensar que tudo é um milagre.”

Albert Einstein

Aos meus queridos cunhados, **Edson** (*in memorian*) e **Marcel** (*in memorian*)

Vocês fizeram parte dos melhores anos da minha vida!! Jamais pude imaginar que hoje estaria aqui sem vocês, que vocês não participariam da minha defesa e de tantos outros momentos importantes na minha vida. O sofrimento é tão intenso, que fica complicado até para compartilhar, faltam palavras para expressá-lo.

Vocês sempre serão como irmãos mais velhos para mim. Sempre cuidaram tão bem de mim! Estarão sempre vivos dentro do meu coração e em minhas lembranças! É muito difícil aceitar que não tenho mais vocês aqui comigo, mas a vida é assim! Aprendi que a morte é a única coisa na vida em que não podemos voltar atrás!

Agradeço à Deus por ter colocado vocês em meu caminho! E mesmo em tão pouco tempo que vivemos juntos, vocês se tornaram essenciais em minha vida! E hoje gostaria de dedicar este trabalho à vocês! Que participaram e lutaram junto comigo durante o meu curso de Doutorado! E creio que hoje vocês estão aqui comigo de alguma forma, recebendo os meus mais sinceros agradecimentos por tudo. Amo muito vocês!

**“A grandeza de uma pessoa não se mede pelo espaço que ela ocupa em
nosso coração, mas sim pelo vazio que deixa quando está distante.”**

Aos meus pais, **Edson e Rose**

Mãe,

Hoje sei que estou realizando um sonho seu. Imagino o quanto você deve estar feliz hoje. Obrigada por todo o seu apoio e o seu amor durante a minha trajetória até aqui. Você é o meu lado racional! Jamais teria conseguido chegar até aqui sem você! Te amo muito. A melhor mãe do mundo!

Pai,

Obrigada por sempre me deixar livre para que eu pudesse fazer minhas escolhas. Mesmo as idéias mais loucas você estava sempre ali me apoiando, mesmo discordando por dentro. Você também foi essencial na minha trajetória até aqui! Ouvindo meus choros e minhas alegrias sempre! Sei que para conseguir estar aqui hoje, você fez o possível e até o impossível! Amo você!

Vocês,

São únicos! Meu maior tesouro...

São meu alicerce, meu porto-seguro...

Aqueles que serão eternos em minha vida...

Os responsáveis para que eu pudesse estar aqui hoje...

Acreditaram em mim quando eu não tinha esperanças...

Deram-me asas e me fizeram voar...

Amo incondicionalmente vocês!!!!

“Um amor mais forte do que tudo, mais obstante que tudo, mais duradouro que tudo, é somente o amor dos meus pais”

Aos meus avós maternos **Rachid e Amabile** e
paternos **Renato (*in memorian*) e Isabel**

A vocês que sempre me cercaram com muito carinho e amor, que sempre fazem todas as minhas vontades, que sempre me dão tudo sem pedir nada em troca. Que Deus os abençoe cada dia mais e me dê a benção de tê-los sempre comigo, me passando as suas experiências, me ouvindo com carinho, me aconselhando. Que eu sempre possa receber o amor de vocês. Muito obrigada! Amo vocês eternamente!

Avós,

Sempre me trouxeram sabedoria e experiência,
Amor e carinho sempre recebi em seus braços
Que Deus continue abençoando a vida de vocês com muita saúde
Seremos eternamente inseparáveis...nosso amor é eterno!!

“Um velho amor, sempre novo”

Ao meu noivo **Alberto**

Dedico esse trabalho à você também! Você que teve tanta paciência comigo durante este período. Soube entender os momentos em que estive ausente e me estimulou sempre que eu estava desanimada.

Sempre estive ao meu lado ouvindo minhas histórias de lamentações e de vitórias, mesmo sem saber muitas vezes do que eu estava falando!

E não posso deixar de agradecer quantas vezes você ficou assistindo minhas apresentações, me corrigindo e até decorando tudo o que eu tinha que falar.

Você é o meu ponto de equilíbrio! O grande amor da minha vida! E embora tivemos que passar por momentos muito difíceis, nós sempre estivemos um ao lado do outro. Firmes um para o outro. E a cada dia que passa eu tenho mais certeza de que encontrei o homem da minha vida. O meu príncipe encantado. Você é meu presente de Deus. Amo você!

“Porque quando Deus me mostrou você sabia a porção exata do que faltava em mim...”

Ao meu querido sobrinho **Leonardo**

Você mudou minha vida. Uma criança especial, tão especial que todos os que convivem com você percebem o seu diferencial. Uma criança de apenas 05 anos com a sensibilidade de um adulto.

Amo a sua pureza e ingenuidade! Adoro quando você brinca de ser meu aluninho e até faz anotações assistindo as aulas...

Jamais poderia imaginar minha vida sem você. Mas Deus nunca deixou que eu duvidasse! Enquanto muitos duvidavam eu nunca senti que iria te perder. E hoje você é a prova viva de um milagre de Deus. Uma criança linda, perfeita e saudável! O alicerce da nossa família! O meu grudinho! E eu jamais teria chegado até aqui hoje se eu não tivesse você comigo! Você é a minha luz!

Ainda vamos aprontar muita coisa juntos nessa vida! Amo você!

**“The sun goes down, the stars come out and all that counts is here
and now. My universe will never be the same. I'm glad you came.”**

The wanted

Às minhas queridas irmãs, **Priscila e Thaís**

Irmãs são dádivas de Deus... e hoje nossa união e amizade é muito maior do que a gente poderia imaginar. Muito obrigada por todo o cuidado que vocês tiveram comigo durante toda a minha vida. Obrigada por sempre estarem torcendo por mim e me aconselhando com as suas experiências e sabedoria.

Vocês foram essenciais para que eu pudesse estar aqui hoje! Vocês são a minha fortaleza! São a certeza de que nunca estou sozinha, de que tenho eternas amigas em quem posso confiar, afinal somos irmãs. Brigamos, nos amamos, nos entendemos e nos desentendemos, e por tudo isso, hoje sou uma pessoa melhor, porque vocês dividiram tudo comigo. Palavras são insuficientes para descrever o valor que vocês têm para mim!! Somos pessoas diferentes, mas amor que nos une é um só!!!

“Ter uma irmã é como ter uma melhor amiga que você não pode se libertar. Você sabe que não importa o que você faça, elas sempre estarão lá”

Aos meus queridos sogros, Hideyassu e Emy

Muito obrigada por cada conselho, por cada conversa e principalmente pelo amor de vocês. Vocês são exemplo de força para mim. Saibam que tenho uma admiração muito grande por vocês e que tiveram um papel essencial na minha caminhada até aqui. Eu tenho a sorte de ter uma sogra e um sogro que eu posso sentir a liberdade de conviver com vocês como se fossem meus pais. Obrigada por sempre cuidarem de mim como se eu fosse uma filha! E hoje vocês também fazem parte desta vitória. Amo muito vocês. Um grande beijo da “gaijin” de vocês!

**“O amor que há numa grande amizade, é como a luz do dia...
clareia o pensamento, anima o coração e enche a vida de alegria”**

Agradecimento
Especial

A minha orientadora Professora Dr^a. **Maria José Hitomi Nagata**

Hoje estou chegando ao final da minha temporada aqui na Periodontia. Começamos a trabalhar juntas em 2006 e eu jamais imaginei que estaria aqui hoje concluindo o meu doutorado. Parecia tudo tão longe e hoje o meu dia chegou! Durante essa caminhanda ensinou-me muitos detalhes que eu não conseguia ver sozinha! A senhora estava sempre ali para me ensinar.

Obrigada por permitir que eu tentasse realizar meu sonho de fazer o doutorado sanduíche e ter visto tudo com tanto carinho e competência. E mesmo quando tudo estava por água abaixo, a senhora nunca me estimulou a desistir. Sempre me ouviu e deixou que eu decidisse com o meu coração. Agradeço pela liberdade e apoio que a senhora me deu.

Sei que minha ausência de alguma forma te sobrecarregou, mas a senhora me deu o tempo necessário para que eu pudesse me restabelecer! Permitiu que eu conseguisse fazer isso. Desculpe pelas minhas falhas e falta de atenção, mas saiba que sempre fiz tudo com muito amor e carinho!

Lágrimas correm no meu rosto porque vou sentir muito a sua falta na correria do nosso dia a dia. Hoje saio daqui levando não só a melhor orientadora que podia ter, mas uma amiga muito especial. Amo você! Jamais poderei agradecer o suficiente tudo o que fez por mim!

“A vida é como uma viagem de barco, subindo e descendo conforme o balanço das ondas. Graças aos amigos, não se perde o horizonte. E quando se naufraga, a amizade é a âncora que te apoia enquanto buscas um novo rumo.”

Agradecimientos

“Quem caminha sozinho pode até chegar mais rápido, mas aquele que vai acompanhado com certeza chegará mais longe e terá a indescritível alegria de compartilhar, alegria esta que a solidão nega a todos que a possuem.”

Autor desconhecido

A MINHA SINCERA GRATIDÃO. . .

Ao querido Professor Dr. **Alvaro Francisco Bosco**

Não canso de dizer que o senhor fez eu me apaixonar pela Periodontia. O meu orientador na graduação, que sempre me ensinou com muita paixão, pois ama o que faz e isso nos contagia. No meu curso de Doutorado minha admiração pelo senhor só aumentou. Obrigada por cada quarta-feira que o senhor se dedicou para que eu pudesse aprender cada vez mais sobre Periodontia. Quando eu paro para pensar eu me sinto orgulhosa por ter aprendido com o melhor, o senhor. Cada detalhe que senhor me ensinou eu tentei guardar com muita dedicação.

Admiro muito o senhor como profissional, mas não poderia deixar de falar da sua pessoa. Uma das pessoas mais honestas, corretas e simples que já conheci. O senhor não imagina o quanto me ensinou pessoalmente em todos esses anos. Não existem palavras para que eu possa agradecer tudo o que fez por mim. E nos momentos mais difíceis da minha vida o senhor me estendeu a mão. Jamais me esquecerei disso! Muito obrigada pela sua amizade!

Ao querido Professor Dr. **Valdir Gouveia Garcia**

E hoje estou terminando mais uma maratona. E o senhor tem grande parte nisso! Lembro muito bem quando o senhor me estimulou a fazer o curso de Doutorado.

Agradeço muito por cada conversa que o senhor teve comigo, o seu carinho e empenho para que eu sempre tivesse o melhor. Sempre vibrando com as minhas alegrias e também preocupado em saber se estava tudo certo! Tenho muita admiração pelo senhor! Muito obrigada por tudo!

Aos queridos Professores e amigos **Flávia Furlaneto e Michel Messor**
Hoje vocês são um só e para mim fica difícil separá-los. Não tenho palavras para agradecer tudo o que vocês representam para mim. Vocês são um casal de ouro. Tudo o que sei hoje foi você quem me ensinou Michel. E você Flavinha sempre esteve ao meu lado me apoiando e me aguentando te enchendo com minhas dúvidas do doutorado sanduíche. Vocês foram pessoas fundamentais desde minha iniciação científica! Nunca mediram esforços para me ajudar! Saibam que vocês tem minha eterna gratidão tanto na parte profissional como pessoal. Vocês são amigos especiais que encontrei aqui durante a minha caminhada! Muito obrigada pelo apoio de vocês!

Ao querido Professor **Antonio Moretti**

Um anjo de Deus. Acho que para mim essa seria a melhor forma de descrevê-lo. Muito obrigada por ter me recebido tão bem, mesmo sem me conhecer. Sempre muito preocupado comigo!

O Conheci por pouco tempo, mas foi o suficiente para saber a pessoa maravilhosa que o senhor é. Uma pessoa muito simples e amiga! Espero um dia poder retribuir a forma que fui bem tratada enquanto estive aí, além de toda ajuda, muitas vezes antes mesmo que pedisse, o senhor já se dispunha a me ajudar. Receba a minha sincera gratidão por tudo e principalmente por ter entendido a minha ausência!

Ao querido Professor **Edilson Ervolino**

Se eu tivesse que defini-lo em uma palavra, seria cumplicidade! O senhor nunca se negou a nos ajudar, muito pelo contrário. Sempre que eu fazia algo errado eu não hesitava em te chamar, pois eu sabia que o senhor saberia como consertar. E nunca me desapontou! Rs Sei que nesses anos que trabalhamos juntos encontrei um grande amigo! Muito obrigada por todos os ensinamentos e pelas nossas conversas! Obrigada por seu apoio nos momentos mais difíceis da minha vida. Obrigada por sua dedicação em nos ajudar sempre com perfeição. Professores como o senhor são poucos! Muito obrigada!

Ao querido Professor **Juliano Milanezi**

Nosso contato durante meu curso de doutorado aumentou e eu pude conhecer melhor essa pessoa tão especial. Obrigada por sua dedicação nas clínicas de quarta, por todos os ensinamentos que me passou. Eles foram essenciais para o meu o meu crescimento e aprendizado! Foi uma honra trabalhar com você durante esses anos.

À querida Professora **Letícia Theodoro**

Sempre animada e ligada no 220v nos contagiando. Sempre nos estimulando no dia a dia na perío. Muito obrigada pelos seus ensinamentos durante o decorrer desses anos. Agradeço também pela sua amizade.

Ao querido Professor **Michel Saad**

Obrigada por cada palavra de estímulo que recebi do senhor. Sempre sorrindo, nos trazendo paz e serenidade. Obrigada por fazer com que eu estivesse aqui hoje concluindo meu Doutorado!! O senhor tem grande parte nisso!

Aos meus tios **Robson e Selma, Dinho e Rosana, Jair e Gislaine**

Obrigada por todo o carinho e por compartilharem sempre minhas conquistas e alegrias. Amo muito vocês!!! Deus os abençoe!

Aos meus **primos**

Crescemos juntos, sonhamos juntos e aqui estamos! Compartilhando mais uma vitória...obrigada por contribuírem para que eu chegasse hoje aqui!

Aos meus cunhados **Paula e Hideki** e a querida sobrinha **Carol**

Obrigada por todo apoio e carinho que foram dedicados a mim durante todos esses anos. Vocês são especiais.

À minha querida **Batian**

Obrigada pela torcida e por sempre me apoiar, me mimar e me receber com um sorriso no rosto. Amo você!

À amiga **Nilva**

Minha amiga querida desde o início da Faculdade, e nossa amizade é tão forte que nem mesmo a distância conseguiu nos separar!! Sinto muito a sua falta!! Obrigada pela sua amizade, carinho, compreensão e toda a ajuda para que estivesse hoje aqui!!

À amiga **Carol**

Uma grande amiga que tive a honra de conhecer. Minha companheira de pilates, de imuno, de viagem, de gordices, de muito trabalho e também de muitas alegrias! Amiga para todas as horas!! E não posso deixar de dizer sobre as inúmeras vezes que você me salvou na formatação de textos!! Com o passar dos anos nos tornamos cada vez mais próximas e pude constatar a pessoa honesta,

competente e amiga que você!! Muito obrigada por cada etapa que você me ajudou e esteve ao meu lado!! Você é uma amiga muito especial!

Às amigas de infância **Juliana, Milene, Milena, Lilian e Eloá**

Muito obrigada por todos esses anos de amizade! Por permitirem que eu não ficasse alienada com os meus afazeres! Sei que mesmo que os caminhos percorridos por nós devido à vida sejam diferentes, nossos corações sempre estarão entrelaçados. Amo vocês...

À amiga **Renata**

Você sempre esteve ao meu lado em todos os momentos difíceis, os de crise e também nos momentos de alegria. Sempre alegre e com um sorriso no rosto, fazendo com que eu fosse adiante. Mesmo sem gostar da área da saúde ficava em casa ouvindo minhas histórias de ratinhos, meus trabalhos, sempre mostrando entusiasmo para me ajudar! Obrigada pela sua amizade!! Você sempre será minha amiga irmã!

À amiga **Natália Pola**

Jamais terei como agradecer toda a ajuda, todas as gargalhadas, todas lágrimas derramadas, todos cansaços que passamos juntas, nossas viagens, nossos estudos, nossas conquistas...enfim tudo o que passamos nesta caminhada. Obrigada por toda a ajuda não só nesse trabalho, mas em tudo o que precisei durante o meu Doutorado. Desejo muito sucesso à você! Você merece!

Aos amigos **Michyele e Luis**

Muito obrigada pelos ensinamentos que vocês me proporcionaram. Obrigada pela dedicação para que eu aprendesse cada detalhe desta metodologia. Vocês são amigos especiais.

Ao amigo **Erivan**

Um grande amigo que ganhei dentro da Periodontia. Sempre me aconselhando, me ajudando a amadurecer. Obrigada por todos os ensinamentos, por doar tudo o que você tinha para que eu conseguisse tocar meu projeto. Sempre disposto a me ajudar para que eu conseguisse o melhor. Passamos por muitas fases parecidas durante o doutorado e isso nos aproximou. E ver você no 220v para que o seu sonho se tornasse realidade, fazia com que eu tivesse energia para ir atrás do meu sonho também! Você foi e é um amigo muito especial. Sinto muito a sua falta aqui. As caronas da rodoviária, os jantares, as imunos e nossos almoços corridos, nossos papos de viagem, enfim cada momento que passamos juntos. Você foi essencial para que eu estivesse aqui hoje! Desejo muito sucesso e que seus objetivos sejam alcançados. Você é especial!

Ao professor e amigo **Leandro**

Alguns anos já se passaram e mesmo longe você sempre se manteve presente. Seu carinho pela Periodontia mostrou-se eterno. Muito obrigada por sempre estar disponível e pela sua amizade.

À amiga **Vivian**

A “mamãe” da perio. A mais chorona e sensível!! Chegou sem conhecer ninguém e com o seu jeitinho foi conquistando a todos. Entrou e vestiu a camisa dentro da Periodontia, muitas vezes deixando seus afazeres na sua casa para nos ajudar. Muito obrigada pela a sua amizade, pelas nossas viagens, pela a sua ajuda na clínica (e suas dicas), pelos jantares deliciosos. Você é uma amiga muito especial para mim! Conte sempre comigo!

À amiga **Paulinha**

É interessante como convivemos tanto tempo juntas e demoramos tanto para nos tornarmos próximas! Talvez por você ser a pinsher e eu o pit bul?!?! Rs Tenho

muita admiração por você! Vejo em você uma pessoa muito íntegra e de caráter! Sempre disposta a ajudar, mesmo em situações em que você não tinha condições, você nunca deixou de me estender a mão. Obrigada por sempre sorrir e chorar junto comigo! Deixo aqui meus sinceros agradecimentos à você por toda a sua ajuda, sua amizade e principalmente pelos ensinamentos no micrótomo! rs Você é um presente que ganhei durante a minha convivência na perío!

Aos amigos **Samuel e Daniel**

Obrigada pela convivência, amizade e disposição em sempre me ajudar!

À amiga **Mariélen**

A minha grande companheira de micrótomo! Não só companheira, como também professora. Obrigada pela sua paciência em me ensinar cada detalhe durante o meu curso aqui! Ficamos muito próximas durante o meu doutorado e pude conhecer uma amiga especial que você! Muito obrigada pela sua amizade e pela convivência com você que sempre foi muito especial! Obrigada por cada sorriso seu que sempre tornava os meus dias mais alegres!!

Aos colegas de pós-graduação **Adrieli, Naida e Fabrizio**

Nosso tempo de convivência na Periodontia foi curto, mas foi o suficiente para nos tornarmos amigos. Muito obrigada pela convivência. Desejo muito sucesso à vocês que estão no início desta caminhada!

Ao Dr. **Mário** e à Sra. **Hermínia Nagata**

Obrigada pelo carinho e por sempre me receberem tão bem!! Vocês são especiais para mim!

Ao Dr. **Stephen Fucini**

Um professor muito querido e que tenho muita admiração! Sempre de bom humor e disposto a me ensinar. Muito obrigada pelo carinho e disposição, pois mesmo estando de férias fazia questão de mostrar diversos casos clínicos para que eu pudesse aprender! Também sempre disposto a corrigir meus artigos e resumos, com suas valiosas sugestões! Uma pessoa honesta, competente, alegre e muito humilde. Muito obrigada por cada dia que convivemos juntos!

Ao Sr. **Odair**

Muito obrigada pela companhia e ajuda durante as clínicas!! E não poderia me esquecer dos lanchinhos!! O senhor também faz parte da minha história aqui!

Ao funcionário e amigo **Joilson**

Muito obrigada pela convivência, por sempre estar me ajudando e ensinando com um sorriso no rosto!! Saiba que você tem o meu reconhecimento!

Uma pessoa muito dedicada, simples, inteligente e sempre disposta a ajudar! Sempre vá em busca de seus ideais porque você é um garoto de ouro! Você vai longe!

À Profa. **Suely Bomfim**

Em você encontrei uma amiga muito especial. Sempre com um sorriso no rosto para me receber, deixando os meus dias mais leves!! A bondade e paciência são as suas características principais, além de ser uma profissional muito dedicada e competente! Sempre preocupada com os seus alunos! Adorava as festinhas que a senhora sempre fazia para que pudéssemos ter alguns momentos de descontração em meio a tanto trabalho! Você é uma pessoa mais que especial que tive a honra de conhecer e trabalhar junto....sem seu esforço e dedicação jamais estaria aqui hoje, muito obrigada por toda a ajuda proporcionada e pela sua amizade... sempre fez com que nossos momentos fossem bons como

sonhos....meu eterno carinho, reconhecimento e agradecimento por tudo o que a senhora fez por mim e por este trabalho!!!

Ao Professor **Mário Taba Jr.**

Obrigada por toda a ajuda em meu trabalho experimental, colocando seu laboratório à disposição para que tudo fosse feito com perfeição!!

À colega **Viviane Mariguela**

Obrigada por sua dedicação e paciência em me ensinar novas metodologias.

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

Ao Programa de Pós-graduação em Odontologia, nas pessoas de sua Coordenadora Profa. Dr^a. **Maria José Hitomi Nagata** e de todo corpo docente.

Aos colegas do Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Aos funcionários da Disciplina de Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP por todo apoio e ajuda nas diversas etapas deste trabalho.

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, minha sincera gratidão por sempre atenderem aos meus pedidos com carinho, paciência e principalmente eficiência.

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

eficientes em tudo o que precisei, sempre sorrindo!!! Fundamentais para a realização de nosso trabalho aqui!

Aos funcionários e professores do Departamento de Ciências Básicas, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, por sempre me acolherem tão bem.

Aos funcionários do Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, **Camilo, João Batista** e **Alan**. Obrigada pela prontidão em ajudar!!

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

A todos os alunos de graduação e funcionários da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, pela convivência tão agradável e enriquecedora!

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

Aos animais que, não tendo escolha, simplesmente dispõem-se.

Epígrafe

“É necessário abrir os olhos e perceber que as coisas boas estão dentro de nós, onde os sentimentos não precisam de motivos nem os desejos de razão. O importante é aproveitar o momentos e aprender sua duração, pois a vida está nos olhos de quem souber ver”

Pedro Bial

Resumo

Resumo

CAMPOS, N. **Influência do plasma rico em plaquetas derivado do aspirado de medula óssea na cicatrização de defeitos periodontais. Estudo histológico, histométrico e imunoistoquímico em ratos** [tese]. Araçatuba: UNESP – Univ. Estadual Paulista; 2014.

Este estudo avaliou a influência do plasma rico em plaquetas derivado do aspirado de medula óssea (PRP-bma) na cicatrização de defeitos de fenestração periodontal (PFD) em ratos. PFD foram criados cirurgicamente na mandíbula de 40 ratos. Os animais foram divididos randomicamente em 2 grupos: C e PRP-bma – os defeitos foram preenchidos com coágulo sanguíneo ou PRP-bma, respectivamente. Os animais foram submetidos à eutanásia aos 10 ou 30 dias pós-operatórios. Foram realizadas análises histológica, histométrica e imunoistoquímica. A porcentagem de novo osso (NB), densidade do novo osso formado (DNB), novo cemento (NC) e extensão do defeito remanescente (ERD) foram avaliados histometricamente. Foram realizadas reações imunoistoquímicas para detecção de antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), sialoproteína óssea (BSP), osteocalcina (OCN) e fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP). Células imunomarcadas foram quantificadas. Os dados foram analisados estatisticamente (ANOVA; Tukey, $P < 0,05$). Aos 10 dias, os grupos C e PRP-bma apresentaram quantidades similares de NB e DNB, e não foi observada formação de NC. Aos 30 dias, os grupos C e PRP-bma apresentaram quantidades similares de NB e DNB; o Grupo PRP-bma mostrou significativa formação de NC, com fibras colágenas inseridas obliquamente ou perpendicularmente à superfície radicular, sendo que nenhum espécime do Grupo C apresentou formação de NC. O Grupo PRP-bma apresentou um número significativamente maior de células PCNA-positivas (aos 10 dias) e BSP-positivas (aos 10 e 30 dias) que o Grupo C. Não foram observadas diferenças significativas no número de células

OCN-positivas ou TRAP-positivas entre os grupos aos 10 ou 30 dias. Pode-se concluir que o PRP-bma promoveu formação de NC com ligamento periodontal funcional.

Palavras-chave: Plasma rico em plaquetas; medula óssea; cimento dentário; periodontia; cicatrização.

Abstract

Abstract

CAMPOS, N. **Influence of platelet-rich plasma derived from bone marrow aspirate on the healing of periodontal fenestration defects. A histologic, histometric and immunohistochemical study in rats** [thesis]. Araçatuba: UNESP – Univ. Estadual Paulista; 2014.

This study evaluated the influence of platelet-rich plasma derived from bone marrow aspirate (PRP-bma) on the healing of periodontal fenestration defects (PFD) in rats. PFD were surgically created in the mandible of 40 rats. The animals were randomly divided into 2 groups: C and PRP-bma – defects were filled with blood clot or PRP-bma, respectively. Animals were euthanized at either 10 or 30 days post-operative. Histologic, histometric and immunohistochemical analyses were performed. Percentage of new bone (NB), density of newly formed bone (DNB), new cementum (NC) and extension of remaining defect (ERD) were histometrically evaluated. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA), bone sialoprotein (BSP), osteocalcin (OCN), and tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) immunohistochemical staining were performed. Immunolabeled cells were quantified. Data were statistically analyzed (ANOVA; Tukey, $P < 0.05$). At 10 days, groups C and PRP-bma presented similar amounts of NB and DNB, NC formation was not observed. At 30 days, groups C and PRP-bma presented similar amounts of NB and DNB; Group PRP-bma showed significant NC formation, with collagen fibers inserted obliquely or perpendicularly to the root surface, while NC formation was not observed in any Group C specimen. Group PRP-bma presented a significantly higher number of PCNA-positive (at 10 days) and BSP-positive cells (at 10 and 30 days) than Group C. No significant differences in the number of either OCN-positive or TRAP-positive cells were observed between groups at 10 or 30 days. It can be concluded that PRP-bma promoted NC formation with a functional periodontal ligament.

Key words: Platelet-rich plasma; bone marrow; dental cementum; periodontics; healing.

Lista de Figuras

Lista de Figuras

- Figura 1 - Ilustração esquemática do defeito de fenestração periodontal 75
criado cirurgicamente. (a) Vista vestibular; (b) Corte transversal.
- Figura 2 - Tecido ósseo imaturo preenchendo parcialmente o defeito 76
periodontal no Grupo C (a); tecido ósseo imaturo preenchendo completamente os defeitos periodontais no Grupo PRP-bma (b), aos 10 dias pós-operatórios. Completo fechamento dos defeitos periodontais com tecido ósseo neoformado nos grupos C (c) e PRP-bma (d), aos 30 dias pós-operatórios. H&E, aumento original 40x. Scale Bar = 250 μ m. CT: tecido conjuntivo; DE: dentina; NB: novo osso; cabeças de setas: superfície radicular que foi alisada.
- Figura 3 - Fina rede de fibras colágenas na superfície radicular nos 77
grupos C (a) e PRP-bma (b), aos 10 dias pós-operatórios. Notar a deposição de matriz semelhante ao cementóide no Grupo PRP-bma (asterisco branco). Grande quantidade de fibras colágenas orientadas paralelamente à superfície radicular no Grupo C (c); fibras colágenas inseridas e orientadas obliquamente ou perpendicularmente à superfície radicular no Grupo PRP-bma (d), aos 30 dias pós-operatórios. Notar a deposição de novo cimento no Grupo PRP-bma (asteriscos pretos). H&E, aumento original 1000x. Scale Bar = 25 μ m. Asterisco branco: matriz semelhante ao cementóide; asteriscos pretos: novo cimento; DE: dentina; PL: ligamento periodontal.

Lista de Figuras

- Figura 4 - Padrão de imunomarcção para PCNA, BSP, OCN e TRAP no defeito periodontal. Fotomicrografias evidenciando células PCNA-positivas nos grupos C (a) e PRP-bma (b), aos 10 dias pós-operatórios, e grupos C (c) e PRP-bma (d), aos 30 dias pós-operatórios. Fotomicrografias evidenciando células BSP-positivas nos grupos C (e) e PRP-bma (f), aos 10 dias, e grupos C (g) e PRP-bma (h), aos 30 dias. Fotomicrografias evidenciando células OCN-positivas nos grupos C (i) e PRP-bma (j), aos 10 dias, e grupos C (k) e PRP-bma (l), aos 30 dias. Fotomicrografias evidenciando células TRAP-positivas nos grupos C (m) e PRP-bma (n), aos 10 dias, e grupos C (o) e PRP-bma (p), aos 30 dias. Scale bar = a-l = 20 μ m; m-p = 30 μ m. PCNA, antígeno nuclear de proliferação celular; BSP, sialoproteína óssea; OCN, osteocalcina; TRAP, fosfatase ácida resistente ao tartarato; CT, tecido conjuntivo; NB, novo osso; cabeças de setas pretas: células imunomarcadas. 78
- Figura 5 - Valores percentuais médios e desvios-padrão (média $\pm$ DP) das medidas ERD, NB, DNB e NC, com comparações inter-grupos, aos 10 (a) e 30 (b) dias pós-operatórios. *: $P < 0,05$. ERD, extensão remanescente do defeito; NB, novo osso; DNB, densidade do novo osso; NC, novo cimento. 79

Lista de Tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Médias e desvios-padrão das células PCNA-positivas, BSP-positivas, OCN-positivas e TRAP-positivas aos 10 e 30 dias pós-operatórios, com comparação inter-grupos e intra-grupos.	80
--	----

Lista de Anexos

LISTA DE ANEXOS

Anexo A -	Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEa)	82
Anexo B -	Normas para publicação segundo o periódico <i>Journal of Periodontology</i>	83

*Lista de
Abreviaturas
e Siglas*

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	=	Análise de variância
ATD	=	Área total do defeito
BMA	=	Aspirado de medula óssea
BSP	=	Sialoproteína óssea
C	=	Controle
CEEA	=	Comissão de Ética na Experimentação Animal
CNPq	=	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DE	=	Dentina
DNB	=	Densidade de novo osso
DP	=	Desvio-padrão
EDTA	=	Ácido etilenodiaminotetracético
LED	=	Extensão linear do defeito
LER	=	Extensão linear remanescente
ERD	=	Extensão remanescente do defeito
<i>et al.</i>	=	<i>et alii</i>
GFs	=	Fatores de crescimento
Fig.	=	Figura
H&E	=	Hematoxilina e eosina
Ltda	=	Limitada
M	=	Molar
mg/Kg	=	Miligrama por quilograma
Min.	=	Minuto
ml	=	Mililitro

mm	=	Milímetro
MSCs	=	Células-tronco mesenquimais
n°	=	Número
NBMC	=	Células nucleadas da medula óssea
NC	=	Novo cimento
NB	=	Novo osso
OCN	=	Osteocalcina
PDGF	=	Fator de crescimento derivado de plaquetas
pH	=	Potencial hidrogeniônico
PL	=	Ligamento periodontal
PPP	=	Plasma pobre em plaquetas
PRP	=	Plasma rico em plaquetas
PRP-bma	=	Plasma rico em plaquetas derivado do aspirado de medula óssea
PRP-pb	=	Plasma rico em plaquetas derivado do sangue periférico
PCNA	=	Antígeno nuclear de proliferação celular
PFD	=	Defeito de fenestração periodontal
TC	=	Tecido conjuntivo
TRAP	=	Fosfatase ácida resistente ao tartarato
TGF- β	=	Fator de crescimento transformador- β
μ l	=	Microlitro
μ m	=	Micrometro
UNESP	=	Universidade Estadual Paulista
USP	=	Universidade de São Paulo
VEGF	=	Fator de crescimento endotelial vascular

Lista de Símbolos

LISTA DE SÍMBOLOS

β	=	Beta
@	=	Arroba
n	=	Tamanho da amostra
P	=	Probabilidade do valor do teste
°C	=	Graus Celsius
%	=	Por cento
G	=	Gravidade
x	=	Vezes
<	=	Menor
>	=	Maior
=	=	Igual
*	=	Asterisco
®	=	Marca Registrada
TM	=	<i>Trade Mark</i>
+	=	Mais
-	=	Menos

Sumário

SUMÁRIO

Manuscrito para publicação	48
Página de título	49
Resumo	50
Introdução	51
Material e Método	53
Resultados	58
Discussão	61
Agradecimentos	65
Referências	66
Anexos	81

Manuscrito para Publicação[☆]

[☆]Segundo as normas do periódico *Journal of Periodontology* – Anexo B

Influência do plasma rico em plaquetas derivado do aspirado de medula óssea na cicatrização de defeitos periodontais. Estudo histológico, histométrico e imunoistoquímico em ratos

Natália de Campos, DDS, MS* ; Maria J. H. Nagata, DDS, PhD*

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

Autora responsável pela correspondência:

Maria José Hitomi Nagata

Telefone: +55 18 3636 3271

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

Rua: José Bonifácio, 1193

CEP: 16015-050 - Araçatuba, SP, Brasil

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

Fonte de apoio: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq: 307518/2009-4) – Brasília, DF, Brasil

Contagem de palavras: 3.998

Número de figuras: 05

Número de tabelas: 01

Título resumido: PRP-bma em defeitos de fenestração periodontal

Key finding: PRP-bma promoveu formação de NC com ligamento periodontal funcional em defeitos de fenestração em ratos

Resumo

Objetivo: Este estudo avaliou a influência do plasma rico em plaquetas derivado do aspirado de medula óssea (PRP-bma) na cicatrização de defeitos de fenestração periodontal (PFD) em ratos. **Métodos:** PFD foram criados cirurgicamente na mandíbula de 40 ratos. Os animais foram divididos randomicamente em 2 grupos: C e PRP-bma – os defeitos foram preenchidos com coágulo sanguíneo ou PRP-bma, respectivamente. Os animais foram submetidos à eutanásia aos 10 ou 30 dias pós-operatórios. Foram realizadas análises histológica, histométrica e imunoistoquímica. A porcentagem de novo osso (NB), densidade do novo osso formado (DNB), novo cemento (NC) e extensão do defeito remanescente (ERD) foram avaliados histometricamente. Foram realizadas reações imunoistoquímicas para detecção de antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), sialoproteína óssea (BSP), osteocalcina (OCN) e fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP). Células imunomarcadas foram quantificadas. Os dados foram analisados estatisticamente (ANOVA; Tukey, $P < 0,05$). **Resultados:** Aos 10 dias, os grupos C e PRP-bma apresentaram quantidades similares de NB e DNB, e não foi observada formação de NC. Aos 30 dias, os grupos C e PRP-bma apresentaram quantidades similares de NB e DNB; o Grupo PRP-bma mostrou significativa formação de NC, com fibras colágenas inseridas obliquamente ou perpendicularmente à superfície radicular, sendo que nenhum espécime do Grupo C apresentou formação de NC. O Grupo PRP-bma apresentou um número significativamente maior de células PCNA-positivas (aos 10 dias) e BSP-positivas (aos 10 e 30 dias) que o Grupo C. Não foram observadas diferenças significativas no número de células OCN-positivas ou TRAP-positivas entre os grupos aos 10 ou 30 dias. **Conclusão:** O PRP-bma promoveu formação de NC com ligamento periodontal funcional.

Palavras-chave: Plasma rico em plaquetas; medula óssea; cimento dentário; periodontia; cicatrização.

INTRODUÇÃO

A regeneração periodontal envolve a formação de novo osso alveolar, cemento e ligamento periodontal funcional. Modalidades mais recentes de tratamento periodontal para promover a regeneração incluem o plasma rico em plaquetas (PRP) e as células-tronco mesenquimais (MSCs).

Células-tronco da medula óssea têm sido amplamente estudadas no que diz respeito à capacidade das mesmas em auxiliar a regeneração periodontal. Estas células têm a capacidade de promover a regeneração periodontal através da geração aumentada de osso alveolar maduro e de boa qualidade estrutural e neovascularização¹. Além disso, o transplante de células-tronco da medula óssea contribui para a formação de novo cemento e ligamento periodontal²⁻⁷.

Há, também, um interesse crescente no uso do PRP para o tratamento de defeitos periodontais⁸⁻¹¹. As plaquetas são uma rica fonte de fatores de crescimento (GFs), tais como o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), o fator de crescimento transformador- β (TGF- β) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), que modulam a resposta cicatricial em tecidos moles e duros¹²⁻¹⁴. Assim, o PRP pode melhorar a cicatrização de feridas através do aumento do nível de GFs no sítio de reparo após a degranulação das plaquetas¹⁵. Recentes estudos in vitro têm demonstrado que o PRP exerce efeitos positivos sobre fibroblastos gengivais¹⁶, osteoblastos bucais¹⁷ e fibroblastos do ligamento periodontal¹⁸, fazendo do PRP um candidato ideal para facilitar a regeneração periodontal completa. Um estudo preliminar in vivo recentemente publicado pelo nosso grupo mostrou que o PRP promoveu a formação de novo cemento com ligamento periodontal funcional em defeitos de fenestração em ratos¹¹. No entanto, o papel preciso dos concentrados de plaquetas na regeneração dos tecidos periodontais ainda precisa ser melhor esclarecido.

Paradigmas atuais na engenharia tecidual frequentemente envolvem a combinação de MSCs e células progenitoras, GFs e citocinas e arcabouço/biomateriais¹⁹. Estudos in vitro têm demonstrado que o PRP aumenta a proliferação de MSCs²⁰⁻²³. Uma vantagem potencial da associação MSCs-PRP é que ela é simultaneamente osteogênica, osteocondutiva e osteoindutiva, devido à capacidade de formação óssea das MSCs e à presença dos GFs liberados pelas plaquetas em um arcabouço tridimensional de fibrina. Além disso, esta associação MSCs-PRP é autóloga, não-tóxica e exhibe excelente plasticidade²⁴.

Diversos estudos animais e clínicos relataram o uso de MSCs associadas com o PRP na regeneração óssea²⁵⁻²⁸ e periodontal^{5,19,29,30}. Em todos esses estudos, as MSCs foram isoladas e expandidas in vitro antes de serem combinadas com o PRP. O cultivo de MSCs é uma técnica promissora, porém requer instalações especiais, consome tempo e é oneroso. Oyama et al.³¹ foram os primeiros a relatarem o uso do PRP derivado do aspirado de medula óssea (BMA). Eles usaram a associação de grânulos de beta-tricálcio fosfato com PRP derivado de BMA para o tratamento de casos de fissuras labiopalatinas. Segundo estes autores, a tomografia computadorizada realizada 6 meses após a cirurgia mostrou regeneração óssea suficiente. A técnica de preparo do PRP derivado de BMA foi avaliada por Nishimoto et al.³². Segundo estes autores, células fonte e GFs podem ser obtidos ao mesmo tempo com uma técnica simples e de baixo custo. Esta concentração simultânea de plaquetas e células da medula óssea tem grande potencial como uma fonte de materiais para a medicina regenerativa. A densidade de plaquetas e os níveis de fatores de crescimento (PDGF and TGF- β) são semelhantes no PRP derivado de BMA ou de sangue periférico³².

O propósito deste estudo foi analisar a influência do PRP-bma na cicatrização de defeitos de fenestração periodontal em ratos. A avaliação consistiu de análise histológica qualitativa, análise histométrica da extensão remanescente do defeito, da área de novo osso, da densidade do novo osso e da formação de novo cemento e análise imunoistoquímica dos seguintes

biomarcadores: antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), um marcador de proliferação celular; sialoproteína óssea (BSP) e osteocalcina (OCN), proteínas não-colagenosas abundantes nos tecidos mineralizados que são sintetizadas e secretadas por osteoblastos, indicando as fases iniciais e tardias da osteogênese, respectivamente; e fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP), um marcador biológico de osteoclastos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Modelo Experimental

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEAA) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP. Foram utilizados 40 ratos machos (*Rattus norvegicus*, *albinus*, Wistar), de 5 a 6 meses de idade. Um defeito de fenestração foi criado em cada animal. Os animais foram, então, divididos nos seguintes grupos experimentais usando a amostragem aleatória simples: C (controle) ou PRP-bma (plasma rico em plaquetas derivado do aspirado de medula óssea). Estes grupos foram divididos em 2 subgrupos (n=10), que foram submetidos à eutanásia aos 10 e 30 dias pós-operatórios.

Preparo do PRP-bma

Os ratos do Grupo PRP-bma foram anestesiados pela injeção intramuscular da associação de quetamina[#] (70 mg/kg de peso corporal) e xilazina^{**} (6 mg/kg de peso corporal). Imediatamente antes da realização dos procedimentos cirúrgicos, os animais desses grupos foram submetidos à coleta de medula das cristas ilíacas direita e esquerda. 1 ml de medula óssea (0,5 ml de cada crista ilíaca) foi coletada de cada animal usando uma seringa descartável de 10 ml contendo 0,1 ml de citrato de sódio a 3,2% para prevenir coagulação. A

amostra de medula óssea foi centrifugada^{††} a 160 G por 20 minutos a 22 °C para separar o plasma contendo as plaquetas e células nucleadas da medula óssea (NBMC) das células vermelhas. Na sequência, o plasma foi pipetado da parte superior do tubo e centrifugado^{††} a 400 G por mais 15 minutos a 22 °C para separar as plaquetas e NBMC do plasma pobre em plaquetas (PPP). O PPP foi, então, pipetado da parte superior do tubo e descartado, deixando o PRP-bma e “buffy coat” no fundo do tubo.

Procedimento Cirúrgico

Os ratos do Grupo C foram anestesiados usando o mesmo protocolo descrito para o Grupo PRP-bma. Após anti-sepsia, uma incisão foi feita e um retalho total foi rebatido sobre o corpo da mandíbula, coronariamente à borda inferior do lado direito da mandíbula. Foram criados defeitos de fenestração periodontal (3 mm em extensão horizontal, 2 mm em altura e aproximadamente 1 mm de profundidade) através da remoção do osso superficial usando uma broca esférica nº 2, acoplada em uma peça de mão de alta rotação e sob irrigação abundante com solução salina estéril (Fig. 1). Foi realizada, então, raspagem e alisamento da região vestibular da raiz distal do primeiro molar mandibular com um cinzel, removendo-se ligamento periodontal, cimento e dentina superficial. O reposicionamento do retalho foi feito simplesmente pela remoção dos afastadores cirúrgicos seguida do fechamento por camadas da incisão^{11,33}.

No Grupo C, o defeito foi preenchido somente pelo coágulo sanguíneo. No Grupo PRP-bma, o defeito foi preenchido com 25 µl de PRP-bma. Cada animal recebeu uma injeção intramuscular de 24,000 UI de penicillina G-benzathine^{‡‡} no pós-operatório.

Protocolo de Aplicação do PRP-bma

No momento da aplicação clínica, 25 µl de PRP-bma foi ativado com 1,25 µl of de solução de cloreto de cálcio a 10%^{§§} usando uma proporção de 0,05 ml de cloreto de cálcio para cada 1 ml de PRP-bma.

Análises Qualitativa e Quantitativa de Plaquetas

O líquido de Brecher foi usado para lisar os eritrócitos e diluir as amostras de BMA e PRP-bma. As plaquetas nas amostras de BMA e PRP-bma foram, então, contadas manualmente em uma câmara de Neubauer. Além disso, esfregaços de BMA e PRP-bma foram corados com corante tipo Romanovsky^{||} para analisar a morfologia das plaquetas.

Análises Qualitativa e Quantitativa das Células Nucleadas da Medula Óssea (NBMC)

O líquido de Turk foi usado para diluir as amostras de BMA e PRP-bma para analisar as NBMC. Estas células foram, então, contadas manualmente em câmara de Neubauer. Além disso, os esfregaços de BMA e PRP-bma foram corados com o corante tipo Romanovsky^{||} para analisar a morfologia das NBMC.

Processamento Tecidual

Os animais foram submetidos à eutanásia aos 10 e 30 dias pós-operatórios. A área do defeito cirúrgico original e os tecidos circunjacentes foram removidos em bloco. As peças foram fixadas em solução de formoldeído a 4%, lavadas em água corrente e descalcificadas em solução de Ácido Etilenodiaminotetracético (EDTA) a 18%. Após descalcificação, as peças foram processadas e incluídas em parafina. Foram realizados cortes transversais seriados, em relação aos molares, com 6 µm de espessura, em direção ápico-coronal. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina (H&E) para as análises histológica e histométrica ou submetidos ao método da imunoperoxidase indireta.

Para as reações imunoistoquímicas, os cortes histológicos foram desparafinizados e reidratados em série decrescente de etanol. Para a recuperação antigênica, as lâminas foram incubadas em solução tampão^{¶¶} em uma câmara pressurizada^{##} a 95°C por 10 min. Ao final de cada passo da reação imunoistoquímica, as lâminas histológicas foram lavadas em tampão fosfato salino (0,1 M; pH 7,4). Subsequentemente, as lâminas foram imersas em peróxido de hidrogênio a 3% por 1 hora e, então, em soro de albumina bovina a 1% por 12 horas, para bloqueio da peroxidase endógena e dos sítios inespecíficos, respectivamente. Lâminas histológicas contendo amostras de cada grupo experimental foram divididas em quatro lotes, e cada lote foi submetido à incubação com um dos seguintes anticorpos primários: anti-PCNA do rato gerado em cabra PCNA (1:150^{***}), anti-BSP do rato gerado em coelho (1:100^{†††}), anti-OCN do rato gerado em cabra OCN (1:100^{‡‡‡}), anti-TRAP do rato gerado em cabra (1:100^{‡‡‡}). Os cortes histológicos foram incubados no anticorpo secundário biotinilado durante 2 horas e subsequentemente tratados com estreptavidina conjugada com a peroxidase da raiz forte^{§§§}, por 1 hora. A reação foi revelada usando o cromógeno 3,3'-tetracloridrato de diaminobenzidina^{|||}. Foi realizada a contracoloração com hematoxilina de Harris (para BSP, OCN e TRAP) ou *Fast green* (para PCNA). Todas as amostras foram acompanhadas por um controle negativo (os espécimes foram submetidos aos procedimentos descritos anteriormente, suprimindo-se a utilização dos anticorpos primários).

Procedimento de Análise Microscópica

Foram selecionados dez cortes histológicos, representando o centro do defeito cirúrgico original em uma direção ápico-coronal, para as análises histológica e histométrica (6 cortes) e imunoistoquímica (4 cortes). Elas foram realizadas por examinadores calibrados e cegos em relação ao tratamento realizado (*software* “ImageLab 2000”^{¶¶¶}).

A análise histológica do processo de cicatrização periodontal foi realizada por um histologista certificado e os seguintes parâmetros foram avaliados: 1) natureza e grau de inflamação; 2) extensão do processo inflamatório para os tecidos adjacentes; 3) presença e extensão de necrose tecidual; 4) presença anormal e extensão de reabsorção de osso, de cemento e de dentina; 5) estado da vasculatura; 6) padrão de estruturação da matriz extracelular dos tecidos pré-existentes e dos tecidos neoformados; 7) padrão de celularidade dos tecidos pré-existentes e dos tecidos neoformados.

Critérios baseados no trabalho de Benatti et al.³⁴ foram utilizados para padronizar a análise histométrica das imagens digitais:

Medidas lineares: 1) Extensão Linear do Defeito (LED): extensão linear do defeito ósseo original no sentido méso-distal; 2) Extensão Remanescente do Defeito (ERD): extensão linear do defeito ósseo original sem novo tecido ósseo; 3) Extensão Linear da Raiz (LER): extensão linear da superfície radicular original que foi alisada; 4) Novo Cimento (NC): soma das extensões radiculares lineares do defeito cobertas com novo cimento.

Medidas de área: 1) Área Total do Defeito (TDA): correspondeu à área inteira do defeito cirúrgico original; 2) Novo Osso (NB): porção da área total do defeito cirúrgico original preenchida com novo osso; 3) Densidade de Novo Osso (DNB): área de novo osso menos a área dos espaços medulares.

Critérios baseados no trabalho de Nagata et al.³⁵ foram utilizados para padronizar a análise imunoistoquímica da imagem digital. Células positivas para PCNA, BSP, OCN e TRAP foram quantificadas dentro dos limites da TDA.

Análise Estatística

A normalidade e homocedasticidade dos dados foram verificadas. Cada parâmetro (ERD, NC, NB, DNB, número de células PCNA-positivas, número de células BSP-positivas, número de

células OCN-positivas, número de células TRAP-positivas) foi avaliado separadamente. Os valores das medidas lineares e de área para cada animal foram representados pela porcentagem média dos seis cortes histológicos. ERD foi calculada como uma porcentagem de LED, NC foi calculada como uma porcentagem de LER e NB foi calculada como uma porcentagem de TDA. Para ERD, aos 10 dias pós-operatórios, a significância das diferenças entre os grupos foi determinada pelo teste *t*. Para os outros parâmetros, a significância das diferenças entre os grupos foi determinada por uma análise de variância com dois fatores (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey post hoc quando a ANOVA mostrou uma diferença significativa entre os grupos ($P < 0,05$). Um cálculo do poder da amostra foi realizado para determinar o tamanho desta. O animal foi considerado como a unidade do estudo. O tamanho da amostra foi determinado para prover um poder de 80% para reconhecer uma diferença significativa de 20% entre os grupos e o desvio-padrão de 15%, com um intervalo de confiança de 95% ($\alpha = 0,05$) usando a alteração na porcentagem de novo osso (NB) como variável de resultado primária. Portanto, o tamanho da amostra necessário foi de 10 animais.

RESULTADOS

Acompanhamento Clínico

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

Análises Qualitativa e Quantitativa das Plaquetas

As plaquetas apresentaram morfologia normal. A quantidade média de plaquetas nas amostras de BMA foi $630,83 \pm 127,39 \times 10^3$ plaquetas/ μ l, enquanto que nas amostras de PRP-bma foi

$2.663,75 \pm 951,93 \times 10^3$ plaquetas/ μ l. Portanto, a concentração de plaquetas nas amostras de PRP-bma foi mais que 4 vezes maior do que aquela observada nas amostras de BMA.

Análises Qualitativa e Quantitativa das NBMC

As NBMC apresentaram morfologia normal. A quantidade média de NBMC nas amostras de BMA foi $637,25 \pm 172,24 \times 10^3$ NBMC/ μ l, enquanto que nas amostras de PRP-bma foi $3.099,24 \pm 141,59 \times 10^3$ NBMC/ μ l. Portanto, a concentração de NBMC nas amostras de PRP-bma foi quase 5 vezes maior que aquela observada nas amostras de BMA.

Análise Histológica Qualitativa

Aos 10 dias pós-operatórios, o Grupo C apresentou finas trabéculas de tecido ósseo imaturo nas margens do defeito cirúrgico estendendo-se para o seu centro (Fig. 2A). O restante do defeito estava ocupado por tecido conjuntivo altamente vascularizado, rico em fibroblastos e com moderado infiltrado inflamatório. O Grupo PRP-bma apresentou tecido ósseo imaturo composto por delgadas trabéculas ósseas em toda a extensão do defeito cirúrgico na maioria dos espécimes (Fig. 2B). Aos 30 dias pós-operatórios, ambos os grupos apresentaram tecido ósseo composto por espessas trabéculas ósseas preenchendo totalmente o defeito cirúrgico (Fig. 2C and D), com restituição completa do periósteo sobrejacente e ausência de infiltrado inflamatório. No Grupo PRP-bma, o trabeculado ósseo mostrou-se evidentemente mais espesso quando comparado ao Grupo C.

Novo cimento (NC) foi definido como o tecido inserido à superfície radicular com fibras colágenas arranjadas em aspecto de palisadas. A formação do NC foi precedida pela reabsorção superficial da dentina que foi alisada. O NC era uniformemente fino e acelular. Ele estava conectado ao tecido conjuntivo contido no espaço periodontal por feixes de fibras que se assemelhavam às fibras periodontais funcionalmente orientadas, as quais estavam, por sua

vez, inseridas ao osso alveolar. Estas características diferenciam NC dos depósitos de tecido semelhante ao osso³⁶. No Grupo C, não foi observada neoformação de cemento em nenhum espécime de 10 (Fig. 3A) ou 30 (Fig. 3C) dias pós-operatórios. Neste grupo, o ligamento periodontal apresentou uma rede delicada de fibras colágenas e uma pequena quantidade de células inflamatórias aos 10 dias, enquanto que, aos 30 dias, este tecido mostrou-se rico em fibroblastos e com fibras colágenas orientadas paralelamente à superfície radicular (Fig. 3C). No Grupo PRP-bma, aos 10 dias, embora a maioria dos espécimes não apresentou formação de NC, alguns deles apresentaram uma fina camada de matriz semelhante ao cementóide na superfície radicular (Fig. 3B). Uma fina camada de NC cobrindo a raiz previamente desnuda foi observada em todos os espécimes deste grupo aos 30 dias. Células semelhantes a cementoblastos foram observadas na superfície do NC, entremeadas a espessas fibras colágenas dispostas obliquamente ou perpendicularmente à superfície radicular (Fig. 3D).

Análise Imunoistoquímica Qualitativa

A técnica imunoistoquímica utilizada para detectar PCNA, BSP, OCN e TRAP mostrou uma alta especificidade na detecção destas proteínas, como evidenciado pela ausência total de coloração nos controles negativos para as reações imunoistoquímicas. As células imunorreativas apresentaram coloração acastanhada que estava confinada ao núcleo (PCNA), ao citoplasma e matriz extracelular (BSP e OCN) ou exclusivamente ao citoplasma (TRAP). Os grupos C e PRP-bma apresentaram marcações positivas para PCNA, BSP, OCN e TRAP aos 10 e 30 dias pós-operatórios (Fig. 4). Células PCNA-positivas foram observadas ao redor do osso neoformado, nos espaços da medula óssea e no periósteo, no tecido conjuntivo localizado no centro do defeito naqueles casos sem a completa regeneração óssea, bem como no ligamento periodontal regenerado. Células BSP-positivas foram observadas nos osteoblastos e nas células semelhantes a cementoblastos. Células OCN-positivas foram

observadas em osteoblastos. Osteoclastos (células TRAP-positivas multinucleadas) foram observadas adjacente à superfície do novo osso formado.

Análise Estatística

O estudo apresentou poder estatístico de 0,99 considerando-se NB como variável primária. Diferenças estatisticamente significativas não foram observadas na LED, LER ou TDA entre os grupos C e PRP-bma tanto aos 10 como aos 30 dias pós-operatórios ($P > 0,05$). As médias e os desvios-padrão de ERD, NB, DNB e NC, aos 10 e 30 dias pós-operatórios, com comparação inter-grupos estão apresentados na Figura 5. NB e DNB, aos 30 dias pós-operatórios, foram significativamente maiores quando comparados aos seus valores aos 10 dias pós-operatórios em ambos os grupos (comparações intra-grupo). Tanto no Grupo C como no Grupo PRP-bma, os valores de NC, aos 10 dias pós-operatórios, e de ERD, aos 30 dias pós-operatórios, foram zero.

As médias e os desvios-padrão das células PCNA-positivas, BSP-positivas, OCN-positivas e TRAP-positivas, aos 10 e 30 dias pós-operatórios, com comparação inter e intra-grupos estão apresentados na Tabela 1.

DISCUSSÃO

O presente estudo foi o primeiro, que se tem conhecimento, que avaliou o uso do PRP-bma para promover a regeneração periodontal em ratos.

Um passo crítico para alcançar a regeneração periodontal é a formação de novo cemento (NC). Tem sido demonstrado que o cemento apresenta capacidade de auto-regeneração muito limitada, mesmo na ausência de exposição prévia ao biofilme dental³⁵. Isso foi confirmado no presente estudo, pois todos os espécimes do Grupo C, tanto aos 10 como aos 30 dias pós-

operatórios, apresentaram ausência total de formação de cimento. Por outro lado, todos os espécimes do Grupo PRP-bma apresentaram, aos 30 dias pós-operatórios, significativa neoformação de NC com fibras colágenas inseridas obliquamente ou perpendicularmente à superfície radicular, indicando um ligamento periodontal funcional. A regeneração óssea foi completa. Apesar das diferenças nos modelos experimentais e metodologias utilizadas, os resultados deste estudo parecem corroborar os achados de Simsek et al.⁵, que também observaram a formação significativa de NC, juntamente com ligamento periodontal e formação de osso alveolar em defeitos de furca classe II tratados com a combinação de MSCs/PRP. As MSCs foram derivadas da medula óssea. Os autores também observaram que os defeitos de furca classe II tratados com PRP sozinho mostraram menor formação de NC quando comparado aos defeitos tratados com MSCs/PRP.

Sabe-se que as MSCs são um dos tipos de células presentes na medula óssea que contribuem para a regeneração de tecidos mesenquimais, incluindo o osso, cimento e ligamento periodontal^{2-4,7}. É possível que os resultados positivos na regeneração periodontal observados no Grupo PRP-bma foram devidos a um aumento significativo de MSCs e GFs no sítio cirúrgico. Embora uma contagem específica de MSCs e GFs não tenha sido realizada no presente estudo, esta hipótese é suportada pelos achados de Nishimoto et al.³² que conduziram um estudo in vitro para analisar a qualidade do PRP derivado do sangue periférico (PRP-pb) e do PRP derivado do aspirado de medula óssea (PRP-bma). Os autores observaram que a densidade de plaquetas e os níveis de GFs (PDGF e TGF- β) no PRP-bma foram os mesmos que no PRP-pb e, também, confirmaram que o PRP-bma apresentou uma alta concentração de células tronco. Portanto, é plausível inferir que, no presente estudo, o PRP-bma atuou como uma boa fonte de MSCs e GFs. Estudos têm mostrado que MSCs adultas, osteoblastos, fibroblastos e células endoteliais expressam receptores na membrana celular que são específicos para os GFs presentes no PRP^{15,37}. Sugere-se, também, que os GFs presentes no

PRP podem ativar diversos tipos celulares envolvidos na cicatrização de feridas e induzir a cicatrização de tecidos moles e regeneração óssea^{15,37}. Pode-se sugerir que no Grupo PRP-bma, houve um número maior de MSCs no sítio cirúrgico. O nível aumentado de GFs provavelmente não somente estimulou a proliferação de MSCs, mas também estimulou a diferenciação das mesmas em células da linhagem fibroblástica, osteoblástica e cementoblástica e a maturação destas células. Esta hipótese é suportada pelos achados imunoistoquímicos do presente estudo, no qual o Grupo PRP-bma apresentou um número de células PCNA-positivas e BSP-positivas significativamente maior que o Grupo C, aos 10 dias pós-operatórios. Aos 30 dias pós-operatórios, o número de células BSP-positivas ainda permaneceu significativamente maior no Grupo PRP-bma do que no Grupo C, indicando um efeito positivo na diferenciação e maturação dos osteoblastos e células semelhantes a cementoblastos.

Além desses efeitos nas MSCs, os GFs no sítio cirúrgico devem ter tido também um efeito bioestimulatório nas outras células. O PDGF pode ter estimulado a angiogênese e a ativação de macrófagos³⁸, a atividade proliferativa nos fibroblastos do ligamento periodontal³⁹, bem como a quimiotaxia de fibroblastos e a síntese de colágeno⁴⁰. O TGF- β provavelmente também promoveu a produção de matriz extracelular⁴¹, aumentou a atividade proliferativa dos fibroblastos do ligamento periodontal⁴² e estimulou a biossíntese do colágeno tipo I e da fibronectina⁴³.

Em uma revisão recente sobre o papel das MSCs no reparo de feridas, Maxson et al.⁴⁴ afirmaram que a sinalização parácrina tem sido implicada como um dos mecanismos pelos quais as MSCs melhoram o reparo de tecidos. A sinalização parácrina das MSCs regula as respostas celulares locais à injúria pela liberação de moléculas biologicamente ativas que afetam a migração e proliferação celulares e sobrevivência das células adjacentes. Outro componente significativo do mecanismo de ação das MSCs é que elas atenuam diretamente a

resposta inflamatória⁴⁴ através da regulação negativa de citocinas pró-inflamatórias e regulação positiva de citocinas anti-inflamatórias⁴⁵. Portanto, considerando os resultados histológicos, histométricos e imunoistoquímicos do presente estudo, é plausível inferir que o PRP-bma atuou como uma boa fonte de MSCs que se diferenciaram em células ativas semelhantes à cementoblastos, osteoblastos e fibroblastos, que tiveram efeitos parácrinos nos tecidos circunjacentes e atenuaram a resposta inflamatória local, promovendo, assim, a regeneração periodontal.

Alguns estudos demonstraram que o PRP-bma promoveu a regeneração óssea⁴⁶⁻⁴⁹. Contudo, no presente estudo, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na quantidade de NB, células OCN-positivas e células TRAP-positivas entre os grupos C e PRP-bma. Uma possível explicação para a falta de efeito do PRP-bma na quantidade de formação óssea no presente estudo é que um defeito periodontal de tamanho não-crítico foi utilizado. Apesar de ser de tamanho não-crítico, tem sido comprovado que o modelo de defeito periodontal usado no presente estudo é um modelo confiável para estudar a cicatrização periodontal sem a contaminação de bactérias orais ou invasão de epitélio gengival^{7,11,33,50}.

Dentro dos limites deste estudo, pode-se concluir que o PRP-bma promoveu formação de NC com ligamento periodontal funcional.

FOOTNOTES

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

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

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

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

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

|| LaborClin, Pinhais, Brasil

¶¶ Diva Decloaker, Biocare Medical, Concord, CA

Decloaking Chamber™, Biocare Medical, Concord, CA

*** Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA

††† Chemicon International, Temecula, CA

‡‡‡ Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA

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

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

¶¶¶ Diracon Bio Informática Ltda., Vargem Grande do Sul, Brasil

AGRADECIMENTOS E FONTE DE FINANCIAMENTO

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (CNPq – Brasília, DF, Brasil), pela concessão de Bolsa Produtividade em Pesquisa (Processo 307518/2009-4) à Maria José Hitomi Nagata. Os autores também agradecem à professora Suely Regina Mogami Bomfim, da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba – UNESP, pela assistência nos procedimentos experimentais; ao professor Edilson Ervolino, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, pela assessoria prestada na análise histológica deste estudo; ao professor Michel Reis Messor, da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, pela assessoria prestada na análise estatística deste estudo.

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram que não possuem nenhum conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

1. Hynes K, Menicanin D, Gronthos S, Bartold PM. Clinical utility of stem cells for periodontal regeneration. *Periodontol 2000* 2012;59:203-227.
2. Hasegawa N, Kawaguchi H, Hirachi A, et al. Behavior of transplanted bone marrow-derived mesenchymal stem cells in periodontal defects. *J Periodontol* 2006;77:1003-1007.
3. Kawaguchi H, Hirachi A, Hasegawa N, et al. Enhancement of periodontal tissue regeneration by transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells. *J Periodontol* 2004;75:1281-1287.
4. Li H, Yan F, Lei L, Li Y, Xiao Y. Application of autologous cryopreserved bone marrow mesenchymal stem cells for periodontal regeneration in dogs. *Cells Tissues Organs* 2009;190:94-101.
5. Simsek SB, Keles GC, Baris S, Cetinkaya BO. Comparison of mesenchymal stem cells and autogenous cortical bone graft in the treatment of class II furcation defects in dogs. *Clin Oral Investig* 2012;16:251-258.
6. Tsumsnuma Y, Iwata T, Washio K, et al. Comparison of different tissue-derived stem cell sheets for periodontal regeneration in a canine 1-wall defect model. *Biomaterials* 2011;32:5819-5825.

7. Yang Y, Rossi FM, Putnins EE. Periodontal regeneration using engineered bone marrow mesenchymal stromal cells. *Biomaterials* 2010;31:8574-8582.
8. Lafzi A, Chitsazi MT, Farahani RM, Faramarzi M. Comparative clinical study of coronally advanced flap with and without use of plasma rich in growth factors in the treatment of gingival recession. *Am J Dent* 2011;24:143-147.
9. Goyal B, Tewari S, Duhan J, Sehgal PK. Comparative evaluation of platelet-rich plasma and guided tissue regeneration membrane in the healing of apico marginal defects: a clinical study. *J Endod* 2011;37:773-780.
10. Rodrigues SV, Acharya AB, Thakur SL. An evaluation of platelet-rich plasma without thrombin activation with or without anorganic bone mineral in the treatment of human periodontal intrabony defects. *Platelets* 2011;22:353-360.
11. Nagata MJH, Campos N, Messoria MR, et al. Platelet-rich Plasma, Low-level Laser Therapy or Their Combination Promote Periodontal Regeneration in Fenestration Defects. A Preliminary in Vivo Study. [published online ahead of print Sept 3, 2013]. *J Periodontol*; doi: 10.1902/jop.2013.130318.
12. Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent* 2001;10:225-228.
13. Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg* 2004; 62: 489-496.
14. Bertrand-Duchesne MP, Grenier D, Gagnon G. Epidermal growth factor released from platelet-rich plasma promotes endothelial cell proliferation in vitro. *J Periodont Res* 2010;45:87-93.
15. 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* 1998;85:638-646.

16. Anitua E, Troya M, Orive G. Plasma rich in growth factors promote gingival tissue regeneration by stimulating fibroblast proliferation and migration and by blocking transforming growth factor-beta1-induced myodifferentiation. *J Periodontol* 2012;83:1028-1037.
17. Anitua E, Tejero R, Zalduendo MM, Orive G. Plasma rich in growth factors promotes bone tissue regeneration by stimulating proliferation, migration and autocrine secretion on primary human osteoblasts. *J Periodontol* 2013;84:1180-1190.
18. Anitua E, Troya M, Orive G. An autologous platelet rich plasma stimulates periodontal ligament regeneration. *J Periodontol* 2013;84:1556-1566.
19. Tobita M, Uysal CA, Guo X, Hyakusoko H, Mizuno H. Periodontal tissue regeneration by combined implantation of adipose tissue-derived stem cells and platelet-rich plasma in a canine model. *Cytotherapy* 2013;15:1517-1526.
20. Gruber R, Karreth F, Kandler B, et al. Platelet-released supernatants increase migration and proliferation, and decrease osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells under in vitro conditions. *Platelets* 2004;15:29-35.
21. Lucarelli E, Beccheroni A, Donati D, et al. Platelet-derived growth factors enhance proliferation of human stromal stem cells. *Biomaterials* 2003;24:3095-3100.
22. Murphy MB, Blashki D, Buchanan RM, et al. Adult and umbilical cord blood-derived platelet-rich plasma for mesenchymal stem cell proliferation, chemotaxis, and cryo-preservation. *Biomaterials* 2012;33:5308-5316.
23. Xie X, Wang Y, Zhao C, et al. Comparative evaluation of MSCs from bone marrow and adipose tissue seeded in PRP-derived scaffold for cartilage regeneration. *Biomaterials* 2012;33:7008-7018.

24. Anitua E, Sánchez M, Nurden AT, Nurden P, Orive G, Andía I. New insights into and novel applications for platelet-rich fibrin therapies. *Trends Biotechnol* 2006;24:227-234.
25. Lucarelli E, Fini M, Beccheroni A, et al. Stromal stem cells and platelet-rich plasma improve bone allograft integration. *Clin Orthop Relat Res* 2005;435:62-68.
26. Dallari D, Fini M, Stagni C, et al. In vivo study on the healing of bone defects treated with bone marrow stromal cells, platelet-rich plasma, and freeze-dried bone allografts, alone and in combination. *J Orthop Res* 2006;24:877-888.
27. Filho Cerruti H, Kerkis I, Kerkis A, et al. Allogeneous bone grafts improved by bone marrow stem cells and platelet growth factors: clinical case reports. *Artif Organs* 2007;31:268-273.
28. Pieri F, Lucarelli E, Corinaldesi G, et al. Mesenchymal stem cells and platelet rich plasma enhance bone formation in sinus grafting: a histomorphometric study in minipigs. *J Clin Periodontol* 2008;35:539-546.
29. Yamada Y, Ueda M, Hibi H, Baba S. A novel approach to periodontal tissue regeneration with mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma using tissue engineering technology: A clinical case report. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2006;26:363-369.
30. Tobita M, Uysal AC, Ogawa R, Hyakusoku H, Mizuno H. Periodontal Tissue Regeneration with Adipose-Derived Stem Cells. *Tissue Eng Part A* 2008;14:945-953.
31. Oyama T, Nishimoto S, Takeda M. Alveolar bone regeneration utilizing b-TCP and platelet-rich plasma (PRP) derived from bone marrow aspirate. *Ann Plast Surg* 2005;54:222-223.

32. Nishimoto S, Oyama T, Matsuda K. Simultaneous concentration of platelets and marrow cells: a simple and useful technique to obtain source cells and growth factors for regenerative medicine. *Wound Repair Regen* 2007;15:156-162.
33. King GN, King N, Cruchley AT, Wozney JM, Hughes FJ. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 promotes wound healing in rat periodontal fenestration defects. *J Dent Res* 1997;76:1460-1470.
34. Benatti BB, César-Neto JB, Casati MZ, Sallum EA, Sallum AW, Nociti FH Jr. Periodontal healing may be affected by aging: a histologic study in rats. *J Periodontal Res* 2006;41:329-333.
35. Nagata MJ, Santinoni CS, Pola NM, et al. Bone marrow aspirate combined with low-level laser therapy: A new therapeutic approach to enhance bone healing. *J Photochem Photobiol B* 2013;121:6-14.
36. Lindskog S, Blomlöf L. Mineralized tissue-formation in periodontal wound healing. *J Clin Periodontol* 1992;19:741-748.
37. Sánchez AR, Sheridan PJ, Kupp LI. Is platelet-rich plasma the perfect enhancement factor? A current review. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2003;18:93-103.
38. Raines EW, Ross R. Platelet-derived growth factor. *J Biol Chem* 1982;257:5154-5160.
39. Oates TW, Rouse CA, Cochran DL. Mitogenic effects of growth factors on human periodontal ligament cells in vitro. *J Periodontol* 1993;64:142-148.
40. Matsuda N, Lin WL, Kumar NM, Cho MI, Genco RJ. Mitogenic, chemotactic, and synthetic responses of rat periodontal ligament fibroblastic cells to polypeptide growth factors in vitro. *J Periodontol* 1992;63:515-525.
41. Wrana JL, Macho M, Hawrylyshyn B, Yao KL, Domenicucci C, Sodek J. Differential effects of transforming growth factor-beta on the synthesis of extracellular matrix

- proteins by normal fetal rat calvarial bone cell populations. *J Cell Biol* 1988;106:915-924.
42. Dennison DK, Vallone DR, Pinero GJ, Rittman B, Caffesse RG. Differential effect of TGF-beta1 and PDGF on proliferation of periodontal ligament cells and gingival fibroblasts. *J Periodontol* 1994;65:641-648.
43. Bonewald LF, Mundy GR. Role of transforming growth factor-beta in bone remodeling. *Clin Orthop Relat Res* 1990;250:261-276.
44. Maxson S, Lopez EA, Yoo D, Danilkovitch-Miagkova A, Leroux MA. Concise review: role of mesenchymal stem cells in wound repair. *Stem Cells Transl Med* 2012;1:142–149.
45. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005;105:1815–1822.
46. Zhong W, Sumita Y, Ohba S, et al. In vivo comparison of the bone regeneration capability of human bone marrow concentrates vs. platelet-rich plasma. *Plos One* 2012;7:e40833.
47. Gessmann J, Köller M, Godry H, Schildhauer TA, Seybold D. Regenerate augmentation with bone marrow concentrate after traumatic bone loss. *Orthop Rev* 2012;4:e14.
48. Sauerbier S, Rickert D, Gutwald R, et al. Bone marrow concentrate and bovine bone mineral for sinus floor augmentation: a controlled, randomized, single-blinded clinical and histological trial – per-protocol analysis. *Tissue Eng Part A* 2011;17:2187-2197.
49. Jager M, Herten M, Fochtmann U, et al. Bridging the gap: bone marrow aspiration concentrate reduces autologous bone grafting in osseous defects. *J Orthop Res* 2011;29:173-180.

50. Benatti BB, César-Neto JB, Gonçalves PF, Sallum EA, Nociti FH Jr. Smoking affects the self-healing capacity of periodontal tissues. A histological study in the rat. *Eur J Oral Sci* 2005;113:400-403.

LEGENDA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração esquemática do defeito de fenestração periodontal criado cirurgicamente.

(a) Vista vestibular; (b) Corte transversal.

Figura 2. Tecido ósseo imaturo preenchendo parcialmente o defeito periodontal no Grupo C

(a); tecido ósseo imaturo preenchendo completamente os defeitos periodontais no Grupo PRP-bma (b), aos 10 dias pós-operatórios. Completo fechamento dos defeitos periodontais com tecido ósseo neoformado nos grupos C (c) e PRP-bma (d), aos 30 dias pós-operatórios. H&E, aumento original 40x. Scale Bar = 250 µm. CT: tecido conjuntivo; DE: dentina; NB: novo osso; cabeças de setas: superfície radicular que foi alisada.

Figura 3. Fina rede de fibras colágenas na superfície radicular nos grupos C (a) e PRP-bma

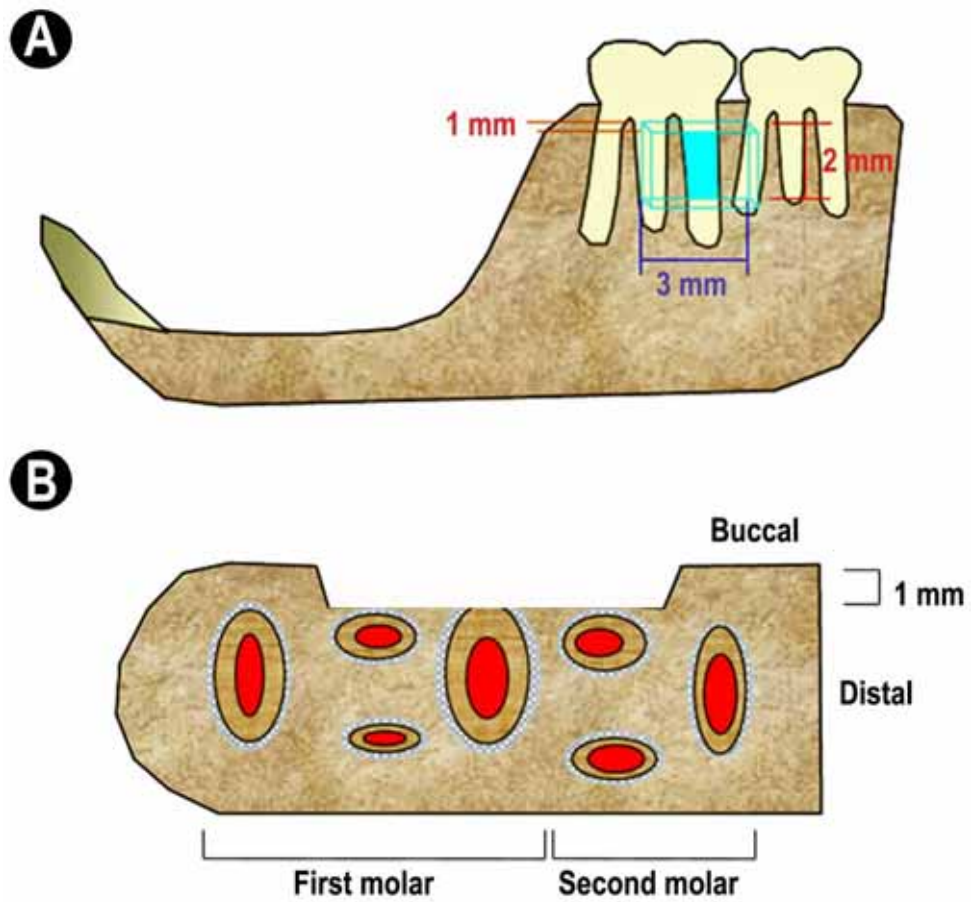
(b), aos 10 dias pós-operatórios. Notar a deposição de matriz semelhante ao cementóide no Grupo PRP-bma (asterisco branco). Grande quantidade de fibras colágenas orientadas paralelamente à superfície radicular no Grupo C (c); fibras colágenas inseridas e orientadas obliquamente ou perpendicularmente à superfície radicular no Grupo PRP-bma (d), aos 30 dias pós-operatórios. Notar a deposição de novo cemento no Grupo PRP-bma (asteriscos pretos). H&E, aumento original 1000x. Scale Bar = 25 µm. Asterisco branco: matriz semelhante ao cementóide; asteriscos pretos: novo cemento; DE: dentina; PL: ligamento periodontal.

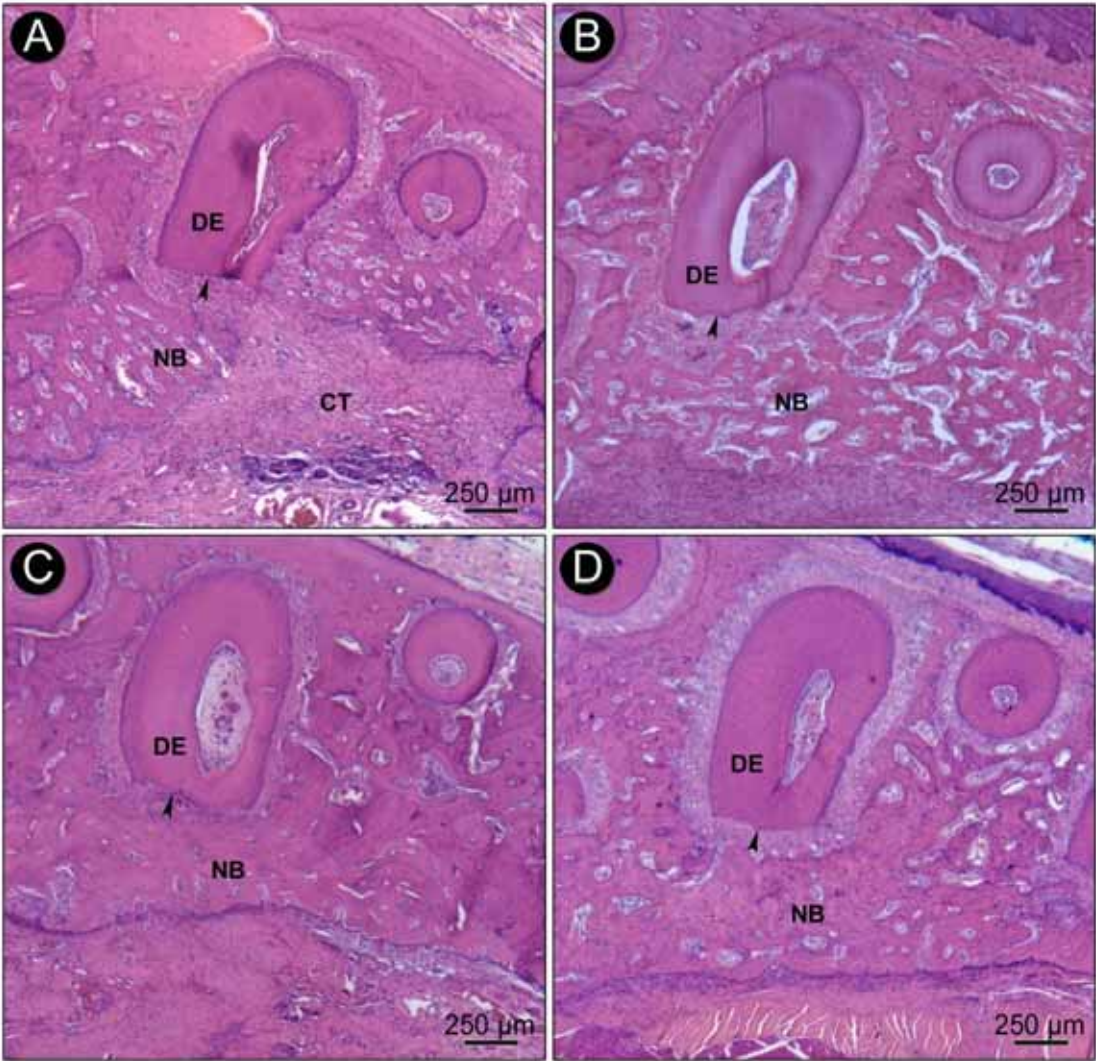
Figura 4. Padrão de imunomarcção para PCNA, BSP, OCN e TRAP no defeito periodontal.

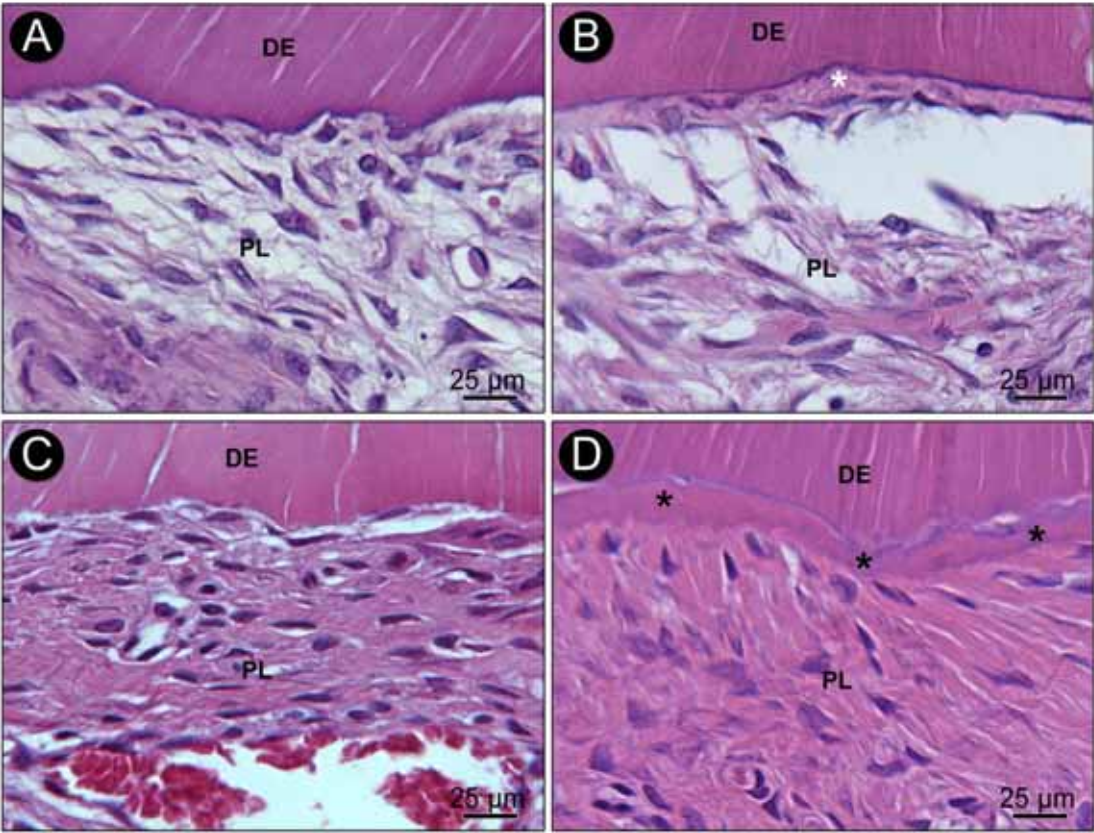
Fotomicrografias evidenciando células PCNA-positivas nos grupos C (a) e PRP-bma (b), aos 10 dias pós-operatórios, e grupos C (c) e PRP-bma (d), aos 30 dias pós-operatórios. Fotomicrografias evidenciando células BSP-positivas nos grupos C (e) e PRP-bma (f), aos 10 dias, e grupos C (g) e PRP-bma (h), aos 30 dias. Fotomicrografias evidenciando células OCN-positivas nos grupos C (i) e PRP-bma (j), aos 10 dias, e grupos C (k) e PRP-bma (l), aos 30 dias. Fotomicrografias evidenciando células TRAP-positivas nos grupos C (m) e PRP-bma

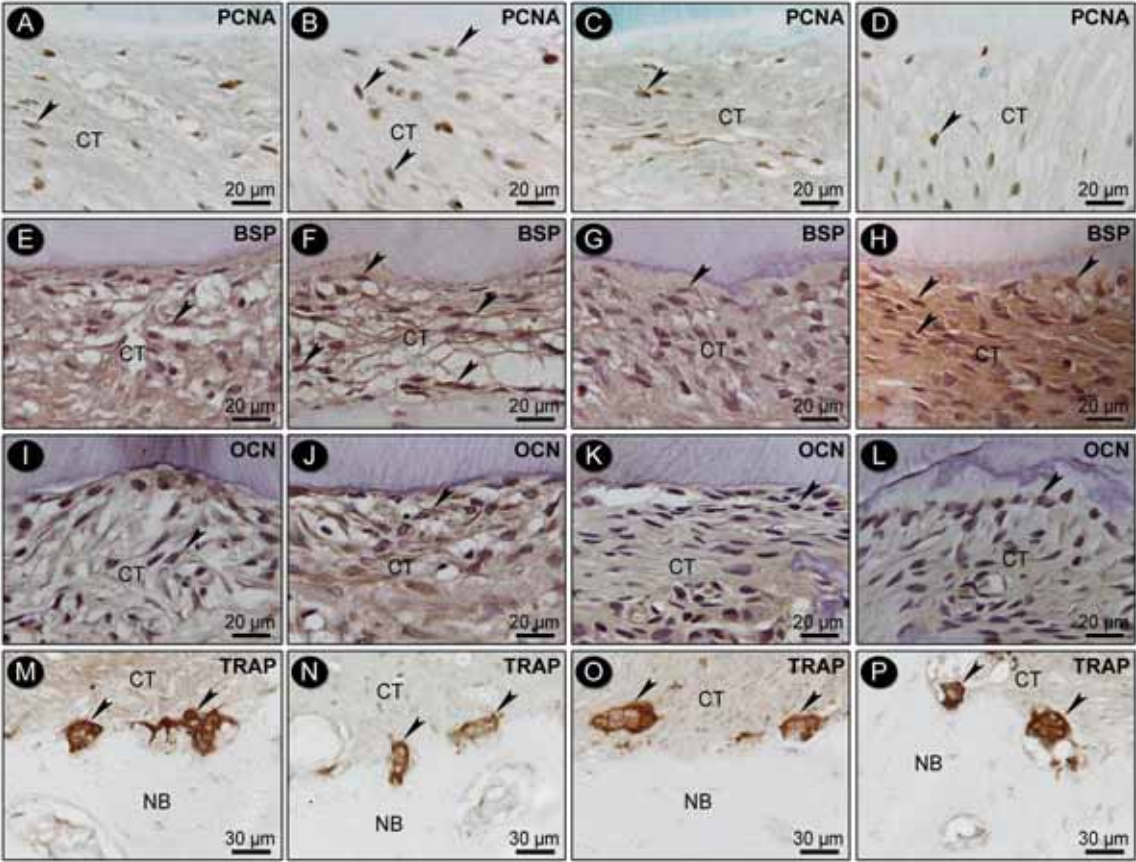
(n), aos 10 dias, e grupos C (o) e PRP-bma (p), aos 30 dias. Scale bar = a-l = 20 μ m; m-p = 30 μ m. PCNA, antígeno nuclear de proliferação celular; BSP, sialoproteína óssea; OCN, osteocalcina; TRAP, fosfatase ácida resistente ao tartarato; CT, tecido conjuntivo; NB, novo osso; cabeças de setas pretas: células imunomarcadas.

Figura 5. Valores percentuais médios e desvios-padrão (média $\pm$ DP) das medidas ERD, NB, DNB e NC, com comparações inter-grupos, aos 10 (a) e 30 (b) dias pós-operatórios. *: $P < 0,05$. ERD, extensão remanescente do defeito; NB, novo osso; DNB, densidade do novo osso; NC, novo cimento.









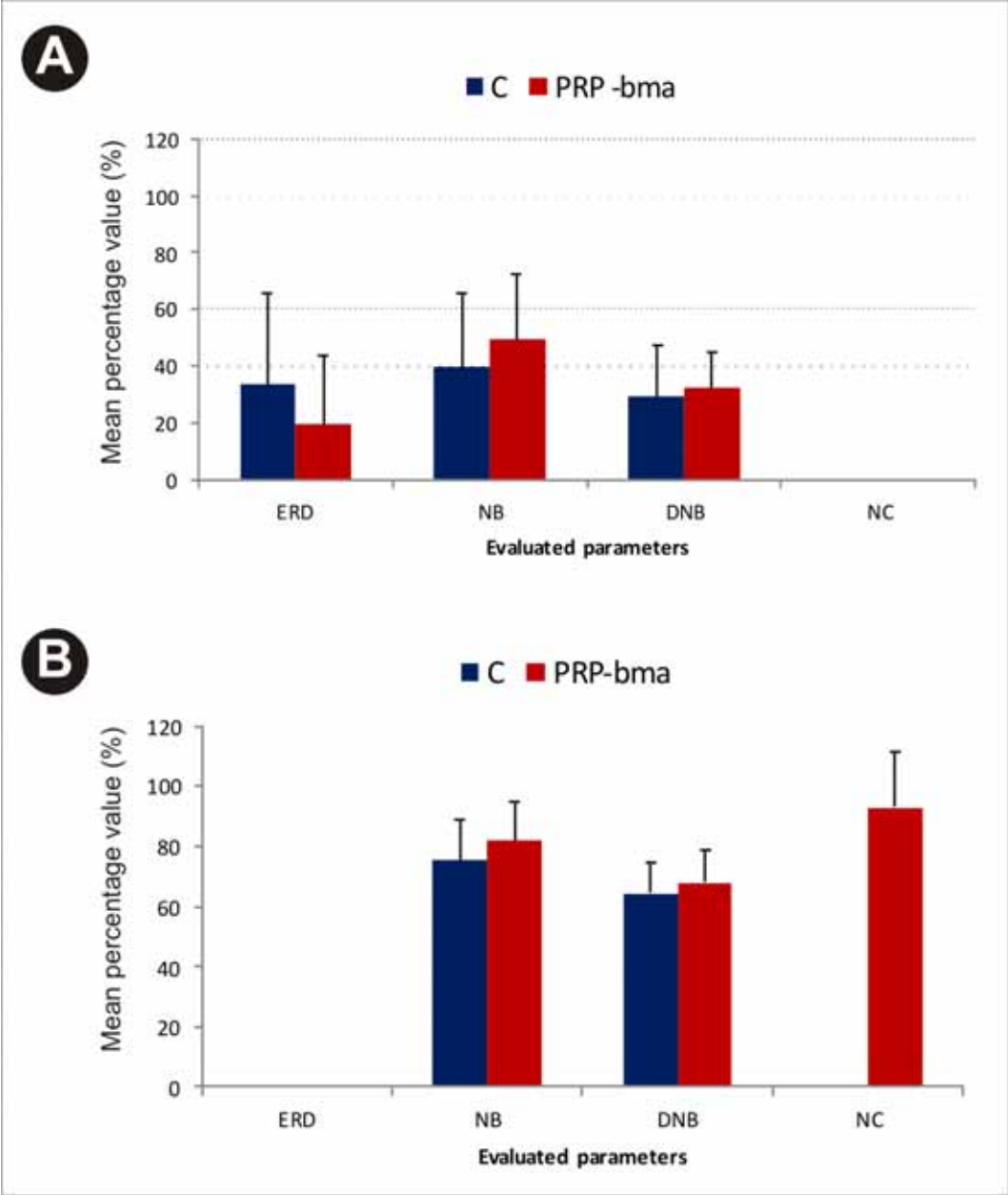


Tabela 1.

Médias e desvios-padrão das células PCNA-positivas, BSP-positivas, OCN-positivas e TRAP-positivas aos 10 e 30 dias pós-operatórios, com comparação inter-grupos e intra-grupos.

Variáveis	C		PRP-bma	
	10 dias	30 dias	10 dias	30 dias
PCNA	262,40 ± 213,82	66,20 ± 12,19	567,80 ± 155,40 ^a	197,00 ± 66,66 [*]
BSP	94,75 ± 10,56	80,33 ± 65,23	321,66 ± 55,05 ^b	210,25 ± 77,17 ^c
OCN	14,75 ± 12,50	8,80 ± 9,44	10,17 ± 4,54	6,75 ± 1,50
TRAP	30,00 ± 26,75	28,43 ± 10,16	19,71 ± 7,72	24,50 ± 13,32

Comparações inter-grupos:

^aDiferença significativa quando comparado ao Grupo C aos 10 dias ($P < 0,01$);

^bDiferença significativa quando comparado ao Grupo C aos 10 dias ($P < 0,05$);

^cDiferença significativa quando comparado ao Grupo C aos 30 dias ($P < 0,05$).

Comparações intra-grupos:

^{*}Diferença significativa quando comparado ao Grupo PRP-bma aos 10 dias ($P < 0,001$).

Anexos

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

82



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



COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto **"INFLUÊNCIA DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS DERIVADO DO ASPIRADO DA MEDULA ÓSSEA NA CICATRIZAÇÃO DE DEFEITOS PERIODONTAIS. ESTUDO HISTOLÓGICO E IMUNOISTOQUÍMICO EM RATOS"** sob responsabilidade da **Profa. Dra. Maria José Hitomi Nagata** e colaboração de **Natália Marcumini e Natália de Campos** de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela CEEA número de protocolo número 000122-2010

Araçatuba, 18 de Fevereiro de 2010

Prof.ª Adj. Tereza Cristina Cardoso da Silva
Presidente da CEEA- FOA/UNESP

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

83



Instructions to Authors

Updated January 2013

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

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

CONTENT

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

MANUSCRIPT CATEGORIES AND SPECIFIC FORMATS

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

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

ORIGINAL ARTICLES

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

Format

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

Abstract

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

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

Introduction

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

Materials and Methods

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

Results

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

Discussion

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

MANUSCRIPT SUBMISSION, PREPARATION, AND FORMAT

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

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

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

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

SUBMISSION

Authorship

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

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

Conflict of Interest and Financial Disclosure Forms

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

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

PREPARATION

Style

Please follow the guidelines below when preparing the manuscript:

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

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

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

FORMAT

Manuscripts must be submitted in Microsoft Word.

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

Title Page

Abstract (or Introduction) and Key Words

Text

Footnotes

Acknowledgments

References

Figure Legends

Tables

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

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

TITLE PAGE

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

ABSTRACT OR INTRODUCTION

Please see specific instructions provided for each manuscript category.

KEY WORDS

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

TEXT

Please see specific instructions provided for each manuscript category.

ACKNOWLEDGMENTS AND CONFLICTS OF INTEREST

Acknowledgments(s)

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

Conflicts of Interest

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

Authors are required to submit:

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

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

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

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

Example of Conflict of Interest Statement:

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

REFERENCES

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

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

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

Journals

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

Books and Other Monographs

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

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

Electronic Citations

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

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

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

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

TABLES

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

FIGURE LEGENDS

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

FIGURES

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

EQUATIONS

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

SUPPLEMENTAL MATERIAL

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

Supplemental Figures and Tables

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

Supplemental Videos

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

UNITS OF MEASUREMENT

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

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

STATISTICS

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

ANIMAL AND HUMAN TRIALS

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

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

FOOTNOTES

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

IDENTIFICATION OF PRODUCTS

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

REVIEW PROCESS AND PUBLICATION PROCEDURES

Peer Review

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

Copyright

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

Reprints

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