

Michel Reis Messoria

Cicatrização de enxertos de osso alógeno fresco congelado (O AFC) associados ou não ao plasma rico em plaquetas (PRP). Estudo histológico e histométrico em mandíbulas de cães.

ARAÇATUBA -SP

2009

Michel Reis Messoria

Cicatrização de enxertos de osso alógeno fresco congelado (O AFC) associados ou não ao plasma rico em plaquetas (PRP). Estudo histológico e histométrico em mandíbulas de cães.

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, para a obtenção do Título de DOUTOR 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

M585c Messoria, Michel Reis
Cicatrização de enxertos de osso alógeno fresco congelado (OAFC) associados ou não ao plasma rico em plaquetas (PRP) : estudo histológico e histométrico em mandíbulas de cães / Michel Reis Messoria. - Araçatuba : [s.n.], 2009
78 f. : il. + 1 CD-ROM

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

1. Regeneração óssea 2. Transplante homólogo 3. Plasma rico em plaquetas

Black D6
CDD 617.632

Dados Curriculares

Michel Reis Messoro

- Nascimento: 09.09.1980 – Itanhandu/MG
- Filiação: Roberto Costa Messoro
Magdala Luzia Reis Messoro
- 1999-2003: Curso de Graduação em Odontologia
Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL
- 2004-2005: Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área
de Periodontia
Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – UNESP
- 2006-2009: Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia,
Área de Periodontia
Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – UNESP
- 2009: Professor das disciplinas de Clínica Integrada e Metodologia da Pesquisa
do Centro Universitário de Lavras - UNILAVRAS

Dedicatória

A Deus

Naquela hora, o coração **disparou**

Naquela hora, a emoção **revigorou...**

Naquela hora, tudo parecia ter **acabado**

Naquela hora, nenhum sonho parecia **sobreviver...**

Naquela hora, foi preciso tomar uma **decisão**

Naquela hora, foi preciso **abandonar...**

Naquelas horas... Nessas horas...

Sempre: sua **Santa Onipresença!**

Presença que acalmou, fortaleceu...

Presença que guiou, iluminou...

Presença que deu sentido para tudo! **Presença** que me fez capaz nas minhas limitações!

Presença que ultrapassa minha ingratidão e minhas vaidades...

Presença que simplesmente se faz **Presença** no mais singelo amor!

"Amar-te mais que a mim mesmo

Amar-te mais que aos mais queridos

Amar-te mais do que tudo que há aqui

Amar-te, Amar-te e dar a vida só por Ti!"

Aos meus pais, **Roberto e Magdala**

Mãe,

O maior coração desse mundo! Dentro desse coração eu me refugiei em muitos momentos da minha vida... E que todos saibam que nunca me faltou espaço, por mais aflita ou angustiada que sua alma pudesse estar! Como eu preciso desse coração! Às vezes, não sei se estou vivo pelas batidas do meu ou desse coração... Mas, sem dúvidas, são as batidas desse coração que motivam a minha vida, que me enchem de esperança e que me fizeram chegar até aqui! Incondicionalmente! É assim que recebo seu amor... Você é **MÃE** no sentido mais completo e sublime dessa palavra!

Pai,

No seu labor, o meu descanso... Nas suas preocupações, a minha tranquilidade... Na sua luta, a minha vitória... Nos seus cabelos brancos, a minha juventude... Nas suas lágrimas, o meu sorriso... Nas suas noites de insônia, os meus sonhos... O que seria de mim sem você, **pai**? Olhar sempre atento a todas as minhas necessidades! TODAS! Nunca me deixou faltar absolutamente nada e, quando eu pensei em desistir, foram os seus olhos que transmitiram o estímulo, a dignidade e a coragem para seguir em frente. Meu exemplo, meu herói, meu melhor e eterno AMIGO!

Meu amor por vocês transcende qualquer medida...

É tempo sem horas...

É horizonte sem limites!

Aos meus avós, **Alcino e Wanda**

Vovô,

Meu fanático torcedor...

Tudo pelos netos e nada sem os netos. Este é o seu lema de vida!

Ponto de equilíbrio de toda nossa família. Vertente de sabedoria a nos guiar...

Um dia o senhor adoeceu... Um dia quase o perdemos...

A dor da ausência nos ameaçou bem de perto!

Percebi quão frágil é a vida e quão insuportável seria sua ausência...

Mas o senhor se recuperou! Vitória! Vida em abundância!!!

E na festa da vida, comemoro contigo a realização desse meu grande sonho.

Meu sonho, seu sonho, nosso sonho!

Vovó,

Seus netos partiram... Farmácia, Medicina, Odontologia...

Em cada partida, as lágrimas incoformadas da avó que nunca se acostumou com a ausência!

Mas, em cada volta, o abraço mais gostoso do mundo!

E que alegria em cada reencontro! Tudo como um delicioso filme repetido.

O café, o bolo, as conversas na varanda, as gargalhadas... Tudo sempre nesta mesma ordem...

Sei que um dia teremos que enfrentar a sua ausência....

Nesse dia ficará uma saudade dolorida, que de tão forte será uma ferida!

Mas as lembranças estarão sempre gravadas na minha alma...

Lembranças de seus olhos reluzentes de vida, de sonhos que não se acabaram, de otimismo...

Seus olhos, incondicionalmente, apaixonados pela vida e por todos os seus!

AMO VOCÊS!

À minha namorada **Flávia**

Você surgiu e nunca mais eu fui o mesmo...
Trouxe de volta o brilho dos meus olhos...
Consegui destrancar todas as portas do meu coração...
Mesmo sem eu merecer, curou todas as feridas da minha alma!

Você me compreendeu como ninguém
Ensinou-me o que é verdadeiramente amar...
Me fez descobrir um novo sentido para a vida...
E nunca mais me senti sozinho!

Você completou tudo que faltava aqui dentro do meu peito...
Transformou tudo que precisava ser mudado...
Despertou o que há de melhor em mim...
Tornou-se a minha força nas minhas fraquezas!

Tudo que **sinto**...
Toda minha **vida**...
Todas as minhas **lembranças**...
Todas as minhas **alegrias**...
Todos os meus **segredos**...
Todas as minhas **razões**...
Todo o meu **espaço**...
Todos os meus **sonhos**...

São todos para ti!

Porque TE AMO com todo o meu coração!!!

Ao professor e amigo, Dr. **Ronaldo Célio Mariano**

Você plantou em mim a semente da **docência**,
Regou essa semente com cuidados de mestre e de pai...
E se hoje posso colher algum fruto,
Foi porque suas lições permaneceram...

Lições de mestre

Que me ensinaram o valor de ser educador, edificador de vida e de seres!

Lições de amigo

Que me fizeram descobrir em você um ser humano grandioso!

À sombra do seu **talento**,

Encontrei alento para buscar a docência...

À sombra da sua **amizade**,

Encontrei novo ardor para vencer minhas limitações e imperfeições...

**“Não sou mestre de ninguém,
Ninguém é discípulo meu!
Indico a todos o Mestre invisível,
Que habita na alma de cada um
E para além de todos os mundos.**

**Sinto-me feliz, quando o viajor,
Orientado pela legenda da minha seta,
Me abandona e vai em demanda
Da indigitada meta
Em espontânea liberdade,
Rumo à longínqua felicidade...”**

(Professor Huberto Rohden)

A minha orientadora, Professora Dra. **Maria José Hitomi Nagata**

O silêncio que inspirou essas frases iluminadas
Reflete o que vivo agora
Uma profunda gratidão já misturada em saudades...

Dizem que “um professor influi para a eternidade”
E que “nunca se pode dizer até onde vai a sua influência!”
Sem dúvidas, levo a impressão de valores eternos em minha alma
De uma professora que, literalmente, lapidou a minha vida:

Alguém que foi flecha na encruzilhada,
Cuja missão era apontar o caminho certo!
Alguém que foi janela aberta, permitindo visão de horizontes longínquos,
Passagem franca para o Infinito!

Alguém que aparou muitas das minhas arestas,
Despertou em mim os mais sublimes valores da docência!
Foi modelo de honestidade incorruptível e de perseverança,
Foi exemplo de seriedade e de fé...

Alguém que se dedicou para me tornar melhor profissionalmente,
Sobretudo, para me tornar melhor como ser humano...
Seus conselhos transcenderão o tempo,
Estarão sempre diante do meu coração e nos meus pensamentos...

**“Você que reconhece o professor de verdade,
eu conheço o mestre da verdade
que todo discípulo sonha acompanhar,
ouvir, conhecer, aprender e amar.”**

(Carlos Estrela)

Agradecimentos Especiais

Ao professor Dr. **Valdir Gouveia Garcia**

O senhor me ensinou o que de mais nobre existe no ser humano,
Altruísmo, humildade e verdade... Exemplos não faltaram... Bastava estar com senhor!
Às pressas no corredor, em um canto da clínica, no telefone...
Suas palavras sempre fizeram TODA a diferença!

Excelente profissional... Sábio professor... Incansável educador!
Mostrou-me que vale a pena a tentativa e não o receio...
Vale a pena confiar e nunca ter medo! Vale a pena encarar e não fugir da realidade...
Ainda que haja fracasso, vale a pena lutar!

“As palavras são anões... Os exemplos são gigantes!!!”

(Provérbio suíço)

Ao professor Dr. **Alvaro Francisco Bosco**

Seriedade, ética e competência...
Valores incorruptíveis que acompanham o senhor como **profissional**...
Generosidade, honestidade e fraternidade...
Valores notórios que acompanham o senhor como **ser humano**...

Cada conselho vindo do senhor foi sempre recebido com carinho de filho.
Que privilégio tê-lo tão perto ao longo desses anos!
O maior orgulho do discípulo é a sapiência do Mestre...
É poder lembrar-se um dia da grandeza de quem o ensinou!

“Pensa como pensam os sábios, mas fala como falam as pessoas simples.”

(Aristóteles)

Aos meus grandes amigos, **Natália de Campos, Natália Pola, Michyele Sbrana e Luis Augusto Esper**

Parte de mim fica com vocês, mas uma grande parte de vocês eu levarei comigo...

Vocês são os co-autores desta minha conquista!

A saudade já machuca o coração...

Mas as boas lembranças vêm à tona para serem guardadas como um grande tesouro!

Saudades ficarão de cada momento... E tantos bons momentos existiram!

Em cada situação, cumplicidade sem limites...

Fomos um! Literalmente, todos por um e um por todos!

Vivemos o que chamam de “amizade” no seu sentido mais completo...

A **franqueza** da Michyele, a **lealdade** irrefutável do Luis Augusto...

A **sinceridade** da Natália Campos, a **generosidade** da Natália Pola!

Completamo-nos, fomos fortes nas nossas fraquezas...

Rimos muito... E nas lágrimas, ombro a ombro SEMPRE!

Não quero dizer “adeus”... No máximo, “até logo”...

Manterei cada um de vocês vivos no meu coração!

E aonde quer que eu esteja,

Estarei, incansavelmente, torcendo pelo sucesso de cada um!

**“Amigo fiel é proteção poderosa,
E quem o encontrar, terá encontrado um tesouro.
Amigo fiel não tem preço, e o seu valor é incalculável.
Amigo fiel é remédio que cura,
E os que temem ao Senhor o encontrarão.
Quem teme ao Senhor tem amigos verdadeiros,
Pois tal e qual ele é, assim será o seu amigo.”**

(Eclesiástico 6, 14-17)

Agradecimientos

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**.

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

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, **Diogo, Marina e Valéria**

O bom humor que socorre, abriga e fortalece! O bom humor que é calor humano vivo e diário... O bom humor, custe o que custar...! Cada sorriso foi um bálsamo para o espírito!

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP: **Alexandra, Ana Claudia, Ana Paula, Claudia, Cláudio Maciel Júnior, Cláudio Matsumoto, Fernando, Helena, Isabel, Ivone, Izamar, Jessica, Luzia e Maria Cláudia**

A nobreza do ser humano é revelada na maneira como ele trata seu semelhante! A atenção dispensada, o sorriso de estímulo e as palavras de coragem tornaram o nosso dia-a-dia mais caloroso!

Aos funcionários do Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, **Camilo, João Batista e Alan**

A disponibilidade e a alegria de servir serão para sempre lembradas!

Aos funcionários do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, **Bernadete, Cleide, Dirce, Gilmar e Paulo**

Pela agradável convivência! Por terem me ensinado tanto durante esses anos!

Aos funcionários e professores do Departamento de Ciências Básicas, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, pela acolhida de cada dia!

A MINHA SINCERA GRATIDÃO. . .

Às funcionárias do Departamento de Odontologia Restauradora, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, **Hermelinda Brefore** e **Nelci Vieira**

Vocês foram imprescindíveis para o processamento laboratorial deste trabalho. Obrigado pela prontidão e socorro imediatos em cada dificuldade enfrentada.

Ao Sr. **Odair Vicente**

Toda convivência tem seus erros e acertos. Acredito que, em nossa convivência, acertamos muito mais do que erramos! Obrigado pelo seu valioso auxílio em muitas etapas deste trabalho. Sem a sua disposição nada teria sido possível. Leve o melhor de mim que também levarei o melhor de ti! Cultivarei com carinho cada demonstração de verdadeira amizade que recebi de você.

Ao Professor do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada Dr. **Tetuo Okamoto**

“A noite abre as flores em silêncio e deixa que o dia receba os agradecimentos.” Sua humildade e doação são jóias raras!

Obrigado pelo auxílio inestimável na análise histológica de cada projeto de pesquisa!

À Professora Dra. **Suely Regina Mogami Bomfim**

“Sê tu aquele que afasta as pedras do caminho.” Foi muito bom partilhar contigo tantos dias de trabalho...

Seus olhos fixos no microscópio... Seus olhos atentos para as necessidades do ser humano!

Obrigado pela doce presença amiga e pela dedicação! Nunca me esquecerei de você!

Aos Professores Dra. **Valéria Nobre Leal de Souza Oliva** e Dr. **Paulo Sérgio Patto dos Santos**

Obrigado pela acolhida e por terem disponibilizado condições físicas e equipamentos para a realização dos procedimentos cirúrgicos deste trabalho.

Ao Professor Dr. **Wagner Luís Ferreira**

Pela doação de medicamentos necessários aos animais desta pesquisa.

Ao médico veterinário **Guillermo Carlos Veiga de Oliveira**

Meu grande amigo! Acho que posso chamá-lo dessa forma hoje! Obrigado pela sua TOTAL disposição durante a execução desta pesquisa. Sem a sua amizade e competência, este trabalho não teria sido realizado! Você se doou de corpo e a alma e assumiu a minha causa como a SUA causa. Longas horas de cirurgia, longos dias de trabalho... Sofremos juntos, mas também nos divertimos bastante!

Aos médicos veterinários **Edson Luiz de Campos** e **Flaviano Damasceno**

Pelo auxílio inestimável no tratamento e seleção dos animais desta pesquisa.

Aos meus tios **Magali** e **Délio**

A alegria e a torcida de vocês sempre caminharão lado a lado comigo! Vocês são minha segunda família! Amo vocês!

Aos meus primos **Alcino** e **Renan**

Crescemos juntos, sonhamos juntos e aqui estamos! Meus verdadeiros irmãos! Laços mais do que consangüíneos nos unem! Sempre lutamos um pelo outro! A todo custo buscamos preservar o que mais amamos nessa vida: nossa família! Este é nosso maior valor, nosso alicerce, nosso ponto de encontros e de partidas!

À **Rosa** e à **Zezé**

Vocês são parte de mim, da minha família, das nossas vidas! Obrigado pela lealdade, pelo carinho e pela torcida sincera que manifestaram em tantos momentos da minha vida.

Aos meus grandes amigos **Marcos Guskuma** e **Fabiano Guskuma**

Meus companheiros de república! O segredo da nossa harmonia foi a amizade sincera e o respeito mútuo. Temos muitas histórias para contar! Foi um grande privilégio dividir teto e vida com vocês ao longo desses anos. Contem sempre comigo em tudo o que precisarem.

Ao amigo **Luiz Gustavo de Melo**

Você foi a primeira pessoa que me recebeu aqui em Araçatuba. Você me ajudou a dar os primeiros passos quando a vida acadêmica ainda era minha grande aspiração. Durante um

bom tempo convivemos e comungamos os mesmos valores e ideais. Descobrimos nossas diferenças, aprendemos a nos respeitar, erramos, acertamos... Que fiquem as boas lembranças de um passado glorioso que nos deu a oportunidade de crescermos juntos como seres humanos e como profissionais.

À minha querida amiga **Gracieli**

Reitero aqui as palavras dirigidas a você ao término do meu curso de Mestrado, pois esta é melhor definição que tenho para nossa amizade.

“Você foi um doce divisor de águas na minha vida! Transformou-me! Fez brotar poços de água onde existia terra seca! A eternidade se fez concreta em nosso relacionamento!”

À minha querida amiga **Tatiana**

Sua praticidade e sua transparência foram remédios para a alma! Seu bom senso foi um guia seguro em muitas encruzilhadas! Obrigado pela disponibilidade, pelas boas gargalhadas, pela sua sincera amizade!

À **Patrícia**

Por ter cuidado da nossa casa, das nossas coisas e tão carinhosamente de nós!

À Sra. **Harue Uehara Guskuma**

Tive o grande privilégio de conhecê-la há pouco tempo. Pouco, mas tempo suficiente para perceber quão verdadeiro foi este privilégio. Batalhadora, corajosa, simples, prática, altruísta... Sempre otimista e divertida! Foi nosso grande socorro em diversas ocasiões! E o que seria de nós sem o seu socorro...

Às estagiárias de iniciação científica **Daniele, Paula, Carolina e Rosana**

Pela agradável convivência e auxílio durante o processamento laboratorial deste trabalho.

Ao amigo **Caril do Amaral**

Pelo auxílio no processamento das imagens histológicas deste trabalho.

Aos meus colegas do Mestrado e Doutorado em Periodontia **Ana Cristina, Erivan, Ricardo, Leandro e Thiago**

Embora as afinidades sejam diversas, um só ideal é compartilhado, uma só meta é almejada...
Em cada conquista, nos tornamos mais do que cúmplices!

Aos colegas do Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, nas Áreas de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial, Estomatologia, Odontopediatria, Ortodontia e Prótese Dental

Os dons são vários, mas a vocação é única! Nas experiências vividas, fica a certeza de que o respeito e a partilha são os melhores atalhos para atingirmos nossos objetivos.

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

A família que deixei distante para buscar este sonho se tornou próxima na acolhida e no carinho de vocês! Dr. Mário, exemplo de inatacável honestidade. Sra. Hermínia, exemplo de dedicação incondicional à família. Como sentirei saudades de vocês! Obrigado por cada manifestação de apoio e de solidariedade. Obrigado por sempre se preocuparem com o meu bem-estar!

Ao Dr. **Stephen Fucini**

Embora a convivência física não tenha sido uma constante, você esteve mais do que presente em nossas vidas. Obrigado por todo o auxílio nas traduções e publicações, pelas valiosas sugestões científicas, pelo empenho na aquisição de materiais para nossos trabalhos, pela comunhão diária para com os nossos ideais e desafios. Admiro muito você como ser humano e como profissional.

Aos amigos **Padre Guabiraba, Judith, Maria, Ângelo, Márcia, Cristina e José Luis** pela partilha de fé em cada domingo.

À **BIOMET 3i, Inc.** (Palm Beach Gardens, FL, EUA), pela doação de materiais e equipamento para o preparo do Plasma Rico em Plaquetas, bem como do triturador ósseo, e à **Johnson & Johnson Produtos Profissionais Ltda.** (São José dos Campos, SP, Brasil), pela doação dos fios de sutura.

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

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

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

Epígrafe

“Alguns homens vêem as coisas como são,
e dizem: **Por que?**

Eu sonho com as coisas que nunca foram
e digo: **Por que não?”**

(George Bernard Shaw)

Resumo

MESSORA, M.R. **Cicatrização de enxertos de osso alógeno fresco congelado (O AFC) associados ou não ao plasma rico em plaquetas (PRP):** estudo histológico e histométrico em mandíbulas de cães [tese]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2009.

O propósito deste estudo foi avaliar, histologicamente, a cicatrização de enxertos de osso alógeno fresco congelado (O AFC) associados ou não ao plasma rico em plaquetas (PRP) em defeitos ósseos criados cirurgicamente em mandíbulas de cães. Defeitos ósseos bilaterais, medindo 1,5 cm de largura x 1 cm de altura, foram criados na borda inferior da mandíbula de 10 cães adultos machos. Os defeitos foram divididos em 3 grupos experimentais: C (controle), O AFC, O AFC/PRP. No Grupo C (n=7), os defeitos foram preenchidos apenas com coágulo sangüíneo. No Grupo O AFC (n=7), os defeitos foram preenchidos com enxertos de O AFC. No Grupo O AFC/PRP (n=6), os defeitos foram preenchidos com enxertos de O AFC associados ao PRP. A eutanásia dos animais foi realizada em 12 semanas pós-operatórias. Foram realizadas análises histológica e histométrica. Os dados foram analisados estatisticamente (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$). Nenhum defeito regenerou completamente com tecido ósseo. Os enxertos de O AFC foram bem incorporados. A quantidade média de osso neoformado e os desvios-padrão dos Grupos C, O AFC e O AFC/PRP foram $70,55 \pm 8,01\%$, $71,31 \pm 14,36\%$ e $65,57 \pm 11,55\%$, respectivamente. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (ANOVA, $p = 0,642$). Os enxertos de O AFC foram biocompatíveis e bem incorporados, mas não proporcionaram maior formação óssea que os defeitos controle em mandíbulas de cães. O uso do PRP não promoveu nenhum benefício adicional à cicatrização desses enxertos em 12 semanas pós-operatórias.

Palavras-chave: Regeneração Óssea; Transplante Homólogo; Plasma Rico em Plaquetas.

Abstract

MESSORA, M.R. **Healing of fresh frozen bone allograft (FFBA) with or without platelet-rich plasma (PRP):** a histologic and histometric study in mandible of dogs [thesis]. Araçatuba: UNESP - São Paulo State University; 2009.

The purpose of this study was to histologically analyze the healing of fresh frozen bone allograft (FFBA) with or without platelet-rich plasma (PRP) in bony defects surgically created in mandible of dogs. Bilateral bony defects, measuring 1.5 cm in width vs. 1 cm in height, were created in the inferior border of the mandible of 10 adult male dogs. The defects were divided into three groups: C (control), FFBA and FFBA/PRP. In Group C (n=7), the defect was filled with blood clot only. In Group FFBA (n=7), the defect was filled with FFBA. In Group FFBA/PRP (n=6), the defect was filled with FFBA combined with PRP. All animals were euthanized at 12 weeks post-operative. Histologic and histometric analyses were performed. Data were statistically analyzed (ANOVA, Tukey, $p < 0.05$). No defect completely regenerated with bone. The FFBA was well incorporated. The mean percentage of newly formed bone and the standard-deviations of Groups C, FFBA and FFBA/PRP were $70.55 \pm 8.01\%$, $71.31 \pm 14.36\%$ and $65.57 \pm 11.55\%$, respectively. Statistically significant differences were not found among the groups (ANOVA, $p = 0,642$). FFBA were biocompatible and well incorporated. However, these grafts did not promote a greater bone formation than the control defects in mandible of dogs. The use of PRP promoted no additional benefit to the healing of these grafts at 12 weeks post-operative.

Key words: Bone Regeneration; Transplantation, Homologous; Platelet-Rich Plasma.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Defeito cirúrgico (1,5 cm de largura x 1 cm de altura) criado na borda inferior da mandíbula e protegido com uma tela cirúrgica absorvível. 61
- Figura 2 - A Área Total está delineada pelas linhas vermelhas (Linhas A, B, C e D) e corresponde à área da mandíbula onde o defeito cirúrgico foi originalmente criado. A Área de Osso Neoformado, em azul, está delineada dentro dos limites da Área Total. 61
- Figura 3 - Número médio de plaquetas por microlitro (μ l) e desvios-padrão nas amostras de PRP e de sangue periférico. 62
- Figura 4 - (A) Grupo C - Tecido ósseo neoformado imaturo, pouco organizado e com muitos osteócitos. Largos espaços medulares (EM) também podem ser observados. (B) Grupo OAFC/PRP – Tecido ósseo neoformado maduro, compacto, com organização lamelar (H.E., aumento original 200x). 63
- Figura 5 - Grupo OAFC - Tecido ósseo neoformado maduro e compacto. As lamelas ósseas formadas estão delimitadas por linhas incrementais (setas) (H.E., aumento original 400x). 64
- Figura 6 - Grupo OAFC – Tecido ósseo neoformado (ON) em íntimo contato com o osso pré-existente (OP) (H.E., aumento original 200x). 65
- Figura 7 - Grupo OAFC/PRP – Área de tecido ósseo em transição (H.E., aumento original 200x). 66
- Figura 8 - Médias e desvios-padrão da Área de Osso Neoformado (AON) dentro dos defeitos cirurgicamente criados. 67

LISTA DE ANEXOS

Anexo A - Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)	69
Anexo B - Normas para Publicação segundo o Periódico “Journal of Clinical Periodontology”	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AABT	=	Associação Americana de Bancos de Tecidos
ANOVA	=	Análise de Variância
AON	=	Área de Osso Neoformado
AT	=	Área Total
BM	=	<i>Bad Mergentheim</i>
C	=	Controle
CAPES	=	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CEEA	=	Comissão de Ética na Experimentação Animal
cm	=	Centímetro
DNA	=	Ácido Desoxirribonucleico
DPs	=	Desvios-padrão
EM	=	Espaço Medular
EOA	=	Enxertos Ósseos Alógenos
<i>et al.</i>	=	<i>et alii</i>
EUA	=	Estados Unidos da América
FCs	=	Fatores de Crescimento
Fig.	=	Figura
FL	=	Flórida
g	=	Gramas
H.E.	=	Hematoxilina e Eosina
IM	=	Intramuscular
Inc.	=	<i>Incorporation</i>
IV	=	Intravenosa
Kg	=	Quilograma
Ltda.	=	Limitada

MA	=	<i>Massachusetts</i>
mg	=	Miligrama(s)
ml	=	Mililitro(s)
mm	=	Milímetro(s)
mm ²	=	Milímetro(s) ao quadrado
μl	=	Micro litro(s)
μm	=	Micrômetro(s)
NJ	=	Nova Jersey
O AFC	=	Osso Alógeno Fresco Congelado
O ASC	=	Osso Alógeno Seco e Congelado
ON	=	Osso Neoformado
OP	=	Osso Pré-existente
PCCS	=	<i>Platelet Concentrate Collection System</i>
PR	=	Paraná
PRP	=	Plasma Rico em Plaquetas
RJ	=	Rio de Janeiro
ROG	=	Regeneração Óssea Guiada
rpm	=	Rotações por minuto
S/A	=	Sociedade Anônima
SP	=	São Paulo
TX	=	Texas
UNESP	=	Universidade Estadual Paulista

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	=	Graus Celsius
@	=	Arroba
%	=	Por cento
n	=	Tamanho da amostra
<i>p</i>	=	Probabilidade do valor do teste
F	=	Valor do teste da análise de variância
x	=	Vezes
<	=	Menor
®	=	Marca Registrada
™	=	<i>Trade Mark</i>
-	=	Menos
+	=	Mais

SUMÁRIO

Manuscrito para Publicação	37
Página de título	38
Resumo	39
Introdução	41
Material e métodos	43
Resultados	50
Discussão	51
Agradecimentos	55
Referências	56
Anexos	68

*Manuscrito
para Publicação**

*Segundo as normas do periódico "Journal of Clinical Periodontology"

**Cicatrização de enxertos de osso alógeno fresco congelado (O AFC)
associados ou não ao plasma rico em plaquetas (PRP). Estudo histológico e
histométrico em mandíbulas de cães.**

Michel R. Messoria¹, Maria J. H. Nagata¹

¹Disciplina de Periodontia, Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada, Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Brasil.

Título resumido (“Running title”): Osso alógeno com ou sem PRP

Palavras-chave: Regeneração óssea; Fatores de crescimento; Plaquetas; Enxertos ósseos; Modelo animal

Autora responsável pela correspondência:

Maria José Hitomi Nagata

Rua José Bonifácio 1193

16015-050 - Araçatuba, SP, Brasil

Telefone: +55 18 3636 3239

Fax: +55 18 3636 3332

e-mail: mjnagata@foa.unesp.br

Conflitos de Interesse e Fontes de Financiamento

Os autores declaram que não possuem nenhum conflito de interesse. A maior parte do estudo foi financiada pela própria instituição dos autores. Todos os materiais e equipamento para o preparo do PRP, bem como o triturador ósseo, foram generosamente fornecidos pela BIOMET 3i, Inc., Palm Beach Gardens, FL, EUA.

Resumo

Objetivo: O propósito deste estudo foi avaliar, histologicamente, a cicatrização de enxertos de osso alógeno fresco congelado (O AFC) associados ou não ao plasma rico em plaquetas (PRP) em defeitos ósseos criados cirurgicamente em mandíbulas de cães.

Material e Métodos: Defeitos ósseos bilaterais, medindo 1,5 cm de largura x 1 cm de altura, foram criados na borda inferior da mandíbula de 10 cães adultos machos. Os defeitos foram divididos em 3 grupos experimentais: C (controle), O AFC, O AFC/PRP. No Grupo C (n=7), os defeitos foram preenchidos apenas com coágulo sanguíneo. No Grupo O AFC (n=7), os defeitos foram preenchidos com enxertos de O AFC. No Grupo O AFC/PRP (n=6), os defeitos foram preenchidos com enxertos de O AFC associados ao PRP. A eutanásia dos animais foi realizada em 12 semanas pós-operatórias. Foram realizadas análises histológica e histométrica. Os dados foram analisados estatisticamente (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$).

Resultados: Nenhum defeito regenerou completamente com tecido ósseo. Os enxertos de O AFC foram bem incorporados. A quantidade média de osso neoformado e os desvios-padrão dos Grupos C, O AFC e O AFC/PRP foram $70,55 \pm 8,01\%$, $71,31 \pm 14,36\%$ e $65,57 \pm 11,55\%$, respectivamente. Diferenças estatisticamente significativas não foram observadas entre os grupos (ANOVA, $p = 0,642$).

Conclusão: Os enxertos de O AFC foram biocompatíveis e bem incorporados, mas não proporcionaram maior formação óssea que os defeitos controle em mandíbulas de cães. O uso do PRP não promoveu nenhum benefício adicional à cicatrização desses enxertos em 12 semanas pós-operatórias.

Relevância Clínica

Razão científica do estudo: Há uma carência de estudos controlados avaliando o uso de enxertos de osso alógeno fresco congelado (OAFC) na Odontologia. O efeito do plasma rico em plaquetas (PRP) na cicatrização desses enxertos também foi pouco estudado.

Principais achados: Enxertos de OAFC associados ou não ao PRP foram biocompatíveis e bem incorporados, mas não proporcionaram maior formação óssea que os defeitos controle em mandíbulas de cães.

Implicações práticas: Enxertos de OAFC não potencializaram a regeneração óssea. O uso do PRP não promoveu nenhum benefício adicional à cicatrização desses enxertos.

Introdução

O osso autógeno é considerado o material de enxerto ideal para cirurgias ósseas reconstrutivas devido ao seu potencial osteogênico, osteoindutivo e osteocondutivo (Hallman & Thor 2008). Contudo, as desvantagens decorrentes do seu uso incluem morbidade, disponibilidade limitada e imprevisibilidade na reabsorção do enxerto (Hallman & Thor 2008, Kasten et al. 2008). Portanto, a regeneração óssea por meio da engenharia tecidual tem atraído grande interesse. O conceito da engenharia tecidual está fundamentado em três pilares: arcabouço, células e fatores de crescimento (Kasten et al. 2008).

Na busca de um substituto adequado para o osso autógeno, os enxertos ósseos alógenos (EOA) são uma opção viável. Estes enxertos proporcionam um arcabouço para que os tecidos do hospedeiro possam se desenvolver, o que os torna, basicamente, osteocondutivos (Bostrom & Seigerman 2005). EOA são, provavelmente, incorporados por um processo similar àquele dos enxertos ósseos autógenos. Contudo, esse processo ocorre mais lentamente devido à ausência de células vivas (Urist 1980). Portanto, as pesquisas atuais estão focadas no uso de agentes osteoindutivos capazes de potencializar as propriedades dos EOA.

Em cirurgias ortopédicas e maxilo-faciais, EOA são frequentemente combinados com o plasma rico em plaquetas (PRP) para melhorar o processo de regeneração óssea (Cenni et al. 2008). O PRP contém vários fatores de crescimento (FCs) em sua composição natural que podem influenciar a quimiotaxia, diferenciação, proliferação e a atividade sintética das células ósseas (Kasten et al. 2008, Marx et al. 1998). No entanto, há controvérsias em relação à capacidade regenerativa do PRP e aos reais benefícios do seu uso com enxertos ósseos (Filho Cerruti et al. 2007, Plachokova et al. 2008).

Um estudo randomizado, duplo-cego e controlado foi conduzido para avaliar a formação óssea em seios maxilares de humanos tratados com osso alógeno seco e congelado (OASC)

associado ao PRP ou com OASC associado a uma membrana reabsorvível (Kassolis & Reynolds 2005). Os resultados desse estudo sugeriram que o uso de OASC associado ao PRP potencializou a taxa de formação óssea quando comparado ao uso de OASC associado à membrana.

Estudos conduzidos em animais também demonstraram uma melhora na cicatrização óssea quando EOA foram associados ao PRP para o tratamento de defeitos de tamanho crítico em fêmures de coelhos (Dallari et al. 2006) e em defeitos ósseos ao redor de implantes em cães (Kim et al. 2002). Contudo, em outros estudos, a combinação EOA/PRP não melhorou a cicatrização óssea em levantamento de seio maxilar em ovelhas (Grageda et al. 2005), em defeitos criados em calvária (Palmisano et al. 2002), arco zigomático (Harris et al. 2003) ou rebordo alveolar (Duziak & Block 2003) de cães e em defeitos de tamanho não crítico em calvária de coelhos (Aghaloo et al. 2005).

De acordo com Marx (2001), a cicatrização de EOA não pode ser beneficiada pelo PRP, pois esses enxertos não possuem células viáveis. Portanto, EOA não podem responder aos estímulos dos FCs presentes no PRP da mesma forma que os enxertos ósseos autógenos. Contudo, um recente estudo demonstrou que um tipo de EOA, o osso alógeno fresco congelado (OAFC), possui células vivas com capacidade de crescimento (Heyligers & Klein-Nulend 2005). Amostras de OAFC, cultivadas *in vitro*, apresentaram crescimento celular. A análise de marcadores de DNA mostrou alelos idênticos entre as células da cultura e àquelas obtidas da cavidade bucal do mesmo doador (Heyligers & Klein-Nulend 2005).

Os primeiros casos clínicos do uso de OAFC na Odontologia, com avaliação histológica e histométrica, foram recentemente relatados por Stacchi et al. (2008). Estes autores demonstraram uma boa incorporação do OAFC em seios maxilares de humanos. De fato, há uma carência de estudos prospectivos controlados avaliando o uso do OAFC na Odontologia (Hallman & Thor 2008). Os estudos que avaliaram a combinação desses enxertos com PRP

também são escassos. Apenas dois estudos em animais foram conduzidos para avaliar a cicatrização de OAFC combinado com PRP no tratamento de defeitos ósseos criados ao redor de implantes de titânio inseridos em úmeros ou côndilos femorais de cães (Jensen et al. 2004, 2005). Os resultados desses estudos demonstraram que o PRP não trouxe nenhum benefício adicional à cicatrização do OAFC. Contudo, os autores atribuíram os resultados obtidos, principalmente, ao potencial de cicatrização espontânea dos defeitos ósseos utilizados e às variações inter-animais nas mensurações dos parâmetros analisados.

O propósito deste estudo foi avaliar, histologicamente, a cicatrização de enxertos de OAFC associados ou não ao PRP em defeitos ósseos criados cirurgicamente em mandíbulas de cães.

Material e Métodos

Modelo experimental

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP. Todas as diretrizes relativas aos cuidados com a pesquisa animal foram estritamente seguidas. Para o presente estudo, foram utilizados dez cães adultos, machos, de raça indefinida, com peso entre 20 e 25 Kg (Biotério da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – UNESP). Todos os animais apresentavam-se em bom estado de saúde geral.

Preparo do enxerto de OAFC

O OAFC do presente estudo foi preparado utilizando osso córtico-medular de um cão submetido à eutanásia no fim de outro projeto experimental que não envolvia o tecido esquelético ou o uso de osso transplantado. Os fêmures foram captados imediatamente após a

eutanásia do animal sob rigoroso controle de assepsia e transportados em gelo seco até o Banco de Tecidos Musculoesqueléticos da Universidade de Marília (Unioess, Marília, SP, Brasil). A limpeza e o processamento final dos tecidos captados foram realizados de acordo com as diretrizes da Associação Americana de Bancos de Tecido (AABT). O osso foi cortado e modelado em pequenos blocos com o uso de instrumentos específicos. Células, sangue e tecido adiposo foram removidos usando solução salina. Os blocos foram embalados individualmente em sacos plásticos triplos de polietileno e congelados a -80°C. Todos os procedimentos foram executados sob rigoroso controle de assepsia e culturas bacterianas foram realizadas para avaliar todos os estágios do processamento.

No momento do uso, as embalagens contendo os enxertos de OAFC foram abertas em um ambiente estéril. O osso foi reidratado com solução salina e particulado por meio de um triturador ósseo (Quentin Bone Mill, Quentin Dental Products, Leimen, BM, Alemanha).

Preparo do PRP

Antes dos procedimentos cirúrgicos para a criação dos defeitos ósseos mandibulares, 40 ml de sangue foram coletados de cada animal, via punção da veia jugular, com auxílio de uma cânula adaptada a uma seringa contendo 5 ml 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 3 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 (0,75 ml de cloreto de cálcio para cada 1,5 ml de PRP).

Após a ativação, o PRP foi imediatamente combinado com 0,8 ml de OAFC particulado e colocado no defeito cirúrgico.

Contagem de plaquetas

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

Procedimentos cirúrgicos

Todos os animais receberam 1 g de amoxicilina associada ao clavulanato de potássio (Clavulin[®] 500 mg - GlaxoSmithKline, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), via oral, uma hora antes dos procedimentos experimentais. As cirurgias foram realizadas sob anestesia geral. Como medicações pré-anestésicas, os animais receberam acepromazina 0,2% [0,05 mg/kg de peso corporal, intramuscular (IM) - Acepran[®], Univet S/A, São Paulo, SP, Brasil] e morfina 10 mg/ml (0,5 mg/kg de peso corporal, IM - Dimorf[®], Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., São Paulo, SP, Brasil). A anestesia geral foi induzida por injeção intravenosa (IV) de propofol 10 mg/ml (5 mg/kg de peso corporal - Propofol, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., São Paulo, SP, Brasil) e mantida por halotano e oxigênio administrados por um tubo endotraqueal. A anestesia geral e os sinais cardíacos dos animais foram monitorados durante toda a cirurgia.

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados pelo mesmo operador. A anestesia local do nervo alveolar inferior foi realizada com lidocaína 2% e bupivacaína 0,5% contendo

epinefrina (1:200.000). A área a ser operada recebeu, também, anestesia local infiltrativa com mepivacaína 2% contendo epinefrina (1:100.000) para reduzir o sangramento. Após a antissepsia, uma incisão de 5 cm foi feita na linha média do pescoço, sobre a pele e tecidos subcutâneos, seguida por uma dissecação mais profunda em direção à fáscia do músculo gênio-hióideo. A partir deste ponto, a dissecação prosseguiu superficial e lateralmente à fáscia do músculo até encontrar a borda inferior da mandíbula de ambos os lados, direito e esquerdo. O periósteo foi agudamente dividido entre o ângulo da mandíbula e a região do forame mentoniano bilateralmente. Uma dissecação subperiosteal foi realizada com muito cuidado para evitar qualquer comunicação acidental com a cavidade bucal. Com auxílio de brocas e osteótomos, foram criados defeitos ósseos padronizados, medindo 1,5 cm de comprimento x 1 cm de altura, na borda inferior da mandíbula, bilateralmente. Todos os cuidados foram tomados para proteger o feixe vaso-nervoso do canal mandibular. Uma tela cirúrgica (Vicryl Mesh Woven, Ethicon Inc., Somerville, NJ, EUA) foi, então, colocada sobre os defeitos ósseos criados e fixada na borda inferior da mandíbula com parafusos (6 mm x 1,4 mm – PEX1406, SIN, São Paulo, SP, Brasil). Um parafuso foi colocado 2 mm anterior e outro 2 mm posterior às margens dos defeitos mandibulares criados (Fig. 1). Estes parafusos foram utilizados como referências para localizar a margens ósseas originais dos defeitos cirúrgicos durante a análise histométrica.

Os defeitos mandibulares, seguindo uma randomização bloqueada, foram divididos em três grupos: C (n = 7), OAFC (n = 7) e OAFC/PRP (n = 6). No Grupo C (controle), os defeitos foram preenchidos somente com coágulo sanguíneo. No Grupo OAFC, os defeitos foram preenchidos com 0,8 ml de OAFC. No Grupo OAFC/PRP, os defeitos foram preenchidos com 0,8 ml de OAFC associado a 1,5 ml de PRP.

Os tecidos foram, então, reposicionados e suturados em múltiplas camadas. Fios reabsorvíveis de vicryl 5-0 (Ethicon, Johnson & Johnson Produtos Profissionais Ltda., São José dos

Campos, SP, Brasil) foram utilizados para os tecidos subcutâneos e fios de seda 4-0 (Ethicon, Johnson & Johnson Produtos Profissionais Ltda., São José dos Campos, SP, Brasil) para o fechamento da pele.

Procedimentos pós-cirúrgicos

Todos os animais foram examinados diariamente para verificação de quaisquer sinais clínicos de infecção ou desconforto, durante todo o período experimental. Após os procedimentos cirúrgicos, cada animal recebeu as seguintes medicações: a) meloxicam 10 mg/ml (0,2 mg/kg de peso corporal, IM - Movatec[®], Eurofarma Laboratórios Ltda., São Paulo, SP, Brasil) uma vez ao dia, durante 5 dias; b) cloridrato de tramadol 50 mg/ml (2 mg/kg de peso corporal, IM - Tramal[®], Pfizer Ltda., São Paulo, SP, Brasil) uma vez ao dia, durante 3 dias; c) amoxicilina associada ao clavulanato de potássio, via oral (Clavulin[®] 500mg - GlaxoSmithKline, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), duas vezes ao dia, durante 7 dias.

Todos os animais foram alimentados com uma dieta macia durante 15 dias. As suturas foram removidas aos 10 dias pós-operatórios.

Processamento tecidual

A eutanásia dos animais foi realizada, por perfusão, 12 semanas após a realização dos procedimentos cirúrgicos, sob sedação com xilazina (2 mg/kg de peso corporal, IM - Coopazine[®], Coopers Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil) e anestesia geral com tiopental (12,5 mg/kg de peso corporal, IV - Thiopentax[®], Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda., São Paulo, SP, Brasil). Após a eutanásia, blocos contendo os defeitos cirúrgicos e os tecidos adjacentes foram removidos e imediatamente fixados em solução de formol neutro a 10%. Após lavagem em água corrente, os blocos foram descalcificados em solução de Morse (ácido fórmico a 50% e citrato de sódio a 20% na proporção de 1:1) e

reduzidos de tal forma que a distância do centro de cada parafuso às extremidades das peças, no sentido ântero-posterior, fosse de 3 mm. As peças foram, então, processadas rotineiramente para inclusão em parafina.

Foram realizados cortes seriados com 6 µm de espessura, no plano méso-distal, corados pela técnica da Hematoxilina e Eosina (H.E.) para análise em microscopia de luz.

Análise histomorfométrica

Foram selecionados 2 cortes histológicos de cada espécime, da região do defeito em íntima proximidade com o canal mandibular, para as análises histológica e histométrica. As imagens dos cortes histológicos foram capturadas por uma câmera digital acoplada a um microscópio óptico, com um aumento de 0,65x e salvas em um computador. Como não foi possível capturar o defeito inteiro em uma mesma imagem devido ao aumento usado, foram unidas duas imagens digitais para formar um quadro único que compreendia toda a extensão do defeito e as suas margens ósseas originais. A análise histomorfométrica foi realizada com o auxílio do software “ImageLab 2000” (Dracon 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, em um intervalo de 48 horas, utilizando 10% do total das imagens digitais, 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%.

Os seguintes critérios foram usados para padronizar a análise histomorfométrica das imagens digitalizadas:

- 1) A Área Total (AT) a ser analisada correspondeu à área total do defeito cirúrgico original. Esta área foi determinada, primeiramente, pela identificação da borda inferior

da mandíbula nas margens direita e esquerda do defeito cirúrgico. Estas superfícies foram conectadas por uma linha horizontal (Linha A). Outra linha (Linha B) foi desenhada, paralela e coronalmente à Linha A, a uma distância de 1 cm (altura original dos defeitos cirúrgicos criados). Dois pontos foram marcados na Linha A, distantes 5 mm de ambas as extremidades do espécime, para estabelecer os limites do defeito cirúrgico original. A distância de 5 mm foi determinada considerando-se a soma de duas medidas: a) distância do centro de cada parafuso às extremidades da peça (3 mm); b) distância do centro de cada parafuso às margens ósseas originais dos defeitos (2 mm). Partindo de cada um dos pontos marcados na Linha A, duas linhas verticais foram traçadas em direção coronal (Linhas C e D), formando um ângulo de 90° com a Linha A, até interceptarem a Linha B. Dessa forma, um retângulo foi delineado com as mesmas dimensões e localização originais dos defeitos cirurgicamente criados (1,5 cm x 1 cm). A Área de Osso Neoformado (AON) foi delineada dentro dos limites da AT (Fig. 2).

2) A AT foi medida em mm^2 e considerada 100% da área a ser analisada. A AON também foi medida em mm^2 e calculada como uma porcentagem da AT.

Análise estatística

A avaliação de cada espécime correspondeu a um valor médio calculado das medidas obtidas dos 2 cortes histológicos. A normalidade dos dados foi confirmada. Os dados percentuais foram transformados em arcoseno para a análise estatística. A significância das diferenças entre os grupos foi determinada pela análise de variância (ANOVA, $p < 0,05$).

Resultados

Acompanhamento clínico

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

Estudo da contagem de plaquetas

Esfregaços de amostras de PRP exibiram maior quantidade de plaquetas do que esfregaços de amostras de sangue periférico. Em ambos os esfregaços, as plaquetas apresentaram morfologia normal. As contagens de plaquetas confirmaram que a técnica usada para o preparo de PRP neste estudo produziu amostras com altas concentrações de plaquetas. A quantidade média de plaquetas nas amostras de sangue periférico foi $175,083 \pm 15,59 \times 10^3$ plaquetas/ μ l, enquanto que nas amostras de PRP foi $758,167 \pm 98,62 \times 10^3$ plaquetas/ μ l (Fig. 3). Portanto, a concentração de plaquetas nas amostras de PRP foi aproximadamente 4,5 vezes maior que aquela observada nas amostras de sangue periférico (Fig. 3).

Análise histológica qualitativa

Nenhum espécime regenerou completamente com tecido ósseo. Todos os defeitos cirúrgicos cicatrizaram de tal forma que houve uma perda em altura dos mesmos, mais intensa na parte central. Tecido conjuntivo fibroso e bastante vascularizado, com discreto infiltrado inflamatório, ocupava a porção mais superficial dos defeitos cirúrgicos.

No Grupo C (controle), o restante dos defeitos estava, na maioria dos espécimes, ocupado por tecido ósseo neoformado imaturo, pouco organizado e com muitos osteócitos (Fig. 4A). Em algumas regiões, foi observada a presença de osso trabecular circundado por osteoblastos em

intensa atividade. As trabéculas ósseas neoformadas estavam unidas por pontes ósseas e delimitavam largos espaços medulares com numerosos vasos sanguíneos.

Nos Grupos OAFC e OAFC/PRP, o restante dos defeitos estava, na maioria dos espécimes, ocupado por tecido ósseo neoformado maduro, com organização lamelar (Fig. 4B). O tecido ósseo neoformado era mais compacto que o dos espécimes do Grupo C e, também, possuía menos osteócitos. As lamelas formadas em diferentes tempos estavam separadas por linhas incrementais (Fig. 5). O tecido ósseo neoformado estava em íntimo contato com o osso pré-existente nas margens dos defeitos cirúrgicos (Fig. 6). Partículas remanescentes do enxerto ósseo não foram observadas em nenhum espécime. Os defeitos estavam quase totalmente preenchidos por osso em 2 espécimes do Grupo OAFC. Áreas de tecido ósseo em transição (de imaturo para maduro) estavam presentes em 1 espécime do Grupo OAFC e em 2 espécimes do Grupo OAFC/PRP (Fig. 7).

Análises histométrica e estatística

Diferenças estatisticamente significativas não foram encontradas entre os grupos em relação à AT (ANOVA, $F = 1,062$ e $p = 0,3675$). As médias e os desvios-padrão (DPs) da AON dos Grupos C, OAFC e OAFC/PRP, em 12 semanas pós-operatórias, estão apresentados na Figura 8. Os Grupos C, OAFC e OAFC/PRP apresentaram médias e DPs de $70,55 \pm 8,01\%$, $71,31 \pm 14,36\%$ e $65,57 \pm 11,55\%$, respectivamente. Não foram encontradas diferenças significativas entre esses grupos (ANOVA, $F = 0,455$ e $p = 0,642$).

Discussão

Enxertos de OAFC não provocam considerável resposta imunológica e possuem excelente compatibilidade histológica com o sítio receptor, conforme documentado por centenas de intervenções cirúrgicas ortopédicas que usam este material há mais de 20 anos (D'Aloja et al.

2008). Um maior controle viral no processamento desses enxertos e o avanço da biotecnologia molecular tornaram possível seu uso em procedimentos cirúrgicos odontológicos. O presente estudo avaliou, histologicamente, a cicatrização de enxertos de OAFc associados ou não ao PRP em defeitos ósseos criados cirurgicamente em mandíbulas de cães.

Este estudo utilizou defeitos “saddle-type” criados na borda inferior da mandíbula, conforme o modelo proposto por Gerard et al. (2006). Com esse tipo de abordagem, foi possível evitar algumas complicações pós-operatórias que ocorrem mais freqüentemente quando esses defeitos experimentais são criados no rebordo alveolar mandibular da cavidade bucal. Em um estudo conduzido por Jovanovic et al. (2007), 44% dos defeitos “saddle-type” criados na cavidade bucal de cães apresentaram falhas na cicatrização incluindo acúmulo de depósitos bacterianos, inflamação da mucosa e exposição precoce de membranas usadas na Regeneração Óssea Guiada (ROG). No presente estudo, não foram observadas quaisquer complicações pós-operatórias durante todo o período experimental.

Um achado interessante deste estudo foi a ausência de diferenças estatisticamente significativas na AON entre os espécimes do Grupo C e aqueles tratados com OAFc (Grupos OAFc e OAFc/PRP). Este resultado pode ser explicado levando-se em consideração, basicamente, dois aspectos. O primeiro deles refere-se ao potencial inato de regeneração óssea desses tipos de defeitos experimentais, os quais estão sujeitos a um rico ambiente osteogênico devido ao efeito sinérgico de três margens ósseas que contribuem para a sua cicatrização (Jovanovic et al. 2007). No presente estudo, os defeitos mandibulares do Grupo C apresentaram um preenchimento ósseo de aproximadamente 70%. Um potencial de regeneração semelhante a este foi observado por Jovanovic et al. 2007 em defeitos “saddle-type” que possuíam as mesmas dimensões dos que foram utilizados no presente estudo. O segundo aspecto a ser ressaltado é que os defeitos mandibulares deste estudo não foram

tratados com ROG. O uso de uma membrana com a finalidade de ROG poderia ter mantido o enxerto ósseo em posição (Dahlin et al. 1990, Becker et al. 1994, Buser et al. 1995, Mellonig et al. 1998, Stavropoulos et al. 2003) e, dessa forma, contribuído para a obtenção de melhores resultados nos grupos tratados com OAFc. Em um estudo conduzido em cães, Stavropoulos et al. (2003) demonstraram que defeitos “saddle-type” criados no rebordo alveolar mandibular e tratados apenas com enxertos ósseos alógenos apresentaram notável deformação do osso regenerado devido ao colapso do perióstio nas superfícies vestibular e lingual dos defeitos. Radiograficamente, os defeitos tratados apenas com enxertos ósseos apresentaram uma menor quantidade de tecidos mineralizados que os defeitos tratados com enxertos ósseos e ROG.

No presente estudo, embora não tenham sido observadas diferenças estatisticamente significativas na quantidade de formação óssea entre os Grupos C e OAFc, deve-se considerar que dois espécimes do Grupo OAFc apresentaram uma regeneração quase completa dos defeitos mandibulares. A análise histológica qualitativa mostrou que a maioria dos espécimes do Grupo OAFc apresentou tecido ósseo com maturidade e densidade maiores que aqueles do Grupo C. Esses aspectos são extremamente importantes na reconstrução óssea de sítios que serão futuramente reabilitados com implantes dentários, pois a qualidade do tecido ósseo regenerado é um dos fatores que determinam a taxa de sobrevivência dos implantes (Stanford & Schneider 2004). Uma boa incorporação de OAFc também foi demonstrada, histologicamente, em procedimentos para levantamento de seios maxilares em humanos (Stacchi et al. 2008). Os autores observaram que as partículas remanescentes de OAFc quase não podiam ser distinguidas do osso pré-existente. No presente estudo, remanescentes de partículas de OAFc não foram observadas em nenhum espécime. Em defeitos ósseos criados em fêmures de coelhos e tratados com enxertos ósseos alógenos liofilizados, Dallari et al. (2006) também não observaram partículas de enxerto ósseo nos

espécimes histológicos de 12 semanas pós-operatórias. Os autores atribuíram esse resultado ao metabolismo de coelhos, que é muito mais alto que o de seres humanos. Ressaltaram, também, que a reabsorção de biomateriais é mais lenta em humanos do que em animais.

Um dos principais determinantes da quantidade de novo osso nos sítios tratados com enxertos alógenos é a técnica de processamento aplicada (Boyce et al. 1999, Bauer & Mushler 2000). O OAFC não passa por nenhum processo de liofilização ou desmineralização, mas apenas pelo congelamento profundo a -80°C , o que preserva o potencial osteogênico do tecido ósseo (Mizutani et al. 1990, Jensen et al. 2005). Recentemente, um estudo *in vitro* demonstrou que OAFC contém células vivas com capacidade de crescimento (Heyligers & Klein-Nulend 2005). A grande questão é se estas células, de fato, contribuem positivamente para a regeneração óssea nos sítios tratados com OAFC (Heyligers & Klein-Nulend 2005, Stacchi et al. 2008). Também é necessário investigar se essas células poderiam responder aos FCs presentes no PRP.

No presente estudo, não foram observadas diferenças significativas na quantidade de formação óssea entre os Grupos OAFC e OAFC/PRP, corroborando os achados de estudos prévios (Jensen et al. 2004, 2005). Duas hipóteses poderiam explicar este resultado. A primeira delas é que o PRP pode ter tido um baixo potencial regenerativo. Isto pode ter ocorrido devido às possíveis alterações nos níveis de FCs nas amostras de PRP. Os níveis de FCs é que realmente determinam o potencial biológico do PRP (Weibrich et al. 2003). No presente estudo, o PRP foi preparado de acordo com um protocolo desenvolvido para garantir a quantidade e qualidade das plaquetas concentradas (o PCCS IITM). De fato, os resultados da contagem de plaquetas e a análise dos esfregaços de amostras de PRP confirmaram a eficácia desse protocolo na produção de um “PRP terapêutico”, conforme a definição de Marx (2004). Contudo, os níveis de FCs nas amostras de PRP não foram mensurados. A concentração de plaquetas não pode estimar seguramente os níveis de FCs. Alguns estudos demonstraram que

amostras de PRP com a mesma concentração de plaquetas apresentaram variados níveis de FCs (Martineau et al. 2004, Fréchette et al. 2005). A segunda hipótese que poderia explicar a ausência de benefícios adicionais do PRP ao OAFc, no presente estudo, refere-se ao longo e único período de observação selecionado (12 semanas pós-operatórias). Em um estudo conduzido em cães, Gerard et al. (2006, 2007) demonstraram que defeitos mandibulares tratados com enxertos ósseos autógenos combinados com PRP apresentam maior volume de novo osso do que defeitos tratados apenas com enxertos ósseos em 4 e em 8 semanas pós-operatórias. Contudo, estas diferenças não foram mais evidentes em 12 semanas pós-operatórias. Os autores concluíram que o PRP atua apenas nos períodos iniciais da cicatrização, auxiliando a incorporação do enxerto pelo aumento do número de osteoblastos e osteoclastos (Gerard et al. 2006, 2007).

Dentro dos limites deste estudo, pode-se concluir que os enxertos de OAFc foram biocompatíveis e bem incorporados, mas não proporcionaram maior formação óssea que os defeitos controle em mandíbulas de cães. O uso do PRP não promoveu nenhum benefício adicional à cicatrização desses enxertos em 12 semanas pós-operatórias.

Agradecimentos

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 alguns equipamentos necessários para este estudo. Ao médico veterinário Dr. Guillermo Carlos Veiga de Oliveira, pela assistência profissional durante os procedimentos cirúrgicos e ao Dr. Eric Carlson, por compartilhar sua considerável experiência com o modelo experimental usado neste estudo. À BIOMET 3i, Inc. (Palm Beach Gardens, FL, EUA), pela doação de materiais e equipamento para o preparo do PRP, bem como do triturador ósseo, e à

Johnson & Johnson Produtos Profissionais Ltda. (São José dos Campos, SP, Brasil), pela doação dos fios de sutura. À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos do Programa de Doutorado ao pós-graduando Michel R. Messoria.

Referências

Aghaloo, T. L., Moy, P. K. & Freymiller, E. G. (2005) Evaluation of platelet-rich plasma in combination with freeze-dried bone in the rabbit cranium. A pilot study. *Clinical Oral Implants Research* **16**, 250-257.

Bauer, T. W. & Muschler, G. F. (2000) Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clinical Orthopaedics and Related Research* **371**, 10–27.

Becker, W., Dahlin, C., Becker, B. E., Lekholm, U., van Steenberghe, D., Higuchi, K. & Kultje, C. (1994) The use of e-PTFE barrier membranes for bone promotion around titanium implants placed into extraction sockets: a prospective multicenter study. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **9**, 31-40.

Bostrom, M. P. & Seigerman, D. A. (2005) The clinical use of allografts, demineralized bone matrices, synthetic bone graft substitutes and osteoinductive growth factors: a survey study. *HSS Journal : The Musculoskeletal Journal of Hospital for Special Surgery* **1**, 9-18.

Boyce, T., Edwards, J. & Scarborough, N. (1999) Allograft bone. The influence of processing on safety and performance. *The Orthopedic Clinics of North America* **30**, 571-581.

Buser, D., Ruskin, J., Higginbottom, F., Hardwick, R., Dahlin, C. & Schenk, R. K. (1995) Osseointegration of titanium implants in bone regenerated in membrane-protected defects: a histologic study in the canine mandible. *The International Journal of Oral & Mmaxillofacial Implants* **10**, 666-681.

Cenni, E., Perut, F., Ciapetti, G., Savarino, L., Dallari, D., Cenacchi, A., Stagni, C., Giunti, A., Fornasari, P. M. & Baldini, N. (2009) In vitro evaluation of freeze-dried bone allografts

combined with platelet-rich plasma and human bone marrow stromal cells for tissue engineering. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine* **20**, 45-50.

D'Aloja, E., Santi, E., Aprili, G. & Franchini, M. (2008) Fresh frozen homologous bone in oral surgery: case reports. *Cell and Tissue Banking* **9**, 41-46.

Dahlin, C., Gottlow, J., Linde, A. & Nyman, S. (1990) Healing of maxillary and mandibular bone defects using a membrane technique. An experimental study in monkeys. *Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery and Hand Surgery* **24**, 13-19.

Dallari, D., Fini, M., Stagni, C., Torricelli, P., Nicoli Aldini, N., Giavaresi, G., Cenni, E., Baldini, N., Cenacchi, A., Bassi, A., Giardino, R., Fornasari, P. M. & Giunti, A. (2006) In vivo study on the healing of bone defects treated with bone marrow stromal cells, platelet-rich plasma, and freeze-dried bone allografts, alone and in combination. *Journal of Orthopaedic Research* **24**, 877-888.

Duziak, M. E. & Block, M. S. (2003) Ridge augmentation with PRP/PPP and mineralized bone in dogs. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **61**, 41. (Abstract)

Filho Cerruti, H., Kerkis, I., Kerkis, A., Tatsui, N. H., da Costa Neves, A., Bueno, D. F. & da Silva, M. C. (2007) Allogeneous bone grafts improved by bone marrow stem cells and platelet growth factors: clinical case reports. *Artificial Organs* **31**, 268-273.

Fréchette, J. P., Martineau, I. & Gagnon, G. (2005) Platelet-rich plasmas: growth factor content and roles in wound healing. *Journal of Dental Research* **84**, 434-439.

Gerard, D., Carlson, E. R., Gotcher, J. E. & Jacobs, M. (2006) Effects of platelet-rich plasma on the healing of autologous bone grafted mandibular defects in dogs. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **64**, 443-451.

Gerard, D., Carlson, E. R., Gotcher, J. E. & Jacobs, M. (2007) Effects of platelet-rich plasma at the cellular level on healing of autologous bone-grafted mandibular defects in dogs. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **65**, 721-727.

Grageda, E., Lozada, J. L., Boyne, P. J., Caplanis, N. & McMillan, P. J. (2005) Bone formation in the maxillary sinus by using platelet-rich plasma: an experimental study in sheep. *The Journal of Oral Implantology* **31**, 2-17.

Hallman, M. & Thor, A. (2008) Bone substitutes and growth factors as an alternative/complement to autogenous bone for grafting in implant dentistry. *Periodontology* **2000** **47**, 172-192.

Harris, D., Farrell, B. & Block, M. S. (2003) Zygomatic arch defects grafted with mineralized bone with PRP or PPP in dogs. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **61**, 42. (Abstract)

Heyligers, I. C. & Klein-Nulend, J. (2005). Detection of living cells in non-processed but deep-frozen bone allografts. *Cell and Tissue Banking* **6**, 25-31.

Jensen, T. B., Rahbek, O., Overgaard, S. & Søballe, K. (2004) Platelet rich plasma and fresh frozen bone allograft as enhancement of implant fixation. An experimental study in dogs. *Journal of Orthopaedic Research* **22**, 653-658.

Jensen, T. B., Rahbek, O., Overgaard, S. & Søballe, K. (2005) No effect of platelet-rich plasma with frozen or processed bone allograft around noncemented implants. *International Orthopaedics* **29**, 67-72.

Jovanovic, S. A., Hunt, D. R., Bernard, G. W., Spiekermann, H., Wozney, J. M. & Wikesjö, U. M. (2007) Bone reconstruction following implantation of rhBMP-2 and guided bone regeneration in canine alveolar ridge defects. *Clinical Oral Implants Research* **18**, 224-230.

Kassolis, J. D. & Reynolds, M. A. (2005) Evaluation of the adjunctive benefits of platelet-rich plasma in subantral sinus augmentation. *The Journal of Craniofacial Surgery* **16**, 280-287.

- Kasten, P., Vogel, J., Geiger, F., Niemeyer, P., Luginbühl, R. & Szalay, K. (2008) The effect of platelet-rich plasma on healing in critical-size long-bone defects. *Biomaterials* **29**, 3983-3992.
- Kim, S. G., Kim, W. K., Park, J. C. & Kim, H. J. (2002) A comparative study of osseointegration of Avana implants in a demineralized freeze-dried bone alone or with platelet-rich plasma. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **60**, 1018-1025.
- Martineau, I., Lacoste, E. & Gagnon, G. (2004) Effects of calcium and thrombin on growth factor release from platelet concentrates: kinetics and regulation of endothelial cell proliferation. *Biomaterials* **25**, 4489-4502.
- Marx, R. E., Carlson, E. R., Eichstaedt, R. M., Schimmele, S. R., Strauss, J. E. & Georgeff, K. R. (1998) Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics* **85**, 638-646.
- Marx, R. E., (2001) Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dentistry* **10**, 225-228.
- Marx, R. E. (2004) Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **62**, 489-496.
- Mellonig, J. T., Nevins, M. & Sanchez, R. (1998) Evaluation of a bioabsorbable physical barrier for guided bone regeneration. Part II. Material and a bone replacement graft. *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry* **18**, 129-137.
- Mizutani, A., Fujita, T., Watanabe, S., Sakakida, K. & Okada, Y. (1990) Experiments on antigenicity and osteogenicity in allotransplanted cancellous bone. *International Orthopaedics* **14**, 243-248.
- Palmisano, W., Degen, M. & Block, M. S. (2002) Craniotomy bone defect healing with PRP combined with mineralized bone. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **60**, 39. (Abstract)

Plachokova, A. S., Nikolidakis, D., Mulder, J., Jansen, J. A., & Creugers, N. H. (2008) Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in dentistry: a systematic review. *Clinical Oral Implants Research* **19**, 539-545.

Stacchi, C., Orsini, G., Di Iorio, D., Breschi, L. & Di Lenarda, R. (2008) Clinical, histological, and histomorphometric analyses of regenerated bone in maxillary sinus augmentation using fresh frozen human bone allografts. *Journal of Periodontology* **79**, 1789-1796.

Stanford, C. M. & Schneider, G. B. (2004) Functional behaviour of bone around dental implants. *Gerodontology* **21**, 71-77.

Stavropoulos, F., Dahlin, C., Ruskin, J. D. & Johansson, C. (2003) A comparative study of barrier membranes as graft protectors in the treatment of localized bone defects. An experimental study in a canine model. *Clinical Oral Implants Research* **15**, 435-442.

Urist, M. R. (1980) Bone Transplants and Implants. p. 331-368, Philadelphia. JB Lipicott.

Weibrich, G., Kleis, W. K., Hafner, G., Hitzler, W. E. & Wagner, W. (2003) Comparison of platelet, leukocyte, and growth factor levels in point-of-care platelet-enriched plasma, prepared using a modified Curasan kit, with preparations received from a local blood bank. *Clinical Oral Implants Research* **14**, 357-362.



Fig. 1. Defeito cirúrgico (1,5 cm x 1 cm) criado na borda inferior da mandíbula e protegido com uma tela cirúrgica absorvível.

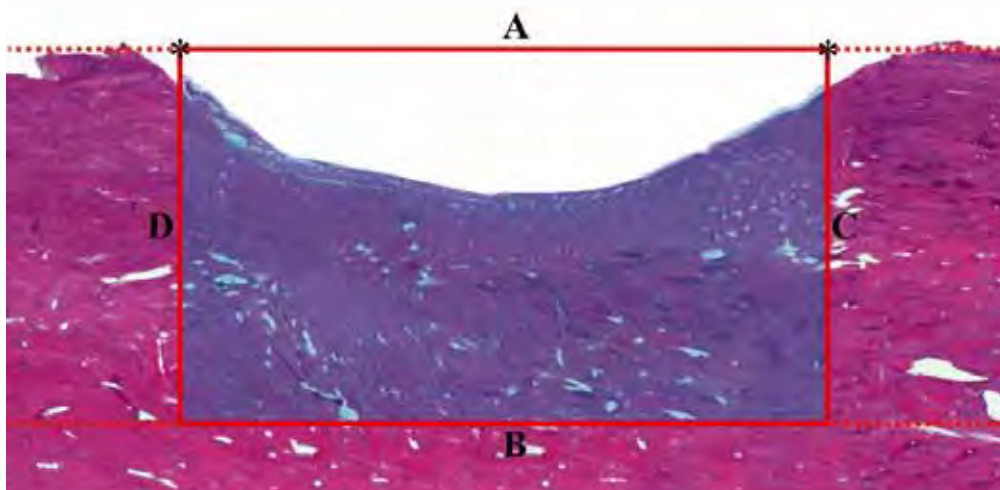


Fig. 2. A Área Total está delimitada pelas linhas vermelhas (Linhas A, B, C e D) e corresponde à área da mandíbula onde o defeito cirúrgico foi originalmente criado. A Área de Osso Neoformado, em azul, está delimitada dentro dos limites da Área Total.

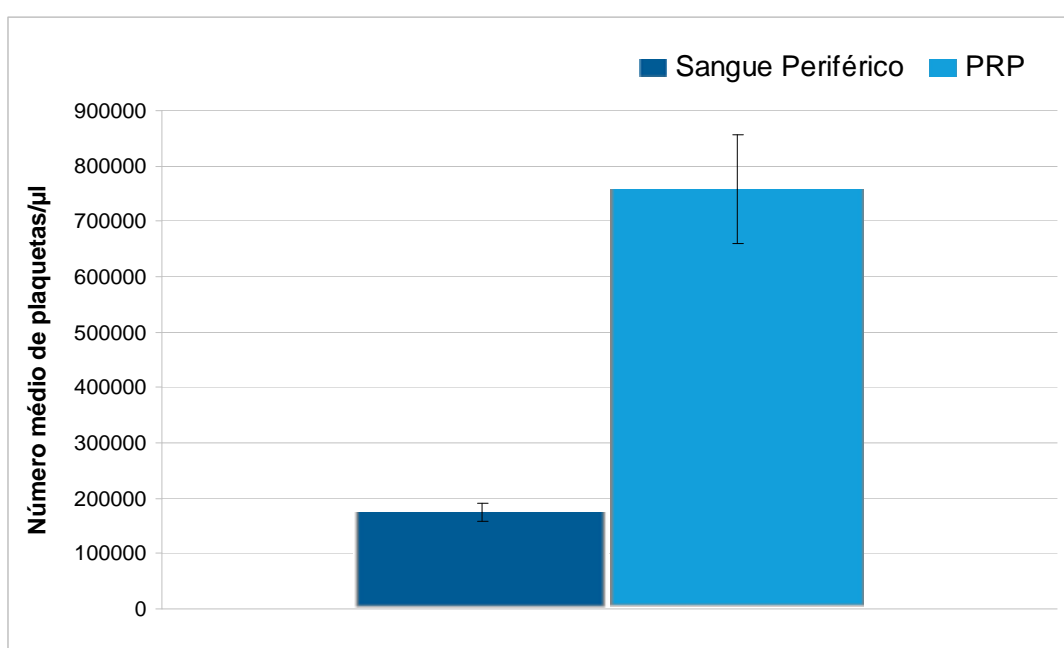


Fig. 3. Número médio de plaquetas por microlitro (μ l) e desvios-padrão nas amostras de PRP e de sangue periférico.

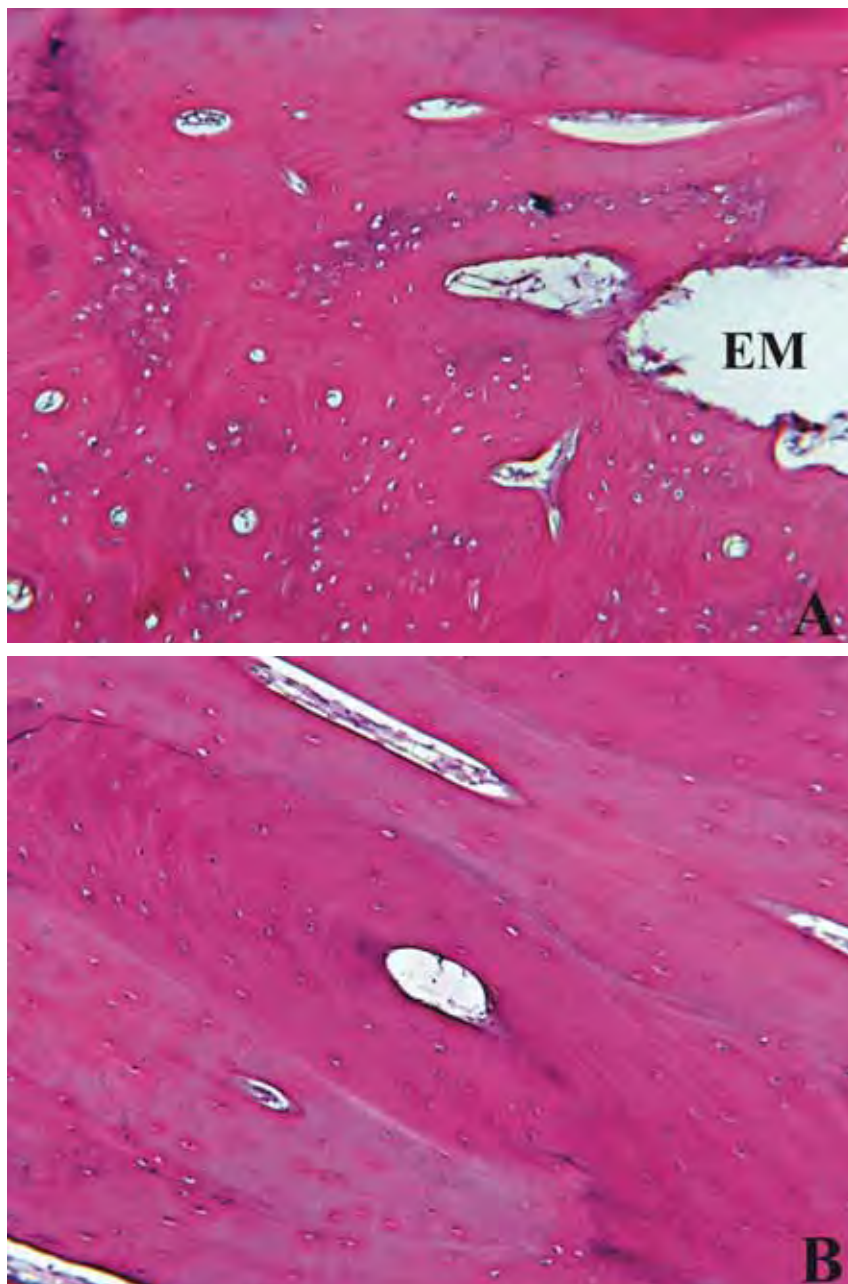


Fig. 4. (A) Grupo C - Tecido ósseo neoforado imaturo, pouco organizado e com muitos osteócitos. Largos espaços medulares (EM) também podem ser observados. (B) Grupo OAFc/PRP – Tecido ósseo neoforado maduro, compacto, com organização lamelar (H.E., aumento original 200x).

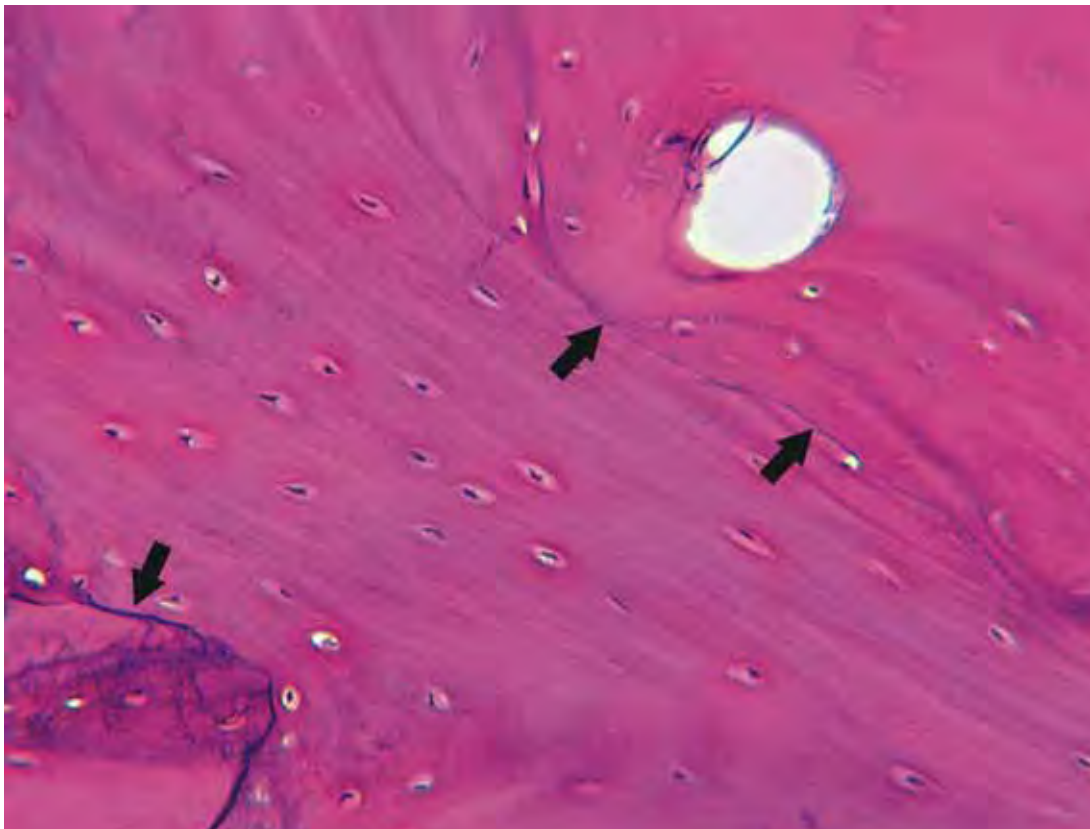


Fig. 5. Grupo OAFC - Tecido ósseo neoformado maduro e compacto. As lamelas ósseas formadas estão delimitadas por linhas incrementais (setas) (H.E., aumento original 400x).

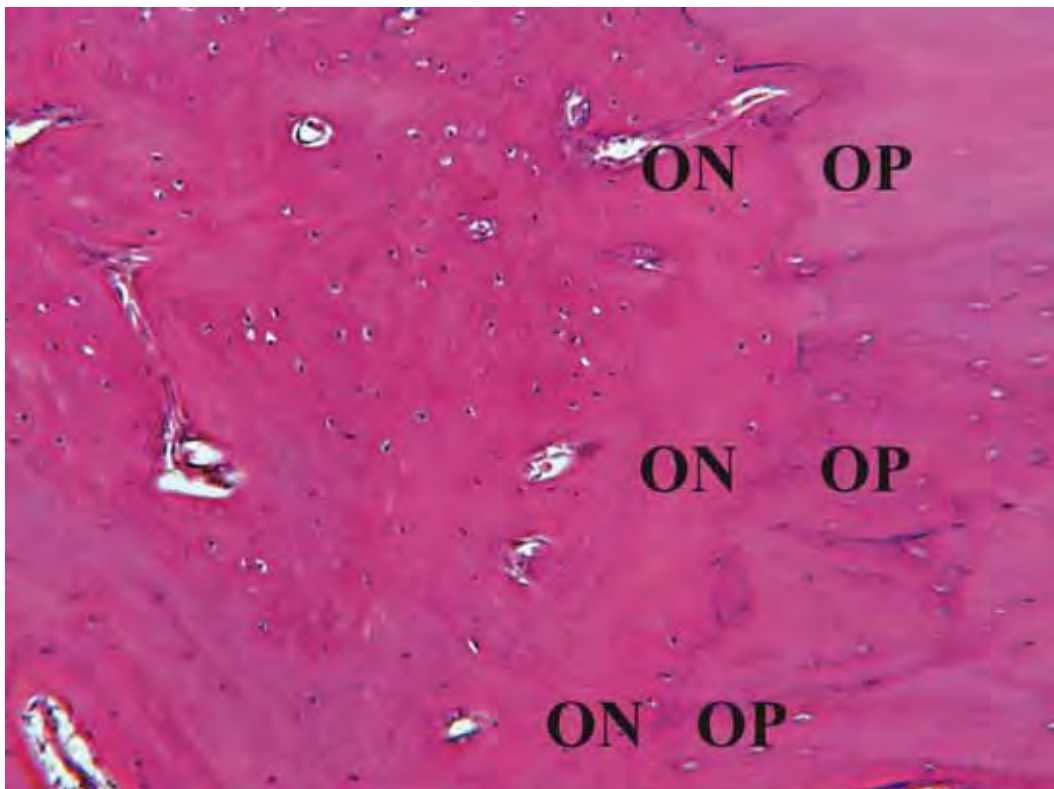


Fig. 6. Grupo OAFc – Tecido ósseo neoformado (ON) em íntimo contato com o osso pré-existente (OP) (H.E., aumento original 200x).

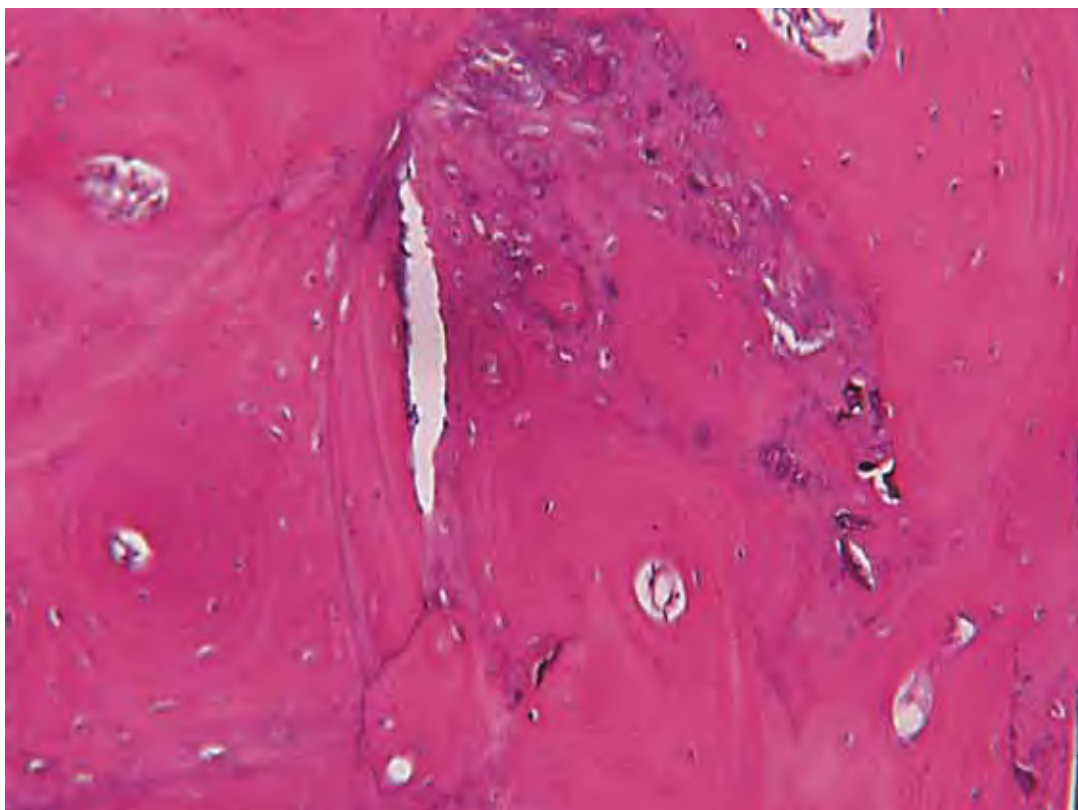


Fig. 7. Grupo OAFC/PRP – Área de tecido ósseo em transição (H.E., aumento original 200x).

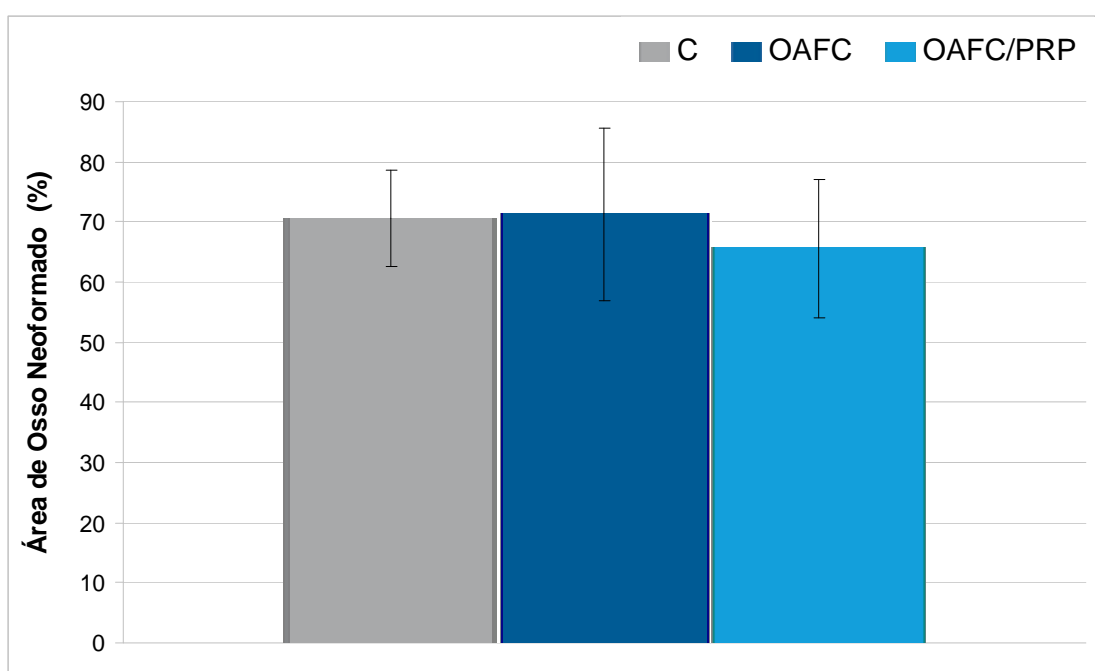


Fig. 8. Médias e desvios-padrão da Área de Osso Neoformado (AON) dentro dos defeitos cirurgicamente criados.

Anexos

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



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

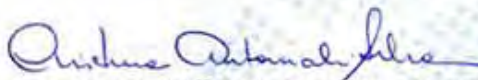


COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "AVALIAÇÃO DA CICATRIZAÇÃO DE DEFEITOS ÓSSEOS TRATADOS COM ENXERTOS ALÓGENOS ASSOCIADOS OU NÃO AO PLASMA RICO EM PLAQUETAS. ESTUDO HISTOLÓGICO E HISTOMÉTRICO EM MANDÍBULAS DE CÃES" sob responsabilidade da Dra MARIA JOSÉ HITOMI NAGATA e colaboração de MICHEL REIS MESSORA, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela CEEA em 27 de abril de 2007, de acordo com o protocolo no. 2007-002526.

Araçatuba, 02 de maio de 2007.



Prof.ª Dr.ª CRISTINA ANTONIALI SILVA
Presidente da CEEA - FOA/UNESP

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

Author 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](#)

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.