



**PRÓ-REITORIA ACADÊMICA  
DIRETORIA DE PESQUISA, EXTENSÃO E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE MESTRADO PROFISSIONAL EM ODONTOLOGIA**

**EVERTON SALANTE**

**Influência da centrífuga na celularidade da  
membrana de L-PRF**

**Influence of centrifuge on L-PRF membrane cellularity**

**MARINGÁ  
2022**



**PRÓ-REITORIA ACADÊMICA  
DIRETORIA DE PESQUISA, EXTENSÃO E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE MESTRADO PROFISSIONAL EM ODONTOLOGIA**

**EVERTON SALANTE**

**Influência da centrífuga na celularidade da  
membrana de L-PRF**

**Influence of centrifuge on L-PRF membrane cellularity**

Dissertação formato artigo apresentada ao Programa de Mestrado Profissional em Odontologia, do Centro Universitário Ingá UNINGÁ, como parte dos requisitos a obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração Implantodontia.

Orientador: Profa. Dra. Polyane Mazucatto Queiroz

**MARINGÁ  
2022**

Salante, Everton

Influência da centrífuga na celularidade da membrana de L-PRF

Salante / Everton Salante. -- Maringá, 2022.

52 p. : il. ; 31 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Centro Universitário Ingá Uningá, 2022.

Orientadora: Profa. Dra. Polyane Mazucatto Queiroz

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data: 19/04/2022

Comitê de Ética da UNINGÁ  
Protocolo nº: 29185020.7.0000.5220

## FOLHA DE APROVAÇÃO

EVERTON SALANTE

**Influência da centrifuga na celularidade da membrana de L-PRF**

**Influence of centrifuge on L-PRF membrane cellularity**

Dissertação em formato artigo apresentada ao Programa de Mestrado Profissional em Odontologia, do Centro Universitário Ingá UNINGÁ, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração Implantodontia.

Maringá, 19 de abril de 2022.

### BANCA EXAMINADORA



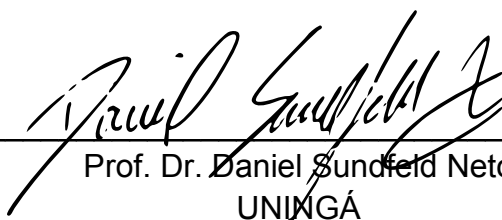
---

Profa. Dra. Polyane Mazucatto Queiroz  
UNINGÁ



---

Prof. Dr. Heliton Gustavo de Lima  
UFPR



---

Prof. Dr. Daniel Sundfeld Neto  
UNINGÁ

## DEDICATÓRIA

A minha esposa, Andressa, e ao meu filho, Heitor, que são minha maior motivação.

## AGRADECIMENTO

Agradeço em primeiro lugar a **Deus** que iluminou o meu caminho durante esta caminhada.

Agradeço à toda a minha família que me incentivou a cada momento e não permitiram que eu desistisse, aos **meus pais**, mas principalmente a minha esposa **Andressa** e ao meu filho **Heitor** que é minha razão de viver, pois é graças aos seus esforços durante a minha ausência, que hoje posso concluir o mestrado.

A minha orientadora professora **Polyane Mazucatto Queiroz**, que me orientou de forma maestral e que sem ela jamais teria conseguido concluir esta difícil tarefa.

Sou extremamente grato aos professores do mestrado em implantodontia, que através dos seus ensinamentos permitiram que eu pudesse hoje estar concluindo este trabalho.

Aos meus colegas de turma, **Fabiano Gava** e **Fabiano Brites**, mas principalmente a minha colega **Júlia Freitas**, que me ajudou muito nos momentos que não pude estar presente. Sem ela esse trabalho não poderia ser desenvolvido e finalizado.

A todos que participaram desta pesquisa, pela colaboração no processo de obtenção de dados, professora **Ana Regina** e a **Monique** pela ajuda na confecção das lâminas e toda orientação nos laboratórios.

Ao programa de Mestrado Profissional em Odontologia do Centro Universitário Ingá, no nome da professora Dra. **Karina Maria Salvatore de Freitas**, e ao Centro Universitário Ingá, no nome do reitor Dr. **Ricardo Benedito de Oliveira**, pelas oportunidades.

E agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para que fosse possível a conclusão deste projeto!

## RESUMO

A utilização de agregados plaquetários tem sido estudada para aplicação em diversas áreas da Odontologia como um recurso coadjuvante em procedimentos cirúrgicos. Embora o protocolo de centrifugação tenha sido desenhado a partir de um modelo específico de centrífuga, diferentes marcas e modelos de centrífugas são comercializadas para obtenção destes concentrados sanguíneos. O presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de comparar a contagem celular em membranas de L-PRF obtidas a partir de três diferentes centrífugas de hemoderivados. Foi realizada a coleta de tubos de sangue de indivíduos saudáveis do gênero masculino. Imediatamente após a coleta, foi realizada a centrifugação em três centrífugas: Centrífuga Intra Spin (Intralock), Centrífuga K14-0815C (Kasvi) e Centrífuga Titan (Daiki). Em todas as centrífugas foi selecionado o *Protocolo de Choukroun*. As membranas foram preparadas para realização de cortes histológicos semi-seriados e foi feita a coloração das lâminas em Hematoxilina e Eosina (HE) e Giemsa. Em microscópio óptico, foi realizada a contagem de leucócitos em quinze campos em cada lâmina, sendo cinco campos proximais à região de coágulo, cinco campos na região de transição coágulo/fibrina e cinco campos distais à região de coágulo (apenas área de fibrina). A contagem de células das membranas obtida nas três diferentes centrífugas foram comparados pelo teste de *Kruskal-Wallis* com teste *post hoc* de *Student-Newman-Keuls*, nível de significância de 5%. Foi observada diferença significativa ( $p=0,0029$ ) quando comparado o número de células das membranas obtidas nas diferentes centrífugas. Considerando as diferentes áreas da membrana, foi observada diferença significativa para a contagem de células na área proximal ( $p=0,007$ ) e área de transição ( $p=0,041$ ), mas na área distal não foi observada diferença significativa ( $p=0,485$ ) entre membranas obtidas nas diferentes centrífugas estudadas. Usando um mesmo protocolo de centrifugação em centrífugas diferentes, a contagem de célula nas membranas foi diferente devido às características inerentes aos princípios físicos e mecânicos das centrífugas.

**Palavras-chave:** Buffy coat. Centrifugação. Fibrina rica em plaquetas. Leucócitos.

## ABSTRACT

The use of platelet aggregates has been studied for application in several areas of Dentistry as an adjunct resource in surgical procedures. Although the centrifugation protocol was designed from a specific model of centrifuge, different brands and models of centrifuges are commercialized to obtain these blood concentrates. The present study was developed with the objective of studying the cell count in L-PRF membranes obtained from three different blood products centrifuges. Blood tubes were collected from healthy male individuals. Immediately after collection, centrifugation was performed in three centrifuges: Intra Spin Centrifuge (Intralock), K14-0815C Centrifuge (Kasvi) and Titan Centrifuge (Daiki). In all centrifuges, the *Choukroun* Protocol was selected. Membranes were prepared for semi-serial histological sections and slides were stained with Hematoxylin and Eosin (HE) and Giemsa. Under an optical microscope, leukocyte counts were performed in fifteen fields on each slide, five fields proximal to the clot region, five fields in the clot/fibrin transition region and five fields distal to the clot region (fibrin area only). The cell counts of the membranes obtained in the three different centrifuges were compared by the *Kruskal-Wallis* test with the *Student-Newman-Keuls post hoc* test, significance level of 5%. A significant difference ( $p=0.0029$ ) was observed when comparing the number of cells in the membranes obtained in the different centrifuges. Considering the different areas of the membrane, a significant difference was observed for the cell count in the proximal area ( $p=0.007$ ) and transition area ( $p=0.041$ ), but in the distal area there was no significant difference ( $p=0.485$ ) between membranes obtained in the different centrifuges studied. Even using the same centrifugation protocol in different centrifuges, the cell count in the membranes was different due to inherent characteristics of the physical and mechanical principles of centrifuges.

**Keywords:** Blood buffy coat. Centrifugation. Leukocytes. Platelet-rich fibrin.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	(A) Centrífuga Intra Spin (Intralock). (B) Centrífuga K14-0815C (Kasvi). (C) Centrífuga Titan (Daiki).....	20
Figura 2 -	Avaliação microscópica das membranas de L-PRF preparadas com três diferentes centrífugas, considerando as áreas proximais ao coágulo e transição coágulo/fibrina (Coloração de Giemsa, 40x).....	23

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Informações sobre ângulo do rotor e raio dos modelos das centrífugas estudadas e a força resultando no processo de centrifugação. ....	21
Tabela 2 -	Contagem das células obtidas nas membranas.....	22
Tabela 3 -	Contagem de células das membranas obtidas nas centrífugas Intralock, Kasvi e Daiki considerando as diferentes áreas da membrana.....	23

## LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

PRF - Fibrina rica em plaqueta

PPP - Plasma pobre em plaqueta

L-PRF - Fibrina rica em plaqueta e leucócitos, do inglês, leukocyte - *platelet-rich fibrin*

PDGF - Fator de crescimento derivado de plaquetas

TGF- beta - Fator de crescimento transformante beta

VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular

IGF - Fator de crescimento de insulina

EGF - Fator de crescimento epidérmico

TCLE - Termo de consentimento livre e esclarecido

RCF - Força de centrifugação relativa aplicada

g - Aceleração relativa à gravidade da Terra

R - Raio da centrífuga

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	13
2.	ARTIGO .....	17
3.	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	30
4.	RELEVÂNCIA E IMPACTO DO TRABALHO PARA A SOCIEDADE .....	31
	REFERÊNCIAS.....	32
	ANEXO 1 .....	35
	ANEXO 2 .....	47

## 1. INTRODUÇÃO

Atualmente existe uma vasta opção de biomateriais classificados quanto ao seu modo de atuação, podendo apresentar características de osteocondução, osteoindução e/ou osteogênese. A osteocondução se refere a capacidade do biomaterial em conduzir o crescimento de um novo tecido ósseo através de uma matriz. A osteoindução envolve a formação de novo osso a partir do recrutamento de células mesenquimais indiferenciadas, sua diferenciação em pré-osteoblastos que futuramente será evoluído em osteoblastos (ALBREKTSSON; JOAHANSSON, 2001). A osteogênese refere-se à formação de osso a partir de osteoblastos (OVERMANN *et al.*, 2020; FARDIN *et al.*, 2010).

Existe uma diversidade de biomateriais que são desenvolvidos para preencher defeitos ósseos e acelerar a cicatrização de feridas, como hidroxapatita, enxerto liofilizados, fosfato tricálcio, vidro bioativo, entre outros. Também existem os agregados plaquetários que são derivados a partir de sangue autólogo e têm demonstrado resultados promissores (XU *et al.*, 2020; MIRON; CHOUKROUN; GHANAATI, 2018).

Eles são usados com o intuito de combinar as propriedades vedantes da fibrina juntamente aos fatores de crescimento das plaquetas, proporcionando um arcabouço osteocondutor, denominado fibrina rica em plaquetas (PRF, do inglês, *platelet rich fibrin*) (AHMAD *et al.*, 2014).

A PRF é formada por uma matriz tridimensional de fibrina, células autógenas, e contém vários fatores de crescimento, como fator de crescimento transformante beta (TGF- beta), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento de insulina (IGF) e fator de crescimento epidérmico (EGF) que auxiliam no processo de reparação tecidual (CHOUKROUN *et al.*, 2006; DOHAN EHRENFEST *et al.*, 2006; TOFFLER *et al.*, 2006).

A fibrina é uma forma ativa de fibrinogênio presente no plasma e nas plaquetas, que efetua um papel determinante na agregação plaquetária durante a hemostasia. Já o fibrinogênio é o substrato final das reações de coagulação, pois se trata de uma proteína solúvel que é transformada em fibrina insolúvel pela trombina sendo a primeira matriz do local lesionado (DOHAN EHRENFEST *et al.*, 2006; TOFFLER *et al.*, 2009). A PRF atua durante a cicatrização e tem a função de liberar fatores de

crescimento no local lesionado, estimular a proliferação de fibroblastos e osteoblastos, promover angiogênese, induzir a síntese de colágeno, cobrir feridas e regular a imunidade (AHMAD *et al.*, 2014).

A obtenção de PRF é relativamente simples. Essa técnica consiste no uso de sangue venoso do próprio paciente (DOHAN EHRENFEST *et al.*, 2010). No tubo de coleta não é utilizado nenhum anticoagulante ou qualquer outro gelificante para realizar seu processo de formação. Devem ser usado tubos de vidro seco, pois possuem sílica natural, ou de plástico com adição de revestimento de sílica para viabilizar a formação do coágulo de fibrina (DE OLIVEIRA *et al.*, 2020).

A velocidade da coleta e do tempo de transferência do sangue para a centrífuga também podem influenciar na qualidade da PRF. O manuseio do material coletado deve ser rápido para obter um coágulo PRF utilizável clinicamente. Pois, se a coleta do sangue for muito longa, maior que três minutos, pode ocorrer a polimerização da fibra de maneira difusa resultando em um pequeno coágulo sanguíneo sem consistência (DOHAN EHRENFEST *et al.*, 2006).

O tubo com o sangue é centrifugado em uma centrífuga a partir de um protocolo em que é selecionado o tempo e a velocidade de centrifugação (CHOUKROUN; GHANAATI, 2018). Com as rotações programadas por um determinado tempo, o sangue entra em contato com as paredes dos tubos iniciando o processo da cascata de coagulação. Inicialmente, o fibrinogênio concentra-se na parte superior do tubo, antes que a trombina que também está presente o transforme em fibrina. Um coágulo de fibrina é então obtido no meio do tubo, e na base do tubo os eritrócitos são depositados. Isso ocorre devido a força centrífuga que atua sobre os tubos, esta força é que faz a separação do sangue em camadas (DE OLIVEIRA *et al.*, 2020; EL BAGDADI *et al.*, 2019).

Ao término do processo de centrifugação, espera-se que o sangue dentro do tubo esteja sedimentado em três camadas. A camada mais superior do tubo é composta pelo plasma acelular, também conhecido como plasma pobre em plaquetas (PPP). A camada inferior do tubo contém glóbulos vermelhos (eritrócitos) que consiste em 55% do volume dentro do tubo. (XU *et al.*, 2020) Na camada intermediária está concentrada a maior quantidade de plaquetas e leucócitos, essa camada é denominada *buffy coat*. Além disso, nessa camada intermediária, devido a ação da força centrífuga, ocorre a polimerização do fibrinogênio formando uma matriz de fibrina

que tem propriedades homeostáticas (CHOUKROUN *et al.*, 2001; FEIGIN; SHOPE, 2019; VALLADÃO *et al.*, 2020; SIMONPIERI *et al.*, 2009).

Esse concentrado sanguíneo está sendo cada vez mais utilizado na Odontologia, principalmente em cirurgia oral e bucomaxilofacial. Esse biomaterial foi desenvolvido na França por Joseph Choukroun. Para a obtenção da PRF podem ser realizados diferentes protocolos, o mais conhecido é o protocolo proposto por Joseph Choukroun (CHOUKROUN *et al.*, 2001). Este protocolo consiste em utilizar uma velocidade de 2.700 rotações por minuto (rpm) por um período de 12 minutos (EL BAGDADI *et al.*, 2019).

Constantemente, diversas centrifugas são desenvolvidas com diferentes características. Para o processo de centrifugação, existe uma angulação do rotor, mantendo o tubo em posição inclinada. Esse ângulo é responsável pelo tamanho da área de transição entre as hemácias e a matriz de fibrina. É nessa junção em que está a maior concentração celular (DOHAN EHRENFEST *et al.*, 2010). Quanto menor o ângulo do rotor, maior será a *buffy coat* (CHOUKROUN *et al.*, 2006).

A força centrífuga relativa (RCF, do inglês, *relative centrifugal force*), é gerada quando uma partícula é submetida a um movimento circular. A unidade de medida da RCF é também conhecida como força “g”, que equivale à aceleração da gravidade na superfície da Terra. Assim, a velocidade de uma centrífuga será fornecida em RCF ou em rotações por minuto (rpm). Os protocolos técnicos costumam fornecer a velocidade em g. O valor de rpm depende do tamanho do raio (R) da centrífuga. Existe um cálculo matemático para descobrir qual a RCF ou força g,  $RCF = 1,12 \times R \times (RPM/1000)^2$ , sendo o R o raio em mm e o RPM a rotação determinada no protocolo. (HUYGENS, 1703), quando a rotação é pré-estabelecida, temos uma interferência no valor do raio em relação a força RCF. Com isso quando temos uma rotação fixa, quanto maior for o raio da centrífuga maior será a força RCF ou “g”. (DOHAN EHRENFEST *et al.*, 2010).

Na prática clínica, as membranas de L-PRF são muito utilizadas em casos que há necessidade de reconstruções ósseas, como levantamento de seio maxilar, casos de perfuração da membrana do seio maxilar, proteção para alvéolos após enxertia e auxiliando no pós-operatório de exodontias, por exemplo. (BÖLÜKBAŞI *et al.*, 2013). Considerando a influência da centrífuga na produção da membrana de L-PRF, este estudo foi proposto com o objetivo de comparar as características celulares de

membranas obtidas em três modelos de centrifugas de bancada, aplicando o protocolo tradicional de Choukroun (CHOUKROUN *et al.*, 2001; ZHU *et al.*, 2016).



## 2. ARTIGO

O artigo apresentado foi escrito de acordo com as normas da Revista *Journal of Periodontology* (Anexo 01).

# INFLUÊNCIA DA CENTRÍFUGA NA CELULARIDADE DA MEMBRANA DE L-PRF

## RESUMO

**Introdução:** Os concentrados sanguíneos têm sido estudados como um recurso coadjuvante em procedimentos cirúrgicos. Embora o protocolo de centrifugação tenha sido desenhado a partir de um modelo específico de centrífuga, diferentes marcas e modelos de centrífugas são comercializadas para esse fim.

**Objetivo:** Comparar a contagem celular em membranas de L-PRF obtidas a partir de três diferentes centrífugas de hemoderivados.

**Método:** Foi realizada a coleta de tubos de sangue de indivíduos saudáveis do gênero masculino. Imediatamente após a coleta, foi realizada a centrifugação em três centrífugas: Intra Spin (Intralock), K14-0815C (Kasvi) e Titan (Daiki). Em todas as centrífugas foi selecionado o *Protocolo de Choukroun*. As membranas foram preparadas para realização de cortes histológicos semi-seriados e foi feita a coloração das lâminas em Hematoxilina e Eosina e Giemsa. Em microscópio óptico foi realizada a contagem de leucócitos em campos proximais à região de coágulo, campos de transição coágulo/fibrina e campos distais à região de coágulo. A contagem de células das membranas foi comparada pelo teste de *Kruskal-Wallis* com *post hoc* de *Student-Newman-Keuls*, nível de significância de 5%.

**Resultados:** Foi observada diferença significativa ( $p=0,0029$ ) quando comparado o número de células das membranas obtidas nas diferentes centrífugas. Foi observada diferença significativa para a contagem de células na área proximal ( $p=0,007$ ) e área de transição ( $p=0,041$ ), mas na área distal não foi observada diferença significativa ( $p=0,485$ ) entre membranas obtidas nas diferentes centrífugas estudadas.

**Conclusão:** Mesmo usando o mesmo protocolo de centrifugação em centrífugas diferentes, a contagem de célula nas membranas foi diferente devido às características inerentes aos princípios físicos e mecânicos das centrífugas.

**PALAVRAS-CHAVE:** Buffy coat. Centrifugação. Fibrina rica em plaquetas. Leucócitos.

## INTRODUÇÃO

A fibrina rica em plaquetas e leucócitos (L-PRF) é formada por uma matriz tridimensional de fibrina e células autógenas contendo vários fatores de crescimento que auxiliam no processo de reparação tecidual.<sup>1-3</sup> A L-PRF atua durante a cicatrização e tem a função de liberar fatores de crescimento no local lesionado, no período de uma a duas semanas. Esses fatores agem estimulando a proliferação de fibroblastos e osteoblastos, promovendo angiogênese, induzindo à síntese de colágeno, diminuindo à inflamação e auxiliando na imunidade.<sup>4</sup>

Na prática clínica, as membranas de L-PRF são muito utilizadas em casos que há necessidade de reconstruções ósseas, como levantamento de seio maxilar, casos de perfuração da membrana do seio maxilar, proteção para alvéolos após enxertia e exodontias, por exemplo<sup>1</sup>.

A obtenção de PRF é relativamente simples. Essa técnica consiste no uso de sangue venoso do próprio paciente e, em geral, tem boa aceitação clínica.<sup>5,6</sup> No tubo de coleta não é utilizado nenhum anticoagulante ou qualquer outro gelificante para realizar seu processo de formação, tornando o processo mais natural e menos oneroso.<sup>3,7-9</sup> Após a centrifugação, é obtida a sedimentação do sangue em três camadas: a camada superior constituída de plasma pobre em plaquetas, seguida pela camada intermediária de fibrina e leucócitos e a camada inferior com glóbulos vermelhos. Assim, a camada intermediária é usada como membrana de L-PRF.<sup>6,10</sup>

Para o processo de centrifugação podem ser realizados diferentes protocolos, o mais conhecido é o protocolo proposto por *Joseph Choukroun*.<sup>11</sup> O protocolo determina a velocidade da centrifugação em rotações por minuto e o tempo de duração do processo de centrifugação. Esse protocolo influencia nas características da membrana obtida e podem ser alterados pelo próprio operador no momento da centrifugação.<sup>12</sup>

Com o uso crescente da membrana de L-PRF na prática clínica, diversas empresas têm produzido centrífugas que apresentam características diversas em relação ao tamanho do raio da centrífuga e/ou ângulo do rotor. Considerando os princípios físicos do movimento de centrifugação, teoricamente, os aspectos físicos e mecânicos inerentes à conformação da centrífuga também poderiam influenciar nas características do produto da centrifugação.<sup>13,14</sup>

Considerando a importância da celularidade da membrana de L-PRF para o resultado clínico e o uso de protocolos padronizados na prática clínica, o presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar se o *Protocolo de Choukroun* realizado em diferentes centrífugas disponíveis comercialmente pode resultar em membranas de L-PRF com celularidade diferentes.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa do Centro Universitário Ingá, via Plataforma Brasil (CAAE: 29185020.7.0000.5220), parecer: 4.668.021.

### **Participantes**

Dez indivíduos adultos, com faixa etária de 22 a 50 anos de idades, gênero masculino, participaram como voluntários nessa pesquisa. Foram selecionados indivíduos saudáveis, sem histórico de doença crônica ou qualquer alteração biológica nos últimos 60 dias. Os voluntários não faziam uso de medicação de uso contínuo e não tinham feito uso de qualquer tipo de medicação nos últimos 60 dias. Além disso, os voluntários não eram fumantes e não faziam uso de bebidas alcoólicas. Todos os indivíduos participantes estavam em concordância com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

### **Coleta de sangue**

Após assepsia, foi realizada a coleta de sangue com sistema à vácuo utilizando *scalp* 21G- Tubo de 7" (VACUPLAST®, Cotia, Brasil). Um cirurgião bucomaxilofacial habilitado em venopunção realizou a coleta de sangue das veias periféricas da fossa antecubital (cefálica, basilica ou intermédia cubital), totalizando quatro tubos de sangue em vidro seco (VACUPLAST®) de cada paciente, contendo 9 ml cada tubo.

Cada tubo apresentou tempo médio de preenchimento de 20 segundos. Dos quatro tubos coletados, um foi utilizado para realizar o exame de hemograma, para confirmar o padrão de normalidade sistêmica do paciente, e três tubos foram usados como amostra para obtenção das membranas, totalizando 30 tubos de sangue para centrifugação.

### Modelos de centrífugas utilizadas

Foram utilizados três centrífugas (Figura 1): Centrífuga Intra Spin (Intralock, Alemanha), Centrífuga K14-0815C (Kasvi, Brasil) e Centrífuga Titan (Daiki, Brasil). Para a centrifugação foi selecionado o *Protocolo de Choukroun* (2700 rotações por minuto durante 12 minutos). As características de ângulo do rotor, raio e força resultante no processo de centrifugação estão apresentadas na Tabela 1. A força g ou Força Centrífuga Resultante (RCF) foi calculada a partir da fórmula:  $RCF = 1,12 \times R \times (RPM/1000)^2$  (M Lauritzen, 1992).

**Figura 1.** (A) Centrífuga Intra Spin (Intralock). (B) Centrífuga K14-0815C (Kasvi). (C) Centrífuga Titan (Daiki).



**Tabela 1.** Informações sobre ângulo do rotor e raio dos modelos das centrífugas estudadas e a força resultando no processo de centrifugação.

<b>Centrífuga (Fabricante)</b>	<b>Ângulo rotor</b>	<b>Raio</b>	<b>Força g*</b>
Intra-Lock	33°	86mm	702
Kasvi	45 °	103mm	840
Daiki	45 °	105mm	857

### **Obtenção das membranas de L-PRF**

Imediatamente após a coleta, foi realizada a centrifugação dos tubos nas três centrífugas apresentadas acima. Para um correto balanceamento da centrífuga, todos os espaços de centrifugação foram preenchidos com tubos contendo água. Nas três centrífugas, o protocolo de centrifugação foi determinado selecionando o protocolo de 2700 rpm durante um período de 12 minutos, conforme preconizado por Choukroun *et al.*, (2001).

Após a centrifugação, o material centrifugado foi acomodado em caixas metálicas de preparo de membrana de L-PRF para o processo de desidratação durante um período de cinco minutos, formando 30 membranas de L-PRF.

### **Preparação das membranas para análise histológica**

Seguindo o protocolo de preparação de peças para análise histológica, as membranas de L-PRF foram fixadas em formol 10% por 24 horas para posterior inclusão em parafina. No micrótomo Laica RM 2125RT (Laica Biosystems, China) foram realizados cortes histológicos semi-seriados no sentido longitudinal com espessura de 5µm. Foram obtidos quatro cortes histológicos de cada peça. Posteriormente, foi realizada a coloração de Hematoxilina e Eosina (HE) e Giemsa.

### **Avaliação microscópica**

A avaliação microscópica foi realizada utilizando o microscópio binocular (Medilux, Barneveld, Holanda) por dois avaliadores previamente calibrados. Quinze campos foram selecionados e capturados em objetiva de 40x, com aumento de 400 vezes, mediante câmera de vídeo digital Moticam 2000 (Vancouver, Canadá) acoplada ao microscópio óptico e a um computador, sendo cinco campos proximais à região de coágulo, cinco campos na região de transição coágulo/fibrina e cinco

campos distais à região de coágulo (apenas área de fibrina). A quantificação de leucócitos ocorreu através das imagens de captura com apoio de uma grade de orientação para contagem do número celular. A quantidade de leucócitos contada foi tabulada.

### Análise estatística

Os dados obtidos foram tabulados e as análises estatísticas foram realizadas nos *softwares* BioEstat (Fundação Mamiraua, Belém, Brasil) e MedCalc 15.8 (MedCalc Software, Oostende, Bélgica). Os valores obtidos na contagem das células foram submetidos ao teste de normalidade de D'Agostino-Person, por não apresentarem normalidade ( $p < 0,001$ ) a contagem das células das membranas obtida nas três diferentes centrífugas foram comparados pelo teste de *Kruskal-Wallis* com teste *post hoc* de *Student-Newman-Keuls* (SNK) considerando nível de significância de 5%. A concordância entre as avaliações foi calculada pelo Índice de Correlação Intraclasse (ICC).

## RESULTADOS

Na contagem realizada nas membranas, independente da área (Tabela 2), foi observada diferença significativa ( $p = 0,0029$ ) quando comparado o número de células das membranas obtidas nas diferentes centrífugas, com maior número de células nas membranas obtidas na centrífuga Daiki em comparação com a Intralock ( $p = 0,040$ ) e Kasvi ( $p = 0,012$ ), mas essas não apresentaram diferença significativa entre si ( $p = 0,605$ ).

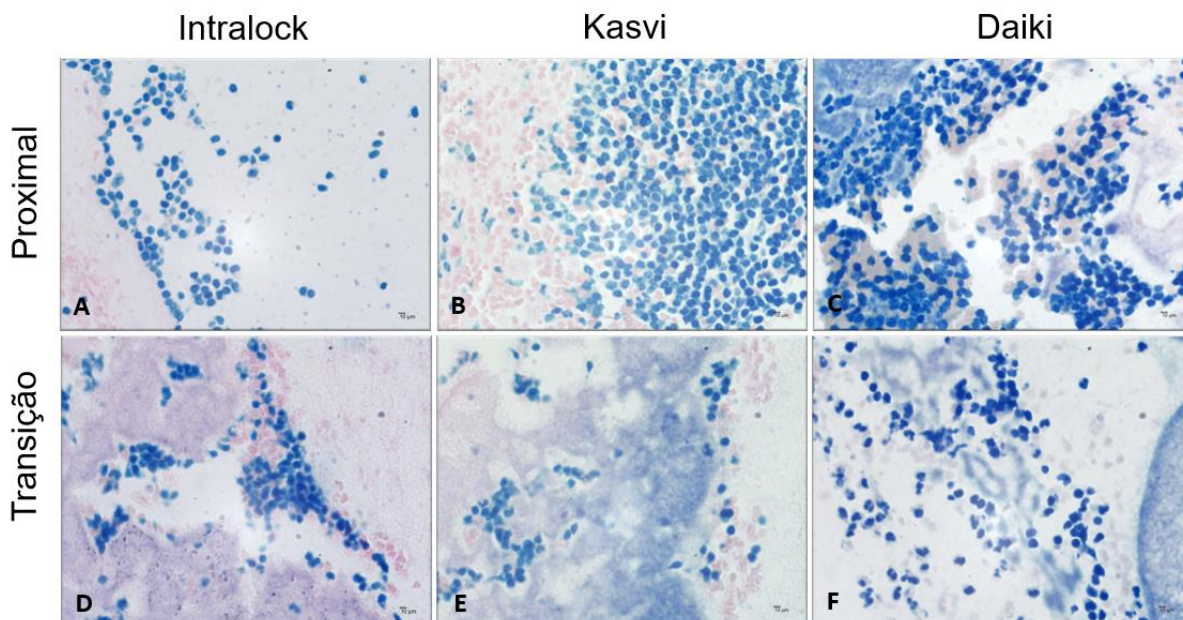
**Tabela 2.** Contagem das células obtidas nas membranas

Contagem de células	
<b>Intralock</b>	41,46 ( $\pm 49,5$ ) <sup>B</sup>
<b>Kasvi</b>	47,80 ( $\pm 74,83$ ) <sup>B</sup>
<b>Daiki</b>	58,69 ( $\pm 60,5$ ) <sup>A</sup>

\*Letras diferentes indicam diferença significativa para  $p \leq 0,05$ .

Considerando as diferentes áreas da membrana (Figura 2), foi observada diferença significativa para a contagem de células na área proximal ( $p = 0,007$ ) e área de transição ( $p = 0,041$ ), mas na área distal não foi observada diferença significativa ( $p = 0,485$ ) entre as membranas obtidas nas diferentes centrífugas estudadas (Tabela 3).

**Figura 2.** Avaliação microscópica das membranas de L-PRF preparadas com três diferentes centrífugas, considerando as áreas proximais ao coágulo e transição coágulo/fibrina (Coloração de Giemsa, 40x).



Na área proximal, observou-se maior contagem nas membranas obtidas pelas centrífugas Kasvi e Daiki, sem diferença significativa entre elas ( $p=0,979$ ), mas ambas apresentam contagem significativamente superior em relação a Intralock, com p-valor de 0,0006 e 0,0005 para Kasvi e Daiki, respectivamente.

Na área de transição, observou-se maior contagem de células nas membranas obtidas nas centrífugas Daiki e Intralock, sem diferença significativa entre si ( $p=0,147$ ), mas ambas apresentaram diferença significativa em relação a contagem observada nas membranas da Kasvi com p-valor de 0,0310 e 0,002 para Intralock e Daiki, respectivamente.

**Tabela 3.** Contagem de células das membranas obtidas nas centrífugas Intralock, Kasvi e Daiki considerando as diferentes áreas da membrana

	Intralock	Kasvi	Daiki	p-valor
Proximal	66,3 ( $\pm 36,7$ ) <sup>B</sup>	154,3 ( $\pm 66,3$ ) <sup>A</sup>	111,3 ( $\pm 37,3$ ) <sup>A</sup>	0,007
Transição	60,7 ( $\pm 37,7$ ) <sup>A</sup>	37,2 ( $\pm 56,6$ ) <sup>B</sup>	77,5 ( $\pm 30,0$ ) <sup>A</sup>	0,041
Distal	0,14 ( $\pm 0,2$ ) <sup>A</sup>	0,28 ( $\pm 0,4$ ) <sup>A</sup>	0,29 ( $\pm 0,3$ ) <sup>A</sup>	0,485

\*Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa para  $p \leq 0,05$ .

O ICC obtido foi de 0,870 para as contagens de células feitas em diferentes tempos.

## DISCUSSÃO

Com o desenvolvimento de estudos científicos explorando e evidenciando os benefícios dos agregados plaquetários, vários protocolos foram desenvolvidos e aprimoradas com o passar do tempo, com características associadas a indicação de usabilidade da membrana.<sup>9,12</sup> Dentre os diferentes protocolos estudados na literatura, os parâmetros determinados para o processo de obtenção da membrana devem ser observados, pois é possível que alterem o resultado da membrana de L-PRF.<sup>15</sup>

O protocolo mais difundido é o protocolo proposto por Joseph Choukroun, idealizador do uso de concentrados sanguíneos na prática clínica.<sup>11</sup> Este protocolo, que ficou conhecido como *Protocolo de Choukroun*, consiste em utilizar uma velocidade de 2.700 rotações por minuto (rpm) por um período de 12 minutos.<sup>12</sup> para obtenção da membrana de L-PRF. E sua produção está atrelada a centrífuga *Intralock*, desenvolvida por Choukroun, que foi utilizada como a centrífuga-padrão de controle nesse estudo.

Com a evolução da técnica e uma maior popularização dos agregados plaquetários, surgiu um mercado para a comercialização de diferentes centrífugas. Diferentes marcas comerciais passaram a comercializar centrífugas de hemoderivados. Os diferentes modelos de centrífuga, dentro de uma mesma marca comercial, e as diferentes marcas começaram a propor centrífugas com características físicas e parâmetros de centrifugação diferentes da centrífuga na qual o *Protocolo de Choukroun* foi idealizado.<sup>16,17</sup>

Existem parâmetros e aspectos mecânicos das centrífugas que podem influenciar na centrifugação do hemoderivado, conseqüentemente influenciar nas características e propriedades da membrana. Fatores como *rpm*, tempo, ângulo do rotor e RCF podem estar diretamente relacionados com a disponibilidade celular, organização da matriz fibrilar e na liberação de fatores de crescimento.<sup>5</sup>

Nas diferentes centrífugas, os parâmetros de centrifugação (*rpm* e duração do processo de centrifugação) normalmente podem ser determinados pelo profissional, de forma digital ou analógica, permitindo que seja selecionado o *Protocolo de Choukroun* (2700rpm por 12 minutos). O tempo de centrifugação e o número de rotações por minuto devem ser criteriosamente selecionados, pois podem influenciar nas características e propriedades das membranas.<sup>18</sup>



No presente estudo, ao analisar a contagem de células das membranas, é possível observar que mesmo utilizando os parâmetros padronizados (*Protocolo de Choukroun*) para todas as centrífugas, eliminando variável de protocolo, foram obtidas diferentes contagens de células nas membranas obtidas a partir nas diferentes centrífugas estudadas. Isso evidencia a influência de fatores inerente à centrífuga.<sup>13,14</sup>

Aspectos mecânicos da centrífuga como raio, que influenciará na força de centrifugação relativa (RCF), e o ângulo do rotor são fatores que não podem ser alterados pelo operador pois fazem parte da conformação mecânica da centrífuga.

A força de centrifugação relativa depende essencialmente de dois fatores: raio da centrífuga e a *rpm*.<sup>19</sup> em uma relação diretamente proporcional. No presente estudo, a *rpm* foi padronizada, assim, o raio foi o principal fator que impactou na RCF. Quanto maior o raio, maior será a RCF.<sup>5</sup> E as centrífugas Kasvi e Daiki apresentam raios de 103 e 105 mm, respectivamente, em contrapartida, a centrífuga-padrão apresenta um raio de 86 mm. Assim, há uma maior resultante de RCF nas centrífugas Kasvi e Daiki, em relação à centrífuga Intralock. No presente estudo, é possível observar que houve uma maior contagem de células na área proximal das membranas preparadas nas centrífugas Kasvi e Daiki, evidenciando maior celularidade, que pode ser decorrente do fato de que ambas as centrífugas apresentavam maior RCF.<sup>5</sup>

É sabido que a RCF demasiadamente grande pode gerar deformação de células até a morte das mesmas, inferindo na liberação de fatores de crescimento.<sup>20,21</sup> Contudo, no presente estudo, pela presença de maior número de células, pode-se inferir, que a força maior não impactou de forma negativa. Estudos futuros podem ser realizados para determinar o limiar entre a RCF que pode aumentar a celularidade e a RCF que pode resultar em menor eficiência na liberação de fatores de crescimento.

O ângulo do rotor é responsável por manter o tubo em posição inclinada durante o processo de centrifugação. Esse ângulo é responsável pelo tamanho da área de transição entre as hemácias e a matriz de fibrina. É nessa junção em que está a maior concentração celular.<sup>5</sup> Teoricamente, quanto menor o ângulo do rotor, maior será o *buffy coat*.<sup>1</sup> No entanto, no presente estudo, observou-se que uma das centrífugas que apresentava uma angulação de 45° apresentou maior celularidade na área proximal em relação a centrífuga-padrão que apresentava angulação de 33°. Esse resultado pode ser devido à pequena diferença na angulação, que pode ter tido seu efeito menos expressivo que a influência observada pelo maior raio, que impactou na RCF, conforme discutido anteriormente.

Sem a padronização da configuração básica da centrífuga, as diferenças entre as membranas são inevitáveis.<sup>22,23,14</sup> Embora, teoricamente, espera-se melhor desempenho quando há maior celularidade, ainda é desconhecido o impacto clínico dessas diferenças entre às membranas. Estudos futuros devem ser realizados para avaliar esse impacto nos resultados clínicos.

Assim, observa-se que mesmo usando o mesmo protocolo de centrifugação em centrífugas diferentes, a contagem de célula nas membranas será diferente devido às características inerentes aos princípios físicos e mecânicos das centrífugas.

## REFERÊNCIAS

1. Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, *et al.* 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* 2006;101:56-60.
2. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, *et al.* Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part I: Technological concepts and evolution. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;101:e37-44.
3. Toffler M. Treating the atrophic posterior maxilla by combining short implants with minimally invasive osteotome procedures. *Practical Procedures and Aesthetic Dentistry* 2006;18(5)301.
4. Agrawal N, Smith G, Heffelfinger R. Ablative skin resurfacing. *Facial Plastic Surgery* 2014;30:055-061.
5. Dohan Ehrenfest DM, Coelho PG, Kang BS, Sul YT, Albrektsson T. Classification of osseointegrated implant surfaces: materials, chemistry and topography. *Trends Biotechnol* 2010;28:198-206.

6. Feigin K, Shope B. Use of Platelet-Rich Plasma and Platelet-Rich Fibrin in Dentistry and Oral Surgery: Introduction and Review of the Literature. *J Vet Dent* 2019;36:109-123.
7. Ortega-Mejia H, Estrugo-Devesa A, Saka-Herrán C, Ayuso-Montero R, López-López J, Velasco-Ortega E. Platelet-Rich Plasma in Maxillary Sinus Augmentation: Systematic Review. *Materials (Basel)*. 2020;13(3):622.
8. Strauss FJ, Nasirzade J, Kargarpoor Z, Stähli A, Gruber R. Effect of platelet-rich fibrin on cell proliferation, migration, differentiation, inflammation, and osteoclastogenesis: a systematic review of in vitro studies. *Clinical Oral Investigations* 2019;24:1-16.
9. De Oliveira LA, Borges TK, Soares RO, Buzzi M, Kückelhaus SA. Methodological variations affect the release of VEGF *in vitro* and fibrinolysis' time from platelet concentrates. *PLoS One* 2020;15:e0240134.
10. Otarola WE, Nunez GC, Vaz LG, Kuga MC. Fibrina rica en plaquetas (FRP): Una alternativa terapéutica en odontología. *Rev. Estomatol. Herediana* 2016;26(3):173-178.
11. Choukroun J, Adda F, Schoeffler C, Vervelle A. Une Opportunité en parodontologie: le PRF. *Implantodontie* 2001;42:55-62.
12. El Bagdadi K, Kubesch A, Yu X, *et al.* Reduction of relative centrifugal forces increases growth factor release within solid platelet-rich-fibrin (PRF)-based matrices: a proof of concept of LSCC (low speed centrifugation concept). *Eur J Trauma Emerg Surg* 2019;45(3):467-479.
13. Dohan Ehrenfest DM, Pinto NR, Pereda A. The impact of the centrifuge characteristics and centrifugation protocols on the cells, growth factors and fibrin architecture of a Leukocyte- and Platelet-Rich Fibrin (L-PRF) clot and membrane. Part 1: evaluation of the vibration shocks of 4 models of table

centrifuges for L-PRF. Poseido. *Journal Periodontology Oral Surgery, Esthetic & Implant Dentistry* 2014;2(2)

14. Zhu W, Ma X, Gou M, Mei D, Zhang K, Chen S. 3D printing of functional biomaterials for tissue engineering. *Curr Opin Biotechnol.* 2016;40:103-112.
15. Fujioka-Kobayashi M, Miron RJ, Hernandez M, Kandalam U, Zhang Y, Choukroun J. Optimized Platelet-Rich Fibrin With the Low-Speed Concept: Growth Factor Release, Biocompatibility, and Cellular Response. *J Periodontol* 2017;88(1):112-121.
16. Miron R, Choukroun J, Ghanaati S. Controversies related to scientific report describing g-forces from studies on platelet-rich fibrin: necessity for standardization of relative centrifugal force values. *International Journal of Growth Factors and Stem Cells in Dentistry* 2018;1(3):80.
17. Bielecki T, Dohan Ehrenfest DM, Everts PA, Wiczkowski A. The role of leukocytes from L-PRP/L-PRF in wound healing and immune defense: new perspectives. *Current pharmaceutical biotechnology* 2012;13:1153-1162.
18. Dohan Ehrenfest DM, Pinto NR, Pereda A, The impact of the centrifuge characteristics and centrifugation protocols on the cells, growth factors, and fibrin architecture of a leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) clot and membrane. *Platelets* 2018;29:171-184.
19. Lauritzen M. Quantities and units for centrifugation in the clinical laboratory. *The Journal of automatic chemistry* 1992;14(3):93-6.
20. Dohan Ehrenfest DM, de Peppo GM, Doglioli P, Sammartino G. 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* 2009;27(1):63-69.

21. Bölükbaşı N, Yenişol S, Tekkesin MS, Altunatmaz K. The use of platelet-rich fibrin in combination with biphasic calcium phosphate in the treatment of bone defects: a histologic and histomorphometric study. *Curr Ther Res Clin Exp* 2013;75:15-21.
22. Coury AJ. Expediting the transition from replacement medicine to tissue engineering. *Regen Biomater* 2016;3:111-113.
23. Dai R, Wang Z, Samanipour R, Koo KI, Kim K. Adipose-derived stem cells for tissue engineering and regenerative medicine applications. *Stem Cells Int* 2016.

### **3. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Centrífugas de diferentes modelos e marcas comerciais estão disponíveis no mercado. Um mesmo protocolo pode ter resultado diferente em relação à celularidade da célula, dependendo da característica da centrífuga pois o raio influenciará na força resultante, conseqüentemente, influenciará na membrana.

#### **4. RELEVÂNCIA E IMPACTO DO TRABALHO PARA A SOCIEDADE**

O presente estudo contribuiu para entender sobre a efetividade de centrífugas disponíveis no mercado a fim de aplicar um protocolo pré-estabelecido a partir de um modelo específico. Confirmar a efetividade de centrífugas de marcas alternativas à marca/modelo padrão é importante para aumentar o alcance de uso da membrana de L-PRF, haja vista que o custo dessas centrífugas é mais acessível.

## REFERÊNCIAS

AHMAD, T., *et al.* Miro1 regulates intercellular mitochondrial transport & enhances mesenchymal stem cell rescue efficacy. **The EMBO journal**, v. 33, n. 9, p. 994-1010, 2014.

ALBREKTSSON, T.; JOHANSSON C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. **the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society**, v. 10, Suppl. 2, p. 96-101, 2001.

BÖLÜKBAŞI, N., *et al.* The use of platelet-rich fibrin in combination with biphasic calcium phosphate in the treatment of bone defects: a histologic and histomorphometric study. **Curr Ther Res Clin Exp** v. 75, p. 15-21, 2013.

CHOUKROUN, J., *et al.* Unn opportunitéén paro implantologie: Le PRF. **Implantodontie**, v. 42, p. 55-62, 2001.

CHOUKROUN, J., *et al.* 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**, v. 101, n. 3, p. 56-60, 2006.

CHOUKROUN, J.; GHANAATI, S. Reduction of relative centrifugation force within injectable platelet-rich-fibrin (PRF) concentrates advances patients' own inflammatory cells, platelets and growth factors: the first introduction to the low speed centrifugation concept. **European journal of trauma and emergency surgery: official publication of the European Trauma Society**, v. 44, n. 1, p. 87-95, 2018.

DE OLIVEIRA, L. A., *et al.* Methodological variations affect the release of VEGF in vitro and fibrinolysis' time from platelet concentrates. **Plos One**, v. 15, n. 10, e0240134, 2020.

DOHAN EHRENFEST, D. M., *et al.* Classification of osseointegrated implant surfaces: materials, chemistry and topography. **Trends in biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 198-206, 2010.

DOHAN EHRENFEST, D. M., *et al.* Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part I: Technological concepts and evolution. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 101, n. 30, p. 37-44, 2006.



EL BAGDADI, K., *et al.* Reduction of relative centrifugal forces increases growth factor release within solid platelet-rich-fibrin (PRF)-based matrices: a proof of concept of LSCC (low speed centrifugation concept). **European journal of trauma and emergency surgery: official publication of the European Trauma Society**, v. 45, n. 3, 2019.

FARDIN, A. C., *et al.* Bone graft in dentistry: review of literature. **Innovations Implant Journal**, v. 5, n. 3, p. 48-52, 2010.

FEIGIN, K.; SHOPE, B. Use of Platelet-Rich Plasma and Platelet- Rich Fibrin in Dentistry and Oral Surgery: Introduction and Review of the Literature. **Journal of Veterinary Dentistry**, v. 36, n. 2, p. 109-123, 2019.

HUYGENS, C. Opuscula postuma. **Cornelium Boutesteyn**, 1703.

MIRON, R.; CHOUKROUN, J.; GHANAATI, S. Controversies related to scientific report describing g-forces from studies on platelet-rich fibrin: necessity for standardization of relative centrifugal force values. **International Journal of Growth Factors and Stem Cells in Dentistry**, v. 1, n. 3, p. 80, 2018.

OVERMANN, A. L., *et al.* Orthopaedic osseointegration: Implantology and future directions. **Journal of orthopaedic research**. v. 38, n. 7, p. 1445-1454, 2020.

SIMONPIERI, A., *et al.* 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 dentistry**, v. 18, n. 3, 2009.

TOFFLER, M. *et al.* Introducing Choukroun's Platelet Rich Fibrin (PRF) to the Reconstructive Surgery Milieu. **The Journal of Implant & Advanced Clinical Dentistry**, v. 1, n. 6, p. 21-30, 2009.

TOFFLER, M. Treating the atrophic posterior maxilla by combining short implants with minimally invasive osteotome procedures. **Practical Procedures and Aesthetic Dentistry**, v. 18, n. 5, p. 301, 2006.

VALLADÃO, C. A. J. A; MONTEIRO M. F.; JOLY J. C. Guided bone regeneration in staged vertical and horizontal bone augmentation using platelet-rich fibrin associated

with bone grafts: a retrospective clinical study. **International journal of implant dentistry**, v. 6, n. 1, p. 72-17, 2020.

XU, J. *et al.* Platelet-Rich Plasma and Regenerative Dentistry. **Australian Dental Journal**, v. 65, n. 2, p. 131-142, 2020.

ZHU, W. *et al.* 3D printing of functional biomaterials for tissue engineering. **Current opinion in biotechnology**, v. 40, p. 103-112, 2016.

## ANEXO 1

### Normas para submissão para a Revista Journal of Pridontology

#### *Journal of Periodontology* Author Instructions

##### Manuscript Categories

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

The *Journal of Periodontology* accepts manuscript submissions online at [ScholarOne Manuscripts](#). To start a new submission, enter the Author Center and click "Start New Submission" in the left menu box. Details regarding each submission step are located at the top of the page in ScholarOne Manuscripts. Authors should prepare manuscripts in accordance with the instructions below. Failure to do so may result in delays or manuscript unsubmission.

#### MANUSCRIPT CATEGORIES AND SPECIFIC FORMATS

Submissions to the *Journal of Periodontology* should be limited to one of the categories defined below. Specific information regarding length and format is provided for each category. Please also refer to the instructions provided under [General Format](#) and [Style](#). All manuscripts will be reviewed by the Editors for novelty, potential to extend knowledge, and relevance to clinicians and researchers in the field. Some manuscripts will be returned without review, based on the Editors' judgment of the appropriateness of the manuscript for the *Journal of Periodontology*.

##### ORIGINAL ARTICLES

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

##### *Format*

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

##### *Abstract*

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

- Background: Describes the problem being addressed.
- Methods: Describes how the study was performed.
- Results: Describes the primary results.

- **Conclusion(s):** Reports what authors have concluded from these results, and notes their clinical implications.

### ***Introduction***

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

### ***Materials and Methods***

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

### ***Results***

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

### ***Discussion***

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

## **REVIEW ARTICLES**

**The *Journal of Periodontology* is no longer accepting submissions of reviews.** Authors may be invited to submit reviews for potential publication, but unsolicited reviews will no longer be accepted.

## **COMMENTARIES**

The purpose of these papers is to provide a forum for discussion of controversies and other issues as they relate to the practice of periodontics and implant dentistry. Full and balanced discussion of controversies on important issues is encouraged. This may result in several authors each presenting a relevant viewpoint. Commentaries should be concise (2,000 to 3,000 words) with no more than 50 references; however, they should be complete and balanced, which may require that the issue or controversy addressed be highly focused.

### **Introduction**

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

### ***Body***

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

illustrative materials may be incorporated. The total combined number of figures and tables should not exceed six.

### ***Summary***

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

### ***Acknowledgment(s)***

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

## **CASE SERIES**

**The *Journal of Periodontology* no longer publishes Case Reports. Authors are encouraged to submit Case Reports to [Clinical Advances in Periodontics](#).** The *Journal of Periodontology* publishes selected Case Series that describe unusual case presentations, complex diagnoses, and novel approaches to treatment within the scope of practice of periodontology. These Case Series provide valuable information for clinicians and teachers in the field.

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

The requirements for patient consent, privacy, and institutional approval are well defined for manuscripts describing research on human subjects. These basic requirements are described by the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) in their Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals (available at: [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) and are interpreted in the instructions to authors of all peer-reviewed biomedical journals, including the *Journal of Periodontology*.

Due to the changing ethical and legal environment around the use of patient information, the editorial team has received multiple questions about the need for subject consent from patients described in Case Series submitted for publication.

The following applies to most Case Series. It should be noted that the Editors will determine whether specific Case Series require additional approvals beyond what is described below.

### ***Requirement for Ethics Board Approval***

Most Case Series are a retrospective description of clinical findings in cases or an observed course of events that document a new aspect of patient management during the normal course of clinical treatment. Since there is no hypothesis testing, no systematic data collection beyond that which is part of routine clinical practice, no data analysis, and the work has already been done, Case Series do not usually qualify as "research" requiring approval from ethical boards designed to protect humans involved in clinical research.

(U.S. Fed. definition: "RESEARCH is any systematic investigation, including research development, testing and evaluation, designed to develop or contribute to generalizable knowledge.")

Example 1: Series of private practice implant cases in patients who have been taking bisphosphonates. Authors describe the findings in each case, which are collected and reported in a table format.

Example 2: Authors collect series of private practice implant cases in patients who have or have not been taking bisphosphonates. The sample size is sufficient for data analysis, and authors analyze and report the incidence of complications.

Example 1 does not qualify as "research," but example 2 does qualify and requires ethical approval.

Please see "[Does My Case Series Need IRB Approval?](#)" for more information.

### ***Privacy in Case Series***

No patient identifiers should be included in Case Series. If the authors choose to include any subject identifiers, the authors must include the patient's informed written consent to publish the information.

Our policy conforms to the Uniform Requirements, which states: "Patients have a right to privacy that should not be violated without informed consent. Identifying information, including names, initials, or hospital numbers, should not be published in written descriptions, photographs, or pedigrees unless the information is essential for scientific purposes and the patient (or parent or guardian) gives written informed consent for publication. Informed consent for this purpose requires that an identifiable patient be shown the manuscript to be published. Authors should disclose to these patients whether any potential identifiable material might be available via the Internet as well as in print after publication."

It should be noted that patients may have given a signed "consent to treat," but that does not constitute permission to publish their case with personal identifiers unless they have explicitly approved the manuscript. Likewise, patient consent under government privacy rules, such as the Health Insurance Portability and Accountability Act (HIPAA) in the United States, does not constitute permission to publish their case with personal identifiers unless they have explicitly approved the manuscript.

### ***Format***

Case Series must be limited to 2,000 to 3,000 words (excluding the abstract, references, and figure legends). The reference list should not exceed 50 references, and the total combined number of figures and tables must be six or fewer. Multi-panel figures are acceptable.

### ***Abstract***

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

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

### ***Introduction***

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

### ***Case Description and Results***

This section describes the cases, including all relevant data. For ease of presentation, tables

describing longitudinal data in a chronological form may be useful. Carefully selected, high-quality clinical photographs in full color, as well as radiographs, are encouraged.

### ***Discussion***

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

## **GUEST EDITORIALS**

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

## **LETTERS TO THE EDITOR**

The *Journal of Periodontology* no longer accepts submissions of letters to the editor.

## **GENERAL FORMAT**

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

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

**Figures should not be embedded in the manuscript.** Please see the *Journal of Periodontology* [Digital Art Guidelines](#) for more information on submitting figures. Authors should retain a copy of their manuscript for their own records.

## **SEARCH ENGINE OPTIMIZATION**

For tips on Search Engine Optimization (SEO) and article discovery, please see our [SEO guide](#).

## **TITLE PAGE**

The title page should contain:

1. a concise but informative title;
2. first name, middle initial, and last name of each author, with the highest academic degree and the current institutional affiliation, including department, for each (please use footnote numbers in the sequence <sup>1, 2, 3</sup>, etc. to identify authors and their corresponding

- institutions);
3. disclaimers, if any;
  4. the name and address (including fax number and e-mail) of the author responsible for correspondence (please indicate whether fax number and e-mail can be published);
  5. word count and number of figures, tables, and references in the manuscript;
  6. a short running title of no more than 60 characters, including spaces;
  7. a one-sentence summary describing the key finding(s) from the study.

## KEY WORDS

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

## ACKNOWLEDGMENT(S) AND CONFLICTS OF INTEREST

### *Acknowledgment(s)*

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

### *Conflicts of Interest*

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

Authors are required to submit:

1. A statement in the acknowledgments section of the manuscript that includes the source of any funding for the study, and defines the commercial relationships of each author. If an author has no commercial relationships to declare, a statement to that effect should be included. This statement should include financial relationships that may pose a conflict of interest or potential conflict of interest. These may include financial support for research (salaries, equipment, supplies, travel reimbursement); employment or anticipated employment by any organization that may gain or lose financially through publication of the paper; and personal financial interests such as shares in or ownership of companies affected by publication of the research, patents or patent applications whose value may be affected by this publication, and consulting fees or royalties from organizations which may profit or lose as a result of publication. An example is shown below.
2. A conflict of interest and financial disclosure form for each author. Please see the *Journal of Periodontology* Conflict of Interest Form [here](#)

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



### ***Example of Conflict of Interest Statement***

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

### **REFERENCES**

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

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

The use of abstracts as references is strongly discouraged. Manuscripts accepted for publication may be cited and should include the manuscript's DOI, if known. Material submitted, but not yet accepted, should be cited in text as "unpublished observations." Written and oral personal communications may be referred to in text, but not cited as references.

Please provide the date of the communication and indicate whether it was in a written or oral form. In addition, please identify the individual and his/her affiliation. Authors should obtain written permission and confirmation of accuracy from the source of a personal communication. Presented papers, unless they are subsequently published in a proceedings or peer-reviewed journal, may not be cited as references. In addition, Wikipedia.org may not be cited as a reference. For most manuscripts, authors should limit references to materials published in peer-reviewed professional journals. In addition, authors should verify all references against the original documents. References should be typed double-spaced.

Examples of references are given below. Authors are encouraged to consult EndNote for the *Journal of Periodontology*'s preferred reference style.

#### ***Journals***

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

#### ***Books and Other Monographs***

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

### ***Electronic Citations***

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

9. Online-only article. Rasperini G, Acunzo R, Limiroli E. Decision making in gingival recession treatment: Scientific evidence and clinical experience. *Clin Adv Periodontics* 2011;1:41-52. doi:10.1902/cap.2011.100002.
10. Ahead of print. McGuire MK, Scheyer ET, Nevins M, et al. Living cellular construct for increasing the width of keratinized gingiva. Results from a randomized, within-patient, controlled trial [published online ahead of print March 29, 2011]. *J Periodontol*; doi:10.1902/jop.2011.100671.
11. Web sites. Centers for Disease Control and Prevention. Periodontal Disease. Available at: <https://www.cdc.gov/oralhealth/conditions/periodontal-disease.html>.

### **TABLES**

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

### **FIGURES**

Please see the *Journal of Periodontology's* [Digital Art Guidelines](#) for detailed instructions on submitting high-quality images.

### **FOOTNOTES**

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

### **SUPPORTING INFORMATION**

The *Journal of Periodontology* includes supplementary/supporting information in the online Journal. All supplementary material should be called out in the text.

### Supplementary Figures and Tables

*Journal of Periodontology* articles are limited to a combined total of six figures and tables in the print publication. Any additional figures and tables should be submitted as supplementary files. Each supplementary figure or table should be submitted as a separate file. Please follow the guidelines regarding resolution, format, etc. for printed figures (see **Figures** above) and tables (see above) when preparing supplementary figures and tables. In summary, each figure, table, or multimedia file should be uploaded separately and the file names should clearly identify the file (i.e., SupplementaryFigure1.tif, SupplementaryTable1.xls, etc.). If file size limitations prevent you from uploading your supplemental material, please e-mail [jerry@perio.org](mailto:jerry@perio.org).

### Supplementary Videos

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

Authors can create video abstracts for their articles through Wiley's partnership with Research Square. Visit the [Wiley](#) and [Research Square](#) websites for more information about this video option. Authors are also welcome to create and submit their own videos.

### STYLE

Please follow the guidelines below when preparing a manuscript:

- Be sure to put the genus and species of an organism and journal names in the reference section in italics.
- Do not italicize common Latin terms such as *in vitro*, *in vivo*, e.g., or i.e.
- Use a block style; do not tabulate or indent material.
- Refer to the newest edition of the [Glossary of Periodontal Terms](#) published by the American Academy of Periodontology for preferred terminology.
- Authors are encouraged to use the disease classification as outlined in the [Annals of Periodontology, volume 4](#) (1999 International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions).
- Create equations as text, treating any mathematical symbols as special characters and assigning them the Symbol font.
- Measurements of length, height, weight, and volume should be reported in metric units or their decimal multiples. Temperatures should be given in degrees Celsius and blood pressure in millimeters of mercury. All hematologic and clinical chemistry measurements should be reported in the metric system in terms of the International System of Units (SI). Description of teeth should use the American Dental Association (i.e., Universal) numbering system.
- Statistical methods should be described such that a knowledgeable reader with access to the original data could verify the results. Wherever possible, results should be quantified and appropriate indicators of measurement error or uncertainty given. Sole reliance on statistical hypothesis testing or normalization of data should be avoided. Data in as close to the original form as reasonable should be presented. Details about eligibility criteria for subjects, randomization, methods for blinding of observations, treatment complications, and numbers

of observations should be included. Losses to observations, such as dropouts from a clinical trial, should be indicated. General-use computer programs should be listed. Statistical terms, abbreviations, and symbols should be defined. Detailed statistical, analytical procedures can be included as an appendix to the paper if appropriate.

## AUTHORSHIP

Individuals identified as authors must meet all of the following criteria established by the International Committee of Medical Journal Editors: 1) substantial contributions to conception and design, or acquisition, analysis, or interpretation of data; 2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content; 3) final approval of the version to be published; and 4) agreement to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Once the *Journal of Periodontology* has received a manuscript, any changes in authorship must be e-mailed to [jerry@perio.org](mailto:jerry@perio.org) and must contain the signature of the author who has been added or removed from the paper. Authors who are added must submit a conflict of interest and financial disclosure form (see below).

### Wiley's Author Name Change Policy

In cases where authors wish to change their name following publication, Wiley will update and republish the paper and redeliver the updated metadata to indexing services. Our editorial and production teams will use discretion in recognizing that name changes may be of a sensitive and private nature for various reasons including (but not limited to) alignment with gender identity, or as a result of marriage, divorce, or religious conversion. Accordingly, to protect the author's privacy, we will not publish a correction notice to the paper, and we will not notify co-authors of the change. Authors should contact the journal's Editorial Office with their name change request.

### *Conflict of Interest and Financial Disclosure Form*

A conflict of interest and financial disclosure form must be submitted by each author (please see the *Journal of Periodontology* Conflict of Interest Form [here](#)) A link to this electronic form will be e-mailed to each author after manuscript submission. Due to this, **all authors are required to have accounts with valid e-mail addresses in [ScholarOne Manuscripts](#)** and be listed as authors for the submitted paper. Submitting authors are able to create accounts for co-authors.

## CLINICAL TRIALS

If your manuscript is reporting a randomized clinical trial, you are required to submit a [CONSORT checklist](#) with your manuscript. More information can be found at [www.consort-statement.org](http://www.consort-statement.org).

All clinical trials must be registered prior to submission to the Journal of Periodontology at one of the registration sites listed below. The registration number and date of registration should be included in the Materials and Methods section. **Starting January 1, 2016, all clinical trials must be registered prior to initiation (i.e., recruitment) of the trial.**

Please see <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/about-studies/learn#WhatIs> for more information regarding clinical trials.

- U.S. National Institutes of Health Clinical Trials Registry - <http://www.clinicaltrials.gov>
- EU Clinical Trials Register - <https://www.clinicaltrialsregister.eu>
- WHO International Clinical Trials Registry Platform - <http://www.who.int/ictrp/en>

## ANIMAL AND HUMAN TRIALS

All manuscripts reporting the use of human subjects must include a statement that the protocol was approved by the author's institutional review committee for human subjects **AND** that the study was conducted in accordance with the Helsinki Declaration as revised in 2013. Do not use any designation in tables, figures, or photographs that would identify a patient, unless written consent from the patient is submitted.

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

## PRODUCT IDENTIFICATION

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

## REVISED MANUSCRIPTS

Revised manuscripts should be submitted online at [ScholarOne Manuscripts](#) by the same author who submitted the original manuscript. Authors have 30 days to submit a revision. Revisions should adhere to the same requirements as original submissions. Additionally:

1. A detailed response to each reviewer comment for the original manuscript should be included. This response should also describe what changes were made in the manuscript to address each comment in the reviews.
2. Only the most recent version of each file should be uploaded. You may have to delete older files from the Author Center.
3. **Please Any modified or added text must be highlighted in yellow in the revised manuscript.**
4. Figures and tables should be resubmitted with revised manuscripts, even if they were not revised.

## REVIEW PROCESS

### *Peer Review*

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

## MANUSCRIPT ACCEPTANCE

All manuscripts accepted for publication become the property of the American Academy of Periodontology. If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to log in to Author Services where, via the Wiley Author Licensing Service (WALS), they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper. Once all forms are received by the editorial office, an unedited version of the accepted manuscript will appear online ahead of print on the journal's website. Once a manuscript is online ahead of print, it is fully citable based on the Digital Object Identifier (DOI) assigned to the manuscript. Manuscripts will be copyedited, published online, and printed in an issue of the *Journal of Periodontology* approximately 4 to 6 months after acceptance.

### ***Copyright Transfer Agreement (CTA)***

If the Open Access option is not selected, the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the [Copyright FAQs](#).

### ***Open Access***

If the Open Access option is selected, the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

- Creative Commons Attribution Non-Commercial License
- Creative Commons Attribution Non-Commercial NoDerivs License
- Research Councils UK (RCUK) and Wellcome Trust authors will use the Creative Commons Attribution License

Please visit the terms and conditions of these open access agreements [here](#).

If you select the Open Access option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK), you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and RCUK requirements. For more information on this policy and the journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

American Academy of Periodontology members receive a discount on open access fees. Visit Wiley's [hybrid open access](#) and [pricing](#) pages for more information.

### ***Reprints***

Corresponding authors may purchase reprints at the time pages are received for proofreading.

### **Funding Agency Requirements**

Consistent with current policies, authors who have papers based on funded research accepted for publication in the *Journal of Periodontology* may make their final accepted paper or published article available to agency depositories. However, authors should indicate that the paper may not be released publicly until 12 months following final publication in an issue.

Authors are responsible for complying with all funding agency requirements.

## ANEXO 2

FACULDADE INGÁ /  
UNINGÁ/PR

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICAS E CELULARES DE MEMBRANAS DE PRF

**Pesquisador:** Polyane Mazucatto Queiroz

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 44398821.8.0000.5220

**Instituição Proponente:** Faculdade Ingá / UNINGÁ/PR

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 4.668.021

**Apresentação do Projeto:**

De acordo com as informações apresentadas na PB\_Informações básicas do projeto apresentada pelo pesquisador Polyane Mazucatto Queiroz, no projeto intitulado AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICAS E CELULARES DE MEMBRANAS DE PRF, versão 1, submetido dia 05/03/2021, CAAE nº 44398821.8.0000.5220: Após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Centro Universitário Ingá – UNINGÁ e assinados os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), doze indivíduos do gênero masculino, saudáveis, realizarão a doação de sangue para esta pesquisa. Os voluntários devem apresentar idade entre 18 e 60 anos, não fazer uso sistêmico de anticoagulante ou qualquer outra medicação nas últimas quatro semanas. Além disso, os voluntários não devem ser portadores de doenças sistêmicas, não podem fazer uso de bebidas alcoólicas, tabaco ou qualquer outra droga. Em uma primeira análise, serão incluídos os pacientes dentro da faixa etária, que se

**Endereço:** Rodovia BR 317, n 6114 - Bloco G, Sala 24  
**Bairro:** Saída para Astorga **CEP:** 87.035-510  
**UF:** PR **Município:** MARINGÁ  
**Telefone:** (44)3033-5040 **Fax:** (44)3225-5009 **E-mail:** comitedeetica@uninga.edu.br

FACULDADE INGÁ /  
UNINGÁ/PR



Continuação do Parecer: 4.668.021

declararem normosistêmicos, não realizarem uso de qualquer medicamento e apresentar a pressão arterial dentro dos padrões de normalidade. Desses indivíduos, serão coletadas 10 amostras de sangue em tubos de 9 ml, seguindo os protocolos de coleta e biossegurança conforme preconizados no Manual da Organização Mundial da Saúde (OMS): "Diretrizes da OMS para tiragem de sangue: boas práticas em flebotomia". A coleta de sangue será realizada por um profissional capacitado em venopunção.

As análises para inclusão dos pacientes serão pautadas nos protocolos nacionais das suas respectivas academias, portanto, a partir de um tubo de sangue serão realizadas as avaliações do hemograma completo, teste para coagulação, hemoglobina glicada e pressão arterial. Serão excluídos os indivíduos que apresentarem seus exames incompatíveis com o padrão de normalidade nos testes realizados.

#### Objetivo da Pesquisa:

De acordo com as informações apresentadas na PB\_Informações básicas do projeto apresentada pelo pesquisador Polyane Mazucatto Queiroz, no projeto intitulado AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICAS E CELULARES DE MEMBRANAS DE PRF, versão 1, submetido dia 05/03/2021, CAAE nº44398821.8.0000.5220, os objetivos da pesquisa são: Objetivo Primário: Avaliar as características físicas e celulares de membranas de PRF considerando diferentes intervalos de tempo transcorridos entre a preparação e o uso clínico, e considerando diferentes centrífugas disponíveis comercialmente

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

De acordo com as informações apresentadas na PB\_Informações básicas do projeto apresentada pelo pesquisador Polyane Mazucatto Queiroz, no projeto intitulado AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICAS E CELULARES DE MEMBRANAS DE PRF, versão 1, submetido dia 05/03/2021, CAAE nº44398821.8.0000.5220, os riscos e benefícios da pesquisa são: Riscos:

Endereço: Rodovia BR 317, n 8114 - Bloco G, Sala 24  
 Bairro: Saída para Astorga CEP: 87.035-510  
 UF: PR Município: MARINGÁ  
 Telefone: (44)3033-5040 Fax: (44)3225-5009 E-mail: comitedeetica@uninga.edu.br



FACULDADE INGÁ /  
UNINGÁ/PR



Continuação do Parecer: 4.668.021

Os riscos do presente estudo são os mesmos que podem acontecer durante qualquer procedimento de flebotomia. O paciente será previamente avaliado por anamnese e só será voluntário o indivíduo sem alteração sistêmica prévia. O voluntário será previamente orientado sobre todos os possíveis riscos da sua participação.

Existe a possibilidade de contaminação durante o procedimento de flebotomia. Contudo, o operador responsável tomará todos os cuidados de biossegurança, conforme preconizado pela OMS, para evitar qualquer contaminação. Caso ocorra a contaminação, os pesquisadores serão responsáveis pelo encaminhamento e acompanhamento do paciente conforme a necessidade. Além disso, o indivíduo está sujeito a um desconforto durante o procedimento. A flebotomia será realizada por um profissional capacitado e experiente a fim de gerar o mínimo de desconforto possível.

Como todo processo de coleta de sangue, o indivíduo está sujeito a hemorragia, hematomas e edemas na região. No entanto, o profissional realizará todos os cuidados para otimizar o processo de hemostasia e minimizar qualquer dano. Além disso, o profissional é capacitado e estará preparado para resolver qualquer possível intercorrência.

Outro risco a qual o paciente está sujeito é em relação a exposição de sua identidade. No entanto, os pesquisadores asseguram total sigilo e preservação da identidade do paciente e/ou de qualquer informação que possa identificá-lo.

**Benefícios:**

Como benefício ao voluntário, o mesmo receberá uma cópia de todos os exames realizados e será orientado e encaminhado para busca de atendimento médico conforme a necessidade. Além disso, espera-se que com os resultados do presente estudo, a comunidade de modo geral e o

Endereço: Rodovia BR 317, n 6114 - Bloco G, Sala 24  
Bairro: Saída para Astorga CEP: 87.035-510  
UF: PR Município: MARINGÁ  
Telefone: (44)3033-5040 Fax: (44)3225-5009 E-mail: comitedeetica@uninga.edu.br

FACULDADE INGÁ /  
UNINGÁ/PR



Continuação do Parecer: 4.668.021

indivíduo voluntário possam se beneficiar no futuro pelos resultados do presente estudo como uma forma de otimizar a conduta clínica do preparo e manejo da PRF.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

De acordo com as informações apresentadas na PB\_ Informações básicas do projeto apresentada pelo pesquisador Polyane Mazucatto Queiroz, no projeto intitulado AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICAS E CELULARES DE MEMBRANAS DE PRF, versão 1, submetido dia 05/03/2021, CAAE nº44398821.8.0000.5220, trata-se de estudo nacional prospectivo. Patrocínio: financiamento próprio. 12 Participantes brasileiros. Início previsto para 01/06/2021 e término em 31/05/2022.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Foram apresentados todos os termos.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

De acordo com as informações apresentadas na PB\_ Informações básicas do projeto apresentada pelo pesquisador Polyane Mazucatto Queiroz, no projeto intitulado AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICAS E CELULARES DE MEMBRANAS DE PRF, versão 2, submetido dia 25/03/2021, CAAE nº 44398821.8.0000.5220: a pesquisadora apresenta carta de resposta ao primeiro parecer (nº4.601.573):

Pendência: Riscos: explicar quais são os riscos que o pesquisado estará exposto durante a flebotomia.

Resposta ao Comitê: São apontados como riscos aos quais o indivíduo colaborador estará submetido durante a flebotomia:

- Hematoma: É um acúmulo de sangue extravasado sob a pele. O hematoma pode decorrer de uma venopunção imperfeita com angulação muito acentuada, dupla punção da veia ou ainda por pressão insuficiente na região após a coleta das amostras.
- Reação vaso-gaval: É um reflexo involuntário em que ocorre bradicardia com redução da pressão arterial, haverá privação parcial de sangue para o cérebro e ocorre o episódio de desmaio. Essa alteração pode ser decorrente da ansiedade do voluntário, quadro de hipoglicemia ou falta de líquido.
- Desmaio retardado (síncope): É um episódio de desmaio que pode ocorrer de uma a quatro horas após a coleta das amostras de sangue. A síncope pode ser

Endereço: Rodovia BR 317, n 6114 - Bloco G, Sala 24  
Bairro: Saída para Astorga CEP: 87.035-510  
UF: PR Município: MARINGÁ  
Telefone: (44)3033-5040 Fax: (44)3225-5009 E-mail: comitedeetica@uninga.edu.br

FACULDADE INGÁ /  
UNINGÁ/PR



Continuação do Parecer: 4.668.021

decorrente de situação de estresse ou ingestão insuficiente de líquido (queda do volume).

- Perfuração arterial: É a perfuração indesejada da artéria braquial devido a relação de proximidade da artéria com a veia.
- Comprometimento de nervo: Dor ou parestesia que pode estar associada a perda motora ou sensorial. Ocorre devido ao acometimento de terminações nervosas durante a punção.

Pendência: Riscos: explicar detalhadamente quais são os protocolos da OMS para minimizar os riscos.

Resposta ao Comitê: Para evitar/minimizar a manifestação de riscos, os protocolos a serem seguidos para cada risco apresentado:

- Hematoma: Após a coleta deve-se fazer a pressão e colocação do curativo com firmeza e instruir que o voluntário evite levantar objeto pesado.
- Reação vaso-gaval: Esclarecer sobre o procedimento, tranquilizar o voluntário e instruir sobre ingestão normal de água antes da coleta.
- Desmaio retardado (síncope): Tranquilizar o voluntário e instruir sobre ingestão normal de água antes e após a coleta.
- Perfuração arterial: Localização correta da veia e inclinação adequada da agulha. Caso ocorra a perfuração (identificada pelo sangue vermelho vivo e de fluxo rápido) a coleta deve ser interrompida, aplicar pressão firme por pelo menos 15 minutos e, se necessário, entrar em contato com serviço médico.
- Comprometimento nervoso: Tranquilizar o voluntário, localização correta da veia e inclinação adequada da agulha. Caso ocorra comprometimento com perda motora ou sensorial, orientar e observar remissão espontânea esperada em até 24 horas.

Pendência: TCLE: adotar linguagem para que um leigo entenda quais são os riscos aos quais ele estará exposto durante a flebotomia.

Resposta ao Comitê: Em relação aos riscos no TCLE foram reescritos buscando uma linguagem mais simples. As adequações realizadas estão transcritas abaixo:

“Os riscos aos quais estará sujeito são os mesmos envolvidos em qualquer coleta de sangue, como realizada para exames médicos. O profissional que vai fazer a sua coleta é habilitado e com experiência em coleta de sangue. O

Endereço: Rodovia BR 317, n 6114 - Bloco G, Sala 24  
 Bairro: Saída para Astorga CEP: 87.035-510  
 UF: PR Município: MARINGÁ  
 Telefone: (44)3033-5040 Fax: (44)3225-5009 E-mail: comitedeetica@uninga.edu.br

FACULDADE INGÁ /  
UNINGÁ/PR



Continuação do Parecer: 4.668.021

profissional seguirá todos os cuidados preconizados pela Organização Mundial da Saúde, para evitar qualquer dano. Entretanto, observamos que há a possibilidade de ocorrer riscos e desconfortos relacionados com a coleta de sangue, ainda que raros e passageiros, como hematoma (mancha vermelha/arroxeada sob a pele) após a coleta, desmaio durante ou após a coleta do sangue, perfuração de alguma artéria da região ou ainda de algum nervo que pode causar uma perda de sensibilidade temporária na região. Apesar de raros e passageiros, caso ocorra alguma dessas complicações, você terá todo o suporte e acompanhamento da nossa equipe de pesquisadores.”

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Ressalta-se que cabe ao pesquisador responsável encaminhar os relatórios parciais e final da pesquisa, por meio da Plataforma Brasil, via notificação “relatório” para que sejam devidamente apreciados no CEP, conforme Norma Operacional CNS nº 001/13, item XI, 2.d.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1711703.pdf	25/03/2021 11:21:33		Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	Respostaaoparecer.pdf	25/03/2021 11:21:08	Polyane Mazucatto Queiroz	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_adequacoes.pdf	25/03/2021 11:20:30	Polyane Mazucatto Queiroz	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projetodepesquisa.pdf	05/03/2021 17:33:49	Polyane Mazucatto Queiroz	Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRosto_assinaturas.pdf	05/03/2021 17:33:30	Polyane Mazucatto Queiroz	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

Endereço: Rodovia BR 317, n 6114 - Bloco G, Sala 24  
 Bairro: Saída para Astorga CEP: 87.035-510  
 UF: PR Município: MARINGÁ  
 Telefone: (44)3033-5040 Fax: (44)3225-5009 E-mail: comitedeetica@uninga.edu.br