

Luis Augusto Esper

***Influência do Plasma Rico em Plaquetas associado
ou não à Regeneração Tecidual Guiada na
cicatrização de defeitos de fenestração periodontal
em cães. Estudo histológico e histométrico.***

ARAÇATUBA -SP

2009

Luis Augusto Esper

***Influência do Plasma Rico em Plaquetas associado
ou não à Regeneração Tecidual Guiada na
cicatrização de defeitos de fenestração periodontal
em cães. Estudo histológico e histométrico.***

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, para a obtenção do Título de MESTRE EM ODONTOLOGIA (Área de Periodontia).

Orientadora: Professora Adjunto Maria José Hitomi Nagata

ARAÇATUBA -SP

2009

Catálogo-na-Publicação

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

E77i Esper, Luis Augusto
Influência do Plasma Rico em Plaquetas associado ou não à
Regeneração Tecidual Guiada na cicatrização de defeitos de
fenestração periodontal em cães. Estudo histológico e histométrico
/ Luis Augusto Esper. - Araçatuba : [s.n.], 2009
96f. : 3 il. ; 4 tab. + 1 CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia, Araçatuba, 2009
Orientador: Profa. Maria José Hitomi Nagata

1. Regeneração tecidual guiada 2. Plasma rico em plaquetas
3. Plaquetas 4. Fatores de crescimento

Black D6
CDD 617.632

Dados Curriculares

Luis Augusto Esper

Nascimento: 01.10.1979 – Presidente Prudente/SP

Filiação: Victor Geraldo Esper

Rosa Henn

2000-2003: Curso de Graduação em Odontologia

Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP

2004-2005: Curso de Aperfeiçoamento em Periodontia - Hospital de Reabilitação de

Anomalias Craniofaciais – Universidade de São Paulo (HRAC-USP)

2005-2007: Especialização em Periodontia - Hospital de Reabilitação de Anomalias

Craniofaciais – Universidade de São Paulo (HRAC-USP)

2007-2009: Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área

de Periodontia

Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – UNESP

Dedicatória

A Deus:

Pela vida,

Por minha maravilhosa família,

Por meus amigos sinceros,

Por minha querida namorada,

Por estar ao meu lado em todos os momentos desta minha existência,

Por guiar meus passos e me proteger...

Por seu amor infinito...

“ Deus, tu me cercaste em volta,

Tuas mãos em mim repousam...

Tal ciência é grandiosa,

Não alcanço de tão alta...”

Salmo 138

A minha mãe Rosa:

Pela vida...

Por cuidar de mim, quando precisei...

Por me ensinar princípios tão sólidos...

Pelo amor incondicional, que me faz forte para viver...

Pelo exemplo de coragem, honestidade e perseverança...

Lembrar de sua face preocupada, de seu trabalho, de suas orações, de seu apoio incondicional para me dar o melhor, me impulsionou deveras para a luta...

Mãe, mulher corajosa, com um coração enorme...

Você me faz sentir a vida, a beleza das cores, a harmonia, o encanto e a doçura!

Você é capaz de esquecer o sofrimento e a dor para me ver feliz!

Hoje, quero fazer por você uma prece muito bonita e sincera:

“Meu Deus, abençoe esta mulher tão encantadora que me deu a vida.

Abençoe esta mulher guerreira, minha mãe, hoje e sempre!

Olhando o céu aberto, contemplo o grande tesouro de paz, sabedoria, paciência, bondade, ternura e acolhimento que permeia o seu ser.”

Às vezes, quando a vida começa a ficar mais difícil, pensando em você, surge uma nova esperança! Meu porto seguro!

Você é um presente de Deus na minha vida!!

Muito Obrigado Por Tudo !! Amo você!

Ao meu pai Victor:

Pela vida...

Por cuidar de mim quando ainda pequeno...

Pelas noites que passou em claro para que eu dormisse...

Por me defender quando eu ainda não conseguia...

Por toda a preocupação que teve comigo...

Pelo exemplo de trabalho, e coragem...

Por tudo que sempre me ensinou...

... Amo você!

Aos meus irmãos Victor e Andréa:

Vocês são meus exemplos de vida. Pessoas maravilhosas, batalhadoras, honestas, e que sempre admirei.

Sempre estiveram ao meu lado desde que nasci, me acompanharam e ensinaram muito sobre a vida...

Muito obrigado pelo apoio, incentivo e por tudo que sempre fizeram por mim. Vocês são os melhores irmãos que alguém poderia ter.

Quando penso em vocês sinto a presença de Deus em meu coração.

Vocês são de importância inestimável na minha formação como pessoa e como profissional!

Aos meus cunhados Alfredo e Stella:

Muito Obrigado pelo apoio e incentivo que vocês sempre me deram!

Vocês são muito importantes para mim, amigos, pessoas especiais...

Que Deus conserve vocês sempre assim, pessoas tão generosas,

Que se preocupam em doar um pouco de seu amor às pessoas em sua volta.

Aos meus amados sobrinhos: Pedro Henrique, Victor Hugo, Murilo e Amélia:

Anjos em minha vida!! Tenho vocês no coração. Agradeço a Deus por vocês serem meus sobrinhos e fazerem parte da minha vida, trazendo alegria e amor.

... Amo vocês!

Aos meus queridos avós maternos: Gustavo (in memoriam) e Maria do Rosário (in memoriam) :

Tenho certeza de que vocês olham e torcem por nós continuamente.

Obrigado por tudo! Muito amor e saudades...

Aos meus queridos avós paternos: Imil (in memoriam) e Amélia (in memoriam) :

Tenho certeza de que vocês olham e torcem por nós continuamente.

Obrigado por tudo! Muito amor e saudades...

Aos meus padrinhos: Salles e Lourdes:

Sempre estiveram tão presentes em minha vida, e acompanharam toda esta trajetória. Muito obrigado por todo carinho que sempre tiveram por mim.

... Amo vocês!

A minha querida namorada e amiga Michyele:

A jornada pareceu árdua e difícil...

O desânimo tentou se apossar por vezes...

Rimos juntos, choramos juntos, vivemos cada etapa unidos...

Uma união que não consigo explicar...

Me mostra o que há de melhor em mim...

Me ajuda a enxergar, quando eu não posso ver...

Amor, carinho, respeito e cumplicidade vivenciamos diariamente...

Sentimentos puros, verdadeiros, e intensos...

Ter você comigo é:

Caminhar pela vida confiante, sem medo de errar, mesmo errando...

Sem medo de me entregar, quando já estou entregue...

Andar pelas flores, mesmo com arranhões...

É ter força para lutar, crer, vencer...

Ter a mim mesmo...

“Não importa o que a vida nos traga,
Teremos força para suportá-la,
Contanto que tenhamos amor para dar
E alguém com quem compartilhá-lo.”
(Marie Louise Cheatham)

Amo você! Obrigado por fazer parte da minha vida!

A minha querida amiga e professora Ana Lúcia Almeida:

Existem pessoas que quando passam por nossas vidas, deixam um pouco de si e levam um pouco de nós, e você é uma delas. Tenho muito orgulho de ter conhecido você, uma pessoa especial que muito me ensinou. Deus colocou você no meu caminho, e agradeço todos os dias. Uma pessoa como poucas, mulher batalhadora, com um coração enorme. Profissional exemplar em clínica e pesquisa, que sempre divide seu conhecimento infinito com todos os seus alunos. Agradeço toda atenção, carinho e os seus ensinamentos transmitidos. Ensinamentos que trago comigo para a vida. Serei eternamente grato por toda sua dedicação e carinho. Muito obrigado pelo agradável convívio durante todo período que estivemos juntos. Você foi um grande incentivo e exemplo para que eu optasse por realizar pós-graduação. Palavras jamais serão suficientes para exprimir sentimentos e enorme admiração que tenho por você. Muito Obrigado por fazer parte da minha vida. Torço muito pelo seu sucesso !!

“Benditos sejam os amigos que acreditam na tua verdade ou te apontam a realidade. Porque amigo é a direção. Amigo é a base quando falta o chão!”

(Machado de Assis)

Agradecimentos Especiais

A minha orientadora Profa. Dra. Maria José Hitomi Nagata:

Exemplo de pessoa e profissional, com conduta exemplar e admirável. Serei eternamente grato por tudo que fez por mim durante esses dois anos que se passaram. Além da transmissão de conhecimentos, tive o prazer de conviver com uma pessoa especial, que mesmo com toda sua excelência no âmbito profissional, preserva a simplicidade e humildade. Admiro sua fé, e tenho um carinho especial pela senhora. Quantas vezes me acalmou ao dizer sábias palavras em momentos difíceis. Jamais esquecerei! Tenho um orgulho imenso de ter sido orientado por uma educadora, pesquisadora brilhante, profissional ética e mulher com uma reunião de qualidades tão dificilmente encontradas em um ser humano!

Seria difícil colocar em palavras toda a admiração, confiança, carinho e respeito que tenho pela senhora.

MUITO OBRIGADO!!

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, nas pessoas de seu Diretor Prof. Dr. Pedro Felício Estrada Bernabé e Vice-Diretora Profa. Dra. Ana Maria Pires Soubhia

Pela oportunidade de realizar este curso e esta pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, nas pessoas de seu Coordenador Prof. Dr. Idelmo Rangel Garcia Júnior e de todo corpo docente Pela contribuição na minha formação.

À FAPESP, pela concessão da Bolsa de Mestrado (Processo nº 07/53341-9) ao pós-graduando Luis A. Esper.

Às empresas “BIOMET 3i, Inc.” (Palm Beach Gardens, FL, EUA), pela doação de materiais e equipamento para o preparo do Plasma Rico em Plaquetas, “W.L. Gore & Associates” (Flagstaff, AZ, EUA) pela doação das membranas e fios de sutura e Johnson & Johnson Produtos Profissionais Ltda.(São José dos Campos, SP, Brasil) pela doação de fios de sutura utilizados neste estudo.

Ao Professor da Disciplina de Periodontia Dr. Valdir Gouveia Garcia Professor, além de admirá-lo por sua carreira brilhante, vim conhecê-lo melhor como pessoa durante esses dois anos. O senhor tem qualidades raramente observadas no ser humano... Alegra-se com as conquistas das pessoas e torce pelo sucesso... Seu apoio e torcida foram de fundamental importância para que eu conseguisse chegar até aqui. O senhor, com sua sensibilidade, sempre com palavras de otimismo quando mais precisei, ajudou-me a levantar, respirar fundo e recomeçar, sempre que necessário. Muito obrigado pelo seu exemplo e excelência como educador, pesquisador, profissional respeitado e batalhador incansável... Obrigado pelo imenso prazer de conviver com o senhor!

Ao Professor da Disciplina de Periodontia Dr. Alvaro Francisco Bosco

Desde o primeiro contato que tive com o senhor, no início da minha graduação, tive a certeza de que estava diante de um exemplo a ser seguido. Um professor educado, entusiasmado com a profissão, educador, clínico e pesquisador respeitado por sua enorme competência. Além de toda sua excelência profissional, preserva a humildade e simplicidade, além de inúmeras outras qualidades que possui. Sempre muito otimista, me ajudou nos momentos em que precisei. Uma pessoa admirável, honesto, generoso, com princípios éticos e valores tão sólidos. Professor tão querido e respeitado pelos alunos. Tenho um imenso orgulho de ter sido seu aluno, jamais conseguirei expressar em palavras minha admiração e respeito pelo senhor. Serei eternamente grato por todos os ensinamentos transmitidos, por seu exemplo profissional, pelo seu apoio e incentivo e pelos momentos de convívio tão agradável. O senhor muito contribuiu para minha formação pessoal e profissional, e teve um papel fundamental para que eu escolhesse ingressar na pós-graduação. MUITO OBRIGADO POR TUDO!!

Ao professor da Disciplina de Clínica Integrada Dr. Wilson Roberto Poi

Um exemplo de pessoa e dedicação à docência. Sempre tão querido e respeitado pelos alunos. Desde a graduação tenho um enorme respeito e admiração pelo senhor. Muito Obrigado pelos ensinamentos transmitidos!!

Ao Professor da Disciplina de Endodontia Dr. Roberto Holland

Um exemplo de profissional e pesquisador. Agradeço por toda sua paciência, dedicação e por sua enorme contribuição na análise dos cortes histológicos realizados.

Ao Professor da Disciplina de Endodontia Dr. João Eduardo Gomes Filho

Pela contribuição no processamento laboratorial deste trabalho.

Ao Professor da Disciplina de Cirurgia Dr. Tetuo Okamoto

Exemplo de profissional e de dedicação à pesquisa. Agradeço pela amizade, e pela constante ajuda no processamento laboratorial e análise histológica deste trabalho.

Ao Departamento de Ciências Básicas, e em especial ao Prof. Dr. Cláudio

Aparecido Casatti

Por sua contribuição na análise histológica deste trabalho.

Ao Professor Dr. Stephen E. Fucini

Pelo estímulo em sempre seguir adiante! Pela inestimável ajuda nos momentos que estive aqui conosco e dividiu suas valiosas experiências profissionais. Pelo empenho na aquisição de materiais para nossas pesquisas...

Ao meu amigo Michel Reis Messoria

Por todos os momentos compartilhados, pelo convívio agradável, pelas sábias palavras sempre proferidas e imensurável apoio e incentivo. Trabalhamos juntos, dividimos muitas alegrias, tristezas e estivemos sempre unidos pela força da amizade. Sua amizade tem um valor enorme para mim, e nada que eu diga conseguiria traduzir este sentimento tão nobre. Sem a sua ajuda jamais teria conseguido realizar este trabalho. Serei eternamente grato por toda sua ajuda, paciência, dedicação e amizade.

MUITO OBRIGADO POR TUDO!!

À minha amiga Natália de Campos

Por toda sua ajuda e seu otimismo. Sua ajuda foi fundamental na realização deste trabalho. Você é uma pessoa admirável, radiante, batalhadora, e com quem tive o prazer de conviver durante todo este tempo. Dividimos alegrias, tristezas e estivemos sempre unidos pelos laços tão sinceros de amizade. Tenho

muito orgulho de ser seu amigo, e um carinho muito especial por “nossa irmãzinha mais nova”.

À minha amiga Natália Marcumini Pola

Por sua ajuda imprescindível na realização deste trabalho e por todos os momentos que compartilhamos. Pessoa especial, alegre, guerreira e que muito me ajudou em todos os momentos que precisei, incentivando e apoiando nos momentos difíceis. Esteve sempre presente, nos contagiando com sua energia positiva e dedicação. Uma amiga sincera, por quem tenho um enorme carinho, respeito e admiração.

À minha amiga Flávia Furlaneto

Você esteve presente em todos os momentos, e sua ajuda também foi fundamental para realização deste trabalho. Uma pessoa iluminada, com uma fé inabalável, que apoiou e sempre nos brindou com sua sabedoria e proferiu palavras de otimismo. Uma profissional admirável, pessoa amiga, humilde e com princípios de vida tão sólidos. Uma amiga especial, que sempre tem uma palavra de conforto quando mais precisamos. Deus colocou você em nosso caminho para alegrar nossos dias.

MUITO OBRIGADO!!

Aos meus amigos Tatiana, Flávia, Michel, Thiago, Leandro, Ana Cristina, Michyele, Natália de Campos, Natália Pola, Erivan e Ricardo. Muito obrigado pelo agradável e harmônico convívio nesses dois anos. Sucesso em suas carreiras acadêmicas!

Às estagiárias de Iniciação Científica e amigas Carolina, Daniele, Paula e Rosana

Pela inestimável ajuda no processamento laboratorial deste trabalho!

Ao Dr. Mário Nagata e Sra. Hermínia Nagata

Agradeço o carinho, e a atenção que sempre tiveram.

Ao querido amigo e funcionário Odair

O que seria de nós sem você? Sempre nos ajudou com muita alegria. Sua bondade está presente em seu olhar! Sua ajuda foi muito importante para que este trabalho fosse realizado. Obrigado pela sua paciência, dedicação e pelo seu exemplo! Você é uma pessoa especial!!

Ao Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária do Campus de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, à Professora Valéria Nobre Leal de Souza Oliva e ao Professor Paulo Sérgio Patto dos Santos, pelo empréstimo de equipamentos necessários para este estudo e pela atenção dispensada. Minha sincera gratidão!!

Ao médico veterinário e amigo Guillermo Carlos Veiga de Oliveira

Pelo auxílio nas cirurgias realizadas, e por toda sua disponibilidade em ajudar. Você é um exemplo de profissional, admiro muito o seu trabalho... Serei eternamente grato pelo auxílio imprescindível na realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADO POR TUDO!!

Ao Professor do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal
Wagner Luís Ferreira

Por toda assistência prestada no cuidado com os animais e doação de medicamentos necessários para realização desta pesquisa.

À Professora do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal
Suely Regina Mogami Bomfim

Acompanhou todas as etapas deste trabalho. Ajudou em todos os momentos durante a fase cirúrgica e sempre sorrindo e tão perseverante. Foi um prazer

conhecê-la e agradeço por toda a atenção, dedicação e contribuição na realização deste trabalho.

Ao Dr. Edson Luiz de Campos e Flaviano Damasceno
Pela orientação e auxílio no tratamento dos animais.

Ao Caril Constante Ferreira do Amaral
Pelo auxílio no processamento laboratorial deste trabalho e por sua disponibilidade em ajudar sempre.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP Diogo, Marina e Valéria:
Por terem me recebido sempre tão bem, com sorriso nos lábios e um bom-humor contagiante, independentemente de qualquer contratempo... Pela eficiência e presteza de sempre, fundamentais ao prosseguimento dos nossos trabalhos.

Aos funcionários do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP Cleide, Dirce, Gilmar, Bernadete e Paulo. Pela convivência tão agradável.
Em especial à Dirce, Gilmar e Bernadete, pela contribuição no processamento laboratorial neste trabalho.

Aos funcionários do Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP Camilo, João Batista e Alan
Pela disponibilidade em ajudar sempre.

Às funcionárias do Departamento de Odontologia Restauradora, Disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP: Hermelinda Brefore e Nelci Vieira, que tanto auxiliaram no processamento laboratorial deste trabalho. MUITO OBRIGADO!!

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP Alexandra, Ana Claudia, Ana Paula, Cláudio, Cláudio Matsumoto, Isabel, Ivone, Izamar, Luis Cláudio, Luzia e Maria Cláudia.

Pela eficiência, paciência e alegria com que sempre me atenderam.

Ao Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais – HRAC/USP, carinhosamente conhecido como “Centrinho” (à direção, aos profissionais, funcionários e pacientes)

Pelo enorme enriquecimento pessoal e profissional que me proporcionaram, e pelo tratamento sempre agradável. Passar por esta instituição me fez muito feliz, muito me orgulho de ter sido aluno do HRAC. Tenho enorme admiração pelo trabalho realizado neste hospital. Minha eterna gratidão e saudades...

Aos profissionais do Setor Odontológico do HRAC/USP

Serei eternamente grato por todos os ensinamentos transmitidos e pela convivência agradável durante minha passagem pelo Centrinho!! Cada um de vocês contribuiu muito com a minha formação profissional!!

Aos meus colegas da turma de especialização em Periodontia Eliane, Erick, Ingrid, Michyele, Paula, Rosane e Samuel

Sonhamos juntos... Personalidades diferentes, mas todos com tanto amor ao Hospital e ao curso de Periodontia. As diferenças nestes momentos deixavam de existir, e assim estivemos sempre tão unidos por um ideal comum. Aprendemos muito, crescemos como pessoas e profissionais... Muito Obrigado!!

À Elisa Maria

Obrigado pelas palavras encorajadoras e pelo apoio durante todo o período que estive na residência.

À Mariuza

Pelo carinho, respeito e agradáveis conversas durante a especialização. Pelo convívio tão harmônico. Você é uma pessoa muito querida.

MUITO OBRIGADO!!

Ao Sr. Mário, Sra. Clélia e Denis

Vocês me acolheram com muito carinho, e sempre tão preocupados com meu bem-estar. O convívio com vocês tornou mais fácil estar longe de casa, pois com vocês me sinto em família e em casa. Tenho um enorme carinho por vocês. Quantos finais de semana e domingos agradáveis passei ao lado de vocês... Muito obrigado pelo carinho!

Ao Sr. Rodney e Sra. Beatriz

Pessoas muito especiais que me presentearam com meu maior tesouro. Estou sempre orando para que Deus proteja e guie vocês pela vida. Agradeço por sempre me tratarem tão bem, com tanto respeito e carinho. Pela amizade e por todas as palavras de otimismo quando precisamos. Tenho muito respeito e admiração por vocês. Que Deus esteja sempre com vocês.

Aos meus cunhados Danielle, Teruo, Francielle e Maurício

Pela amizade e apoio, pelos momentos agradáveis e conversas que tivemos. Fico muito feliz por tê-los por perto.

Às sobrinhas Luany, Clara e ao que vai chegar

Tenho muito carinho e amor por vocês.

“Vocês são raios de luz a iluminar nossos caminhos, um presente divino”.

Aos meus amigos Samuel e Ludmila

Vocês são muito especiais. Vivemos muitos momentos agradáveis e inesquecíveis. Pessoas que muito contribuíram com meu crescimento

pessoal e profissional. Sei que sempre posso contar com vocês, e torço muito pelo sucesso pessoal e profissional de vocês.

MUITO OBRIGADO!!

Ao meu amigo Erick

Nunca esquecerei os momentos agradáveis de nosso convívio. Você sempre me incentivou muito... Pessoa tranquila, amigo verdadeiro, paciente e sempre disposto a ajudar. Torço pelo seu sucesso...

Aos meus amigos Ingrid e Jeferson

Pessoas sempre de bem com a vida, alegres, amigos queridos. Muito obrigado pelos conselhos, pelas palavras amigas e apoio. O convívio com vocês foi muito especial e prazeroso. Torço muito pelo sucesso de vocês!!

MUITO OBRIGADO!!

Ao meu grande amigo Lucas Medeiros Vilches

Tenho você como um irmão e agradeço a Deus por ter colocado você no meu caminho. Amigo sincero, que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos da minha vida...

Aos meus grandes amigos Fernando Herrero, Alexandre Sgavioli e Fernando Sgavioli Ribeiro

Amigos sinceros, grandes pessoas e profissionais. Sempre tão guerreiros e amigos tão dedicados. Agradeço a Deus por serem meus amigos e sempre admirei muito vocês. Desejo todo sucesso em suas carreiras profissionais.

Aos meus queridos amigos Fernando Ribeiro e Miriam Sgavioli Ribeiro

Vocês sempre acompanharam toda a minha formação profissional, torceram, e foram sempre tão atenciosos. Pessoas especiais, amigos que nunca esquecerei. Que Deus ilumine sempre suas vidas. Têm meu carinho, respeito e enorme consideração.

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

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

A todos, que de forma direta ou indireta contribuíram na realização deste trabalho.

Aos animais que sublimaram a própria vida por um bem maior.

“Aprender é a única coisa da qual a mente humana nunca se cansa, nunca tem medo e jamais se arrepende”.

(Leonardo da Vinci)

Resumo

ESPER, L.A. **Influência do Plasma Rico em Plaquetas associado ou não à Regeneração Tecidual Guiada na cicatrização de defeitos de fenestração periodontal em cães. Estudo histológico e histométrico** [Mestrado em Periodontia]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2009.

Este estudo avaliou histomorfometricamente o processo de cicatrização em defeitos de fenestração periodontal, criados cirurgicamente em cães e tratados com Plasma Rico em Plaquetas (PRP) associado ou não ao uso de barreira de membrana. Defeitos de fenestração periodontal com 5 mm de diâmetro foram cirurgicamente criados nos caninos superiores de 12 cães. Os dentes foram divididos em 4 grupos: C (controle) - defeito preenchido somente com coágulo sangüíneo; M - defeito preenchido com coágulo sangüíneo e protegido com uma membrana de politetrafluoretileno expandido (PTFE-e) com reforço de titânio; PRP - defeito preenchido com PRP; PRP/M - defeito preenchido com PRP e protegido com uma membrana de PTFE-e com reforço de titânio. Os animais foram eutanasiados após 4 semanas. Medidas lineares e de área da cicatrização periodontal foram avaliadas e calculadas como porcentagem do defeito original. Os dados foram submetidos à análise estatística (análise de variância, $p < 0,05$). Nenhum espécime regenerou-se completamente com osso ou cimento. Formação de novo cimento foi significativamente maior nos Grupos PRP e PRP/M quando comparados ao Grupo C. Observou-se, também, significativa maior formação de novo cimento no Grupo PRP/M que no Grupo M. Dentro dos limites deste estudo, pode-se concluir que o PRP favoreceu a formação de novo cimento. A Regeneração Tecidual Guiada (RTG) não proporcionou efeitos adicionais ao uso do PRP no tratamento de defeitos de fenestração periodontal em cães.

Palavras-chave: Regeneração Tecidual Guiada; Plasma Rico em Plaquetas; Plaquetas; Fatores de Crescimento.

Abstract

ESPER, L.A. **Influence of Platelet-Rich Plasma (PRP) with or without Guided Tissue Regeneration (GTR) on the healing of periodontal fenestration defects in dogs: a histologic and histometric study** [dissertation]. Araçatuba: UNESP - São Paulo State University; 2009.

This study histomorphometrically analyzed the healing of periodontal fenestration defects surgically created in dogs and treated with Platelet-Rich Plasma (PRP) with or without a barrier membrane. A 5 mm diameter periodontal fenestration defect was made in each upper canine of 12 dogs. The teeth were divided into 4 groups: C (control) - defect filled with blood clot only; M - defect filled with blood clot and covered by a titanium-reinforced expanded polytetrafluoroethylene membrane (ePTFE); PRP - defect filled with PRP; PRP/M - defect filled with PRP and covered by a titanium-reinforced ePTFE. All animals were euthanized at 4 weeks post-operative. Linear and area measurements of periodontal healing were evaluated and calculated as a percentage of the original defect. Data were statistically analyzed (analysis of variance, $p < 0.05$). No defect completely regenerated with either bone or cementum. Cementum formation was significantly greater in groups PRP and PRP/M when both groups were compared to Group C. A significant greater cementum formation was also observed in Group PRP/M than in Group M. Within the limits of this study, it can be concluded that the PRP favored cementum formation. Guided Tissue Regeneration (GTR) did not promote any additional benefit to the use of PRP in the treatment of periodontal fenestration defects in dogs.

Key words: Guided Tissue Regeneration; Platelet-Rich Plasma; Platelets; Growth Factors.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Defeito de fenestração periodontal e as duas marcações de referência (periférica e central) criados na superfície redicular. 68
- Figura 2 - Número médio de plaquetas/ μ l e desvios-padrão nas amostras de PRP e de Sangue Periférico. 69
- Figura 3 - (A) Grupo C. Nova formação de tecido ósseo (NO) restrita à margem (seta) do defeito periodontal. (B) Grupo PRP. Novo cemento (setas) e novo osso (NO) estendendo-se em direção ao centro do defeito periodontal a partir da marcação periférica (MP). (C) Grupo M. Novo cemento (setas) e novo osso (NO) estendendo-se em direção ao centro do defeito periodontal a partir da marcação periférica (MP). (D) Grupo PRP/M. Novo cemento (setas) estendendo-se em direção ao centro do defeito periodontal a partir da marcação periférica (MP). 70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores percentuais médios e desvios-padrão (DP) das medidas lineares com comparação entre os grupos.	71
Tabela 2 - Valores percentuais médios e desvios-padrão (DP) das medidas de área com comparação entre os grupos.	72

LISTA DE ANEXOS

Anexo A -	Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEAA)	74
Anexo B -	Normas para Publicação segundo o Periódico “Journal of Clinical Periodontology”	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACD-A	=	Anticoagulante Ácido Citrato Dextrose
µl	=	Microlitro
A-NO	=	Área de Novo Osso
A-OT	=	Área de Outros Tecidos
A-TD	=	Área Total do Defeito
Bfgf	=	Fator de Crescimento Fibroblástico Básico
C	=	Controle
CEEA	=	Comissão de Ética na Experimentação Animal
DP	=	Desvios-Padrão
FCs	=	Fatores de Crescimento
Fig.	=	Figura
H.E.	=	Hematoxilina e Eosina
IGF	=	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina
IM	=	Intramuscular
IV	=	Intravenosa
Kg	=	Quilograma
L-A	=	Anquilose
L-FC	=	Formação de Cimento
L-ED	=	Extensão do Defeito
L-FO	=	Formação de Osso
L-TC	=	Tecido Conjuntivo
M	=	Membrana
MG	=	Miligrama
ml	=	Mililitro

Mm	=	Milímetro
MP	=	Marcação Periférica
NO	=	Novo osso
O ₂	=	Oxigênio
PCCS TM	=	Platelet Concentrate Collection System
PCCS II TM	=	Platelet Concentrate Collection System II
PDGF	=	Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas
PRP	=	Plasma Rico em Plaquetas
PRP/M	=	Plasma Rico em Plaquetas/Membrana
PTFE-e	=	Politetrafluoretileno expandido
rpm	=	Rotações por minuto
RTG	=	Regeneração Tecidual Guiada
TGF- β	=	Fator de Crescimento Transformador β
UI	=	Unidades Internacionais

LISTA DE SÍMBOLOS

$\&$	=	E
P	=	Probabilidade do valor do teste
$<$	=	Menor
$\%$	=	Por cento
$>$	=	Maior
B	=	Beta
N	=	Tamanho da Amostra

SUMÁRIO

Manuscrito para Publicação	42
Página de título	43
Resumo	44
Introdução	46
Material e métodos	48
Resultados	55
Discussão	57
Agradecimentos	61
Referências	62
Anexos	73

*Manuscrito para Publicação**

*Segundo as normas do periódico “Journal of Clinical Periodontology” – Anexo B

Influência do Plasma Rico em Plaquetas associado ou não à Regeneração Tecidual Guiada na cicatrização de defeitos de fenestração periodontal em cães. Estudo histológico e histométrico.

Luis A. Esper¹, Maria J. H. Nagata¹

¹Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada, Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Brasil.

Título Resumido (“Running title”): PRP/RTG em defeitos de fenestração periodontal

Palavras-Chave: regeneração tecidual guiada; Plasma Rico em Plaquetas; plaquetas; fatores de crescimento.

Autora responsável pela correspondência:

Maria J. H. Nagata

Telefone: +55 18 3636 3271

Fax: +55 18 3636 3332

Rua José Bonifácio, 1193

CEP: 16015 - 050 Araçatuba, SP, Brasil

e-mail: mjnagata@foa.unesp.br

Conflito de Interesse e Fonte de Apoio:

Os autores declaram que não têm conflitos de interesse. Luis A. Esper recebeu Bolsa de Mestrado da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 07/53341-9). Este estudo foi parcialmente patrocinado pelas empresas BIOMET 3i, Inc. (Palm Beach Gardens, FL, EUA), W. L. Gore & Associates (Flagstaff, AZ, EUA) e Johnson & Johnson Produtos Profissionais Ltda. (São José dos Campos, SP, Brasil).

Resumo

Objetivos: Este estudo avaliou histomorfometricamente o processo de cicatrização em defeitos de fenestração periodontal, criados cirurgicamente em cães e tratados com Plasma Rico em Plaquetas (PRP) associado ou não ao uso de barreira de membrana.

Material e Métodos: Defeitos de fenestração periodontal com 5 mm de diâmetro foram cirurgicamente criados nos caninos superiores de 12 cães. Os dentes foram divididos em 4 grupos: C (controle) - defeito preenchido somente com coágulo sanguíneo; M - defeito preenchido com coágulo sanguíneo e protegido com uma membrana de politetrafluoretileno expandido (PTFE-e) com reforço de titânio; PRP - defeito preenchido com PRP; PRP/M - defeito preenchido com PRP e protegido com uma membrana de PTFE-e com reforço de titânio. Os animais foram eutanasiados após 4 semanas. Medidas lineares e de área da cicatrização periodontal foram avaliadas e calculadas como porcentagem do defeito original. Os dados foram submetidos à análise estatística (análise de variância, $p < 0,05$).

Resultados: Nenhum espécime regenerou-se completamente com osso ou cimento. Formação de novo cimento foi significativamente maior nos Grupos PRP e PRP/M quando comparados ao Grupo C. Observou-se, também, significativa maior formação de novo cimento no Grupo PRP/M que no Grupo M.

Conclusões: Dentro dos limites deste estudo, pode-se concluir que o PRP favoreceu a formação de novo cimento. A Regeneração Tecidual Guiada (RTG) não proporcionou efeitos adicionais ao uso do PRP no tratamento de defeitos de fenestração periodontal em cães.

Relevância Clínica:

Racionalidade Científica para o Estudo: Há uma carência de estudos histológicos que avaliaram o efeito isolado do PRP, bem como da sua associação com Regeneração Tecidual Guiada (RTG) na regeneração periodontal. Tem sido sugerido que o PRP pode exercer o efeito de RTG.

Achados Principais: O PRP favoreceu a formação de novo cemento. A RTG não proporcionou efeitos adicionais ao uso do PRP no tratamento de defeitos de fenestração periodontal em cães.

Implicações Práticas: O PRP pode ser considerado uma alternativa na terapia periodontal regenerativa.

Introdução

Recentemente, uma revisão sistemática demonstrou evidências dos efeitos benéficos do Plasma Rico em Plaquetas (PRP) no tratamento de defeitos periodontais (Plachokova et al. 2008). A racionalidade para o uso local do PRP está, principalmente, no aumento do nível de fatores de crescimento (FCs) autógenos no sítio da ferida após a degranulação das plaquetas. FCs são mediadores biológicos envolvidos no processo de regeneração periodontal. Avanços nas áreas de biologia molecular e celular permitiram a elucidação das funções dos FCs e da participação dos mesmos nas diferentes fases da cicatrização da ferida periodontal. Estudos recentes *in vitro* e *in vivo* têm confirmado que os FCs podem melhorar a capacidade regenerativa dos tecidos, melhorando a proliferação, diferenciação e quimioatração celular (Trombelli & Farina 2008).

Estudos clínicos e em animais têm demonstrado o potencial do PRP na terapia periodontal regenerativa. Em um estudo realizado em cães, a associação do PRP ao enxerto de tecido conjuntivo resultou em maior formação de novo cemento quando comparado ao uso do enxerto isoladamente. Os autores sugeriram que o PRP pode estimular a diferenciação de células do ligamento periodontal em cementoblastos, induzindo a cementogênese (Suaid et al. 2008).

No tratamento de defeitos infra-ósseos, alguns estudos clínicos têm avaliado o efeito do PRP associado a outros materiais como a hidroxiapatita sintética (Okuda et al. 2005), osso bovino (Hanna et al. 2004) ou osso desmineralizado seco congelado (Piemontese et al. 2008). Essas associações resultaram em maior redução na profundidade de sondagem e maior ganho de inserção clínica quando comparados ao uso isolado da hidroxiapatita ou dos enxertos ósseos. Outros estudos clínicos avaliaram, no tratamento de defeitos ósseos periodontais, a associação da Regeneração Tecidual Guiada (RTG) e PRP ao osso bovino (Camargo et al. 2002, Lekovic

et al. 2002, Lekovic et al. 2003, Camargo et al. 2005, Döri et al. 2007a, Döri et al. 2007b) ou ao β fosfato de tricálcio (Christgau et al. 2006, Döri et al. 2008). Alguns estudos mostraram que o PRP não promoveu benefícios adicionais à associação de biomateriais ou enxertos ósseos e RTG (Christgau et al. 2006, Döri et al. 2007a, Döri et al. 2007b, Döri et al. 2008). Outros estudos, contudo, mostraram resultados favoráveis da associação de RTG, PRP e osso bovino quando comparado ao debridamento somente ou ao uso isolado da RTG (Camargo et al. 2002, Lekovic et al. 2003, Camargo et al. 2005).

Lekovic et al. (2002) compararam a associação de RTG, PRP e osso bovino com PRP e osso bovino apenas. Ambos os grupos apresentaram melhoras nos parâmetros clínicos, porém sem diferenças estatísticas entre eles. Como a RTG não apresentou efeito adicional à associação PRP/osso bovino, os autores sugeriram que o PRP pode ter exercido o efeito de RTG, considerando as características físicas do componente de fibrina do PRP. Este componente de fibrina não somente funciona como agente hemostático, ajudando a estabilizar o material de enxerto e o coágulo sanguíneo (Polson & Proye 1983, Wikesjö et al. 1992), mas também adere à superfície radicular e assim poderia impedir a migração de células epiteliais e do tecido conjuntivo do retalho (Gottlow 1994).

O PRP associado à RTG foi avaliado por Keles et al. (2006) em defeitos periodontais infra-ósseos, resultando em ganho de inserção clínica e redução na profundidade de sondagem. Entretanto, os efeitos isolados de cada material não foram avaliados. Recentemente, uma série de casos foi publicada sobre o tratamento de defeitos periodontais infra-ósseos com RTG ou apenas PRP (Papli & Chen 2007). Esta série de casos sugeriu que o PRP obteve ganho de inserção clínica e redução da profundidade de sondagem similares à RTG. Contudo, a associação de RTG e PRP não foi testada. Além disso, o pequeno tamanho da amostra e a falta de padronização dos tipos de defeitos podem ter influenciado os resultados obtidos.

De fato, vários estudos clínicos demonstraram resultados positivos quando o PRP foi associado a diferentes biomateriais no tratamento de defeitos ósseos periodontais (Camargo et al. 2002, Hanna et al. 2004, Okuda et al. 2005, Camargo et al. 2005). Entretanto, é preciso considerar que, nestes modelos investigativos, não foi possível determinar qual o tipo de cicatrização periodontal (regeneração ou reparo) ocorrido, pois nenhuma avaliação histológica foi realizada. Além disso, não foi possível constatar qual a participação individual do PRP na obtenção dos resultados, pois as terapias utilizadas incluíram outros biomateriais, os quais podem ter obscurecido o efeito biológico genuíno do PRP (Pryor et al. 2005). O desenho de alguns desses estudos também não permitiu determinar se a associação de RTG ao PRP é ou não vantajosa.

Portanto, considerando-se a literatura pertinente, constata-se a necessidade da realização de estudos histológicos para avaliar o efeito do uso isolado do PRP, bem como de sua associação com RTG, na cicatrização de defeitos ósseos periodontais.

O propósito deste estudo foi avaliar, histomorfometricamente, o processo de cicatrização em defeitos de fenestração periodontal, criados cirurgicamente em cães e tratados com Plasma Rico em Plaquetas (PRP) associado ou não ao uso de barreira de membrana.

Material e Métodos

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEAA) da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP. Todas as diretrizes relativas aos cuidados com a pesquisa animal foram estritamente seguidas. Para o presente estudo, foram utilizados doze cães adultos, machos, de raça indefinida, com peso entre 15 e 20 Kg (Biotério da Faculdade

de Odontologia do Campus de Araçatuba – UNESP). Os animais apresentavam bom estado de saúde geral. Quanto ao estado bucal, a dentição permanente apresentava-se completa e em boas condições, com ausência de perda óssea e de sinais clínicos de doença periodontal destrutiva. Durante todo o período experimental, os animais foram mantidos em celas individuais e alimentados com ração canina e água *ad libitum*.

Os dentes utilizados para criar os defeitos periodontais de fenestração foram os 2 caninos superiores de cada cão. Os dentes foram divididos, seguindo um protocolo de randomização bloqueada, em quatro grupos: Grupo C (controle) – o defeito foi preenchido somente com coágulo sanguíneo; Grupo M (membrana) – o defeito foi preenchido com coágulo sanguíneo e protegido com uma membrana de politetrafluoretileno expandido (PTFE-e) com reforço de titânio (W. L. Gore & Associates, Flagstaff, AZ, EUA); Grupo PRP (Plasma Rico em Plaquetas) – o defeito foi preenchido com PRP; Grupo PRP/M (Plasma Rico em Plaquetas/membrana) – o defeito foi preenchido com PRP e protegido com uma membrana de PTFE-e com reforço de titânio.

Para todos os procedimentos experimentais, o protocolo anestésico utilizado foi realizado da seguinte forma: a) como medicações pré-anestésicas, os animais receberam acepromazina 0,2% [0,05 mg/kg de peso corporal, intramuscular (IM)] e morfina 10 mg/ml (0,5 mg/kg de peso corporal, IM); b) a anestesia geral foi induzida por injeção intravenosa (IV) de propofol 10 mg/ml (5 mg/kg de peso corporal) e mantida por anestesia inalatória (halotano + O₂); c) a anestesia local foi realizada por bloqueio regional bilateral do nervo infra-orbitário com lidocaína 2% e bupivacaína 0,5%, ambas com epinefrina (1:100.000).

Uma semana antes da realização dos procedimentos cirúrgicos, raspagem supragengival e subgengival foi realizada com curetas Gracey e instrumentos ultrassônicos em todos os

dentes, seguida de polimento dental. O controle da placa bacteriana foi mantido pela aplicação tópica diária de solução de digluconato de clorexidina a 0,12%.

Procedimentos cirúrgicos

Todas as cirurgias foram realizadas pelo mesmo cirurgião. A área a ser operada recebeu anestesia local infiltrativa com mepivacaína a 2%, contendo epinefrina (1:100.000) para reduzir o sangramento. Foram realizadas uma incisão horizontal na gengiva inserida, aproximadamente na junção do terço médio e coronal da superfície radicular de cada canino, e uma incisão vertical mesial. Um retalho de espessura total foi elevado e uma broca trefina com 5 mm de diâmetro externo foi usada para realização do defeito de tamanho crítico padronizado através do osso vestibular (Tal et al. 2005). A dimensão do defeito foi verificada com sonda periodontal milimetrada (UNC15, Hu-Friedy, Chicago, IL, EUA). A superfície radicular exposta foi cuidadosamente raspada e alisada com curetas Gracey e curetas de furca para remover todo o cimento. A trefina foi usada, também, para criar uma marcação contínua ao redor da circunferência da superfície radicular do defeito cirúrgico. O centro da superfície radicular circular exposta foi identificado e marcado com uma broca esférica nº 1/4, a uma profundidade de aproximadamente 1 mm (Klepp et al. 2004). Ambas as marcações foram utilizadas na delimitação do tamanho original do defeito, bem como do seu centro, para as análises histológica e histométrica (Fig. 1).

Em cada animal, seguindo a randomização bloqueada, os defeitos de fenestração periodontal receberam dois dos seguintes tratamentos: M, PRP, PRP/M ou nenhum tratamento (controle). Nos Grupos M e PRP/M, uma membrana de PTFE-e com reforço de titânio (TRW 2, W. L. Gore & Associates, Flagstaff, AZ, EUA) foi ajustada e adaptada à morfologia do defeito, e suturada com fio monofilamentar não absorvível de PTFE-e (P5K17, W. L. Gore & Associates, Flagstaff, AZ, EUA). Após o término dos procedimentos operatórios, os retalhos

foram suturados com fios de seda 4-0 (Ethicon, Johnson & Johnson Produtos Profissionais Ltda., São José dos Campos, SP, Brasil), permitindo a cicatrização das feridas por primeira intenção. Foi realizada analgesia pós-operatória com dose única de cloridrato de tramadol 50 mg/ml (2 mg/kg de peso corporal, IM - Tramal[®], Pfizer Ltda., São Paulo, SP, Brasil), injetado imediatamente após o procedimento cirúrgico, e meloxicam 2 mg (0,2 mg/kg de peso corporal, via oral, Meloxivet[®], Duprat, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), uma vez ao dia, por 3 dias pós-operatórios. A cobertura antibiótica foi realizada com metronidazol (75.000 UI/kg de peso corporal) associado à espiamicina (12,5 mg/kg de peso corporal - Stomorgyl 10, Merial[®], Duluth, GA, EUA) via oral, uma vez ao dia, durante 7 dias pós-operatórios.

Procedimentos pós-cirúrgicos

Após os procedimentos cirúrgicos, os animais foram mantidos com dieta macia até o final do período experimental. As suturas foram removidas aos 10 dias pós-operatórios. Para o controle da placa bacteriana, aplicações tópicas de solução de digluconato de clorexidina a 0,12% foram realizadas, cinco vezes por semana, durante todo o período experimental. Foi realizada, também, a profilaxia cuidadosa com instrumentos ultrassônicos e polimento dental uma vez por semana. Para a realização da profilaxia, os animais foram apenas sedados com a associação de acepromazina 0,2% (0,1 mg/kg de peso corporal, IM) e cloridrato de quetamina (6,66 mg/kg de peso corporal, IM). A eutanásia dos animais foi realizada 4 semanas após a realização dos procedimentos cirúrgicos, sob sedação com xilazina (2 mg/kg de peso corporal, IM) e anestesia geral com tiopental sódico (12,5 mg/kg de peso corporal, IV), por perfusão. Nos grupos tratados com membrana, a mesma foi removida após realização do procedimento de perfusão. Para tanto, um retalho trapezoidal foi levantado e a membrana foi removida cuidadosamente, sem distúrbio dos tecidos subjacentes. O retalho foi, então, reposicionado.

Preparo do PRP

Antes dos procedimentos cirúrgicos para criação dos defeitos periodontais, 35 ml de sangue foram coletados de cada animal, via punção da veia jugular, com auxílio de uma cânula adaptada a uma seringa contendo 6 ml de solução anticoagulante citrato dextrose (noClot-50TM, Cytosol Laboratories, Inc., Braintree, MA, EUA). O PRP foi preparado de acordo com o protocolo do “Platelet Concentrate Collection System” (PCCS IITM, BIOMET 3i, Inc., Palm Beach Gardens, FL, EUA). As amostras de sangue foram centrifugadas a 3200 rpm por 12 minutos.

O PRP preparado foi armazenado, de forma não ativada e em temperatura ambiente, até o término dos procedimentos cirúrgicos (aproximadamente 2 horas). Uma solução de cloreto de cálcio a 10% (Calcium Chloride 10% Solution, ScienceLab.com Inc., Houston, TX, EUA) foi usada para ativar as amostras de PRP (0,025 ml de cloreto de cálcio para cada 0,5 ml de PRP). Após a ativação, o PRP foi imediatamente colocado no defeito periodontal.

Contagem de plaquetas

O líquido de Brecher foi usado para lisar os eritrócitos e diluir as amostras de sangue periférico e de PRP. As plaquetas nas amostras diluídas foram, então, contadas manualmente em uma câmara de Neubauer. Além disso, esfregaços de sangue periférico foram corados com “Panótico Rápido LB” (LaborClin, Pinhais, PR, Brasil) para verificar a morfologia das plaquetas.

Processamento tecidual

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

rotineiramente para inclusão em parafina. Foram realizados cortes seriados com 6 µm de espessura, no plano vestibulo-lingual, corados pelas técnicas da Hematoxilina e Eosina (H.E.) ou de Tricômico de Masson para análises histológica e histométrica em microscopia de luz.

Análise histomorfométrica

O corte mais central de cada defeito cirúrgico foi selecionado para as análises histológica e histométrica. Estas análises foram realizadas por dois examinadores que desconheciam os grupos de tratamento e os achados clínicos.

Na análise histológica descritiva, foram avaliados a presença ou ausência de reabsorção radicular e/ou anquilose dento-alveolar, a formação de tecido conjuntivo, novo cemento e novo osso, a orientação das fibras do ligamento periodontal e o grau de reação inflamatória dos tecidos. Para a análise histométrica, a imagem do corte histológico selecionado foi capturada com uma câmera digital acoplada a um estereomicroscópio, com aumento original de 16x e transferida para um computador. As medidas foram realizadas com o auxílio de um “software” analisador de imagens (ImageLab 2000, Diracon Bio Informática Ltda., Vargem Grande do Sul, SP, Brasil). Todas as medidas foram realizadas por um mesmo pesquisador que desconhecia os grupos experimentais e os tratamentos realizados. O pesquisador foi submetido a um rigoroso processo de calibração pela repetição de mensurações, com um intervalo de 48 horas, em 10% do total das imagens capturadas, as quais foram selecionadas aleatoriamente. A calibração foi aceita se a concordância existente entre as medidas iniciais e aquelas realizadas após 48 horas era maior ou igual a 90%. As seguintes medidas lineares e de área foram avaliadas na análise histométrica:

1 – Medidas Lineares:

1a) Extensão do Defeito (L-ED): medida coronário-apical do defeito experimental; **1b) Formação de Osso (L-FO):** medida dos limites coronário e apical do defeito aos níveis mais distantes das margens ósseas alveolares somada às extensões lineares das formações isoladas de novo osso; **1c) Formação de Cimento (L-FC):** medida dos limites coronário e apical do defeito aos níveis mais distantes do novo cimento somada às extensões lineares das formações isoladas de novo cimento; **1d) Tecido Conjuntivo (L-TC):** soma das extensões lineares da superfície radicular do defeito em contato direto com o tecido conjuntivo; **1e) Anquilose (L-A):** soma das extensões lineares da superfície radicular do defeito em contato direto com o tecido ósseo.

2 – Medidas de Área:

2a) Área Total do Defeito (A-TD): área do defeito delimitada pelas superfícies de corte do osso alveolar coronal e apical existentes (margens ósseas originais do defeito cirúrgico), superfície radicular e a cortical óssea externa original do osso alveolar. Esta cortical foi determinada pela identificação da cortical externa do osso alveolar original localizado tanto coronariamente como apicalmente ao defeito cirúrgico, que foram conectadas com uma linha desenhada com o auxílio de “software” analisador de imagem; **2b) Área de Novo Osso (A-NO):** porção da área total do defeito preenchida por novo osso; **2c) Área de Outros Tecidos (A-OT):** porção da área total do defeito preenchida por cimento e tecidos não mineralizados.

Análise estatística

As medidas lineares (L-FO, L-FC, L-TC, L-A) foram calculadas como uma porcentagem da Extensão do Defeito (L-ED). Os valores de L-A foram zero. As medidas de área (A-NO e A-OT) foram calculadas como uma porcentagem da Área Total do Defeito (A-TD). Estes dados

percentuais foram transformados em raiz quadrada para a análise estatística. Cada variável foi analisada separadamente. A significância das diferenças entre os grupos foi determinada por uma análise de variância (ANOVA), seguida de comparação múltipla de Bonferroni *post hoc* quando a análise de variância mostrou uma diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

Resultados

Todos os animais toleraram bem o procedimento cirúrgico e mantiveram-se saudáveis durante todo o período experimental. O pós-operatório transcorreu sem complicações. Um espécime do Grupo PRP/M foi perdido devido a problemas no processamento laboratorial.

Estudo da Contagem de Plaquetas

As plaquetas exibiram morfologia normal. A contagem de plaquetas confirmou que o protocolo utilizado para preparo do PRP neste estudo produziu amostras de plaquetas altamente concentradas. Os esfregaços de PRP exibiram maior concentração de plaquetas do que os esfregaços de sangue periférico. A média da contagem de plaquetas do sangue periférico foi $195,67 \pm 91,91 \times 10^3$ plaquetas/ μ l enquanto que a média de contagem de plaquetas do PRP foi $876,78 \pm 409,16 \times 10^3$ plaquetas/ μ l. A concentração de plaquetas no PRP foi aumentada em aproximadamente 4 vezes (Fig. 2).

Análise histológica qualitativa

Nenhum espécime regenerou-se completamente com osso ou cimento. Em todos os espécimes, o tecido conjuntivo mostrou-se rico em fibroblastos e com fibras colágenas dispostas paralelamente à superfície radicular e com infiltrado inflamatório crônico leve. Não

foi observada anquilose em nenhum dos espécimes analisados. Nos Grupos M e PRP/M, não foi observado qualquer sinal de colapso da membrana.

Nos espécimes do Grupo C, nova formação de tecido ósseo estava restrita às margens coronária e apical dos defeitos periodontais (Fig. 3A). Nos demais grupos, o osso neoformado estendia-se em direção ao centro dos defeitos periodontais em variadas distâncias. Formações ósseas isoladas no centro dos defeitos periodontais também foram observadas em dois espécimes do Grupo PRP e dois espécimes do Grupo PRP/M.

Novo cemento foi observado em todos os grupos com extensão e espessura variadas. Enquanto nos espécimes do Grupo C, a formação de novo cemento estava restrita às margens coronária e apical dos defeitos periodontais, nos espécimes dos Grupos PRP, M e PRP/M, o novo cemento estendeu-se em direção ao centro dos defeitos em variadas distâncias (Fig. 3; B, C e D). Formações isoladas de cemento também foram observadas no centro dos defeitos periodontais em todos os espécimes do Grupo PRP/M, em 5 espécimes do Grupo M e em 3 espécimes do Grupo PRP.

Análises histométrica e estatística

Tanto a L-ED (medida em milímetros) como a A-TD (medida em milímetros quadrados) de todos os grupos foram comparadas usando ANOVA e Kruskal-Wallis, respectivamente. Nenhuma diferença estatística foi encontrada entre os grupos para ambos os parâmetros ($p = 0,38$ para L-ED e $p = 0,11$ para A-TD). Os valores percentuais médios e desvios-padrão (DP) das medidas lineares, com comparação entre os grupos, são apresentados na Tabela 1. Os valores percentuais médios e DP das medidas de área, com comparação entre os grupos, são mostrados na Tabela 2.

Discussão

Em uma recente revisão de literatura, Trombelli & Farina (2008) relataram que a combinação de PRP com RTG resultou em um significativo ganho de inserção clínica no tratamento de defeitos infra-ósseos (Mauro et al. 2003, Keles et al. 2006). Contudo, os modelos experimentais desses estudos não permitiram determinar o efeito da associação de PRP/RTG em relação à RTG ou ao PRP isoladamente. O presente estudo foi o primeiro, que se tem conhecimento, que avaliou histologicamente a terapia combinada PRP/RTG, bem como a atuação isolada do PRP e da RTG, no processo de cicatrização em defeitos de fenestração periodontal em cães.

Alterações qualitativas e/ou quantitativas das plaquetas podem afetar o potencial regenerativo do PRP. Portanto, a seleção de um protocolo adequado de preparo do PRP é fundamental para avaliar os efeitos biológicos verdadeiros do PRP. Estudos que sugerem não haver benefício no uso do PRP podem estar utilizando um PRP de baixa qualidade, produzido por sistemas inadequados (Marx 2004). No presente trabalho, o PRP foi preparado segundo o protocolo do PCCS IITM. A primeira versão deste sistema, o PCCSTM, demonstrou características ideais para o preparo do PRP, pois concentra as plaquetas em níveis adequados, requer um volume reduzido de sangue, é semi-automatizado e não danifica mecanicamente as plaquetas durante a centrifugação (Weibrich et al. 2005, Leitner et al. 2006). Assim como o PCCSTM, recomendado por Marx (2004) por proporcionar uma concentração de plaquetas considerada “terapêutica” (aumento percentual médio de aproximadamente 400% na contagem de plaquetas), o PCCS IITM utilizado no presente estudo manteve esta propriedade, como constatado pelo aumento constante do número de plaquetas nas amostras de PRP em relação às do sangue periférico.

No presente estudo, a formação de novo cemento foi significativamente maior no Grupo PRP quando comparado ao Grupo C. Observou-se, também, significativa maior formação de novo cemento no Grupo PRP/M que no Grupo M. A racionalidade para a associação PRP/RTG está fundamentada no fato de que, embora a técnica da RTG tenha demonstrado potencial para a regeneração de cemento, osso alveolar e ligamento periodontal (Caffesse et al. 1988, Elharar et al. 1998, Camelo et al. 1998, Sculean et al. 1999) e tenha se tornado amplamente aceita como procedimento clínico, um problema comum da RTG é a alta variabilidade e baixa previsibilidade na resposta cicatricial (MacNeil & Somerman 1999, Kornman & Robertson 2000). Recentes estudos *in vitro* e *in vivo* têm confirmado que os FCs podem melhorar a capacidade dos tecidos de regenerar, melhorando a quimioatração, diferenciação e proliferação celular (Trombelli & Farina 2008). Os resultados do presente estudo indicam uma ação favorável do PRP na formação de cemento, sugerindo também um efeito adicional do PRP à RTG. Maior formação de cemento também foi relatada por Suaid et al. (2008), ao avaliar a associação do PRP a enxerto de tecido conjuntivo comparada ao enxerto de conjuntivo isoladamente, no tratamento de recessões gengivais em cães. Possíveis hipóteses para explicar esses achados estão fundamentadas nos efeitos biológicos do PRP através da atuação de FCs. Estudos *in vivo* sugeriram que FCs recombinantes como o Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas (PDGF), Fator de Crescimento Semelhante à Insulina (IGF) e Fator de Crescimento Fibroblástico Básico (bFGF) poderiam aumentar a formação de cemento sobre superfícies dentinárias desnudas (Giannobile et al. 1996, Rutherford et al. 1992, Sato et al. 2004). Estudos *in vitro* relataram que FCs presentes no PRP, como o Fator de Crescimento Transformador- β (TGF- β) e PDGF, inibem a proliferação de células epiteliais (Okuda et al. 2003) e estimulam a proliferação de células osteoblásticas e do ligamento periodontal (Okuda et al. 2003, Taba et al. 2005). Células presentes no ligamento periodontal

exibem características fenotípicas de células “osteoblast-like”, com potencial de diferenciar-se em osteoblastos e/ou cementoblastos (Basdra & Komposch 1997).

No presente estudo, não foram observadas diferenças significativas quanto à neoformação de cimento, osso alveolar e tecido conjuntivo entre os Grupos PRP/M e PRP, bem como entre os Grupos PRP e M. Além da ação biológica favorável dos FCs, o PRP apresenta-se com uma característica “pegajosa”, devido ao seu alto conteúdo de fibrina, que funciona como um agente hemostático e estabilizador e pode auxiliar a imobilizar o coágulo sangüíneo na área do defeito (Camargo et al. 2005, Okuda et al. 2005). Tem sido sugerido que a imobilização do coágulo é um evento importante nos estágios iniciais da cicatrização nos procedimentos periodontais regenerativos (Polson & Proye 1983, Wikesjö et al. 1992). Segundo Lekovic et al. (2002), o componente de fibrina do PRP não somente age como um agente hemostático auxiliando a estabilizar o coágulo sangüíneo, mas também adere à superfície radicular e assim pode impedir a migração apical de células epiteliais e do tecido conjuntivo do retalho. Esses autores sugeriram, então, que o PRP poderia exercer um efeito de RTG nos defeitos tratados. De fato, no presente estudo, o uso da RTG não melhorou os resultados obtidos apenas com o PRP, corroborando os achados do estudo clínico de Lekovic et al. (2003), que também sugeriram que a RTG não propiciou benefícios clínicos adicionais à terapia realizada com PRP e osso bovino em defeitos periodontais. Portanto, as propriedades físicas e químicas do PRP podem ter contribuído para a similaridade de resultados obtidos com esta modalidade terapêutica e com a RTG no presente estudo. Esses resultados corroboram os achados de Papli & Chen (2007) que, em uma série de casos clínicos, também observaram resultados clínicos e radiográficos similares após tratamento de defeitos infra-ósseos bilaterais com PRP ou RTG. No presente estudo, uma tendência de maior formação óssea foi observada nos Grupos PRP, M e PRP/M quando comparados ao Grupo C, embora diferenças estatisticamente

significativas não foram observadas. Observou-se, também, uma clara tendência de maior formação de cemento no Grupo M quando comparado ao Grupo C, embora sem diferenças significativas. Possíveis explicações para esses resultados são as grandes variações observadas entre os animais em relação a esses parâmetros e o número reduzido de espécimes utilizados no presente estudo.

Uma das limitações deste estudo que deve ser considerada é o fato de que os níveis de FCs nas amostras de PRP não foram mensurados. Portanto, não foi possível estabelecer uma correlação entre os níveis destes fatores e a formação dos tecidos periodontais. De fato, a literatura carece de informações a respeito da significância biológica de diferentes proporções de FCs dentro das amostras de PRP em humanos e grandes animais (Grageda 2004). Portanto, estudos adicionais sobre este tópico são necessários.

Dentro dos limites deste estudo, pode-se concluir que o PRP favoreceu a formação de novo cemento. A RTG não proporcionou efeitos adicionais ao uso do PRP no tratamento de defeitos de fenestração periodontal em cães.

Agradecimentos

Às empresas BIOMET *3i*, Inc. (Palm Beach Gardens, FL, EUA), W. L. Gore & Associates (Flagstaff, AZ, EUA) e Johnson & Johnson Produtos Profissionais Ltda. (São José dos Campos, SP, Brasil) por terem concedido os materiais utilizados neste estudo. Ao Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária do Campus de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, e à professora Valéria Nobre Leal de Souza Oliva pelo empréstimo de equipamentos necessários para este estudo. Ao médico veterinário Dr. Guillermo Carlos Veiga de Oliveira pela assistência profissional durante os procedimentos cirúrgicos. Ao Prof. Dr. Roberto Holland da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – UNESP, pela assessoria prestada na análise histológica deste estudo. À FAPESP, pela concessão da bolsa de mestrado (Processo 07/53341-9) ao pós-graduando Luis A. Esper.

Referências

- Basdra, E. K. & Komposch, G. (1997) Osteoblast-like properties of human periodontal ligament cells: an in vitro analysis. *European Journal of Orthodontics* **19**, 615-621.
- Caffesse, R. G., Smith, B. A., Castelli, W. A. & Nasjleti, C. E. (1988) New attachment achieved by guided tissue regeneration in beagle dogs. *Journal of Periodontology* **59**, 589-594.
- Camargo, P. M., Lekovic, V., Weinlaender, M., Vasilic, N., Madzarevic, M. & Kenney, E. B. (2002) Platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral combined with guided tissue regeneration in the treatment of intrabony defects in humans. *Journal of Periodontal Research* **37**, 300-306.
- Camargo, P. M., Lekovic V., Weinlaender M., Vasilic N., Madzarevic M. & Kenney E. B. (2005) A reentry study on the use of bovine porous bone mineral, GTR, and platelet-rich plasma in the regenerative treatment of intrabony defects in humans. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry* **25**, 49-59.
- Camelo, M., Nevins, M. L., Schenk, R. K., Simion, M., Rasperini, G., Lynch, S. E. & Nevins, M. (1998) Clinical, radiographic, and histologic evaluation of human periodontal defects treated with Bio-Oss and Bio-Guide. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry* **18**, 321-331.
- Christgau, M., Moder, D., Wagner, J., Glässl, M., Hiller, K-A., Wenzel, A. & Schmalz, G. (2006) Influence of autologous platelet concentrate on healing in intra-bony defects following guided tissue regeneration therapy: a randomized prospective clinical split-mouth study. *Journal of Clinical Periodontology* **33**, 908-921.

Döri, F., Huszár, T., Nikolidakis, D., Arweiler, N. B., Gera, I. & Sculean, A. (2007a) Effect of platelet-rich plasma on the healing of intrabony defects treated with an anorganic bovine bone mineral and expanded polytetrafluoroethylene membranes. *Journal of Periodontology* **78**, 983-990.

Döri, F., Huszár, T., Nikolidakis, D., Arweiler, N. B., Gera, I. & Sculean, A. (2007b) Effect of platelet-rich plasma on the healing of intra-bony defects treated with a natural bone mineral and a collagen membrane. *Journal of Clinical Periodontology* **34**, 254-261.

Döri, F., Huszár, T., Nikolidakis, D., Tihanyi, D., Horváth, A., Arweiler, N. B., Gera, I. & Sculean, A. (2008) Effect of platelet-rich plasma on the healing of intrabony defects treated with Beta tricalcium phosphate and expanded polytetrafluoroethylene membranes. *Journal of Periodontology* **79**, 660-669.

Elharar, F., Rodriguez, H. J., Benqué, E. P. & Caffesse, R. G. (1998) Guided tissue regeneration with bioabsorbable and expanded polytetrafluoroethylene barrier membranes in the treatment of naturally occurring periodontal defects in dogs. *Journal of Periodontology* **69**, 1218-1228.

Giannobile, W. V., Hernandez, R. A., Finkelman, R. D. (1996) Comparative effects of platelet-derived growth factor-BB and insulin-like growth factor-1, individually and in combination, on periodontal regeneration in *Macaca fascicularis*. *Journal of Periodontal Research* **31**, 301-312.

Gottlow, J. (1994) Periodontal Regeneration. In: Lang, N. P., Karring, T. eds. *Proceedings of the 1st European Workshop in Periodontology*, 172-192, London. Quintessence Publishing Company.

Grageda, E. (2004) Platelet-rich plasma and bone graft materials: a review and a standardized research protocol. *Implant Dentistry* **13**, 301-309.

Hanna, R., Trejo, P. M. & Weltman, R. L. (2004) Treatment of intrabony defects with bovine-derived xenograft alone and in combination with platelet-rich plasma: a randomized clinical trial. *Journal of Periodontology* **75**, 1668-1677.

Keles, G. C., Cetinkaya, B. O., Albayrak, D., Koprulu, H. & Acikgoz, G. (2006) Comparison of platelet pellet and bioactive glass in periodontal regenerative therapy. *Acta Odontologica Scandinavica* **64**, 327-333.

Klepp, M., Hinrichs, J. E., Eastlund, T., Schaffer, E. M. (2004) Histologic evaluation of demineralized freeze-dried bone allografts in barrier membrane covered periodontal fenestration wounds and ectopic sites in dogs. *Journal of Clinical Periodontology* **31**, 534-544.

Kornman, K. S. & Robertson, P. B. (2000) Fundamental principles affecting the outcomes of therapy for osseous lesions. *Periodontology 2000* **22**, 22-43.

Leitner, G. C., Gruber, R., Neumüller, J., Wagner, A., Kloimstein, P., Höcker, P., Körmöczy G. F., Buchta, C. (2006) Platelet content and growth factor release in platelet-rich plasma: a comparison of four different systems. *Vox Sanguinis* **91**, 135-139.

Lekovic, V., Camargo, P. M., Weinlaender, M., Vasilic, N., & Kenney, E. B. (2002) Comparison of platelet-rich plasma, bovine porous bone mineral, and guided tissue regeneration versus platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral in the treatment of intrabony defects: a reentry study. *Journal of Periodontology* **73**, 198-205.

Lekovic, V., Camargo, P. M., Weinlaender, M., Vasilic, N., Aleksic, Z. & Kenney, E. B. (2003) Effectiveness of a combination of platelet-rich plasma, bovine porous bone mineral and guided tissue regeneration in the treatment of mandibular grade II molar furcations in humans. *Journal of Clinical Periodontology* **30**, 746-751.

MacNeil, R. L. & Somerman, M. J. (1999) Development and regeneration of the periodontium: parallels and contrasts. *Periodontology 2000* **19**, 8-20.

Marx, R. E. (2004) Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **62**, 489-496.

Mauro, S., Orlando, L., Panzoni, R. & Orlando, P. F. (2003) Platelet gel biotechnology applied to regenerative surgery of intrabony defects in patients with refractory generalized aggressive periodontitis. Case report. *Minerva Stomatology* **52**, 401-412.

Okuda, K., Kawase, T., Momose, M., Murata, M., Saito, Y., Suzuki, H., Wolff, L. F. & Yoshie, H. (2003) Platelet-rich plasma contains high levels of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta and modulates the proliferation of periodontally related cells in vitro. *Journal of Periodontology* **74**, 849-857.

Okuda, K., Tai, H., Tanabe, K., Suzuki, H., Sato, T., Kawase, T., Saito, Y., Wolff, L. F. & Yoshiex, H. (2005) Platelet-rich plasma combined with a porous hydroxyapatite graft for the treatment of intrabony periodontal defects in humans: a comparative controlled clinical study. *Journal of Periodontology* **76**, 890-898.

Papli, R. & Chen, S. (2007) Surgical treatment of infrabony defects with autologous platelet concentrate or bioabsorbable barrier membrane: a prospective case series. *Journal of Periodontology* **78**, 185-193.

Piemontese, M., Aspriello, S. D., Rubini, C., Ferrante, L. & Procaccini, M. (2008) Treatment of periodontal intrabony defects with demineralized freeze-dried bone allograft in combination with platelet-rich plasma: a comparative clinical trial. *Journal of Periodontology* **79**, 802-810.

- Plachokova, A. S., Nikolidakis, D., Mulder, J., Jansen, J. A. & Creugers, N. H. J. (2008) Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in dentistry: a systematic review. *Clinical Oral Implants Research* **19**, 539-545.
- Polson, A. M. & Proye, M. P. (1983) Fibrin linkage: A precursor for new attachment. *Journal of Periodontology* **54**, 141-147.
- Pryor, M. E., Polimeni, G., Koo, K. T., Hartman, M. J., Gross, H., April, M., Safadi, F. F. & Wikesjö, U. M. (2005) Analysis of rat calvaria defects implanted with a platelet-rich plasma preparation: histologic and histometric observations. *Journal of Clinical Periodontology* **32**, 966-972.
- Rutherford, R. B., Niekrash, C. E., Kennedy, J. E., Charette, M. F. (1992) Platelet-derived and insulin-like growth factors stimulate regeneration of periodontal attachment in monkeys. *Journal of Periodontal Research* **27**, 285-290.
- Sato, Y., Kikuchi, M., Ohata, N., Tamura, M., Kuboki, Y. (2004) Enhanced cementum formation in experimentally induced cementum defects of the root surface with the application of recombinant basic fibroblast growth factor in collagen gel in vivo. *Journal of Periodontology* **75**, 243-248.
- Sculean, A., Donos, N., Chiantella, G. C., Windisch, P., Reich, E. & Brex, M. (1999) GTR with bioresorbable membranes in the treatment of intrabony defects: a clinical and histologic study. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry* **19**, 501-509.
- Suaïd, F. F., Carvalho, M. D., Santamaria, M. P., Casati, M. Z., Nociti F. H. Jr., Sallum, A. W. & Sallum, E. A. (2008) Platelet-Rich plasma and connective tissue grafts in the treatment of gingival recessions: a histometric study in dogs. *Journal of Periodontology* **79**, 888-895.
- Taba, M. Jr, Jin, Q., Sugai, J. V. & Giannobile, W. V. (2005) Current concepts in periodontal bioengineering. *Orthodontics and Craniofacial Research* **8**, 292-302.

Tal, H., Artzi, Z., Moses, O., Nemcovsky, C. & Kozlovsky, A. (2005) Guided periodontal regeneration using bilayered collagen membranes and bovine mineral in fenestration defects in the canine. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry* **25**, 509-518.

Trombelli, L. & Farina, R. (2008) Clinical outcomes with bioactive agents alone or in combination with grafting or guided tissue regeneration. *Journal of Clinical Periodontology* **35**, 117-135.

Weibrich, G., Kleis, W. K., Hitzler, W. E., Hafner, G. (2005) Comparison of the platelet concentrate collection system with the plasma-rich-in-growth-factors kit to produce platelet-rich plasma: a technical report. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* **20**, 118-123.

Wikesjö, U. M. E., Nilvéus, R. E., Selvig, K. E. (1992) Significance of early healing events on periodontal repair. a review. *Journal of Periodontology* **63**, 158-165.



Fig. 1. Defeito de fenestração periodontal e as duas marcações de referência (periférica e central) criados na superfície radicular.

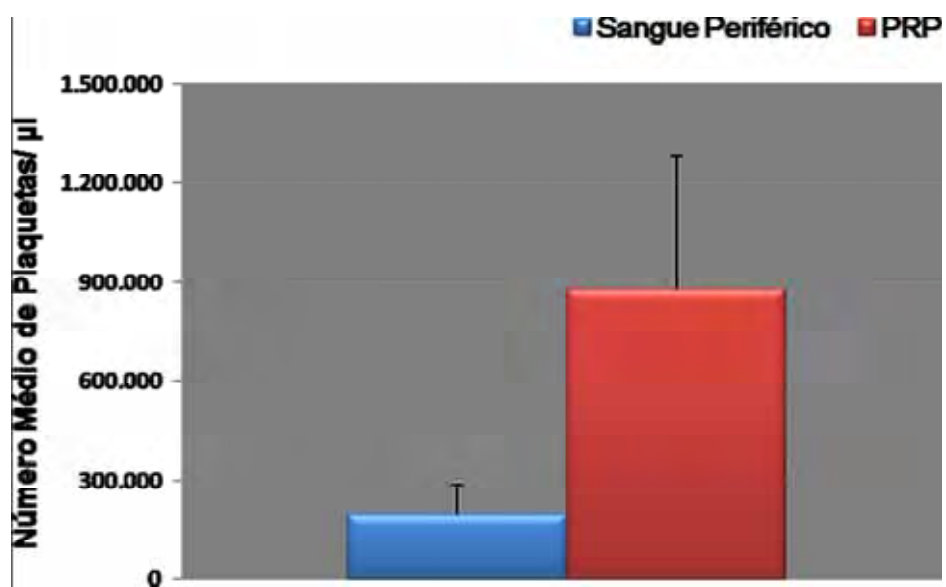


Fig. 2. Número médio de plaquetas/ μ l e desvios-padrão nas amostras de PRP e de Sangue Periférico.

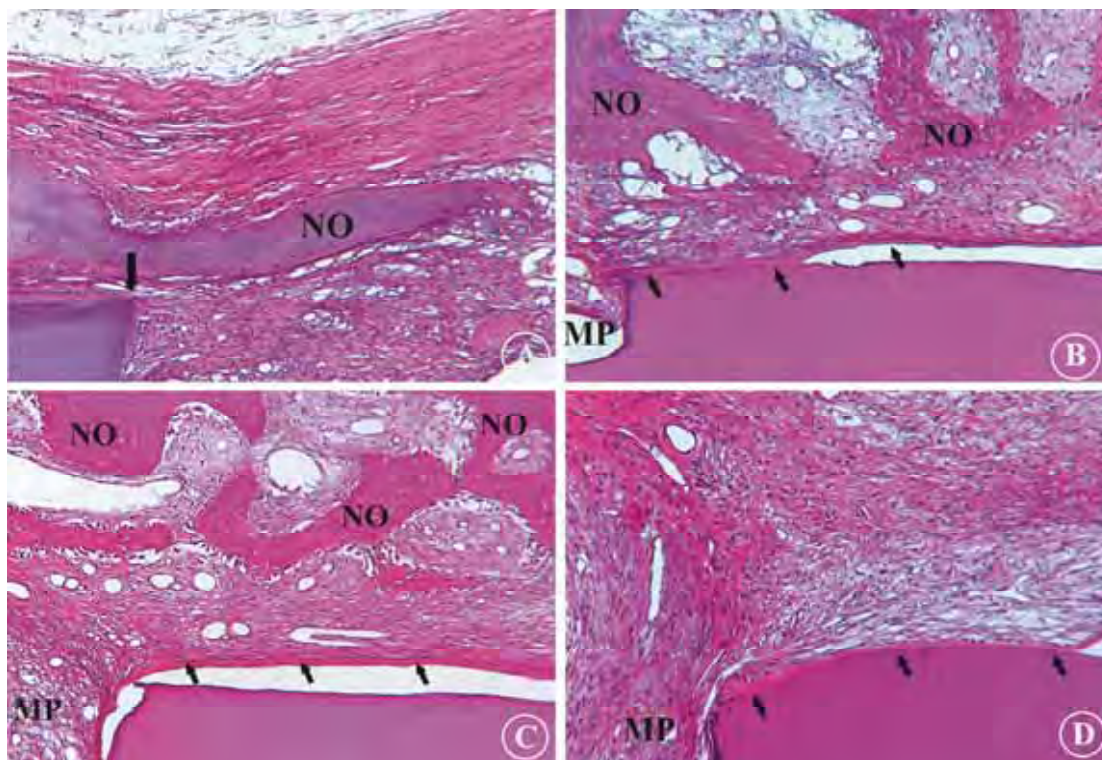


Fig. 3. (A) Grupo C - Nova formação de tecido ósseo (NO) restrita à margem (seta) do defeito periodontal; (B) Grupo PRP - Novo cimento (setas) e novo osso (NO) estendendo-se em direção ao centro do defeito periodontal a partir da marcação periférica (MP). (C) Grupo M - Novo cimento (setas) e novo osso (NO) estendendo-se em direção ao centro do defeito periodontal a partir da marcação periférica (MP). (D) Grupo PRP/M - Novo cimento (setas) estendendo-se em direção ao centro do defeito periodontal a partir da marcação periférica (MP) (H.E., aumento original 160x).

Tabelas

Tabela 1. Valores percentuais médios e desvios-padrão (DP) das medidas lineares com comparação entre os grupos.

Variável	C	PRP	M	PRP/M	ANOVA
	(n=6)	(n=6)	(n=6)	(n=5)	
	Média – DP	Média - DP	Média - DP	Média - DP	<i>P</i>
L-FO	18,84 ± 9,65	32,40 ± 16,98	32,46 ± 12,92	33,29 ± 24,84	0,531
L-FC	9,04 ± 7,50	32,58 ± 29,36	27,33 ± 29,59	52,02 ± 28,48	0,049
L-TC	90,96 ± 7,50	67,42 ± 29,36	72,67 ± 29,59	47,98 ± 28,48	0,097

Comparações para a medida L-FC: $p < 0,05$ para C vs PRP/M; $p < 0,05$ para C vs PRP; $p < 0,05$ para PRP/M vs M.

C, controle; PRP, plasma rico em plaquetas; M, membrana; PRP/M, plasma rico em plaquetas/membrana. L-FO, Formação de Osso; L-FC, Formação de Cimento; L-TC, Tecido Conjuntivo.

Tabela 2. Valores percentuais médios e desvios-padrão (DP) das medidas de área com comparação entre os grupos.

Variável	C	PRP	M	PRP/M	ANOVA
	(n=6)	(n=6)	(n=6)	(n=5)	
	Média – DP	Média – DP	Média - DP	Média - DP	<i>P</i>
A-NO	3,49 ± 3,23	7,00 ± 6,36	9,07 ± 5,09	8,42 ± 7,52	0,293
A-OT	96,51 ± 3,23	93,0 ± 6,36	90,93 ± 5,09	91,58 ± 7,52	0,365

C, controle; PRP, plasma rico em plaquetas; M, membrana; PRP/M, plasma rico em plaquetas/membrana. A-NO, Área de Novo Osso; A-OT, Área de Outros Tecidos.

Anexos

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

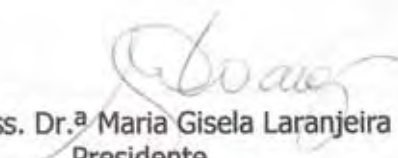
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"
Campus de Araçatuba

COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
(CEEa)

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Projeto "INFLUÊNCIA DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS ASSOCIADO OU NÃO À REGENERAÇÃO TECIDUAL GUIADA NA CICATRIZAÇÃO DE DEFEITOS DE FENESTRAÇÃO PERIODONTAL EM CCÃES. ESTUDO HISTOLÓGICO E HISTOMÉTRICO" sob responsabilidade de MARIA JOSÉ HITOMI NAGATA e MICHEL REIS MESSORA está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado *AD REFERENDUM* pela CEEa em 06 de julho de 2006, de acordo com o protocolo nº 59/06.

Araçatuba, 06 de julho de 2006.


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

Anexo B- Normas para Publicação segundo o Periódico “ Journal of Clinical Periodontology”

Journal of Clinical Periodontology



[The official publication of the European Federation of Periodontology](#)

Edited by:

Maurizio Tonetti

Editor Emeritus: Jan Lindhe

Print ISSN: 0303-6979

Online ISSN: 1600-051X

Frequency: Monthly

Current Volume: 36 / 2009

ISI Journal Citation Reports® Ranking: 2007: 5/51 (Dentistry, Oral Surgery & Medicine)

Impact Factor: 2.678

TopAuthor Guidelines

Content of Author Guidelines: [1. General](#), [2. Ethical Guidelines](#), [3. Manuscript Submission Procedure](#), [4. Manuscript Types Accepted](#), [5. Manuscript Format and Structure](#), [6. After Acceptance](#)

Relevant Documents: [Sample Manuscript](#), [Copyright Transfer Agreement](#)

Useful Websites: [Submission Site](#), [Articles published in Journal of Clinical Periodontology](#), [Author Services](#), [Blackwell Publishing's Ethical Guidelines](#), [Guidelines for Figures](#)

1.GENERAL

Journal of Clinical Periodontology publishes original contributions of high scientific merit in the fields of periodontology and implant dentistry. Its scope encompasses the physiology and pathology of the periodontium, the tissue integration of dental implants, the biology and the modulation of periodontal and alveolar bone healing and regeneration, diagnosis, epidemiology, prevention and therapy of periodontal disease, the clinical aspects of tooth replacement with dental implants, and the comprehensive rehabilitation of the periodontal

patient. Review articles by experts on new developments in basic and applied periodontal science and associated dental disciplines, advances in periodontal or implant techniques and procedures, and case reports which illustrate important new information are also welcome. Please read the instructions below carefully for details on the submission of manuscripts, the journal's requirements and standards as well as information concerning the procedure after a manuscript has been accepted for publication in *Journal of Clinical Periodontology*. Authors are encouraged to visit [Blackwell Publishing Author Services](#) for further information on the preparation and submission of articles and figures.

2. ETHICAL GUIDELINES

Journal of Clinical Periodontology adheres to the below ethical guidelines for publication and research.

2.1. Authorship and Acknowledgements

Authors submitting a paper do so on the understanding that the manuscript have been read and approved by all authors and that all authors agree to the submission of the manuscript to the Journal.

Journal of Clinical Periodontology adheres to the definition of authorship set up by The International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). According to the ICMJE authorship criteria should be based on 1) substantial contributions to conception and design of, or acquisition of data or analysis and interpretation of data, 2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content and 3) final approval of the version to be published. Authors should meet conditions 1, 2 and 3. It is a requirement that all authors have been accredited as appropriate upon submission of the manuscript. Contributors who do not qualify as authors should be mentioned under Acknowledgements. Please note that it is a requirement to include email addresses for all co-authors at submission. If any of the email-addresses supplied are incorrect the corresponding Author will be contacted by the journal administrator.

Acknowledgements: Under acknowledgements please specify contributors to the article other than the authors accredited.

2.2. Ethical Approvals

Experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association Declaration of Helsinki (version VI, 2002 www.wma.net/e/policy/b3.htm) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included.

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

All studies using human or animal subjects should include an explicit statement in the Material and Methods section identifying the review and ethics committee approval for each study, if applicable. Editors reserve the right to reject papers if there is doubt as to whether. Appropriate procedures have been used.

2.3 Clinical Trials

Clinical trials should be reported using the CONSORT guidelines available at www.consort-statement.org. A [CONSORT checklist](#) should also be included in the submission material. *Journal of Clinical Periodontology* encourages authors submitting manuscripts reporting from a clinical trial to register the trials in any of the following free, public clinical trials registries: www.clinicaltrials.gov, <http://clinicaltrials-dev.ifpma.org/>, <http://isrctn.org/>. The clinical trial registration number and name of the trial register will then be published with the paper.

2.4 DNA Sequences and Crystallographic Structure Determinations

Papers reporting protein or DNA sequences and crystallographic structure determinations will not be accepted without a Genbank or Brookhaven accession number, respectively. Other supporting data sets must be made available on the publication date from the authors directly.

2.5 Conflict of Interest and Sources of Funding

Authors are required to disclose all sources of institutional, private and corporate financial support for their study. Suppliers of materials (for free or at a discount from current rates) should be named in the source of funding and their location (town, state/county, country) included. Other suppliers will be identified in the text. If no funding has been available other than that of the author's institution, this should be specified upon submission. Authors are also required to disclose any potential conflict of interest. These include financial interests (for example patent, ownership, stock ownership, consultancies, speaker's fee,) or provision of study materials by their manufacturer for free or at a discount from current rates. Author's conflict of interest (or information specifying the absence of conflicts of interest) and the sources of funding for the research will be published under a separate heading entitled "Conflict of Interest and Sources of Funding Statement". See Editor-in-Chief Maurizio Tonetti's [Editorial on Conflict of Interest and Sources of Funding](#) and www.icmje.org/#conflicts for generally accepted definitions.

2.6 Appeal of Decision

Under exception circumstances, authors may appeal the editorial decision. Authors who wish to appeal the decision on their submitted paper may do so by e-mailing the editorial office at cpeedoffice@wiley.com with a detailed explanation for why they find reasons to appeal the decision.

2.7 Permissions

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

2.8 Copyright Assignment

Authors submitting a paper do so on the understanding that the work and its essential substance have not been published before and is not being considered for publication elsewhere. The submission of the manuscript by the authors means that the authors automatically agree to assign exclusive copyright to Blackwell Publishing if and when the manuscript is accepted for publication. The work shall not be published elsewhere in any language without the written consent of the publisher. The articles published in this journal are protected by copyright, which covers translation rights and the exclusive right to reproduce and distribute all of the articles printed in the journal. No material published in the journal may be stored on microfilm or videocassettes or in electronic database and the like or reproduced photographically without the prior written permission of the publisher. Correspondence to the journal is accepted on the understanding that the contributing author licences the publisher to publish the letter as part of the journal or separately from it, in the exercise of any subsidiary rights relating to the journal and its contents. Upon acceptance of a paper, authors are required to assign the exclusive licence to publish their paper to Blackwell Publishing. Assignment of the exclusive licence is a condition of publication and papers will not be passed to the publisher for production unless licence has been assigned. (Papers subject to government or Crown copyright are exempt from this requirement; however, the form still has to be signed). A completed [Copyright Transfer Agreement](#) (CTA) must be sent to the Editorial Office before any manuscript can be published. Authors must send the completed CTA upon receiving notice of manuscript acceptance, i.e., do not send the CTA at submission.

The CTA should be sent to:

Journal of Clinical Periodontology Editorial Office
Wiley-Blackwell
Rosenorns Allé 1
1970 Frederiksberg C
Denmark

Or by fax to: +45 77 33 33 77
Or by email to: cpeedoffice@wiley.com

For questions concerning copyright, please visit [Blackwell Publishing's Copyright FAQ](#).

3. MANUSCRIPT SUBMISSION PROCEDURE

Manuscripts should be submitted electronically via the online submission site <http://mc.manuscriptcentral.com/jcpe>. The use of an online submission and peer review site enables immediate distribution of manuscripts and consequentially speeds up the review process. It also allows authors to track the status of their own manuscripts. Complete instructions for submitting a paper is available online and below. Further assistance can be obtained from the Journal Admin, Ms Tine Sorgenfrei, at cpeedoffice@wiley.com.

3.1. Getting Started

Launch your web browser (supported browsers include Internet Explorer 5.5 or higher, Safari 1.2.4, or Firefox 1.0.4 or higher) and go to the journal's online Submission Site:

<http://mc.manuscriptcentral.com/jcpe>

- Log-in or, if you are a new user, click on "register here".
- If you are registering as a new user.
 - After clicking on "register here", enter your name and e-mail information and click "Next". Your e-mail information is very important.
 - Enter your institution and address information as appropriate, and then click "Next."
 - Enter a user ID and password of your choice (we recommend using your e-mail address as your user ID), and then select your areas of expertise. Click "Finish".
- If you are registered, but have forgotten your log in details, enter your e-mail address under "Password Help". The system will automatically send you your user ID and a new temporary

password.

- Log-in and select "Corresponding Author Center".

3.2. Submitting Your Manuscript

- After you have logged into your "Corresponding Author Center", submit your manuscript by clicking the submission link under "Author Resources".
- Enter data and answer questions as appropriate. You may copy and paste directly from your manuscript and you may upload your pre-prepared covering letter.
- Click the "Next" button on each screen to save your work and advance to the next screen.
- You are required to upload your files.
- Click on the "Browse" button and locate the file on your computer.
- Upload your manuscript main document complete with title page, statement concerning source(s) of funding and conflict(s) of interest, abstract, clinical relevance section, references, tables and figure legends as "main document". Upload figures as "figures". For clinical trials a Consort Checklist will be required, and it should be uploaded as "supplementary file for review". If any unpublished papers are referenced in the reference list, a digital version of the referenced paper should also be uploaded as "supplementary file for review".
- Select the designation of each file in the drop down next to the Browse button.
- When you have selected all files you wish to upload, click the "Upload Files" button.
- Review your submission (in HTML and PDF format). Notice that all documents uploaded as supplementary files for review will not be viewable in the HTML and PDF format. Click the "Submit" button when you are finished reviewing.

3.3. Manuscript Files Accepted

Manuscripts should be uploaded as Word (.doc) or Rich Text Format (.rft) files (not write-protected) plus separate figure files. GIF, JPEG, PICT or Bitmap files are acceptable for submission, but only high-resolution TIF or EPS files are suitable for printing. The files will be automatically converted to HTML and PDF on upload and will be used for the review process. The text file must contain the entire manuscript including title page, abstract, clinical

reference, main text, references, acknowledgement, statement of source of funding and any potential conflict of interest, tables, and figure legends, but no embedded figures. In the text, please reference any figures as for instance "Figure 1", "Figure 2" etc to match the tag name you choose for the individual figure files uploaded. Manuscripts should be formatted as described in the Author Guidelines below. Please note that any manuscripts uploaded as Word 2007 (.docx) will be automatically rejected. Please save any .docx file as .doc before uploading.

3.4. Blinded Review

All manuscripts submitted to *Journal of Clinical Periodontology* will be reviewed by two or more experts in the field. Papers that do not conform to the general aims and scope of the journal will, however, be returned immediately without review. *Journal of Clinical Periodontology* uses single blinded review. The names of the reviewers will thus not be disclosed to the author submitting a paper.

3.5. Suggest a Reviewer

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

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

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

3.7. E-mail Confirmation of Submission

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

whitelist.

3.8. Manuscript Status

You can access Manuscript Central any time to check your "Corresponding Author Center" for the status of your manuscript. The Journal will inform you by e-mail once a decision has been made.

3.9. Submission of Revised Manuscripts

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

3.10 Resubmissions

If your manuscript was given the decision of reject and resubmit, you might choose to submit an amended version of your manuscript. This should be submitted as a new submission following the guidelines above under 3.2. In addition you should upload comments to the previous review as "supplementary files for review".

4. MANUSCRIPT TYPES ACCEPTED

Journal of Clinical Periodontology publishes original research articles, reviews, clinical innovation reports and case reports. The latter will be published only if they provide new fundamental knowledge and if they use language understandable to the clinician. It is expected that any manuscript submitted represents unpublished original research.

Original Research Articles must describe significant and original experimental observations and provide sufficient detail so that the observations can be critically evaluated and, if necessary, repeated. Original articles will be published under the heading of clinical periodontology, implant dentistry or pre-clinical sciences and must conform to the highest international standards in the field.

Clinical Innovation Reports are suited to describe significant improvements in clinical practice such as the report of a novel surgical technique, a breakthrough in technology or practical approaches to recognized clinical challenges. They should conform to the highest scientific and clinical practice standards.

Case Reports illustrating unusual and clinically relevant observations are acceptable but their merit needs to provide high priority for publication in the Journal. On rare occasions, completed cases displaying non-obvious solutions to significant clinical challenges will be considered.

Reviews are selected for their broad general interest; all are refereed by experts in the field who are asked to comment on issues such as timeliness, general interest and balanced treatment of controversies, as well as on scientific accuracy. Reviews should take a broad view of the field rather than merely summarizing the authors' own previous work, so extensive citation of the authors' own publications is discouraged. The use of state-of-the-art evidence-based systematic approaches is expected. Reviews are frequently commissioned by the editors and, as such, authors are encouraged to submit a proposal to the Journal. Review proposals should include a full-page summary of the proposed contents with key references.

5. MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

5.1.Format

Language: The language of publication is English. Authors for whom English is a second language may choose to have their manuscript professionally edited before submission to improve the English. It is preferred that manuscript is professionally edited. A list of independent suppliers of editing services can be found at www.blackwellpublishing.com/bauthor/english_language.asp. All services are paid for and

arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

Abbreviations, Symbols and Nomenclature: *Journal of Clinical Periodontology* adheres to the conventions outlined in Units, Symbols and Abbreviations: A Guide for Medical and Scientific Editors and Authors. Abbreviations should be kept to a minimum, particularly those that are not standard. Non-standard abbreviations must be used three or more times and written out completely in the text when first used.

5.2. Structure

All articles submitted to *Journal of Clinical Periodontology* should include Title Page, Abstract, and References. In addition, *Journal of Clinical Periodontology* requires that all articles include a section on Clinical Relevance and disclose Source of Funding and Conflict of Interests. Figures, Figure Legends and Tables should be included where appropriate. All manuscripts should emphasize clarity and brevity. Authors should pay special attention to the presentation of their findings so that they may be communicated clearly. Technical jargon should be avoided as much as possible and be clearly explained where its use is unavoidable.

Title Page: The title must be concise and contain no more than 100 characters including spaces. The title page should include a running title of no more than 40 characters; 5-10 key words, complete names of institutions for each author, and the name, address, telephone number, fax number and e-mail address for the corresponding author.

Conflict of Interest and Source of Funding: Authors are required to disclose all sources of institutional, private and corporate financial support for their study. Suppliers of materials (for free or at a discount from current rates) should be named in the source of funding and their location (town, state/county, country) included. Other suppliers will be identified in the text. If no funding has been available other than that of the author's institution, this should be specified upon submission. Authors are also required to disclose any potential conflict of interest. These include financial interests (for example patent, ownership, stock ownership, consultancies, speaker's fee,) or provision of study materials by their manufacturer for free or at a discount from current rates. Author's conflict of interest (or information specifying the absence of conflicts of interest) and the sources of funding for the research will be published under a separate heading entitled "Conflict of Interest and Source of Funding Statement". See

Editor-in-Chief Maurizio Tonetti's [Editorial on Conflict of Interest and Source of Funding](#) and www.icmje.org/#conflicts for generally accepted definitions.

Abstract: is limited to 200 words in length and should not contain abbreviations or references. The abstract should be organized according to the content of the paper. For Original Research Articles the abstract should be organized with aim, materials and methods, results and conclusions. For clinical trials, it is encouraged that the abstract finish with the clinical trial registration number on a free public database such as clinicaltrials.gov.

Clinical Relevance: This section is aimed at giving clinicians a reading light to put the present research in perspective. It should be no more than 100 words and should not be a repetition of the abstract. It should provide a clear and concise explanation of the rationale for the study, of what was known before and of how the present results advance knowledge of this field. If appropriate, it may also contain suggestions for clinical practice. It should be structured with the following headings: scientific rationale for study, principal findings, and practical implications. Authors should pay particular attention to this text as it will be published in a highlighted box within their manuscript; ideally, reading this section should leave clinicians wishing to learn more about the topic and encourage them to read the full article.

Acknowledgements: Under acknowledgements please specify contributors to the article other than the authors accredited.

5.3. Original Research Articles

These must describe significant and original experimental observations and provide sufficient detail so that the observations can be critically evaluated and, if necessary, repeated. Original articles will be published under the heading of clinical periodontology, implant dentistry or pre-clinical sciences and must conform to the highest international standards in the field.

Main Text of Original Research Articles should be organized with Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion. The background and hypotheses underlying the study, as well as its main conclusions, should be clearly explained. Please see Sample Manuscript.

Introduction: should be focused, outlining the historical or logical origins of the study and not summarize the results; exhaustive literature reviews are not appropriate. It should close with the explicit statement of the specific aims of the investigation. **Material and Methods:** must contain sufficient detail such that, in combination with the references cited, all clinical trials and experiments reported can be fully reproduced. As a condition of publication, authors are required to make materials and methods used freely available to academic researchers for their own use. This includes antibodies and the constructs used to make transgenic animals, although not the animals themselves.

(a) Clinical trials should be reported using the CONSORT guidelines available at www.consort-statement.org. A [CONSORT checklist](#) should also be included in the submission material. If your study is a randomized clinical trial, you will need to fill in all sections of the CONSORT Checklist. If your study is not a randomized trial, not all sections of the checklist might apply to your manuscript, in which case you simply fill in N/A. *Journal of Clinical Periodontology* encourages authors submitting manuscripts reporting from a clinical trial to register the trials in any of the following free, public clinical trials registries: www.clinicaltrials.gov, <http://clinicaltrials-dev.ifpma.org/>, <http://isrctn.org/>. The clinical trial registration number and name of the trial register will then be published with the paper.

(b) Statistical Analysis: As papers frequently provide insufficient detail as to the performed statistical analyses, please describe with adequate detail. For clinical trials intention to treat analyses are encouraged (the reasons for choosing other types of analysis should be highlighted in the submission letter and clarified in the manuscript).

(c) DNA Sequences and Crystallographic Structure Determinations: Papers reporting protein or DNA sequences and crystallographic structure determinations will not be accepted without a Genbank or Brookhaven accession number, respectively. Other supporting data sets must be made available on the publication date from the authors directly.

(d) Experimental Subjects: Experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association Declaration of Helsinki (version VI, 2002 www.wma.net/e/policy/b3.htm) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included.

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

All studies using human or animal subjects should include an explicit statement in the Material and Methods section identifying the review and ethics committee approval for each study, if applicable. Editors reserve the right to reject papers if there is doubt as to whether appropriate procedures have been used.

Results: should present the observations with minimal reference to earlier literature or to possible interpretations.

Discussion: may usefully start with a brief summary of the major findings, but repetition of parts of the abstract or of the results section should be avoided. The discussion section should end with a brief conclusion and a comment on the potential clinical relevance of the findings. Statements and interpretation of the data should be appropriately supported by original references.

The discussion may usefully be structured with the following points in mind (modified from the proposal by [Richard Horton \(2002\), The Hidden Research Paper, The Journal of the American Medical Association, 287, 2775-2778](#)). Not all points will apply to all studies and its use is optional, but we believe it will improve the discussion section to keep these points in

mind.

Summary of key finding

- * Primary outcome measure(s)
- * Secondary outcome measure(s)
- * Results as they relate to a prior hypothesis

Strengths and Limitations of the Study

- * Study Question
- * Study Design
- * Data Collection
- * Analysis
- * Interpretation
- * Possible effects of bias on outcomes

Interpretation and Implications in the Context of the Totality of Evidence

- * Is there a systematic review to refer to?
- * If not, could one be reasonably done here and now?
- * What this study adds to the available evidence
- * Effects on patient care and health policy
- * Possible mechanisms

Controversies Raised by This Study**Future Research Directions**

- * For this particular research collaboration
- * Underlying mechanisms
- * Clinical research

5.4. Clinical Innovation Reports

These are suited to describe significant improvements in clinical practice such as the report of a novel surgical technique, a breakthrough in technology or practical approaches to recognized clinical challenges. They should conform to the highest scientific and clinical Practice standards.

Main Text of Clinical Innovation Reports should be organized with Introduction, Clinical Innovation Report, Discussion and Conclusion.

5.5. Case Reports

Case reports illustrating unusual and clinically relevant observations are acceptable but their merit needs to provide high priority for publication in the Journal. On rare occasions, completed cases displaying non-obvious solutions to significant clinical challenges will be considered.

Main Text of Case Reports should be organized with Introduction, Case report, Discussion and Conclusion.

5.6. Reviews

Reviews are selected for their broad general interest; all are refereed by experts in the field who are asked to comment on issues such as timeliness, general interest and balanced treatment of controversies, as well as on scientific accuracy. Reviews should take a broad view of the field rather than merely summarizing the authors' own previous work, so extensive citation of the authors' own publications is discouraged. The use of state-of-the-art evidence-based systematic approaches is expected. Reviews are frequently commissioned by the editors and, as such, authors are encouraged to submit a proposal to the Journal. Review proposals should include a full-page summary of the proposed contents with key references.

Main Text of Reviews should be organized with Introduction, Review of Current Literature, Discussion and Conclusion.

5.7. References

It is the policy of the Journal to encourage reference to the original papers rather than to literature reviews. Authors should therefore keep citations of reviews to the absolute minimum.

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

Please note that all unpublished papers (submitted or in press) included in the reference list should be provided in a digital version at submission. The unpublished paper should be uploaded as a supplementary file for review.

References in the text should quote the last name(s) of the author(s) and the year of publication (Brown & Smith 1966). Three or more authors should always be referred to as, for example, Brown et al. 1966.

A list of references should be given at the end of the paper and should follow the recommendations in Units, Symbols and Abbreviations: A Guide for Biological and Medical Editors and Authors, (1975), p. 36. London: The Royal Society of Medicine.

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

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

(i) for journal references:

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

(ii) for book references:

name(s) of author(s), year, chapter title, title of book in italics, edition, volume, page number(s), town of publication, publisher.

c) Authors' names should be arranged thus:

Smith, A. B., Jones, D. E. & Robinson, F. C.

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

d) The year of publication should be surrounded by parentheses: (1967).

e) The title of the paper should be included without quotation marks.

f) The journal title should be written in full, italicised (single underlining in typescript), and followed by volume number in bold type (double underlining on typescript) and page numbers.

Examples:

Botticelli, D., Berglundh, T. & Lindhe, J. (2004) Hard-tissue alterations following immediate implant placement in extraction sites. *Journal of Clinical Periodontology* 10, 820-828.

doi:10.1111/j.1600-051X.2004.00565.x

Lindhe, J., Lang, N.P. & Karring, K. (2003) *Periodontology and Implant Dentistry*. 4th edition, p. 1014, Oxford. Blackwell Munksgaard.

Bodansky, O. (1960) Enzymes in tumour growth with special reference to serum enzymes in cancer. In *Enzymes in Health and Disease*, eds. Greenberg, D. & Harper, H. A., pp. 269-278. Springfield: Thomas.

URL:

Full reference details must be given along with the URL, i.e. authorship, year, title of document/report and URL. If this information is not available, the reference should be removed and only the web address cited in the text.

Example:

Smith A. (1999) Select Committee Report into Social Care in the Community [WWW document]. URL <http://www.dhss.gov.uk/reports/report0394498.html> [accessed on 7 November, 2003]

5.8. Tables, Figures and Figure Legends

Tables: should be double-spaced with no vertical rulings, with a single bold ruling beneath the column titles. Units of measurements must be included in the column title.

Figures: All figures should be planned to fit within either 1 column width (8.0 cm), 1.5 column widths (13.0 cm) or 2 column widths (17.0 cm), and must be suitable for photocopy reproduction from the printed version of the manuscript. Lettering on figures should be in a clear, sans serif typeface (e.g. Helvetica); if possible, the same typeface should be used for all

figures in a paper. After reduction for publication, upper-case text and numbers should be at least 1.5-2.0 mm high (10 point Helvetica). After reduction symbols should be at least 2.0-3.0 mm high (10 point). All half-tone photographs should be submitted at final reproduction size. In general, multi-part figures should be arranged as they would appear in the final version. Each copy should be marked with the figure number and the corresponding author's name. Reduction to the scale that will be used on the page is not necessary, but any special requirements (such as the separation distance of stereo pairs) should be clearly specified. Unnecessary figures and parts (panels) of figures should be avoided: data presented in small tables or histograms, for instance, can generally be stated briefly in the text instead. Figures should not contain more than one panel unless the parts are logically connected; each panel of a multipart figure should be sized so that the whole figure can be reduced by the same amount and reproduced on the printed page at the smallest size at which essential details are visible.

Figures should be on a white background, and should avoid excessive boxing, unnecessary colour, shading and/or decorative effects (e.g. 3-dimensional skyscraper histograms) and highly pixelated computer drawings. The vertical axis of histograms should not be truncated to exaggerate small differences. The line spacing should be wide enough to remain clear on reduction to the minimum acceptable printed size.

Figures divided into parts should be labelled with a lower-case, boldface, roman letter, a, b, and so on, in the same typesize as used elsewhere in the figure. Lettering in figures should be in lower-case type, with the first letter capitalized. Units should have a single space between the number and the unit, and follow SI nomenclature or the nomenclature common to a particular field. Thousands should be separated by thin spaces (1 000). Unusual units or abbreviations should be spelled out in full or defined in the legend. Scale bars should be used rather than magnification factors, with the length of the bar defined in the legend rather than on the bar itself. In general, visual cues (on the figures themselves) are preferred to verbal explanations in the legend (e.g. broken line, open red triangles etc.)

Preparation of Electronic Figures for Publication: Although low quality images are adequate for review purposes, print publication requires high quality images to prevent the final product being blurred or fuzzy. Submit EPS (lineart) or TIFF (halftone/photographs) files only. MS PowerPoint and Word Graphics are unsuitable for printed pictures. Do not use

pixel-oriented programmes. Scans (TIFF only) should have a resolution of 300 dpi (halftone) or 600 to 1200 dpi (line drawings) in relation to the reproduction size (see below). EPS files should be saved with fonts embedded (and with a TIFF preview if possible).

For scanned images, the scanning resolution (at final image size) should be as follows to ensure good reproduction: lineart: >600 dpi; half-tones (including gel photographs): >300 dpi; figures containing both halftone and line images: >600 dpi. Further information can be obtained at Blackwell Publishing's guidelines for figures: www.blackwellpublishing.com/bauthor/illustration.asp. Check your electronic artwork before submitting it: www.blackwellpublishing.com/bauthor/eachecklist.asp

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

Figure Legends: should be a separate section of the manuscript, and should begin with a brief title for the whole figure and continue with a short description of each panel and the symbols used; they should not contain any details of methods.

5.9. Supporting Information

Supporting Information, such as data sets or additional figures or tables that will not be published in the print edition of the Journal but which will be viewable in the online edition can be submitted. The Editor-in-Chief should be contacted at the time of submission of your paper. Please see www.blackwellpublishing.com/bauthor/suppmat.asp for further information on the submission of Supporting Information.

6. AFTER ACCEPTANCE

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

6.1 Proof Corrections

The corresponding author will receive an email alert containing a link to a web site. A working email address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF (portable document format) file from this site. Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following Web site: www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html.

www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html. This will enable the file to be opened, read on screen, and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof. Hard copy proofs will be posted if no e-mail address is available; in your absence, please arrange for a colleague to access your e-mail to retrieve the proofs. Proofs must be returned to the Production Editor within three days of receipt.

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

6.2 Early Online Publication Prior to Print

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

6.3 Online Production Tracking

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

6.4 Author Material Archive Policy

Please note that unless specifically requested, Blackwell Publishing will dispose of all electronic material submitted one month after publication.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.