Natália Marcumini Pola

Avaliação do reparo ósseo de defeitos de tamanho crítico tratados com plasma rico em plaquetas ou com fibrina rica em plaquetas. Estudo histomorfométrico e imunoistoquímico em calvárias de ratos

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: Profª. Adjunto III Maria José Hitomi Nagata

ARAÇATUBA – SP
2013

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

Pola, Natália Marcumini.
P762a Avaliação do reparo ósseo de defeitos de tamanho crítico tratados com plasma rico em plaquetas ou com fibrina rica em plaquetas : estudo histomorfométrico e imunoistoquímico em calvárias de ratos / Natália Marcumini Pola. - Araçatuba : [s.n.], 2013
108 f.: 8 il. + 1 CD-ROM

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

1. Animais 2. Regeneração óssea 3. Plaquetas 4. Fibrina I. T.

Black D7
CDD 617.64

Dados Curriculares

Natália Marcumini Pola

Nascimento:	26.06.1985 Bauru – SP
Filiação:	Gilberto Pola Maria Teresa Marcumini Pola
2004 – 2007:	Curso de Graduação em Odontologia Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – UNESP
2008 – 2010:	Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Periodontia Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – UNESP
2010 – 2013:	Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Periodontia Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP

Dedicatória

Dedicatória

A Deus

Pela vida,
Por minha maravilhosa família,
Por cada pessoa que colocaste em meu caminho,
Pela minha saúde, disposição e coragem,
Por ter me protegido nas minhas idas e vindas,
Por ter me iluminado e me dado inspiração,
Pelos momentos de alegria,
Pelos momentos de aprendizado
Por me dar forças nos momentos de fraqueza,
Por abrir minhas portas e permitir que eu atingisse meus objetivos e sonhos,
Por guiar meus passos e me proteger...

Por seu infinito amor...

Dedicatória

Aos meus pais, ***Gilberto e Maria Teresa***

Obrigada por acreditarem em mim!
Por serem exemplos de amor incondicional, fé, dedicação e luta,
Por abdicarem de seus sonhos para a realização dos meus...

Obrigada por terem me apoiado, em qualquer que fosse a circunstância...
Por sustentarem meus passos e por me protegerem, mesmo de longe...

Vocês são minha fortaleza!
Meu porto seguro, meu refúgio, minha inspiração...

Minha eterna gratidão por tudo que enfrentaram para que este sonho se tornasse realidade...

Muito obrigada por terem me ensinado os verdadeiros valores de nossas vidas...
A vocês, minha admiração, respeito e gratidão infinitos...
Amo vocês!

"Nos seus labores, o meu descanso... Nas suas preocupações, a minha tranquilidade... Nas suas lutas, a minha vitória... Nos seus cabelos brancos, a minha juventude... Nas suas lágrimas, o meu sorriso... Nas suas noites de insônia, os meus sonhos..."

Dedicatória

Ao meu irmão, ***Bruno***

Muito obrigada pelo apoio, incentivo, confiança e cumplicidade...

Você é meu companheiro. Sempre presente em meu coração e em meu pensamento...
Uma pessoa maravilhosa, batalhadora, honesta, esforçada e que sempre admirei.
Sempre procurando acompanhar meus passos...

Obrigada por cuidar dos nossos pais enquanto eu estive longe...
Por poder oferecer a eles o carinho que eu não podia oferecer todos os dias...

Obrigada por estar sempre ao meu lado.
Obrigada pelo seu amor, seu carinho e seus abraços...

"A força da nossa amizade vence todas as diferenças..."

Te amo!

Dedicatória

Ao meu namorado e amigo, ***Caril***

Difícil expressar em palavras tudo o que gostaria de lhe dizer... Você acompanhou todas as fases deste ciclo que se encerra, e muitos foram os momentos que estava ao meu lado para me fortalecer e me estimular a seguir em frente. Hoje só tenho a lhe agradecer...

Agradecer por seu companheirismo. Compartilhamos nesses 7 anos muito amor, respeito, cumplicidade, carinho, choros e risos.... Identificamo-nos um com o outro, respeitamos as nossas diferenças e enxergamos no outro suas mais valiosas qualidades...
Mas também soubemos compartilhar idéias e pensamentos, linhas e projetos de pesquisa, células, ratos, camundongos, frias noites de laboratório... Um pelo outro, em todos os momentos...

E cada momento valeu muito a pena! E ter você ao meu lado, independente do humor ou do cansaço, tornou a caminhada mais leve e meu deu força para persistir.

Obrigada por acreditar em mim. Por tornar meus dias mais felizes. Por me ajudar a crescer. Por me apoiar na vida pessoal e profissional.
Por estar presente... Simplesmente por estar presente...

Te amo!

Dedicatória

À minha avó, ***Nair***

Um poço de bondade... Um anjo em minha vida..
Obrigada minha "vó" por seu amor e sua dedicação.
Obrigada por sua preocupação, seu carinho, afago, suas orações, seu companheirismo...
A cada partida, a lágrima da bênção... A cada volta, o abraço mais gostoso do mundo!

Sei que um dia teremos que enfrentar a sua ausência,
E 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 e de amor...

"Cada ruga tua representa uma história... Quantas experiências, quantas histórias para contar... Quantos conselhos para dar... Quanta paciência para nos suportar... Esquece a sua vida, para viver a nossa sempre cheia de atenção, de carinho, de amor. Você é o meio termo, o equilíbrio... A palavra de esperança.. O colo que aninha... O ombro que apesar de cansado apóia...
Você é tudo de bom e de belo..."

Dedicatória

Aos meus avós

Eduardo, Emílio e Antônia *(in memorian)*

Sei que por onde estiverem estarão olhando por mim...
Ajudando a dar cada passo novo, a enfrentar cada desafio.
Obrigada por terem acreditado nos meus sonhos comigo desde criança... Por me segurarem pelas mãos quando minhas forças diminuíram...
Obrigada pelas orações valiosas que contribuíram para esta vitória e pelo carinho que sempre tiveram por mim!

A dedicação incondicional... O amor que não morre, não diminui e não adoece...

"A força da experiência e da juventude entrelaça nossos corações! Nada nos separou e nada nos separará! Nem a morte e nem a vida... Porque estamos unidos em um plano divinamente atemporal".

Aos meus tios ***Carlos Augusto e Edson***

Obrigada por estarem comigo em mais esta conquista!
Obrigada por cada momento juntos, pelo carinho, pela atenção, pela preocupação... Pela torcida de cada dia!
Vocês são muito importantes na minha vida.

Amo Vocês!!!

Dedicatória

Às minhas tias ***Elizete, Valéria, Rosemeire e Marisa***

Vocês estiveram em todos os momentos comigo nesta jornada. Acompanharam cada passo, as alegrias, as fraquezas, os momento de dedicação...
Rimos juntas e choramos juntas... Obrigada por serem minhas companheiras e amigas. Por cuidarem de mim. Obrigada por compreenderem minhas ausências na família, por toda paciência e por quererem sempre o melhor para mim...
Vocês são de importância inestimável na minha formação como pessoa e como profissional!

Aos meus primos: ***Leniza, Luciana, Ricardo e Rodrigo***

Vocês são como verdadeiros irmãos para mim! E quanta saudade eu senti nesses anos todos... Muitas foram as vezes que estive ausente nos encontros de família, e vocês souberam compreender. Mas quando estávamos juntos, as energias eram renovadas, e parecia que tudo se tornava mais fácil.
Obrigada por sempre estarem ao meu lado, me apoiando e me incentivando! Vocês foram essenciais em vários momentos deste curso. Obrigada por cada momento de alegria, conversa, cumplicidade, descanso e de bobeira que vivemos juntos... Que possamos conservar para sempre nossos laços de amizade e de irmandade.

Dedicatória

À minha orientadora
Profª. Dra. **Maria José Hitomi Nagata**:

Neste momento, o que sinto é uma mistura de sentimentos: a sensação de saudades e uma profunda gratidão...
A senhora plantou em mim a semente da docência, pouco a pouco... Cuidou desta semente com todo carinho durante todos esses anos...
Foi mestre, educadora, companheira, amiga, confidente.
Também foi séria, severa e exigente quando precisava ser,
Mas a cada momento de convivência, pude descobrir na senhora uma pessoa grandiosa!
A senhora despertou em mim os mais sublimes valores da docência. Dedicou-se para me tornar uma pessoa melhor, como profissional e como ser humana.
Pude vivenciar o que é ser um docente, um pesquisador, um responsável por disciplina, um coordenador... Enfim, acho que pude aprender muito mais do que oferecer... Mas deixo a certeza de que cada aprendizado será levado adiante, durante toda minha vida, assim como o orgulho de ter-lhe tido como minha orientadora.
Muito obrigada pela convivência e pela confiança em mim depositada.

"O mestre é, antes de tudo, um corajoso. Só assim para se dispor a buscar a maestria na trabalhosa arte de ser mestre".

Agradecimentos Especiais

Agradecimentos Especiais

Aos professores ***Alvaro Francisco Bosco e Valdir Gouveia Garcia***

Obrigada por acreditarem em mim e por me ajudarem a crescer. Deixo neste agradecimento palavras alheias, mas que transmitem tudo o que vocês foram para mim durante esses anos, e que com certeza serão para os felizardos que nesta casa irão passar.

Muito Obrigada!

Ser Mestre é descobrir no outro a
beleza do sonhar e do amanhecer,
é caminhar com o futuro
de todas as pessoas nas mãos,
carregar o tom de todas as cores
e suavizar a tristeza de quem ainda
não descobriu o saber.
Ser Mestre é ter vez e voz na vida
do outro que aprende e ensina,
é mostrar o "caminho das pedras"
e como passar por elas!

É vislumbrar o horizonte
muitas vezes perdido
atrás das cores do arco-íris,
é se alegrar com a vida que
renasce de suas idéias e viver
todos os sonhos que emolduram
a vida alheia.
Ser Mestre é iluminar os caminhos
longos e os atalhos nem sempre
floridos e frios! É aprender e ensinar
como viver, como embaralhar e
acertar todas as cartas. É ensinar a
dar passos largos ou pequenos em
todas as direções, como dançar, sorrir
e ser feliz. Ser Mestre é mostrar o
acender das luzes nas trevas tortuosas
mas necessárias do anoitecer
sombrio!É ser maestro e compositor
de homens
e suas obras maravilhosas.

Autora: Marilena Frade

Ao professor e amigo **Michel Reis Messora**

Enfim, "Doutora" (como você sempre me chama!). E devo muito deste título a você. Durante todo o meu preparo para a Pós-Graduação, assim como durante todo o decorrer deste curso, não houve um momento em que você não estivesse presente. Mesmo depois de terminar seu Doutorado, distante, com tantos compromissos, iniciando sua vida na docência, nos momentos difíceis, você nunca deixou de estender as mãos e "cuidar" para que tudo saísse da melhor forma. E hoje não posso deixar de reconhecer por toda a sua dedicação para que eu concluísse este sonho.

E foram tantos os nossos convívios e aprendizados até eu chegar aqui! Idéias, discussões, telefonemas (e quantos telefonemas!!!)... Você foi meu professor, amigo, meu confidente... Dividimos as alegrias e as angústias. Vibrou com minhas conquistas e sempre me estimulou, com sua fome de pesquisa! Sempre o tive como um exemplo a ser seguido.

És uma pessoa iluminada. Admiro muito sua fé e sua conduta profissional. Obrigada por sua amizade e por dividir comigo mais esta conquista! Nossa amizade tem um valor enorme para mim.

"Amigos de verdade não esperam que os procuremos, simplesmente se fazem presentes". (Augusto Branco)

Agradecimentos

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP, nas pessoas de sua Diretora Profª. Dra. **Ana Maria Pires Soubhia** e Vice-Diretor Prof. Dr. **Wilson Roberto Poi**
Pela oportunidade de realizar este curso e esta pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, nas pessoas de sua Coordenadora Profª. Dra. **Maria José Hitomi Nagata** e de todo corpo docente pela contribuição na minha formação.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES**
Pela concessão da Bolsa de Doutorado no ano de 2010.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP**
Pela concessão da Bolsa de Doutorado (Proc. № 10/15095-9) no período de 2011 a 2013.

Ao Departamento de Ciências Básicas, na pessoa do chefe de departamento **Cláudio Aparecido Casatti**
Pela contribuição na realização das reações imunoistoquímicas deste trabalho.

Ao Professor da Disciplina de Histologia e Embriologia Dr. **Edilson Ervolino**

Agradecimentos

Contribuiu em todas as etapas deste trabalho. Muito obrigada por sua dedicação, comprometimento e cuidado com este trabalho. Seus ensinamentos e sua postura frente à pesquisa serão levados por mim como exemplos a serem seguidos. Muito obrigada pela contribuição na análise histológica, imunoistoquímica, e por todas as outras diversas contribuições que foram realizadas durante o desenvolvimento deste trabalho. Obrigada por nossas conversas e por compartilhar minhas conquistas sempre com entusiasmo e alegria!

À Professora do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal **Suely Regina Mogami Bomfim**
Muito obrigada por sua dedicação, carinho e cuidado com este trabalho. Seus ensinamentos e sua contribuição foram essenciais para concluí-lo. Obrigada pelas conversas, pelo apoio e pela ajuda nos momentos difíceis. Foi um prazer poder trabalhar com a senhora! Muito obrigada por tudo!

Ao Professor Dr. **Stephen E. Fucini**
Nossa convivência nos momentos de trabalho trouxe os EUA para bem pertinho do Brasil! Obrigada pela ajuda nas traduções e correções dos artigos científicos. Pela preocupação de sempre estar agregando conhecimento quando está presente. Obrigada por compartilhar nossas idéias e dedicar-se para que tudo ocorra da melhor forma.

À Professora Dra. **Letícia Helena Theodoro**

Exemplo de educadora e pesquisadora! Sua objetividade, praticidade e competência como profissional me admiram. Muito obrigada por toda ajuda dispensada e por sempre me receber com tanto carinho nos momentos necessários!

Ao Professor Dr. **Juliano Milanezi de Almeida**
Sempre disposto a ajudar e passar seus conhecimentos para nos tornar grandes profissionais.
Muito obrigada pelos momentos de convívio e aprendizado!

Ao Professor Dr. **Mário Taba Júnior**
Agradeço imensamente pela ajuda com meu pós-doutorado! O Senhor me estendeu as mãos em um momento decisivo de minha vida. Muito obrigada pela acolhida em sua equipe de trabalho.

À minha grande amiga **Natália de Campos**
Você é para mim sinônimo de amor, respeito, cumplicidade e confiança. Foi meu porto seguro durante todos esses anos de Pós-Graduação. Uma amizade que nasceu dentro da Periodontia e permaneceu. Completamo-nos, fomos fortes nas nossas fraquezas... Soubemos partilhar tudo, sempre pensando de que forma uma poderia beneficiar a outra. Caminhamos juntas... Escorregamos algumas vezes... Mas sempre fomos uma pela outra...
Hoje a saudade já machuca... Mas levarei comigo lembranças que estarão sempre acesas em meu coração. E deixo a certeza de que estarei na primeira fila para aplaudir o seu sucesso.

Agradecimentos

À querida amiga **Flávia Furlaneto**
É bom saber que temos amigos em quem podemos confiar... Pessoas que nos apoiam e nos acolhem com tanto carinho! Apesar de toda a distância, sempre se fez presente, participando no que podia ajudar. Acompanhou minha caminhada durante todo o período, sempre torcendo pelo meu sucesso! Obrigada por sua preciosa amizade. Estaremos sempre juntas, independente da distância! Sucesso na vida profissional e pessoal!

À querida amiga **Paula Faleiros**
Quantas descobertas e quantos bons momentos dividimos juntas! Nossa aproximação foi acontecendo aos pouquinhos e hoje você já ocupa um grande espaço em minha vida. Fez-me encarar estes últimos meses com mais leveza e se fez presente no que fosse necessário para ajudar. Dividi com você minhas indecisões e angústias e você sempre com uma forma bela de orientar os pensamentos ou com uma palavra amiga para oferecer. Obrigada por toda ajuda e por sua preciosa amizade!

À querida amiga **Carolina Santinoni**
Uma pessoa admirável! Sempre pronta para ajudar no que for preciso. Dividimos muito trabalho, mas também muitos momentos de alegria, de incertezas, de choro... Enfim, fomos cúmplices em todos os momentos. Não ganhei somente uma companheira de Pós-Graduação. Ganhei uma companheira de vida! Tivemos nossas divergências, mas sempre pensando no

bem estar uma da outra. Hoje deixo aqui registrado meu sincero agradecimento. Por todo auxílio na conclusão deste curso, por sua amizade e por todo carinho dedicado a mim... Obrigada!

Aos meus grandes amigos **Kléber Gotzo e Sandra Volpato**
Sempre torcendo pela minha vitória! Mesmo distante, estamos sempre perto uns dos outros. Obrigada por dividirem mais esta conquista comigo. Vocês são amigos verdadeiros, essenciais em minha vida. Pessoas que eu posso confiar de olhos fechados! Obrigada pelo carinho, amizade, preocupação, incentivo... Agradeço a Deus por fazerem parte de minha vida.

À minha amiga **Natália Manrique**
Tantos foram os momentos que vivenciamos juntas. Cúmplices nas alegrias, nas tristezas, nos choros e nos "desesperos"... Um exemplo de pessoa amável, carinhosa, dedicada... Sabe o momento e as palavras certas para me acalmar nas dificuldades. Obrigada por sempre estar ao meu lado quando precisei e por dividir comigo mais este momento de alegria!

Às minhas amigas **Jorgiana Sangalli** e **Caroline Vital**
Pouco importa saber em que parte do mundo nossos amigos se encontram, se podemos sentir na alma que dentro de nós e dentro deles há um espaço reservado que nada mais poderá preencher... Independente do tempo e da distância, conseguimos manter nossos laços de amizade, e nos tornamos cada vez mais fortes. Obrigada por todos os momentos vividos, por

partilharmos nossas experiências, nossas dificuldades e nossas conquistas umas com as outras. **Amo Vocês!**

"É na amizade verdadeira que encontramos sinceridade, lealdade, afinidade, cumplicidade, simplicidade, fraternidade..."

Aos meus companheiros de pós-graduação: **Erivan, Mariéllen, Vivian, Natália de Campos, Carolina e Paula**
Embora as afinidades sejam diversas, um só ideal é compartilhado, uma só meta é almejada... Obrigada por tudo o que pude aprender com vocês! Sucesso em suas carreiras profissionais!

Ao Sr. **Edson L. de Campos** e a **Rosmeire A. M. de Campos**
Por sempre me acolherem tão bem em sua casa. Vocês sempre estiveram preocupados com meu bem-estar e acompanharam minha rotina, junto com a Naty, sempre torcendo para que tudo ocorresse bem. Obrigada por todo carinho recebido, pelo cuidado, por nossas conversas. Sempre serei grata por todo o amor que me dedicaram.
OBRIGADA POR TUDO!

Ao Sr. **Vanderlei Santinoni** e **Ana Santinoni**
Por todo o carinho e ajuda dedicada e por me permitirem dividir com vocês momentos agradáveis em sua casa, junto à sua família.

Agradecimentos

Ao meu amigo **Samuel Moraes**

Pelas conversas, pelas palavras de apoio e amizade. O nosso convívio é sempre muito especial e prazeroso. Obrigada pela disponibilidade em sempre ajudar. Boa sorte e sucesso em sua vida pessoal e profissional!

Ao meu amigo **Alberto Kajimoto**

Pelos bons momentos de convívio durante esses anos. Você sempre esteve presente, acompanhando essa jornada e ajudando no que fosse necessário. Obrigada por sua preciosa amizade...

Ao meu amigo **Daniel Almeida**

Por sempre estar presente disposto a ajudar. Obrigada por sua dedicação, carinho e amizade, e por poder dividir comigo mais este momento especial!

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

Pelo carinho e atenção que sempre tiveram... E por sempre estarem com a porta de sua casa aberta para quando fosse necessário. Que Deus os abençoe...

OBRIGADA!

Às estagiárias de iniciação científica **Eduarda Belem** e **Gabriela Leonardi**

Pelos bons momentos de convívio e pela inestimável ajuda na realização deste trabalho.

Agradecimentos

Ao querido amigo e funcionário **Odair Vicente**
Sempre pronto para ajudar com muita alegria. Muito obrigada por sua eficiência, dedicação e preocupação com nossas tarefas.

Ao amigo e funcionário **Joilson de Barros**
Muito obrigada por toda ajuda a mim dedicada, pelo companheirismo nos momentos de trabalho e por cuidar tão bem do dia-a-dia da Periodontia. Muito sucesso em sua vida acadêmica e profissional!

Aos funcionários do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, **Cleide, Dirce, Gilmar, Paulo e Renato**
Pela convivência tão agradável e pela disponibilidade em ajudar.

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

Ao funcionário da Disciplina de Anatomia **Arnaldo**
Você é o exemplo de profissional dedicado! Muito obrigada por cuidar de meus animais. Por seu zelo e dedicação para com eles. Que Deus o abençoe...

Agradecimentos

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

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

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

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

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

Epígrafe

Epígrafe

"Há homens que lutam um dia e são bons.
Há outros que lutam um ano e são
melhores. Há os que lutam muitos anos e
são muito bons. Porém, há os que lutam
toda a vida.
Esses são os imprescindíveis."

(Bertolt Brecht)

Resumo

Resumo

POLA, N.M. **Avaliação do reparo ósseo de defeitos de tamanho crítico tratados com plasma rico em plaquetas ou com fibrina rica em plaquetas.** Estudo histomorfométrico e imunoistoquímico em calvárias de ratos [tese]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2013.

Este estudo avaliou a influência do Plasma Rico em Plaquetas (PRP) e da Fibrina Rica em Plaquetas (FRP) no reparo ósseo de defeitos de tamanho crítico (DTC) criados cirurgicamente em calvárias de ratos. 90 ratos foram aleatoriamente divididos em 3 grupos: C (controle), PRP e FRP. Um DTC de 5 mm de diâmetro foi criado na calvária de cada animal. No Grupo C, o defeito foi preenchido com coágulo sanguíneo somente. Nos grupos PRP e FRP, os defeitos foram preenchidos com PRP e FRP, respectivamente. Os animais foram eutanasiados aos 7, 15 ou 30 dias pós-operatórios. Análises histomorfométrica e imunoistoquímica foram realizadas. A Área de Osso Neoformado (AON) foi calculada como uma porcentagem da área total do defeito original. Imunomarcações do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), fator de transcrição relacionado à Runt 2 (Runx2), proteína morfogenética óssea - 2 (BMP-2) e fosfatase alcalina específica do osso (BALP) foram realizadas. Células positivas para PCNA e Runx2 foram quantificadas e as imunomarcações para BMP-2 e BALP foram semi-quantificadas. Os dados foram estatisticamente analisados. Aos 7 dias, o Grupo PRP (10,74 ± 4,80%) apresentou AON significativamente maior do que os grupos C (0,86 ± 0,98%) e FRP (2,95 ± 2,37%). Aos 15 dias, os grupos C, PRP e FRP apresentaram AON similares (13,07 ± 4,48%; 14,19 ± 2,85%; 18,83 ± 6,71%, respectivamente). Aos 30 dias, os grupos PRP (32,75 ± 7,39%) e FRP (28,73 ± 10,67%) apresentaram AON significativamente maior do que o Grupo C(13,55 ± 4,62%). Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos PRP e FRP aos 30 dias. Aos 7 dias, os grupos PRP e FRP apresentaram número de células PCNA-positivas significativamente maior do que o Grupo C. Aos 15 dias, o Grupo FRP apresentou número de células PCNA-positivas significativamente maior do que os grupos C e PRP e o Grupo PRP apresentou número de células PCNA-positivas significativamente maior do que o Grupo C. Aos 30 dias, o Grupo FRP apresentou número de células PCNA-positivas significativamente maior do que o Grupo C. Aos 7 dias, o Grupo PRP apresentou número de células Runx2-positivas significativamente maior do que os grupos C e FRP. Aos 15 dias, o Grupo FRP apresentou número de células Runx2-

Resumo

positivas significativamente maior do que o Grupo C. Aos 15 dias, o Grupo PRP apresentou escores para BMP-2 significativamente maiores do que o Grupo C e aos 30 dias, os grupos PRP e FRP apresentaram escores para BMP-2 significativamente maiores do que o Grupo C. Aos 30 dias, o Grupo PRP apresentou escores para BALP significativamente maiores do que o Grupo C. Dentro dos limites deste estudo, pode-se concluir que o PRP promoveu uma rápida diferenciação de células osteoprogenitoras, resultando em formação óssea acelerada em defeitos de tamanho crítico cirurgicamente criados em calvária de ratos quando comparado ao controle e FRP. Ambos, PRP e FRP, resultaram em maior formação óssea que o controle aos 30 dias pós-operatórios.

Palavras-chave: animal, regeneração óssea, plaquetas, fibrina

Abstract

Abstract

POLA, N.M. **Bone healing in critical-size defects treated with either Platelet-Rich Plasma (PRP) or Platelet-Rich Fibrin (PRF).** A histomorphometric and immunohistochemical study in rats. [thesis]. Araçatuba: Unesp – Univ Estadual Paulista; 2013.

This study evaluated the influence of Platelet-Rich Plasma (PRP) and Platelet-Rich Fibrin (PRF) on bone healing in surgically created critical-size defects (CSD) in rat calvaria. 90 rats were randomly divided into 3 groups: C (control), PRP and PRF. A 5 mm diameter CSD was created in the calvarium of each animal. In Group C, the defect was filled by blood clot only. In groups PRP and PRF, the defects were filled with PRP and PRF, respectively. Animals were euthanized 7, 15 or 30 days postoperatively. Histomorphometric and immunohistochemical analyses were performed. Newly formed bone area (NFBA) was calculated as percentage of the total area of the original defect. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA), Runt-related transcription factor 2 (Runx2) Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) and Bone Alkaline phosphatase (BALP) immunohistochemical staining were performed. PCNA-positive and Runx2-positive cells were quantified and BMP-2 and BALP immunostaining were semi-quantified. Data were statistically analyzed. At 7 days, Group PRP (10.74 ± 4.80) had significantly greater NFBA than groups C (0.86 ± 0.98) and PRF (2.95 ± 2.37). At 15 days, groups C, PRP and PRF presented similar amount of NFBA (13.07 ± 4.48; 14.19 ± 2.85; 18.83 ± 6.71, respectively). At 30 days, groups PRP (32.75 ± 7.39) and PRF (28.73 ± 10.67) presented significantly greater NFBA than Group C (13.55 ± 4.62) and no significant differences were observed between groups PRP and PRF. At 7 days, Groups PRP and PRF showed a significantly higher number of PCNA-positive cells than Group C. At 15 days, Group PRF had a significantly higher number of PCNA-positive cells than groups C and PRP; Group PRP had a significantly higher number of these cells than Group C. At 30 days, Group PRF presented a significantly higher number of PCNA-positive cells than Group C. At 7 days, Group PRP had a significantly higher number of Runx2-positive cells than groups C and PRF. At 15 days, Group PRF presented a significantly higher number of Runx2-positive cells than Group C. At 15 days, Group PRP had significantly higher BMP-2 scores than Group C. At 30 days, groups PRP and PRF presented significantly higher BMP-2 scores than Group C. At 30 days, Group PRP had a significantly higher BALP scores than Group C. Within the limits of this study, it can be concluded that PRP promoted faster differentiation of osteoprogenitor cells which

Abstract

resulted in accelerated bone formation in surgically created CSD in rat calvaria when compared to control and PRF. Both PRP and PRF resulted in greater bone formation than control at 30 days post-operative.

Keywords: animal; bone regeneration; platelets; fibrin

Lista de Figuras

Lista de Figuras

Figura 1 - Preparos, características clínicas e histológicas do PRP e FRP. (A) PRP e o buffy coat; (B) FRP na porção intermediária do tubo; (C) PRP coagulado; (D) Matriz de FRP; (E) Esfregaço do PRP mostrando plaquetas (setas pretas) e leucócito (seta vermelha) (Coloração de Romanowsky - Panótico); (F) Citoarquitetura da FRP: matriz de fibrina (seta verde), agregados de plaquetas e leucócitos (seta branca) e eritrócitos (seta azul) (H&E). Barras de escala = 10 µm para (E) e 100 µm para (F). Abreviações e símbolos: FRP = Fibrina rica em plaquetas; PRP = Plasma rico em plaquetas; seta azul = eritrócitos; seta branca = agregados de plaquetas e leucócitos; seta preta = plaqueta; seta verde = matriz de fibrina; seta vermelha = leucócito. 82

Figura 2 - Contagem de plaquetas e leucócitos. (A) Média do número de plaquetas/µl e desvios-padrão nas amostras de SP_{PRP} e PRP; (B) Distribuição da frequência de plaquetas nas amostras de SP_{FRP}; (C) Distribuição da frequência de leucócitos nas amostras de SP_{FRP}. Abreviações: SP_{FRP} = Sangue periférico submetido ao preparo da FRP; SP_{PRP} = Sangue periférico submetido ao preparo do PRP; PRP = Plasma rico em plaquetas. 83

Figura 3 - Visões panorâmicas e detalhadas dos defeitos cirúrgicos aos 7 e 30 dias pós-operatórios. (A) Fotomicrografia do Grupo C aos 7 dias pós-operatórios; (B) Fotomicrografia do Grupo C aos 30 dias pós-operatórios; (C) Fotomicrografia do Grupo PRP aos 7 dias pós-operatórios; (D) Fotomicrografia do Grupo PRP aos 30 dias pós-operatórios; (E) Fotomicrografia do Grupo FRP aos 7 dias pós-operatórios; (F) Fotomicrografia do Grupo FRP aos 30 dias pós-operatórios. H&E. Barras de escala = 100 µm para (A), (C) e (E); 40 µm para (B), (D) e (F). Abreviações e símbolos: C = Controle; FRP = Fibrina rica em plaquetas; ON = Osso Neoformado; PRP = Plasma rico em plaquetas; TC = Tecido conjuntivo; TO =Tecido ósseo original; VS = Vaso sanguíneo; seta branca = osteócito; seta preta = osteoblasto. 84

Figura 4 - Imunomarcações para PCNA e Runx2 no defeito cirúrgico, aos 7 dias pós-operatórios. Fotomicrografias mostrando células PCNA- 85

positivas (setas azuis) nos grupos (A) C, (B) PRP e (C) FRP. Fotomicrografias mostrando células Runx2-positivas (setas pretas) nos grupos (D) C, (E) PRP e (F) FRP. *Fast-green*. Barra de escala = 20 µm. Abreviações e símbolos: C = Controle; FRP = Fibrina rica em plaquetas; ON = Osso neoformado; PCNA = Antígeno nuclear de proliferação celular; PRP = Plasma rico em plaquetas; Runx2 = Fator de transcrição relacionado à Runt 2; TC = tecido conjuntivo; seta azul = célula PCNA-positiva; seta preta = célula Runx2-positiva.

Figura 5 - Imunomarcações para BMP-2 e BALP no defeito cirúrgico, aos 30 dias pós-operatórios. Fotomicrografias mostrando imunomarcações para BMP-2 nos grupos (A) C, (B) PRP e (C) FRP. Fotomicrografias mostrando imunomarcações para BALP nos grupos (D) C, (E) PRP e (F) FRP. Hematoxilina de Harris. Barra de escala = 20 µm. Abreviações e símbolos: BALP = Fosfatase alcalina específica do osso; BMP-2 = Proteína morfogenética óssea 2; C = Controle; FRP = Fibrina rica em plaquetas; ON = Osso neoformado; PRP = Plasma rico em plaquetas; TC =Tecido conjuntivo; VS = Vaso sanguíneo; seta azul = osteoblasto BALP-positivo; seta preta = osteoblasto BMP-2-positivo; seta verde = osteócito BALP-positivo; seta vermelha = osteócito BMP-2-positivo. 86

Figura 6 - Gráfico mostrando médias e desvios-padrão da AON (%) para cada grupo, assim como os resultados das comparações intergrupos, aos 7, 15 e 30 dias pós-operatórios. ***p<0,001. Abreviações: AON = Área de Osso Neoformado; C = Controle; FRP = Fibrina rica em plaquetas; PRP = Plasma rico em plaquetas. 87

Figura 7 - Gráfico mostrando médias e desvios-padrão das células (A) PCNA-positivas e (B) Runx2-positivas no defeito cirúrgico para cada grupo aos 7, 15 e 30 dias pós-operatórios, assim como os resultados das comparações intergrupos. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. Abreviações: C = Controle; FRP = Fibrina rica em plaquetas; PCNA = Antígeno nuclear de proliferação celular; PRP = Plasma rico em plaquetas; Runx2 = Fator de transcrição 88

relacionado à Runt 2.

Figura 8 - Gráfico mostrando frequência dos escores atribuídos para as proteínas (A) BMP-2 e (B) BALP no defeito cirúrgico para cada grupo aos 7, 15 e 30 dias pós-operatórios, assim como os resultados das comparações intergrupos. *p<0,05; **p<0,01. Abreviações: BALP = Fosfatase Alcalina Específica do Osso; BMP-2 = Proteína Morfogenética Óssea; C = Controle; FRP = Fibrina rica em plaquetas; PRP = Plasma rico em plaquetas. 89

Lista de Anexos

Lista de Anexos

Anexo A - Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) 91

Anexo B - Normas para Publicação segundo o periódico “Bone” 92

Lista de Abreviaturas e Siglas

Lista de Abreviaturas e Siglas

µl = Microlitro(s)

µm = Micrometro(s)

ANOVA = Análise de Variância

AON = Área de Osso Neoformado

AT = Área Total

BALP = Fosfatase Alcalina Específica do Osso / Bone Alkaline Phosphatase

BMP-2 = Proteína Morfogenética Óssea 2 / Bone Morphogenetic Protein 2

C = Controle / Control

CEEA = Comissão de Ética na Experimentação Animal

CSD = Critical-size Defect(s)

DAB = 3,3'- tetracloridrato de Diaminobenzidina

DTC = Defeito(s) de Tamanho Crítico

EDTA = Ácido Etilenodiaminotetracético

FC = Fatores de Crescimento

FRP = Fibrina Rica em Plaquetas

g = Gramas

G = Giros

H&E = Hematoxilina e Eosina

HRP = Estreptavidina Conjugada com a Peroxidase da Raiz Forte

M = Molar

ml = Mililitro

NFBA = Newly Formed Bone Area

Lista de Abreviaturas e Siglas

ºC = Graus Celsius

PCNA = Antígeno Nuclear de Proliferação Celular / Proliferating Cell Nuclear Antigen

PPP = Plasma Pobre em Plaquetas

PRF = Platelet-Rich Fibrin

PRP = Plasma Rico em Plaquetas

RUNX-2 = Fator de Transcrição Relacionado à Runt 2 / Runt-Related Transcription Factor 2

SP_{FRP} = Sangue Periférico Submetido ao Preparo do FRP

SP_{PRP} = Sangue Periférico Submetido ao Preparo do PRP

TKW = Teste de Kruskal-Wallis

UI = Unidades Internacionais

Lista de Símbolos

Lista de Símbolos

%	=	Por cento
&	=	E
<	=	Menor
±	=	Desvio padrão da amostra
n	=	Tamanho da amostra
p	=	Probabilidade do valor do teste

Sumário

Sumário

Manuscrito para Publicação	46
Página de título	47
Resumo	48
Introdução	50
Materiais e métodos	52
Resultados	60
Discussão	65
Agradecimentos	70
Referências Bibliográficas	71
Legendas de Figuras	79
Anexos	90

*Manuscrito para Publicação**

**Manuscrito segundo as normas do Periódico "Bone"*

Avaliação do reparo ósseo de defeitos de tamanho crítico tratados com plasma rico em plaquetas ou com fibrina rica em plaquetas. Estudo histomorfométrico e imunoistoquímico em calvárias de ratos.

Natália M. Pola[a], Maria J. H. Nagata[a]

[a]Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada, Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP, Brasil. Rua José Bonifácio, 1993, CEP 16015-050. Araçatuba – SP/Brasil.

Autora responsável pela correspondência:

Maria José Hitomi Nagata

Depto. Cirurgia e Clínica Integrada

Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP

Rua José Bonifácio, 1193

CEP: 16015-050 Araçatuba, SP, Brasil

Telefone: +55 18 3636 3271/ +55 18 3636 3239

e-mail: mjnagata@foa.unesp.br

Resumo

Este estudo avaliou a influência do Plasma Rico em Plaquetas (PRP) e da Fibrina Rica em Plaquetas (FRP) no reparo ósseo de defeitos de tamanho crítico (DTC) criados cirurgicamente em calvárias de ratos. 90 ratos foram aleatoriamente divididos em 3 grupos: C (controle), PRP e FRP. Um DTC de 5 mm de diâmetro foi criado na calvária de cada animal. No Grupo C, o defeito foi preenchido com coágulo sanguíneo somente. Nos grupos PRP e FRP, os defeitos foram preenchidos com PRP e FRP, respectivamente. Os animais foram eutanasiados aos 7, 15 ou 30 dias pós-operatórios. Análises histomorfométrica e imunoistoquímica foram realizadas. A Área de Osso Neoformado (AON) foi calculada como uma porcentagem da área total do defeito original. Imunomarcações do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), fator de transcrição relacionado à Runt 2 (Runx2), proteína morfogenética óssea - 2 (BMP-2) e fosfatase alcalina específica do osso (BALP) foram realizadas. Células positivas para PCNA e Runx2 foram quantificadas e as imunomarcações para BMP-2 e BALP foram semi-quantificadas. Os dados foram estatisticamente analisados. Aos 7 dias, o Grupo PRP (10,74 ± 4,80%) apresentou AON significativamente maior do que os grupos C (0,86 ± 0,98%) e FRP (2,95 ± 2,37%). Aos 15 dias, os grupos C, PRP e FRP apresentaram AON similares (13,07 ± 4,48%; 14,19 ± 2,85%; 18,83 ± 6,71%, respectivamente). Aos 30 dias, os grupos PRP (32,75 ± 7,39%) e FRP (28,73 ± 10,67%) apresentaram AON significativamente maior do que o Grupo C(13,55 ± 4,62%). Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos PRP e FRP aos 30 dias. Aos 7 dias, os grupos PRP e FRP apresentaram número de células PCNA-positivas significativamente maior do que o Grupo C. Aos 15 dias, o Grupo FRP apresentou número de células PCNA-positivas significativamente maior do que os grupos C e PRP e o Grupo PRP apresentou número de células PCNA-positivas significativamente maior

do que o Grupo C. Aos 30 dias, o Grupo FRP apresentou número de células PCNA-positivas significativamente maior do que o Grupo C. Aos 7 dias, o Grupo PRP apresentou número de células Runx2-positivas significativamente maior do que os grupos C e FRP. Aos 15 dias, o Grupo FRP apresentou número de células Runx2-positivas significativamente maior do que o Grupo C. Aos 15 dias, o Grupo PRP apresentou escores para BMP-2 significativamente maiores do que o Grupo C e aos 30 dias, os grupos PRP e FRP apresentaram escores para BMP-2 significativamente maiores do que o Grupo C. Aos 30 dias, o Grupo PRP apresentou escores para BALP significativamente maiores do que o Grupo C. Dentro dos limites deste estudo, pode-se concluir que o PRP promoveu uma rápida diferenciação de células osteoprogenitoras, resultando em formação óssea acelerada em defeitos de tamanho crítico cirurgicamente criados em calvária de ratos quando comparado ao controle e FRP. Ambos, PRP e FRP, resultaram em maior formação óssea que o controle aos 30 dias pós-operatórios.

Palavras-chave: animal, regeneração óssea, plaquetas, fibrina

1. Introdução

A formação óssea requer a coordenação de uma variedade de processos fisiológicos. Esses processos envolvem sinais moleculares mediados principalmente por fatores de crescimento (FC) e citocinas. Plaquetas contêm diversos FC e citocinas que desempenham papel fundamental na inflamação e reparo ósseo [1,2]. Além disso, também secretam fibrina, fibronectina e vitronectina, que atuam como moléculas de adesão para migração celular mais eficiente [3]. O uso de cola de fibrina [4] e concentrados de plaquetas [5,6] durante procedimentos cirúrgicos é um conceito atual de tratamento utilizado para acelerar a cicatrização de feridas e a maturação de tecidos [7,8].

Em 1998, Marx et al. [5] propuseram o uso do plasma rico em plaquetas (PRP) autólogo como uma técnica economicamente viável para obter-se uma alta concentração de FC. Esses autores observaram maturação mais rápida dos enxertos ósseos autógenos associados ao PRP quando comparados aos enxertos sem PRP utilizados no tratamento de defeitos mandibulares resultantes da remoção de tumores benignos e malignos. A racionalidade para o uso local do PRP está, sobretudo, no fato de que plaquetas autólogas ativadas retidas na matriz de fibrina são uma fonte de sinais moleculares que controlam crescimento e diferenciação celular através da liberação de diversas proteínas e outras moléculas biologicamente ativas [2].

Após o estudo clínico pioneiro de Marx et al. [5], outros pesquisadores avaliaram os efeitos do PRP associado a enxertos ósseos e/ou biomateriais em modelos animais [9-14] e em estudos clínicos [15-19]. Esses trabalhos, entretanto, têm demonstrado resultados contraditórios em relação à formação e maturação ósseas.

Footnotes:
AT = Área Total
AON = Área de Osso Neoformado
FC = Fatores de Crescimento

Nos últimos anos, a fibrina rica em plaquetas (FRP) de Choukroun tem ganhado amplo espaço na literatura científica [20-22]. Classificada como a segunda geração dos concentrados de plaquetas, ela foi definida como um biomaterial autólogo formado por matriz de fibrina rica em plaquetas e leucócitos [23]. Têm sido descritos efeitos benéficos de vários tipos de aplicações clínicas da FRP em cirurgias orais e maxilofaciais, tais como em cirurgias de levantamento de seio maxilar [22,24,25], preenchimento de alvéolos dentais [21], cirurgias de aumento de rebordo para instalação de implantes [26,27] e no tratamento cirúrgico de defeitos periodontais, tais como em defeitos periodontais infra-ósseos [28,29] e em defeitos de furca [30]. Outras aplicações clínicas da FRP têm sido descritas, também, na área da medicina, tais como em cirurgias de ouvido, nariz e garganta [31,32] e em cirurgias plásticas faciais [33]. Estudos in vitro avaliando os efeitos da FRP na proliferação e diferenciação de osteoblastos [34-36], bem como no cultivo de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido ósseo da cavidade bucal [23] e de células periosteais humanas [37], relataram resultados positivos, sugerindo que o uso dessa matriz pode promover benefícios na regeneração óssea.

Diferentemente das outras técnicas de preparo dos concentrados de plaquetas, a técnica para o preparo da FRP não requer o uso de anticoagulantes ou ativadores, como a trombina bovina. O sucesso dessa técnica depende inteiramente da velocidade de coleta do sangue e transferência do mesmo para centrifugação [38]. Ao contrário do PRP, a FRP não se dissolve rapidamente após a aplicação. A forte matriz de fibrina é lentamente remodelada de forma semelhante ao coágulo sanguíneo natural [39], o que lhe confere uma arquitetura fisiológica favorável para suportar o processo de cicatrização [38].

O desenvolvimento recente dos concentrados de plaquetas para o uso cirúrgico é uma evolução das tecnologias das colas de fibrina utilizadas há muitos anos [40]. Sabe-se que as plaquetas desempenham um papel crucial não apenas na hemostasia, mas também no processo de cicatrização de feridas [37]. Dentro deste contexto e, considerando os resultados clínicos favoráveis obtidos tanto com o PRP como com a FRP [19,29,41], torna-se importante avaliar e comparar os efeitos biológicos e os mecanismos moleculares relacionados ao uso do PRP e da FRP nos procedimentos regenerativos ósseos.

O propósito do presente estudo foi avaliar o reparo ósseo de defeitos de tamanho crítico (DTC) criados cirurgicamente em calvárias de ratos e tratados com plasma rico em plaquetas (PRP) ou com fibrina rica em plaquetas (FRP). Esta avaliação consistiu de análise histomorfométrica e imunoistoquímica para detecção do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), um marcador de células em proliferação; do fator de transcrição relacionado à Runt 2 (Runx2), um biomarcador que evidencia a diferenciação de células osteoprogenitoras em osteoblastos; da proteína morfogenética óssea - 2 (BMP-2), um dos fatores de crescimento com a mais potente ação osteogênica; e da fosfatase alcalina específica do osso (BALP), uma hidrólise pirofosfatase que gera o fosfato inorgânico requerido para a geração e deposição da hidroxiapatita durante o processo de mineralização do osso.

2. Materiais e Métodos

2.1. 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 – UNESP (2010-005123). Foram utilizados 90 ratos machos (*Rattus norvegicus*, *albinus*, Wistar), com idade entre 5 e 6 meses, pesando entre 350 e 450 g (UNESP, Biotério da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba). Eles foram aleatoriamente divididos em 3 grupos experimentais: C (controle), PRP (Plasma Rico em Plaquetas) e FRP (Fibrina Rica em Plaquetas). Cada grupo foi subdividido em 3 subgrupos (n=10), para eutanásia aos 7, 15 ou 30 dias pós-operatórios.

2.2. Preparo do PRP

Os animais do Grupo PRP foram anestesiados por injeção intramuscular de xilazina (6 mg/kg de peso corporal) e quetamina (70 mg/kg de peso corporal). Imediatamente antes da realização dos procedimentos cirúrgicos, foram coletados 3,15 ml de sangue de cada animal via punção cardíaca, utilizando uma seringa descartável de 5 ml contendo 0,35 ml de citrato de sódio a 3,2% como anticoagulante.

O preparo do PRP foi realizado de acordo com o protocolo de Messora et al. [42]: cada amostra coletada foi inicialmente centrifugada a 160 G por 20 minutos, à temperatura de 22°C, para separar o plasma contendo as plaquetas das células vermelhas (Hermle Z323K, Hermle Labortechnik GmbH., Wehingen, Baden-Württemberg, Alemanha). O plasma foi pipetado e centrifugado a 400 G por 15 minutos, à temperatura de 22°C, para separar as plaquetas. O Plasma Pobre em Plaquetas (PPP) foi pipetado do topo, deixando o PRP e o *buffy coat* (Fig. 1A).

2.3. Preparo da FRP

Os animais do Grupo FRP foram anestesiados usando o mesmo protocolo descrito para o Grupo PRP. Imediatamente antes da realização dos procedimentos cirúrgicos, foram coletados 3,0 ml de sangue de cada animal via punção cardíaca, utilizando uma seringa descartável de 5 ml, sem a adição de anticoagulante.

O preparo da FRP foi realizado de acordo com uma adaptação do protocolo de Dohan et al. [38]: cada amostra coletada foi imediatamente centrifugada a 400 G durante 12 minutos, a 22ºC (Hermle Z323K, Hermle Labortechnik GmbH., Wehingen, Baden-Württemberg, Alemanha). Um coágulo de fibrina (FRP) foi obtido na porção intermediária do tubo, entre os corpúsculos vermelhos localizados na porção inferior e o plasma acelular (PPP) localizado na porção superior do tubo (Fig. 1B). Este PPP foi, então, descartado e a FRP foi pinçada do interior do tubo e separada da porção de corpúsculos vermelhos com o uso de uma lâmina de bisturi número 15.

2.4. Procedimentos cirúrgicos

Os animais do Grupo C foram anestesiados utilizando o mesmo protocolo descrito para os grupos PRP e FRP. Após preparo antisséptico, foi realizada uma incisão semilunar na região anterior da calvária e um retalho de espessura total foi rebatido em direção posterior. Um defeito de tamanho crítico (DTC) de 5 mm de diâmetro foi criado com uma trefina acoplada em uma peça de mão de baixa rotação, sob irrigação abundante com solução salina estéril. Uma marcação no formato de “L” foi feita 2 mm anterior e outra 2 mm posterior às margens do defeito cirúrgico utilizando uma broca carbide tronco-cônica e um guia cirúrgico. As marcações foram preenchidas com amálgama. Estas marcações foram usadas para identificação do centro do defeito cirúrgico original

durante o processamento laboratorial e, também, para localizar precisamente as suas margens ósseas originais durante a análise histométrica [42].

No Grupo C, o defeito cirúrgico foi preenchido somente com coágulo sanguíneo. No Grupo PRP, o defeito foi preenchido com o PRP. No Grupo FRP, o defeito foi preenchido com a FRP. Os tecidos moles foram, então, reposicionados e suturados para obter-se um fechamento primário da ferida. Cada animal recebeu, no pós-operatório imediato, injeção intramuscular de 24.000 UI de penicilina G-benzatina (Pentabiótico* Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge® Saúde Animal Ltda., Campinas, SP, Brasil).

2.5. Protocolos de aplicação do PRP e da FRP

50 µl de PRP foi ativado com 1,25 µl de solução de cloreto de cálcio a 10% (Calcium Chloride 10% Solution, ScienceLab.com Inc., Houston, TX, EUA) na proporção de 0,05 ml de cloreto de cálcio para cada 1 ml de PRP, imediatamente antes de sua aplicação no defeito cirúrgico (Fig. 1C).

A FRP foi utilizada imediatamente após a centrifugação ter sido finalizada, para evitar que esta sofresse retração. Esta matriz de FRP, de tamanho padronizado (Fig. 1D), foi aplicada no defeito cirúrgico com o auxílio de uma pinça clínica.

2.6. Contagem de plaquetas e leucócitos

As contagens de plaquetas foram realizadas nas amostras de sangue periférico submetidas ao preparo do PRP (SP_{PRP}) e da FRP (SP_{FRP}) e, também, nas amostras de PRP. As contagens de leucócitos foram realizadas nas amostras de SP_{FRP}.

As amostras de SP_{FRP} utilizadas para realizar as contagens de plaquetas e leucócitos foram obtidas de 10 animais distintos daqueles utilizados para os procedimentos

experimentais do Grupo FRP. Esse protocolo foi necessário devido ao fato de que, nos animais desse grupo, as amostras de sangue periférico, por não conterem anticoagulante, tinham que ser coletadas e imediatamente processadas para o preparo da FRP. Assim, não havia tempo hábil de realizar-se a avaliação das plaquetas e leucócitos nessas amostras sem que houvesse prejuízo da qualidade da FRP obtida. 3,5 ml de sangue foram coletados de cada um desses 10 novos animais, via punção cardíaca, utilizando uma seringa descartável de 5 ml, sem a adição de anticoagulante. 0,5 ml foi utilizado para avaliação da contagem de plaquetas e leucócitos e os restantes 3,0 ml foram utilizados para o preparo de FRP para análise de sua citoarquitetura.

Líquido de Brecher foi usado para lisar os eritrócitos e diluir as amostras de $SP_{PRP,}$ SP_{FRP} e PRP com o objetivo de avaliar as plaquetas. Líquido de Turk foi usado para diluir as amostras de SP_{FRP} para avaliar os leucócitos. As plaquetas e leucócitos foram contados manualmente, em uma câmara de Neubauer. Além disso, esfregaços das amostras de $SP_{PRP,}$ SP_{FRP} e PRP foram corados com "Panótico Rápido LB" (LaborClin, Pinhais, PR, Brasil) para avaliar a morfologia das plaquetas. Esfregaços de SP_{FRP} foram também corados com "Panótico Rápido LB" para avaliar a morfologia dos leucócitos.

2.7. Estudo da citoarquitetura da FRP

Amostras adicionais de FRP foram preparadas exclusivamente para a avaliação da composição celular e citoarquitetura deste biomaterial. Estas amostras foram preparadas seguindo o mesmo protocolo descrito para o preparo de FRP dos animais do Grupo, utilizando os 3 ml de sangue obtidos de cada um dos 10 animais utilizados para contagem de plaquetas e leucócitos das amostras de SP_{FRP}.

2.8. Processamento Tecidual

Os animais foram eutanasiados aos 7, 15 ou 30 dias pós-operatórios. A área do defeito cirúrgico original e os tecidos circunjacentes foram removidos em bloco. Após descalcificação inicial em solução de Ácido Etilenodiaminotetracético (EDTA) a 10%, cada espécime foi dividido longitudinalmente em dois blocos, exatamente ao longo do centro do defeito cirúrgico original, usando-se os maiores eixos de cada marcação em formato de "L" como referência. Cortes transversais foram então realizados usando o menor eixo de cada marcação em "L" como referência, permitindo a identificação precisa das margens do defeito cirúrgico original durante os procedimentos de análises de imagens [42]. Após um período de descalcificação adicional, as peças foram processadas e incluídas em parafina. Foram realizados cortes seriados com 5 μm de espessura na direção longitudinal, corados com Hematoxilina e Eosina (H&E) para análise histomorfométrica ou submetidos à técnica da imunoperoxidase indireta. Para as reações imunoistoquímicas, os cortes histológicos foram desparafinizados e reidratados através de uma série graduada de etanol. Para recuperação antigênica, as lâminas foram incubadas em uma solução tampão (Diva Decloaker®, Biocare Medical, CA, USA), em câmara pressurizada (Decloaking Chamber™, Biocare Medical, CA, USA), a 95°C, por 10 minutos. No final de cada etapa da reação imunoistoquímica, as lâminas histológicas foram lavadas com solução tampão fosfato salino (0,1 M, pH 7,4). Posteriormente, as lâminas foram imersas em peróxido de hidrogênio a 3% por 1 hora e, então, em soro albumina bovino a 1% por 12 horas, para bloqueio da peroxidase endógena e dos sítios inespecíficos, respectivamente. As lâminas contendo amostras de cada grupo experimental foram divididas em quatro lotes, sendo que cada lote foi incubado com um

dos seguintes anticorpos primários: anti-PCNA do rato gerado em camundongo (1:150; Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, EUA), anti-Runx2 do rato gerado em coelho (1:100; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), anti-BMP-2 do rato gerado em camundongo (1:100; Sigma-Aldrich Corporate Offices, St. Louis, MO, EUA) e anti-BALP do rato gerado em coelho (1:150; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA). Os cortes foram incubados com anticorpo secundário biotinilado por 2 horas e, subsequentemente, tratados com estreptavidina conjugada com a peroxidase da raiz forte - HRP por 1 hora (Universal Dako Labeled HRP Streptavidin-Biotin Kit®, Dako Laboratories, CA, EUA). A revelação foi realizada utilizando como cromógeno o 3,3'-tetracloridrato de diaminobenzidina (DAB chromogen Kit®, Dako Laboratories, CA, EUA) e a contracoloração com hematoxilina de Harris (para BMP-2 e BALP) ou *Fast green* (para PCNA e Runx2). Todas as amostras foram acompanhadas por um controle negativo (espécimes submetidos aos procedimentos descritos anteriormente, suprimindo-se a utilização dos anticorpos primários).

Imediatamente após seu preparo, as amostras adicionais de FRP foram fixadas em formaldeído 4%, durante 24 horas. Seguiram-se, então, os procedimentos de lavagem, desidratação, diafanização, impregnação e inclusão em parafina. Cortes seriados longitudinais de 4 µm de espessura foram realizados e corados com Hematoxilina e Eosina (H&E).

2.9. Procedimento de análises das imagens

Foram selecionados 6 cortes histológicos, representando o centro do defeito cirúrgico original, para as análises histomorfométrica (2 cortes) e imunoistoquímica (4 cortes). Essas análises foram realizadas por um examinador calibrado e cego aos tratamentos

realizados (“Imagelab 2000” software, Diracon Bio Informática Ltda., Vargem Grande do Sul, SP, Brazil).

Critérios propostos por Messora et al. [42] foram utilizados para padronizar a análise histomorfométrica das imagens digitais. Resumidamente, a área total (AT) correspondeu à área inteira do defeito original e foi considerada 100% da área a ser analisada. A área de osso neoformado (AON) foi calculada como uma porcentagem da AT.

Critérios propostos por Nagata et al. [43] foram utilizados para padronizar a análise imunoistoquímica das imagens digitais para as proteínas PCNA e Runx2. Resumidamente, a área total (AT) correspondeu à área inteira do defeito original. Células PCNA-positivas e Runx2-positivas foram quantificadas dentro dos limites da AT.

Uma modificação dos critérios estabelecidos por Faria et al. [44] foram utilizados para padronizar a análise imunoistoquímica das imagens digitais para as proteínas BMP-2 e BALP. Os seguintes escores foram considerados: [0] ausência de imunomarcação, [1] baixo padrão de imunomarcação - imunorreatividade presente em aproximadamente 1/4 das células ou menos e a matriz extracelular apresenta fraca marcação; [2] moderado padrão de imunomarcação - imunorreatividade presente em aproximadamente metade das células e a matriz extracelular apresenta fraca marcação; [3] alto padrão de imunomarcação - imunorreatividade presente em aproximadamente 3/4 das células ou mais e a matriz extracelular apresenta moderada marcação.

2.10. Análise Estatística

Para a contagem de plaquetas e leucócitos nas amostras de SP_{FRP}, foi verificada a distribuição de frequência simples dos dados pelo Teste de Shapiro-Wilk. Foram determinadas as classes e intervalos específicos. Os dados foram representados em histogramas e polígonos de frequência.

Para as análises histomofométrica (AON) e imunoistoquímica quantitativa (número de células PCNA-positivas e número de células Runx2-positivas), foram verificadas a normalidade dos dados e a homogeneidade das variâncias. A significância das diferenças entre os grupos foi determinada pela análise de variância (ANOVA), seguida pelo Teste de Tukey *post hoc* quando a ANOVA sugeriu uma diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

Para a análise imunoistoquímica semi-quantitativa (imunomarcações para BMP-2 e BALP), os escores obtidos foram submetidos ao Teste de Kruskal-Wallis (TKW) seguido pelo Teste de Dunn *post hoc*, quando o TKW sugeriu uma diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

3. Resultados

3.1. Análise da contagem de plaquetas e leucócitos

Plaquetas e leucócitos exibiram morfologia normal (Fig. 1E). A média da contagem de plaquetas das amostras de SP_{PRP} foi de 648,25 ± 206,15 x 10^3 plaquetas/µl. A média da contagem de plaquetas das amostras de PRP foi 3184,75 ± 728,73 x 10^3 plaquetas/µl (Fig. 2A). Portanto, a concentração de plaquetas no PRP foi aproximadamente 5 vezes maior que aquela do sangue periférico. As médias das contagens de plaquetas e leucócitos nas amostras de SP_{FRP} foram 537,3 ± 73,2 x 10^3 plaquetas/µl e 6,89 ± 0,95 x

10^3 leucócitos/µl. As distribuições dos valores das contagens de plaquetas e leucócitos nas amostras de SP_{FRP} estão representadas nas Figs. 2B e C.

3.2. Análise da citoarquitetura da FRP

A coloração de hematoxilina e eosina permitiu a identificação dos componentes básicos da FRP: matriz de fibrina, agregados de plaquetas e leucócitos, eritrócitos (Fig. 1F). A matriz de fibrina mostrou-se como uma complexa e entrelaçada trama, bastante homogênea e com leve acidofilia. Na camada intermediária, localizada entre a matriz de fibrina e os eritrócitos, encontravam-se os agregados de plaquetas, com acidofilia mais acentuada e os variados tipos de leucócitos, com forte basofilia. A camada residual de eritrócitos apresentou-se com acidofilia intensa e alguns raros leucócitos foram observados incorporados nesta camada.

3.3. Análise histológica qualitativa

Grupo C: Aos 7 dias pós-operatórios, o defeito cirúrgico mostrava-se em sua maior parte preenchido por tecido conjuntivo frouxo, composto por uma delicada rede de fibras colágenas, orientadas paralelamente à superfície do defeito. Muitos fibroblastos e vasos sanguíneos, poucos leucócitos polimorfonucleares e quantidade moderada de células inflamatórias mononucleadas e eritrócitos foram observados entre as fibras colágenas (Fig. 3A). Aos 15 e 30 dias pós-operatórios, os aspectos histológicos dos espécimes foram muito similares. A neoformação óssea restringiu-se a uma estreita faixa de tecido ósseo imaturo nas bordas do defeito. Aos 30 dias pós-operatórios, o tecido ósseo ocupava menos de um terço da extensão do defeito na maioria dos espécimes (Fig. 3B). O defeito apresentou-se em sua maior parte preenchido por tecido

conjuntivo com grande quantidade de fibras colágenas, orientadas paralelamente a sua superfície, moderada quantidade de fibroblastos, muitos vasos sanguíneos (Fig. 3B) e algumas células inflamatórias.

Grupo PRP: Aos 7 dias pós-operatórios, a porção central do defeito mostrava-se ocupada por tecido conjuntivo denso modelado, com grande quantidade de fibras colágenas, orientadas paralelamente a sua superfície (Fig. 3C). Tais fibras sustentavam uma moderada quantidade de fibroblastos, muitos vasos sanguíneos e células inflamatórias, predominantemente mononucleadas. Grande quantidade de remanescentes do PRP foram observados incorporados ao tecido conjuntivo. Aos 15 dias pós-operatórios, o tecido conjuntivo denso modelado ainda abrigava, além de fibroblastos e vasos sanguíneos, poucas células inflamatórias e remanescentes do PRP, que estavam restritos a pequenos grupamentos de eritrócitos. Aos 30 dias pós-operatórios, o centro do defeito ainda era ocupado por tecido conjuntivo fibroso, bem organizado e intensamente vascularizado na maioria dos espécimes. Em todos os períodos experimentais, o padrão de neoformação óssea progrediu das margens do defeito em direção ao seu centro e a quantidade de tecido ósseo neoformado aumentou ao longo do tempo (Fig. 3D). Em grande parte dos espécimes foi observada grande quantidade de osteoblastos com características morfológicas de intensa atividade de síntese de matriz óssea. Aos 7 e 15 dias pós-operatórios, o tecido ósseo era composto por uma rede de trabéculas de osso imaturo circunscrevendo amplos espaços medulares (Fig. 3C). Aos 30 dias pós-operatórios, o tecido ósseo apresentou-se com trabéculas ósseas mais espessas, circunscritas por pequenos espaços medulares contendo tecido hematopoiético maduro (Fig. 3D). Dois espécimes apresentaram fechamento completo

do defeito e os demais apresentaram neoformação óssea ocupando mais de 2/3 da extensão do defeito.

Grupo FRP: Aos 7 dias pós-operatórios, a FRP ainda estava bem preservada e adaptada ao defeito (Fig. 3E). Um tecido conjuntivo com poucas fibras colágenas e rico em fibroblastos, células inflamatórias e vasos sanguíneos envolvia por completo a FRP (Fig. 3E). Células mesenquimais e inflamatórias invadiam o arcabouço da FRP. Aos 15 dias pós-operatórios, observou-se a desestruturação da FRP, restando apenas alguns remanescentes isolados incluídos no tecido conjuntivo. O tecido conjuntivo apresentava-se composto por grande quantidade de fibras colágenas e fibroblastos, orientados paralelamente à superfície do defeito, muitos vasos sanguíneos e alguns focos de células inflamatórias, principalmente mononucleadas. Finas trabéculas de tecido ósseo imaturo, delimitando amplos espaços medulares, foram observadas progredindo das bordas do defeito em direção ao seu centro. Essas trabéculas ósseas mostravam-se repletas de osteoblastos em franca atividade. Aos 30 dias pós-operatórios, a extensão remanescente do defeito apresentava-se ocupada exclusivamente por tecido conjuntivo fibroso bem estruturado, intensamente vascularizado, composto por grande quantidade de fibras colágenas, moderada quantidade de fibroblastos e raras células inflamatórias. O tecido ósseo imaturo neoformado ocupava mais de 2/3 do defeito na maioria dos espécimes (Fig. 3F). As vertentes ósseas voltadas para o centro do defeito mostravam-se recobertas por osteoblastos em franca atividade (Fig.3F).

3.4. Imunolocalização

A técnica imunoistoquímica empregada para a detecção de PCNA, Runx2, BMP-2 e BALP mostrou alta especificidade na detecção dessas proteínas, o que foi comprovado

pela ausência total de marcação no controle negativo das reações imunoistoquímicas. As células imunomarcadas apresentaram-se com coloração acastanhada confinada ao compartimento nuclear, para PCNA e Runx2, e ao compartimento citosólico, para BMP-2 e BALP.

Em todos os grupos (C, PRP e FRP) e tempos experimentais, as distribuições das células imunomarcadas seguiram padrões semelhantes: a) as células PCNA-positivas estavam presentes no tecido conjuntivo que preenchia o centro do defeito, nas adjacências do tecido ósseo neoformado (Figs. 4A-C), nos espaços medulares e no periósteo; b) as células Runx2-positivas estavam situadas nas adjacências da superfície do tecido ósseo neoformado, próximas aos osteoblastos (Figs. 4D-F); c) as imunomarcações para BMP-2 estavam presentes predominantemente em osteoblastos, osteócitos recém-diferenciados e, em menor intensidade, na matriz extracelular adjacente a essas células (Figs. 5A-C); as imunomarcações para BALP estavam presentes predominantemente em osteoblastos, osteócitos e, em menor intensidade, na matriz extracelular adjacente a estas células (Figs. 5D-F).

3.5. Análise estatística

As médias e os desvios-padrão da AON para os grupos C, PRP e FRP, assim como os resultados das comparações intergrupos estão apresentados na Fig. 6. As comparações intragrupos apresentaram as seguintes diferenças estatisticamente significativas: a) os grupos C e FRP apresentaram AON maior aos 15 e aos 30 dias que aos 7 dias ($p<0,001$); b) os grupos PRP e FRP apresentaram AON maior aos 30 dias que aos 15 dias ($p<0,001$ e $p<0,05$, respectivamente); c) o Grupo PRP apresentou AON maior aos 30 dias que aos 7 dias ($p<0,001$).

As médias e os desvios-padrão do número de células PCNA-positivas e Runx2-positivas para os grupos C, PRP e FRP, assim como os resultados das comparações intergrupos estão apresentados na Fig. 7. As comparações intragrupos apresentaram as seguintes diferenças estatisticamente significativas: a) os grupos C, PRP e FRP apresentaram número de células PCNA-positivas maior aos 7 dias que aos 30 dias ($p<0,001$; $p<0,001$ e $p<0,01$, respectivamente); b) os grupos PRP e FRP apresentaram número de células PCNA-positivas maior aos 15 dias que aos 30 dias ($p<0,01$); c) o Grupo PRP apresentou número de células PCNA-positivas maior aos 7 dias que aos 15 dias ($p<0,001$); d) os grupos C, PRP e FRP apresentaram número de células Runx2-positivas maior aos 30 dias que aos 7 dias ($p<0,01$; $p<0,05$ e $p<0,001$, respectivamente); e) os grupos C e FRP apresentaram número de células Runx2-positivas maior aos 15 dias que aos 7 dias ($p<0,05$ e $p<0,01$, respectivamente).

As frequências dos escores de imunomarcação de BMP-2 e BALP nos grupos C, PRP e FRP, assim como os resultados das comparações intergrupos estão apresentados na Fig. 8. As comparações intragrupos apresentaram as seguintes diferenças estatisticamente significativas: a) os grupos PRP e FRP apresentaram escores para BMP-2 maiores aos 30 dias que aos 7 dias ($p<0,001$) e aos 15 dias ($p<0,05$ e $p<0,01$, respectivamente); b) os grupos PRP e FRP apresentaram escores para BALP maiores aos 30 dias que aos 7 dias ($p<0,001$); c) o Grupo FRP apresentou escores para BALP maiores aos 30 dias que aos 15 dias ($p<0,05$).

4. Discussão

O desenvolvimento recente dos concentrados de plaquetas para o uso cirúrgico é uma evolução das tecnologias das colas de fibrina utilizadas há muitos anos [40]. Várias

técnicas para concentrados de plaquetas estão disponíveis e cada método leva a um produto diferente com usos potenciais e biologias diferentes [45].

No presente estudo, foram utilizados dois tipos de concentrados de plaquetas para o tratamento de defeitos de tamanho crítico (DTC) criados em calvárias de ratos: o PRP e a FRP. Aos 7 dias pós-operatórios, o Grupo PRP apresentou AON significativamente maior que os grupos C e FRP. Este aumento na formação óssea no Grupo PRP foi possivelmente causado pela interação de células na dura-máter dos defeitos cirúrgicos com uma concentração aumentada de fatores de crescimento (FC) no PRP [46,47]. A interação entre os FC e os receptores de superfície nas células alvo ativa uma via de sinalização intracelular que induz a produção de proteínas necessárias ao processo regenerativo (proteínas de proliferação celular, formação de matriz, produção osteóide e síntese de colágeno) [47,48]. A concentração aumentada de FC nos sítios cirúrgicos certamente estimulou a proliferação celular, como pode ser confirmado pelo número significativamente maior de células PCNA-positivas no Grupo PRP quando comparado ao Grupo C. Além disso, o PRP estimulou, também, a diferenciação de células osteoprogenitoras em osteoblastos, como pode ser constatado pelo número significativamente maior de células Runx2-positivas quando comparado aos grupos C e FRP. Além dos FC, o PRP contém fibrina, fibronectina e vitronectina. Estas proteínas agem como moléculas de adesão celular para osteocondução e como matriz para a formação óssea [47,49]. Além disso, as membranas plaquetárias podem estimular a atividade mitogênica de células ósseas, contribuindo assim, para a regeneração de tecidos mineralizados [50].

Na discussão dos resultados observados aos 7 dias pós-operatórios, deve-se ressaltar que o Grupo PRP apresentou AON significativamente maior que o Grupo FRP. Uma

possível explicação para este resultado é que, diferentemente da FRP, o PRP deve ter promovido um rápido aumento dos FC no sítio cirúrgico, pois foi ativado com o cloreto de cálcio, resultando em ativação plaquetária, imediatamente antes de ter sido colocado neste defeito. De acordo com Marx [46,47], nos 10 minutos iniciais após a formação do coágulo, o PRP inicia a secreção dos FC e, dentro do período de 1 hora após a ativação, mais de 95% dos FC pré-sintetizados são secretados. Deve ser considerado ainda que, após esta grande liberação inicial de FC do PRP, as plaquetas sintetizam e secretam FC adicionais durante os 7 dias restantes do seu ciclo de vida [47].

No presente estudo, os grupos PRP e FRP apresentaram AON significativamente maior que o grupo controle aos 30 dias pós-operatórios. Esse resultado do Grupo PRP corrobora os achados de Messora et al. [42], que mostraram um aumento significativo da formação óssea em DTC criados em calvárias de ratos e tratados somente com PRP quando comparados ao Grupo Controle. Deve-se ressaltar que o Grupo FRP apresentou AON significativamente maior que o Grupo C somente aos 30 dias pós-operatórios. Este resultado parece indicar que todo o processo de proliferação de células precursoras de osteoblastos e suas diferenciações em osteoblastos estavam atrasados no Grupo FRP quando comparado ao Grupo PRP. Esta hipótese é suportada pelos achados imunoistoquímicos que mostraram que o Grupo FRP apresentou número de células Runx2-positivas significativamente menor que o Grupo PRP aos 7 dias pós-operatórios. Uma possível explicação para esses resultados seria o tempo necessário para o início da liberação dos FC pela FRP, que seria maior que o do PRP. Esta hipótese é sustentada pelos achados de um estudo in vitro, onde as características biológicas do PRP e da FRP na proliferação e diferenciação de osteoblastos de ratos foram comparadas, e observou-se que o pico de liberação de FC na FRP está atrasado quando comparado a aquele no

PRP [34]. A FRP é uma matriz de fibrina na qual as citocinas plaquetárias estão aprisionadas [51] e podem ser liberadas após certo tempo [52]. Estudos têm demonstrado que a FRP possui uma liberação lenta e sustentada muito significativa de FC essenciais, por no mínimo uma semana [20,35] e até 28 dias [34], o que significa que a FRP poderia estimular o seu ambiente por um tempo significativo durante o reparo tecidual [53]. Esta característica foi também constatada no presente estudo, pois o Grupo FRP foi o único que manteve um número significativamente maior de células PCNA-positivas que o Grupo C aos 30 dias pós-operatórios.

Portanto, considerando os resultados histométricos observados no Grupo FRP, bem como suas características histológicas e imunoistoquímicas, pode-se sugerir que houve uma demora na desestruturação da FRP, com a consequente liberação de FC e início da diferenciação celular em um estágio mais tardio do reparo, quando comparada ao PRP.

Com relação à expressão de BMP-2 no presente estudo, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos PRP e FRP, em todos os períodos de análise. Tanto o PRP, como a FRP apresentaram escores para BMP-2 significativamente maiores que os do Grupo C aos 30 dias pós-operatórios. Estes resultados, associados aos dados histométricos, comprovam que ambas as terapias foram efetivas na formação de novo osso. No entanto, diferentemente do Grupo FRP, o Grupo PRP apresentou escores para BALP significativamente maiores que aqueles do Grupo C aos 30 dias pós-operatórios. Este resultado comprova que o processo de reparo ósseo estava mais adiantado nos espécimes do Grupo PRP.

No presente estudo, o protocolo de preparo do PRP foi realizado de acordo com o proposto por Messora et al. [42], o que levou à obtenção de um “PRP terapêutico”, pois

apresentou concentração de plaquetas de aproximadamente 5 vezes maior que aquela do sangue periférico [47].

Com relação ao protocolo de preparo da FRP no presente estudo, foram coletados 3 ml de sangue periférico, o que corresponde a aproximadamente 12 % do volume sanguíneo de um rato com peso de 350g, não colocando em risco a vida do animal [54]. Deve-se enfatizar que, mesmo com o uso deste pequeno volume de sangue, a citoarquitetura da FRP obtida seguiu os padrões que caracterizam a verdadeira FRP, relatados em estudos anteriores [55].

Portanto, os resultados histomorfométricos e imunoistoquímicos do presente estudo sugerem que tanto o PRP como a FRP foram terapias efetivas na promoção do reparo ósseo de defeitos de tamanho crítico em calvárias de ratos. No entanto, o PRP promoveu uma aceleração da diferenciação osteoblástica e do reparo ósseo quando comparado à FRP. Este é um aspecto importante e desejado de uma terapia que objetiva a reconstrução óssea, pois fazendo-se uma inferência clínica, o PRP poderia proporcionar ao paciente uma mais rápida recuperação funcional do tecido ósseo perdido. Contudo, estudos clínicos controlados e randomizados são ainda necessários para avaliar os reais benefícios desta terapia no reparo ósseo.

Dentro dos limites deste estudo, pode-se concluir que o PRP promoveu uma rápida diferenciação de células osteoprogenitoras, resultando em formação óssea acelerada em defeitos de tamanho crítico cirurgicamente criados em calvária de ratos quando comparado ao controle e FRP. Ambos, PRP e FRP, resultaram em maior formação óssea que o controle aos 30 dias pós-operatórios.

5. Agradecimentos

À Profª Drª. Suely Regina Mogami Bomfim da Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP - Campus de Araçatuba, pela assistência profissional nos procedimentos experimentais relacionados ao preparo do PRP e FRP; ao Prof. Dr. Edilson Ervolino da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, pela assistência na análise histológica e imunoistoquímica. À FAPESP, pela concessão da Bolsa de Doutorado (Processo 10/ 15095-9) à pós-graduanda Natália Marcumini Pola e pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho (Processo 10/19866-0).

6. Referências bibliográficas

[1] G. Intini, The use of platelet-rich plasma in bone reconstruction therapy, Biomaterials. 30 (2009) 4956-4966.

[2] A.T. Nurden, Platelets, inflammation and tissue regeneration, Thromb Haemost. 105 (2011) S13-33.

[3] D.M. Dohan, J. Choukroun, A. Diss, S.L. Dohan, A.J. Dohan, J. Mouhyi, B. Gogly, Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part II: platelet-related biologic features, Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 101 (2006) e45-50.

[4] J.W. Gibble, P.M. Ness, Fibrin glue: the perfect operative sealant? Transfusion. 30 (1990) 741-747.

[5] R.E. Marx, E.R. Carlson, R.M. Eichstaedt, S.R. Schimmele, J.E. Strauss, K.R. Georgeff, Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts, Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 85 (1998) 638-646.

[6] D.M. Dohan, J. Choukroun, PRP, cPRP, PRF, PRG, PRGF, FC . . . How to find your way in the jungle of platelet concentrates?, Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 103 (2007) 305-306.

[7] D. Man, H. Plosker, J.E. Winland-Brown, The use of autologous platelet-rich plasma (platelet gel) and autologous platelet-poor plasma (fibrin glue) in cosmetic surgery, Plast Reconstr Surg. 107 (2001) 229-237.

[8] D.M. Dohan Ehrenfest, M. Del Corso, A. Diss, J. Mouhyi, J.B. Charrier, Three-dimensional architecture and cell composition of a Choukroun's platelet-rich fibrin clot and membrane, J Periodontol. 81 (2010) 546-555.[9] B.H. Choi, C.J. Im, J.Y. Huh, J.J. Suh, S.H. Lee, Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in autogenous bone graft, Int J Oral Maxillofac Surg. 33 (2004) 56–59.

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

[11] D. Gerard, E.R. Carlson, J.E. Gotcher, M. Jacobs, Effects of platelet-rich plasma on the healing of autologous bone grafted mandibular defects in dogs, J Oral Maxillofac Surg. 64 (2006) 443-451.

[12] M. Thorwarth, F. Wehrhan, S. Schultze-Mosgau, J. Wiltfang, K.A. Schlegel, PRP modulates expression of bone matrix proteins in vivo without long-term effects on bone formation, Bone. 38 (2006) 30-40.

[13] M.J. Nagata, M. Messora, N. Pola, N. Campos, R. Vieira, L.A. Esper, M. Sbrana, S. Fucini, V. Garcia, A. Bosco, Influence of the ratio of particulate autogenous bone graft/platelet-rich plasma on bone healing in critical-size defects: a histologic and histometric study in rat calvaria, J Orthop Res. 28 (2010) 468-473.

[14] M.R. Messora, M.J. Nagata, N.M. Pola, N. de Campos, S.E. Fucini, F.A. Furlaneto, Effect of platelet-rich plasma on bone healing of fresh frozen bone allograft in mandibular defects: a histomorphometric study in dogs. Clin Oral Implants Res. (2012) DOI: 10.1111/clr.12008.

[15] J. Wiltfang, K.A. Schlegel, S. Schultze-Mosgau, E. Nkenke, R. Zimmermann, P. Kessler, Sinus floor augmentation with beta-tricalciumphosphate (beta-TCP): does platelet-rich plasma promote its osseous integration and degradation?, Clin Oral Implants Res. 14 (2003) 213-218.

[16] G.M. Raghoebar, J. Schortinghuis, R.S. Liem, J.L. Ruben, J.E. van der Wal, A. Vissink, Does platelet-rich plasma promote remodeling of autologous bone grafts used for augmentation of the maxillary sinus floor?, Clin Oral Implants Res. 16 (2005) 349-356.

[17] E.N. Simon, M.A. Merkx, F.M. Shubi, B.M. Kalyanyama, P.J. Stoelinga, Reconstruction of the mandible after ablative surgery for the treatment of aggressive, benign odontogenic tumours in Tanzania: a preliminary study, Int J Oral Maxillofac Surg. 35 (2006) 421-426.

[18] F. Inchingolo, M. Tatullo, M. Marrelli, A.M. Inchingolo, A.D. Inchingolo, G. Dipalma, P. Flace, F. Girolamo, A. Tarullo, L. Laino, R. Sabatini, A. Abbinante, R. Cagiano, Regenerative surgery performed with platelet-rich plasma used in sinus lift elevation before dental implant surgery: an useful aid in healing and regeneration of bone tissue, Eur Rev Med Pharmacol Sci. 16 (2012) 1222-1226.

[19] R. Célio-Mariano, W.M. de Melo, C. Carneiro-Avelino, Comparative radiographic evaluation of alveolar bone healing associated with autologous platelet-rich plasma after impacted mandibular third molar surgery, J Oral Maxillofac Surg. 70 (2012) 19-24.

[20] D.M. Dohan, J. Choukroun, A. Diss, S.L. Dohan, A.J. Dohan, J. Mouhyi, B. Gogly, Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part III: leucocyte activation: a new feature for platelet concentrates?, Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 101 (2006) e51-55.

[21] J. Choukroun, A. Diss, A. Simonpieri, M.O. Girard, C. Schoeffler, S.L. Dohan, A.J. Dohan, J. Mouhyi, D.M. Dohan, Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part IV: clinical effects on tissue healing, Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 101 (2006) e56-60.

[22] Z. Mazor, R.A. Horowitz, M. Del Corso, H.S. Prasad, M.D. Rohrer, D.M. Dohan Ehrenfest, Sinus floor augmentation with simultaneous implant placement using Choukroun's platelet-rich fibrin as the sole grafting material: a radiologic and histologic study at 6 months, J Periodontol. 80 (2009) 2056-2064.

[23] D.M. Dohan Ehrenfest, P. Doglioli, G.M. de Peppo, M. Del Corso, J.B. Charrier, Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF) stimulates in vitro proliferation and

differentiation of human oral bone mesenchymal stem cell in a dose-dependent way, Arch Oral Biol. 55 (2010) 185-194.

[24] J. Choukroun, A. Diss, A. Simonpieri, M.O. Girard, C. Schoeffler, S.L. Dohan, A.J. Dohan, J. Mouhyi, D.M. Dohan, Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part V: histologic evaluations of PRF effects on bone allograft maturation in sinus lift, Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 101 (2006) 299-303.

[25] A. Diss, D.M. Dohan, J. Mouhyi, P. Mahler, Osteotome sinus floor elevation using Choukroun's platelet-rich fibrin as grafting material: a 1-year prospective pilot study with microthreaded implants, Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 105 (2008) 572-579.

[26] A. Simonpieri, M. Del Corso, G. Sammartino, D.M. Dohan Ehrenfest, The relevance of Choukroun's platelet-rich fibrin and metronidazole during complex maxillary rehabilitations using bone allograft. Part I: a new grafting protocol, Implant Dent. 18 (2009) 102-111.

[27] A. Simonpieri, M. Del Corso, G. Sammartino, D.M. Dohan Ehrenfest, The relevance of Choukroun's platelet-rich fibrin and metronidazole during complex maxillary rehabilitations using bone allograft. Part II: implant surgery, prosthodontics, and survival, Implant Dent. 18 (2009) 220-229.

[28] A. Sharma, A.R. Pradeep, Treatment of 3-wall intrabony defects in patients with chronic periodontitis with autologous platelet-rich fibrin: a randomized controlled clinical trial, J Periodontol. 82 (2011) 1705-1712.

[29] M. Thorat, A.R. Pradeep, B. Pallavi, Clinical effect of autologous platelet-rich fibrin in the treatment of intra-bony defects: a controlled clinical trial, J Clin Periodontol. 38 (2011) 925-932.

[30] A. Sharma, A.R. Pradeep, Autologous platelet-rich fibrin in the treatment of mandibular degree II furcation defects: a randomized clinical trial, J Periodontol. 82 (2011) 1396-1403.

[31] J.I. Choukroun, F. Braccini, A. Diss, G. Giordano, P. Doglioli, D.M. Dohan, Influence of platelet rich fibrin (PRF) on proliferation of human preadipocytes and tympanic keratinocytes: A new opportunity in facial lipostructure (Coleman's technique) and tympanoplasty?, Rev Laryngol Otol Rhinol (Bord). 128 (2007) 27-32.

[32] F. Braccini, D.M. Dohan, The relevance of Choukroun's platelet rich fibrin (PRF) during facial aesthetic lipostructure (Coleman's technique): preliminary results, Rev Laryngol Otol Rhinol (Bord). 128 (2007) 255-260.

[33] J.B. Charrier, J.P. Monteil, S. Albert, S. Collon, S. Bobin, D.M. Dohan Ehrenfest, Relevance of Choukroun's Platelet-Rich Fibrin (PRF) and SMAS flap in primary reconstruction after superficial or subtotal parotidectomy in patients with focal pleiomorphic adenoma: a new technique, Rev Laryngol Otol Rhinol (Bord). 129 (2008) 313-318.

[34] L. He, Y. Lin, X. Hu, Y. Zhang, H. Wu, A comparative study of platelet-rich fibrin (PRF) and platelet-rich plasma (PRP) on the effect of proliferation and differentiation of rat osteoblasts in vitro, Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 108 (2009) 707-713.

[35] D.M. Dohan Ehrenfest, G.M. de Peppo, P. Doglioli, G. Sammartino, Slow release of growth factors and thrombospondin-1 in Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF): a gold standard to achieve for all surgical platelet concentrates technologies, Growth Factors. 27 (2009) 63-69.

[36] I.C. Chang, C.H. Tsai, Y.C. Chang, Platelet-rich fibrin modulates the expression of extracellular signal-regulated protein kinase and osteoprotegerin in human osteoblasts, J Biomed Mater Res A. (2010) DOI: 10.1002/jbm.a.32839.

[37] V. Gassling, T. Douglas, P.H. Warnke, Y. Açil, J. Wiltfang, S.T. Becker, Platelet-rich fibrin membranes as scaffolds for periosteal tissue engineering, Clin Oral Implants Res. 21 (2010) 543-549.

[38] D.M. Dohan, J. Choukroun, A. Diss, S.L. Dohan, A.J. Dohan, J. Mouhyi, B. Gogly, Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 101 (2006) e37-44.

[39] D.M. Dohan Ehrenfest, L. Rasmusson, T. Albrektsson, Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF), Trends Biotechnol. 27 (2009) 158-167.

[40] T. Bielecki, D.M. Dohan Ehrenfest, Platelet-rich plasma (PRP) and Platelet-Rich Fibrin (PRF): surgical adjuvants, preparations for in situ regenerative medicine and tools for tissue engineering, Curr Pharm Biotechnol. 13 (2012) 1121-1130.

[41] M. Tatullo, M. Marrelli, M. Cassetta, A. Pacifici, L.V. Stefanelli, S. Scacco, G. Dipalma, L. Pacifici, F. Inchingolo, Platelet Rich Fibrin (P.R.F.) in reconstructive surgery of atrophied maxillary bones: clinical and histological evaluations, Int J Med Sci. 9 (2012) 872-880.

[42] M.R. Messora, M.J. Nagata, R.C. Mariano, R.C. Dornelles, S.R. Bomfim, S.E. Fucini, V.G. Garcia, A.F. Bosco, Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma: a histologic and histometric study in rat calvaria, J Periodontal Res. 43 (2008) 217-223.

[43] M.J.H. Nagata, C.S. Santinoni, N.M. Pola, N. de Campos, M.R. Messora, S.R.M. Bomfim, E. Ervolino, S.E. Fucini, P.L. Faleiros, V.G. Garcia, A.F. Bosco, Bone marrow aspirate combined with low-level laser therapy: a new therapeutic approach to enhance bone healing, Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology (2013), DOI:10.1016/j.jphotobiol.2013.01.013

[44] P.E. Faria, R. Okamoto, R.M. Bonilha-Neto, S.P. Xavier, A.C. Santos, L.A. Salata, Immunohistochemical, tomographic and histological study on onlay iliac grafts remodeling, Clin Oral Implants Res. 19 (2008) 393-401.

[45] A.R. Pradeep, N.S. Rao, E. Agarwal, P. Bajaj, M. Kumari, S.B. Naik, Comparative evaluation of autologous platelet-rich fibrin and platelet-rich plasma in the treatment of 3-wall intrabony defects in chronic periodontitis: a randomized controlled clinical trial, J Periodontol. 83 (2012) 1499-1507.

[46] R.E. Marx, Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP?, Implant Dent. 10 (2001) 225-228.

[47] R.E. Marx, Platelet-rich plasma: evidence to support its use, J Oral Maxillofac Surg. 62 (2004) 489-496.

[48] H. Schilephake, Bone growth factors in maxillofacial skeletal reconstruction, Int J Oral Maxillofac Surg. 31 (2002) 469-484.

[49] D. Nikolidakis, J.A. Jansen, The biology of platelet-rich plasma and its application in oral surgery: literature review, Tissue Eng Part B Rev. 14 (2008) 249-258.

[50] R. Gruber, F. Karreth, M.B. Fischer, G. Watzek, Platelet-released supernatants stimulate formation of osteoclast-like cells through a prostaglandin/RANKL-dependent mechanism, Bone. 30 (2002) 726-732.

[51] M.W. Mosesson, Fibrinogen and fibrin structure and functions, J Thromb Haemost. 3 (2005) 1894-1904.

[52] V.L. Gassling, Y. Açil, I.N. Springer, N. Hubert, J. Wiltfang, Platelet-rich plasma and platelet-rich fibrin in human cell culture, Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 108 (2009) 48-55.

[53] C.L. Wu, S.S. Lee, C.H. Tsai, K.H. Lu, J.H. Zhao, Y.C. Chang, Platelet-rich fibrin increases cell attachment, proliferation and collagen-related protein expression of human osteoblasts, Aust Dent J. 57 (2012) 207-212.

[54] D.M. Dohan Ehrenfest, N. Lemo, R. Jimbo, G. Sammartino, Selecting a relevant animal model for testing the in vivo effects of Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF): rabbit tricks and traps, Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 110 (2010) 413-416.

[55] D.M. Dohan Ehrenfest, M. Del Corso, A. Diss, J. Mouhyi, J.B. Charrier, Three-dimensional architecture and cell composition of a Choukroun's platelet-rich fibrin clot and membrane, J Periodontol. 81 (2010) 546-555.

Legendas de Figuras

Fig. 1 Preparos, características clínicas e histológicas do PRP e FRP. (A) PRP e o *buffy coat*; (B) FRP na porção intermediária do tubo; (C) PRP coagulado; (D) Matriz de FRP; (E) Esfregaço do PRP mostrando plaquetas (setas pretas) e leucócito (seta vermelha) (Coloração de Romanowsky - Panótico); (F) Citoarquitetura da FRP: matriz de fibrina (seta verde), agregados de plaquetas e leucócitos (seta branca) e eritrócitos (seta azul) (H&E). Barras de escala = 10 µm para (E) e 100 µm para (F). Abreviações e símbolos: FRP = Fibrina rica em plaquetas; PRP = Plasma rico em plaquetas; seta azul = eritrócitos; seta branca = agregados de plaquetas e leucócitos; seta preta = plaqueta; seta verde = matriz de fibrina; seta vermelha = leucócito.

Fig. 2 Contagem de plaquetas e leucócitos. (A) Média do número de plaquetas/µl e desvios-padrão nas amostras de SP_{PRP} e PRP; (B) Distribuição da frequência de plaquetas nas amostras de SP_{FRP}; (C) Distribuição da frequência de leucócitos nas amostras de SP_{FRP}. Abreviações: SP_{FRP} = Sangue periférico submetido ao preparo da FRP; SP_{PRP} = Sangue periférico submetido ao preparo do PRP; PRP = Plasma rico em plaquetas.

Fig. 3 Visões panorâmicas e detalhadas dos defeitos cirúrgicos aos 7 e 30 dias pós-operatórios. (A) Fotomicrografia do Grupo C aos 7 dias pós-operatórios; (B) Fotomicrografia do Grupo C aos 30 dias pós-operatórios; (C) Fotomicrografia do Grupo PRP aos 7 dias pós-operatórios; (D) Fotomicrografia do Grupo PRP aos 30 dias pós-

operatórios; (E) Fotomicrografia do Grupo FRP aos 7 dias pós-operatórios; (F) Fotomicrografia do Grupo FRP aos 30 dias pós-operatórios. H&E. Barras de escala = 100 µm para (A), (C) e (E); 40 µm para (B), (D) e (F). Abreviações e símbolos: C = Controle; FRP = Fibrina rica em plaquetas; ON = Osso Neoformado; PRP = Plasma rico em plaquetas; TC = Tecido conjuntivo; TO =Tecido ósseo original; VS = Vaso sanguíneo; seta branca = osteócito; seta preta = osteoblasto.

Fig. 4 Imunomarcações para PCNA e Runx2 no defeito cirúrgico, aos 7 dias pós-operatórios. Fotomicrografias mostrando células PCNA-positivas (setas azuis) nos grupos (A) C, (B) PRP e (C) FRP. Fotomicrografias mostrando células Runx2-positivas (setas pretas) nos grupos (D) C, (E) PRP e (F) FRP. *Fast-green*. Barra de escala = 20 µm. Abreviações e símbolos: C = Controle; FRP = Fibrina rica em plaquetas; ON = Osso neoformado; PCNA = Antígeno nuclear de proliferação celular; PRP = Plasma rico em plaquetas; Runx2 = Fator de transcrição relacionado à Runt 2; TC = tecido conjuntivo; seta azul = célula PCNA-positiva; seta preta = célula Runx2-positiva.

Fig. 5 Imunomarcações para BMP-2 e BALP no defeito cirúrgico, aos 30 dias pós-operatórios. Fotomicrografias mostrando imunomarcações para BMP-2 nos grupos (A) C, (B) PRP e (C) FRP. Fotomicrografias mostrando imunomarcações para BALP nos grupos (D) C, (E) PRP e (F) FRP. Hematoxilina de Harris. Barra de escala = 20 µm. Abreviações e símbolos: BALP = Fosfatase alcalina específica do osso; BMP-2 = Proteína morfogenética óssea 2; C = Controle; FRP = Fibrina rica em plaquetas; ON = Osso neoformado; PRP = Plasma rico em plaquetas;

TC =Tecido conjuntivo; VS = Vaso sanguíneo; seta azul = osteoblasto BALP-positivo; seta preta = osteoblasto BMP-2-positivo; seta verde = osteócito BALP-positivo; seta vermelha = osteócito BMP-2-positivo.

Fig. 6 Gráfico mostrando médias e desvios-padrão da AON (%) para cada grupo, assim como os resultados das comparações intergrupos, aos 7, 15 e 30 dias pós-operatórios. ***p<0,001. Abreviações: AON = Área de Osso Neoformado; C = Controle; FRP = Fibrina rica em plaquetas; PRP = Plasma rico em plaquetas.

Fig. 7 Gráfico mostrando médias e desvios-padrão das células (A) PCNA-positivas e (B) Runx2-positivas no defeito cirúrgico para cada grupo aos 7, 15 e 30 dias pós-operatórios, assim como os resultados das comparações intergrupos. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. Abreviações: C = Controle; FRP = Fibrina rica em plaquetas; PCNA = Antígeno nuclear de proliferação celular; PRP = Plasma rico em plaquetas; Runx2 = Fator de transcrição relacionado à Runt 2.

Fig. 8 Gráfico mostrando frequência dos escores atribuídos para as proteínas (A) BMP-2 e (B) BALP no defeito cirúrgico para cada grupo aos 7, 15 e 30 dias pós-operatórios, assim como os resultados das comparações intergrupos. *p<0,05; **p<0,01. Abreviações: BALP = Fosfatase Alcalina Específica do Osso; BMP-2 = Proteína Morfogenética Óssea; C = Controle; FRP = Fibrina rica em plaquetas; PRP = Plasma rico em plaquetas.

Figura 1

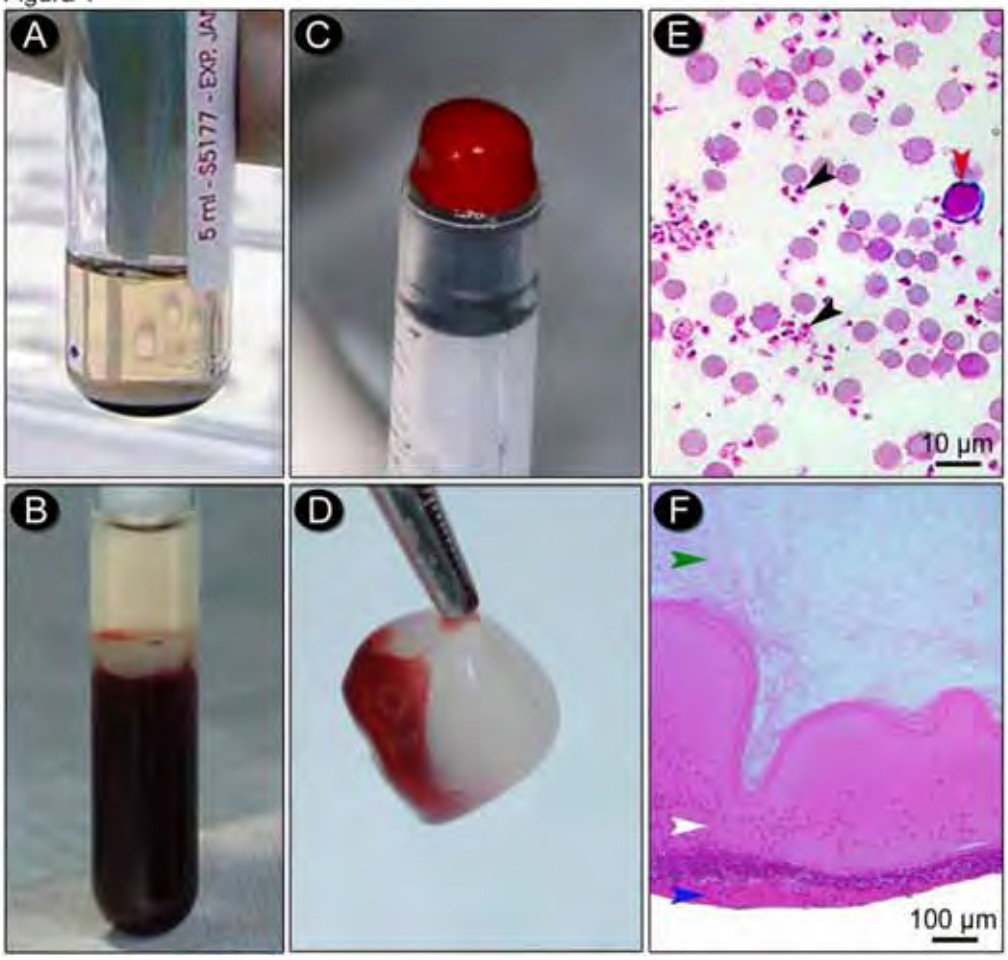


Figura 2

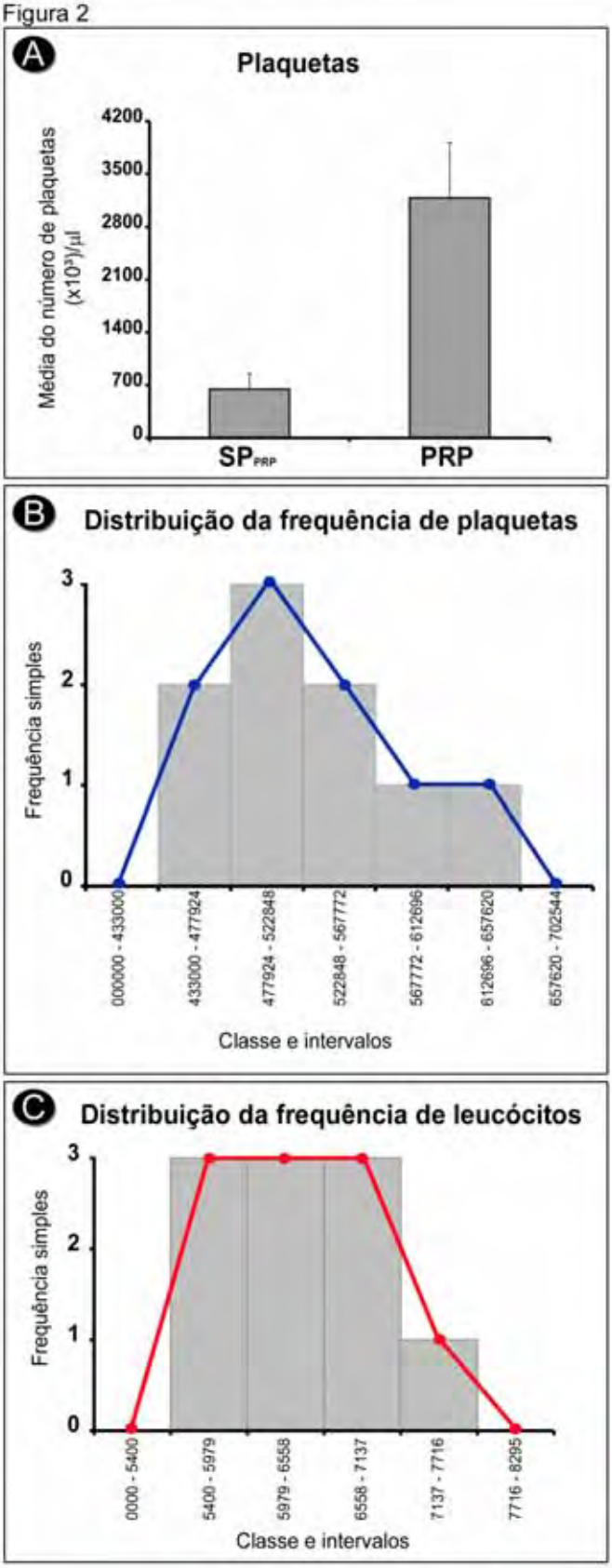

A
Plaquetas
Média do número de plaquetas (x10³)/µl
4200
3500
2800
2100
1400
700
0
SP PRP
PRP
B
Distribuição da frequência de plaquetas
Frequência simples
3
2
1
0
000000 - 433000
433000 - 477924
477924 - 522848
522848 - 567772
567772 - 612696
612696 - 657620
657620 - 702544
Classe e intervalos
C
Distribuição da frequência de leucócitos
Frequência simples
3
2
1
0
0000 - 5400
5400 - 5979
5979 - 6558
6558 - 7137
7137 - 7716
7716 - 8295
Classe e intervalos

Figura 3

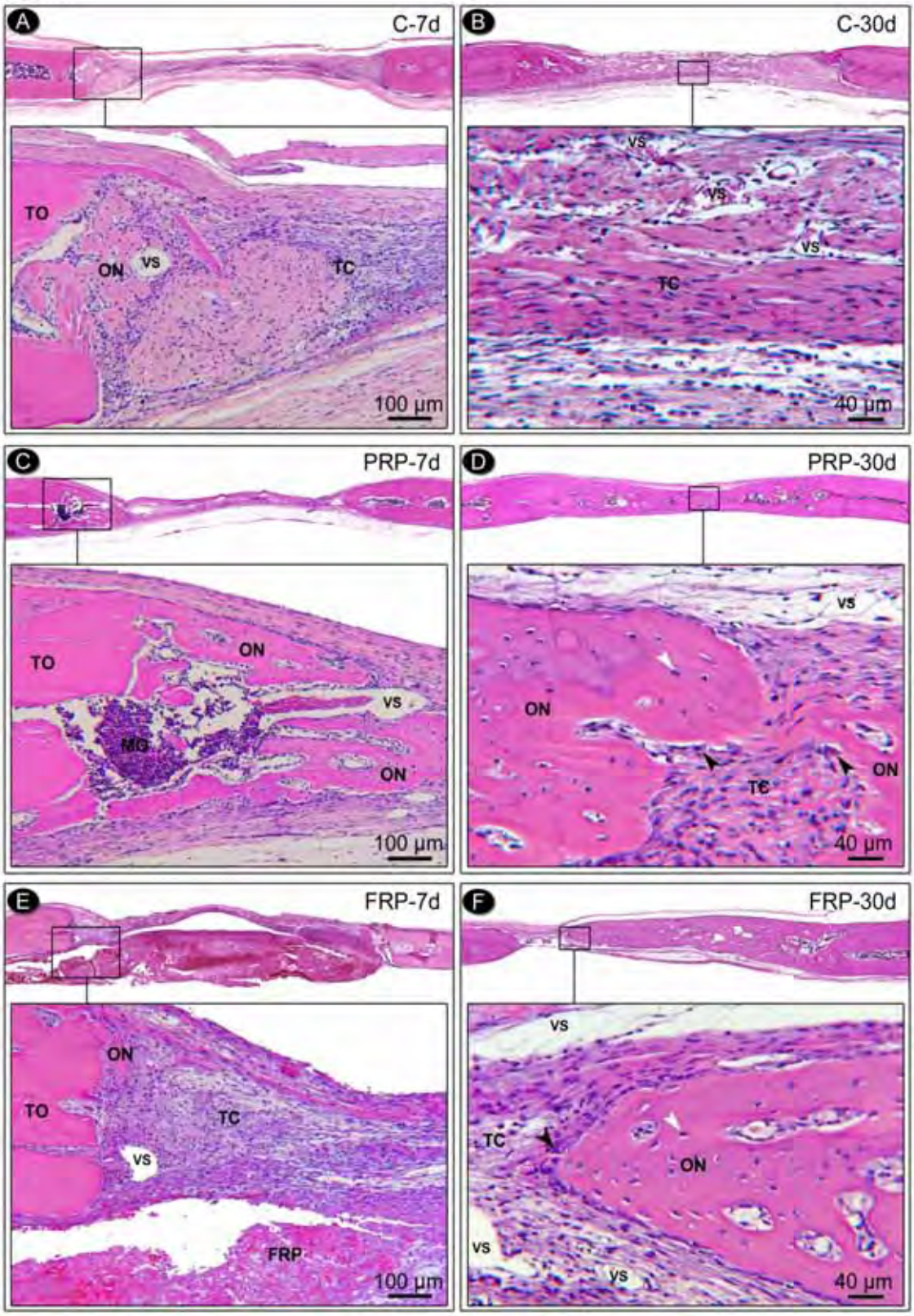

A
C-7d
TO
ON
VS
TC
100 µm
B
C-30d
VS
VS
VS
TC
40 µm
C
PRP-7d
TO
ON
VS
MG
ON
100 µm
D
PRP-30d
VS
ON
TC
ON
40 µm
E
FRP-7d
ON
TO
TC
VS
FRP
100 µm
F
FRP-30d
VS
TC
ON
VS
VS
40 µm

Figura 4

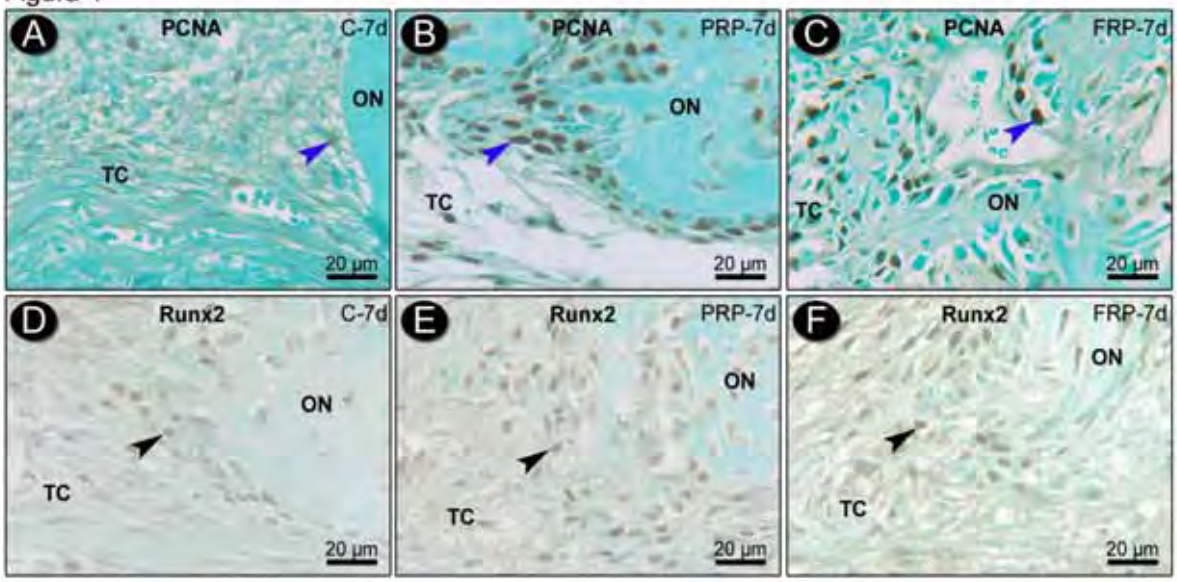

A
PCNA
C-7d
ON
TC
20 µm
B
PCNA
PRP-7d
ON
TC
20 µm
C
PCNA
FRP-7d
TC
ON
20 µm
D
Runx2
C-7d
ON
TC
20 µm
E
Runx2
PRP-7d
ON
TC
20 µm
F
Runx2
FRP-7d
ON
TC
20 µm

Figura 5

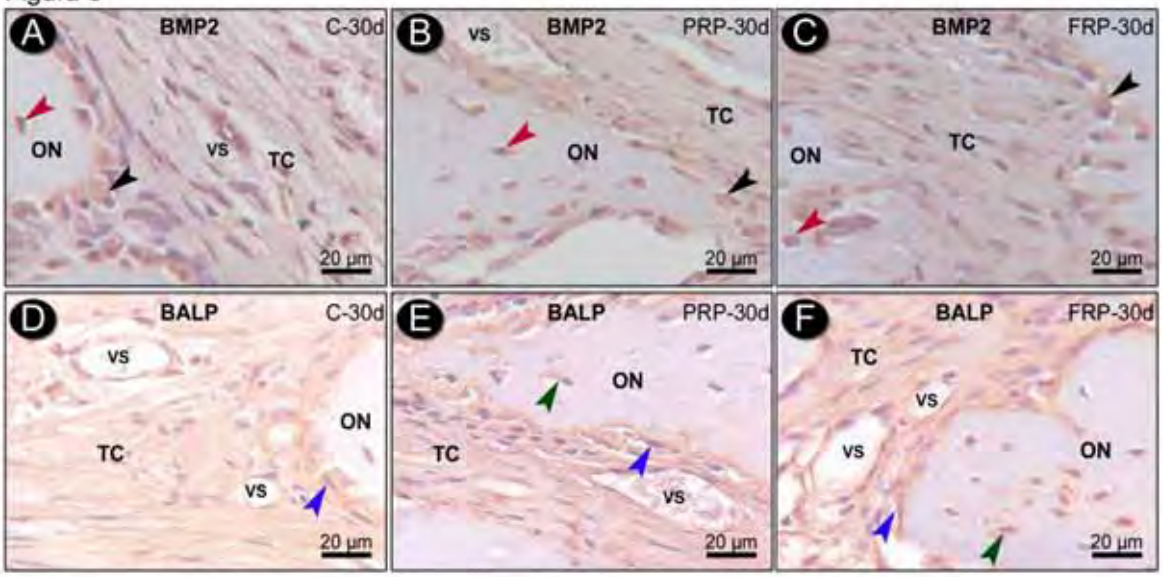

A
BMP2
C-30d
ON
VS
TC
20 µm
B
VS
BMP2
PRP-30d
TC
ON
20 µm
C
BMP2
FRP-30d
ON
TC
20 µm
D
BALP
C-30d
VS
ON
TC
VS
20 µm
E
BALP
PRP-30d
ON
TC
VS
20 µm
F
BALP
FRP-30d
TC
VS
VS
ON
20 µm

Figura 6

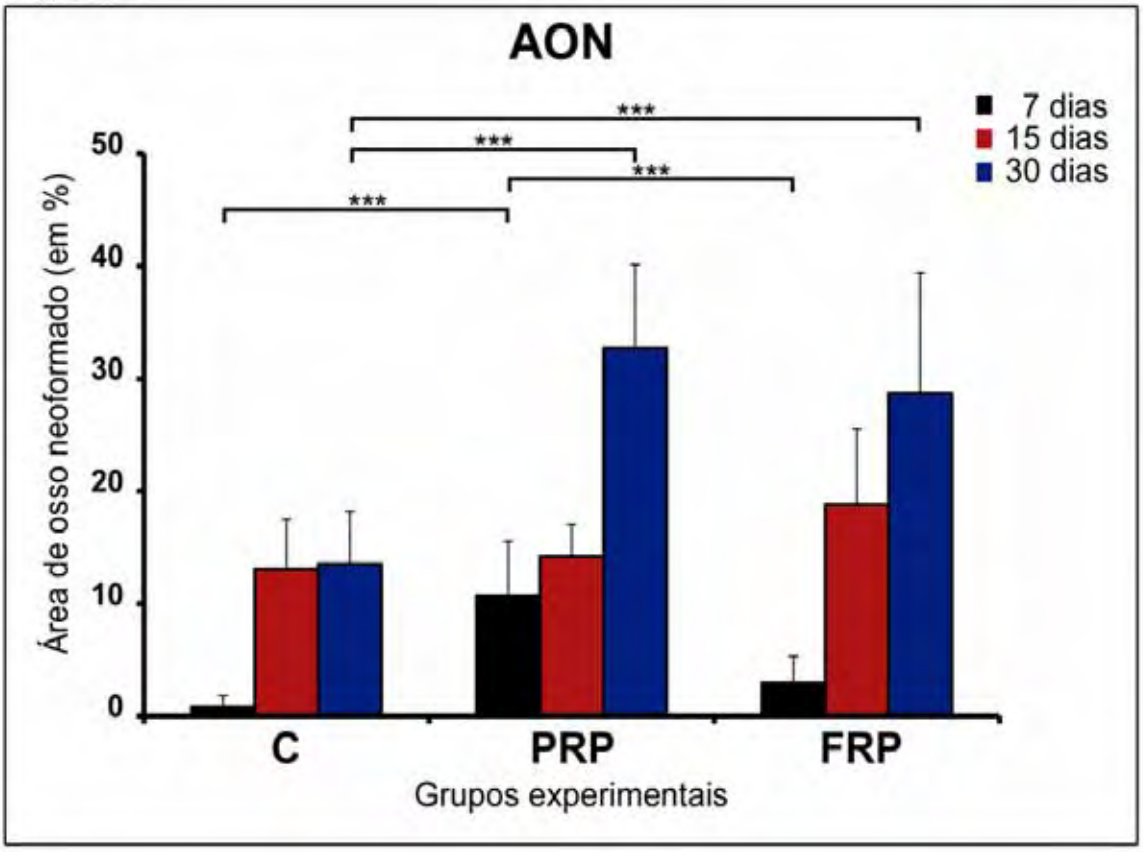
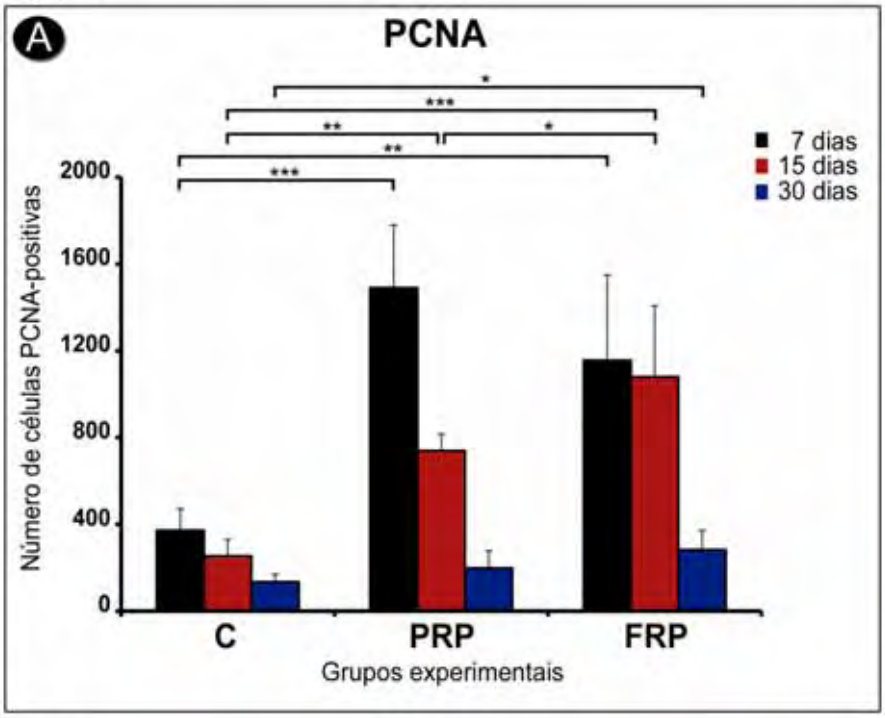

AON
7 dias
15 dias
30 dias
***
***
***
***
50
40
30
20
10
0
Área de osso neoformado (em %)
C
PRP
FRP
Grupos experimentais

Figura 7


A
PCNA
Número de células PCNA-positivas
2000
1600
1200
800
400
0
7 dias
15 dias
30 dias
C
PRP
FRP
Grupos experimentais

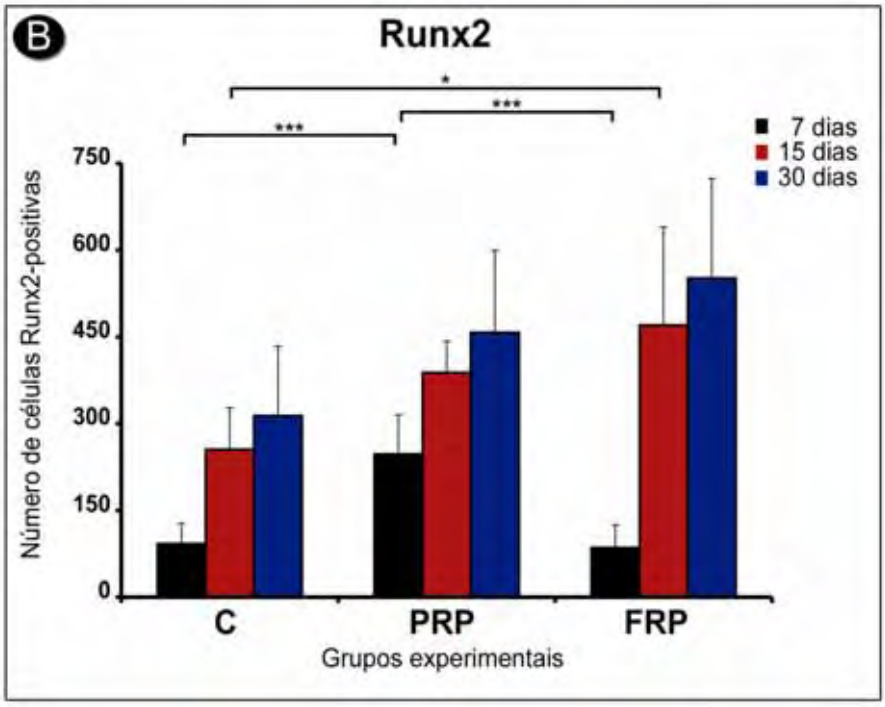
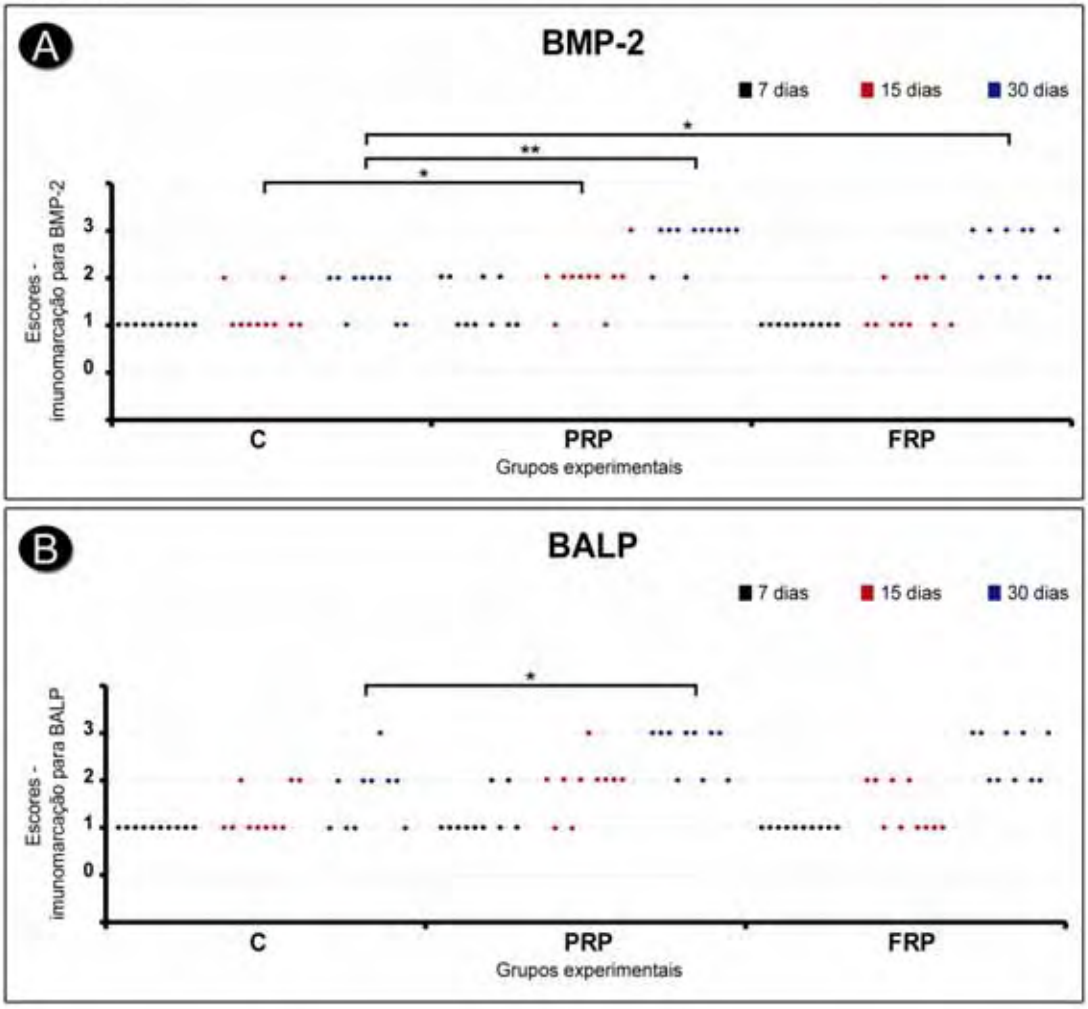

B
Runx2
Número de células Runx2-positivas
750
600
450
300
150
0
7 dias
15 dias
30 dias
C
PRP
FRP
Grupos experimentais

Figura 8


A
BMP-2
7 dias
15 dias
30 dias
*
**
*
Escores - imunomarcação para BMP-2
3
2
1
0
C
PRP
FRP
Grupos experimentais
B
BALP
7 dias
15 dias
30 dias
*
Escores - imunomarcação para BALP
3
2
1
0
C
PRP
FRP
Grupos experimentais

Anexos

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

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

COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
(CEEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto ***"AVALIAÇÃO DO REPARO ÓSSEO DE DEFEITOS DE TAMANHO CRÍTICO TRATADOS COM PLASMA RICO EM PLAQUETAS OU COM MATRIZ DE FIBRINA RICA EM PLAQUETAS"*** sob responsabilidade do **Profa. Dra. Maria José Hitomi Nagata** e colaboração de **Natália Marcumini Pola** acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) foi aprovado pela CEEA em 21/06/2010 de acordo com os protocolos 2010-005123

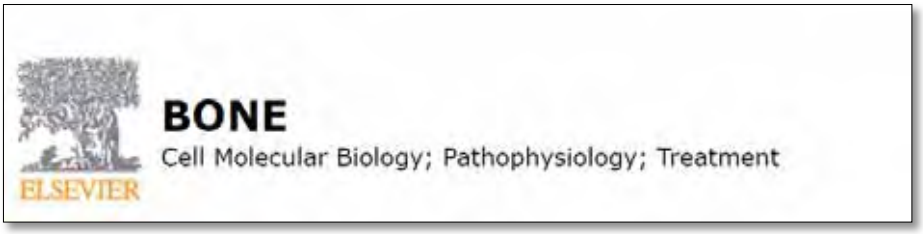
Araçatuba, 21 de Julho de 2010

Tereza Cristina Cardoso Silva

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

Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária – Departamento de Apoio , Produção e Saúde Animal, Rua Clóvis Pestana, 793 CEP 16050-680 Araçatuba – SP
Tel (18) 3636- 1350 Fax (18) 3636- 1352 E-mail: dapsa@fmva.unesp.br

Anexo B - Normas para Publicação segundo o periódico *"Bone"*



GUIDE FOR AUTHORS

Types of article

Types of articles Bone accepts include:

1) Memoriam

2) Editorial or Commentary

3) Review

4) Original Articles

5) Rapid Communication

6) Case Report

7) Technical Note

8) Letters and Response to Letter to the Editor

9) Erratum/Corrigendum

10) Announcements

There are no length or format requirements other than those already shown on the GFA under Article Structure.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see http://www.elsevier.com/publishingethics and http://www.elsevier.com/ethicalguidelines.

Policy and ethics

The work described in your article must have been carried out in accordance with:

Anexo B

The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans: http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html; *EU Directive 2010/63/EU for animal experiments* http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm;
Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals http://www.icmje.org.
This must be stated at an appropriate point in the article.

Conflict of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organisations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/ registrations, and grants or other funding. See also http://www.elsevier.com/conflictsofinterest.

Submission declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see http://www.elsevier.com/postingpolicy), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed. After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see http://www.elsevier.com/ copyright). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement. Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult http://www.elsevier.com/permissions). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult http://www.elsevier.com/permissions.

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: http://www.elsevier.com/authorsrights.

Anexo B

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see http://www.elsevier.com/funding.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit http://www.elsevier.com/ fundingbodies.

Open access

This journal does not ordinarily have publication charges; however, authors can now opt to make their articles available to all (including non-subscribers) via the ScienceDirect platform, for which a fee of $3000 applies (for further information on open access see http://www.elsevier.com/about/open-access/open-access-options). Please note that you can only make this choice after receiving notification that your article has been accepted for publication, to avoid any perception of conflict of interest. The fee excludes taxes and other potential costs such as color charges. In some cases, institutions and funding bodies have entered into agreement with Elsevier to meet these fees on behalf of their authors. Details of these agreements are available at http://www.elsevier.com/fundingbodies. Authors of accepted articles, who wish to take advantage of this option, should complete and submit the order form (available at http://www.elsevier.com/locate/ openaccessform.pdf). Whatever access option you choose, you retain many rights as an author, including the right to post a revised personal version of your article on your own website. More information can be found here:http://www.elsevier.com/authorsrights.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require

editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop http://webshop.elsevier.com/languageediting/ or visit our customer support site http://support.elsevier.com for more information.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

Referees

Please submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of three potential referees. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

PREPARATION

Use of wordprocessing software

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: http://www.elsevier.com/ guidepublication). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

Anexo B

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your wordprocessor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

• Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

• Author names and affiliations. Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name),please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

• Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.

• Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

A Graphical abstract is optional and should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online.

Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See http://www.elsevier.com/graphicalabstracts for examples. Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: Illustration Service.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use Highlights in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 20 words per bullet point). See http://www.elsevier.com/highlights for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Anexo B

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving their readers oneclick access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See http://www.elsevier.com/databaselinking for more information and a full list of supported databases.

Genbank

Electronic artwork

General points

• Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.

• Embed the used fonts if the application provides that option.

• Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.

• Number the illustrations according to their sequence in the text.

• Use a logical naming convention for your artwork files.

• Provide captions to illustrations separately.

• Size the illustrations close to the desired dimensions of the printed version.

• Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

http://www.elsevier.com/artworkinstructions

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below): EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi. TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a

minimum of 1000 dpi. TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

• Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;

• Supply files that are too low in resolution;

• Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see http://www.elsevier.com/artworkinstructions.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Illustration services

Elsevier's WebShop (http://webshop.elsevier.com/illustrationservices) offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medicalstyle images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Anexo B

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these

references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (http://www.endnote.com/support/enstyles.asp) and Reference Manager (http://refman.com/support/rmstyles.asp). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.
Example: '..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result ....'
List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear
in the text.
Examples:
Reference to a journal publication:
[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, J. Sci. Commun. 163 (2010) 51–59.
Reference to a book:
[2] W. Strunk Jr., E.B. White, The Elements of Style, fourth ed., Longman, New York, 2000.
Reference to a chapter in an edited book:
[3] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), Introduction to the Electronic Age, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304.
Journal abbreviations source
Journal names should be abbreviated according to
Index Medicus journal abbreviations: http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html;
List of title word abbreviations: http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php;
CAS (Chemical Abstracts Service): http://www.cas.org/content/
references/corejournals.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version

of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: http://www.sciencedirect.com. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at http://www.elsevier.com/artworkinstructions. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, highresolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: http://www.sciencedirect.com. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at http://www.elsevier.com/ artworkinstructions.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the jornal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

• E-mail address

• Full postal address

• Phone numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

• Keywords

• All figure captions

• All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

• Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'

• References are in the correct format for this journal

• All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa

• Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)

• Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print

• If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes. For any further information please visit our customer support site at http://support.elsevier.com.

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the Publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their
full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*):
http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059
When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to

download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from http://get.adobe.com/reader. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: http://www.adobe.com/products/reader/tech-specs.html.
If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately – please let us have all your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with
the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via email (the PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use). For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's
'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints/myarticlesservices/ booklet).

AUTHOR INQUIRIES

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. For detailed instructions on the preparation of

electronic artwork, please visit http://www.elsevier.com/artworkinstructions. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher. You can track accepted articles at http://www.elsevier.com/trackarticle. You can also check our Author FAQs at http://www.elsevier.com/authorFAQ and/or contact Customer Support via http://support.elsevier.com.