

Carolina dos Santos Santinoni

Reparo ósseo de defeitos de tamanho crítico tratados com aspirado de medula óssea associado ou não a terapia com laser em baixa intensidade. Estudo imunohistoquímico em calvárias de ratos

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – UNESP, para a obtenção do Título de “DOUTOR EM ODONTOLOGIA” – Área de Periodontia

Orientadora: Professora Adjunto Maria José Hitomi Nagata
Co-Orientadores: Professor Titular Valdir Gouveia Garcia
Professor Assistente Dr. Edilson Ervolino

ARAÇATUBA – SP

2015

Catálogo na Publicação (CIP)
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

S235r Santinoni, Carolina dos Santos.
Reparo ósseo de defeitos de tamanho crítico tratados com aspirado de medula óssea associado ou não a terapia com laser em baixa intensidade : estudo imunoistoquímico em calvárias de ratos / Carolina dos Santos Santinoni. - Araçatuba, 2015
99 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientadora: Profa. Maria José Hitomi Nagata
Coorientador: Prof. Valdir Gouveia Garcia
Coorientador: Prof. Edilson Ervolino

1. Células-tronco 2. Medula óssea 3. Lasers 4. Terapia a laser de baixa intensidade 5. Regeneração óssea 6. Imuno-histoquímica I. T.

Black 6
CDD 617.63

Carolina dos Santos Santinoni

Nascimento: 27.04.1987 – Dracena/SP

Filiação: Vanderlei Santinoni

Ana Alice dos Santos Santinoni

2006-2009: Curso de Graduação em Odontologia

Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP

2010-2012: Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de
Periodontia

Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP

2012-2015: Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de
Periodontia

Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP



Dedicatória

A *Deus*

Inicialmente, agradeço pelo dom da vida e por todas as bênçãos que me foram concedidas enquanto caminhava em direção à realização deste sonho. Quero agradecer, também, por Teu amor incondicional pois mesmo nos momentos em que me afastei de Ti, sei que estive ao meu lado me apoiando e me carregando nos braços nos momentos de fraqueza.

Obrigada por cada que vez que achei que não iria suportar e venci. Obrigada por cada vez que achei que eu não iria levantar e o Senhor me colocou ainda mais alto. Quero continuar caminhando ao Teu lado por toda minha vida. Teu amor é o que me faz seguir em frente.

“Para os dias bons: sorrisos; para os dias ruins: paciência; para todos os dias: Fé.”

Aos meus *Pais, Vanderlei e Ana*

Não poderia deixar de dedicar este trabalho a vocês pois essa é uma vitória nossa! Vocês me apoiaram em todas as minhas decisões, vibraram com minhas conquistas e estiverem ao meu lado em todos os momentos! O meu objetivo maior de vida é dar orgulho à vocês e corresponder à toda dedicação e amor que vocês nos deram durante toda nossa vida. Obrigada por serem esses pais maravilhosos! Amo vocês!

“Se eu vi mais longe, foi por estar de pé sobre ombros de gigantes.”

Isaac Newton

A Minha irmã Juliana, meu cunhado Bruno e meu sobrinho Joaquim

Agradeço por vocês terem me apoiado em toda a minha caminhada. Minha irmã, você sempre foi o meu exemplo de inteligência e dedicação. Você e o Bruno estiveram presentes em nossa família muitas vezes quando eu tive que me ausentar. Ao Joaquim, agradeço por sua chegada em nossas vidas de surpresa, certamente como um presente de Deus para aumentar ainda mais o amor que cerca nossa família e para nos ensinar o verdadeiro sentido do amor incondicional. Amo vocês!

“Só se vê bem com o coração, o essencial é invisível aos olhos.”

Antoine de Saint-Exupéry

Ao meu Amor, Daniel

Se hoje eu cheguei até aqui, certamente foi motivada e impulsionada por seu amor, apoio, doação e companheirismo... Nós tropeçamos diversas vezes e levantamos juntos, sem deixar que os obstáculos nos fizessem desistir dos nossos sonhos... Com você, pude aprender o verdadeiro significado do amor. Obrigada por ter compartilhado sua experiência, por compreender minhas ausências, pela paciência e por querer sempre o melhor de mim e para mim. Você tem o dom de me fazer bem pelo simples fato de estar presente em minha vida. Obrigada por estar sempre ao meu lado. Agradeço, também, a Deus por ter a oportunidade de ter alguém tão especial em minha vida e pela Fé que compartilhamos. Amo você!

“As melhores e as mais lindas coisas do mundo não se pode ver nem tocar.

Elas devem ser sentidas com o coração.”

Charles Chaplin



*Agradecimentos
Especiais*

Agradecimentos Especiais

À minha Orientadora,

Maria José Hitomi Nagata,

Quero agradecer-lá pela oportunidade de ter me tornado Mestre e Pesquisadora. Pelos ensinamentos compartilhados e pela oportunidade de ter crescido profissionalmente caminhando ao seu lado. Durante este Curso de Doutorado, eu pude aprender coisas diferentes com cada pessoa que passou por minha vida. Com a senhora, em especial, aprendi a importância da ética, de conduzir a vida acadêmica, profissional e pessoal com seriedade e honestidade, e a importância de se trabalhar com muita atenção e paciência nos detalhes que fazem toda a diferença para a execução de um trabalho de qualidade.

A senhora me deu oportunidades únicas que serão lembradas por mim para sempre, com muita gratidão. Trabalhando ao seu lado, eu pude acompanhar de perto a rotina de ser Pesquisador e pude confirmar que fiz a escolha certa para minha vida e agora seguirei em frente em busca da minha realização profissional.

Muito obrigada pela oportunidade de realização deste sonho!

“Ser Professor é ser condutor de almas e de sonhos...”

Gabriel Chalita

Agradecimentos Especiais

Ao meu Co-Orientador, Professor Dr. Valdir G. Garcia,

Durante o Curso de Doutorado, tive a honra de tê-lo como meu Co-Orientador oficialmente. Um Docente e Pesquisador tão competente e tão importante para a Periodontia nacional e mundial. Agradeço imensamente por toda ajuda dispensada durante todo o curso de Pós-Graduação, com ensinamentos científicos, clínicos e para a vida pessoal.... Sou muito grata por sempre me receber com tanto carinho e respeito nos momentos de dúvida. Muito obrigada por toda contribuição no desenvolvimento deste trabalho e em minha formação acadêmica e pessoal!

Ao meu Co-Orientador, Prof. Dr. Edilson Ervolino,

Agradeço não só pela contribuição em minha formação profissional mas também por toda dedicação que o senhor teve comigo e com a execução deste trabalho. Durante o Curso de Doutorado, eu tive mais certeza que o senhor tem o verdadeiro dom de ser Mestre! O amor que o senhor tem pela profissão que exerce é nítido e admirável e o carinho que o senhor tem para ensinar seus alunos será lembrado para sempre por mim como um exemplo a ser seguido na carreira acadêmica. Muito obrigada por seus ensinamentos, sua dedicação e por sua contribuição durante a execução deste e de todos os outros trabalhos que realizamos juntos. Espero que, onde quer que eu esteja, possamos continuar trabalhando em equipe!

“Ser professor é semear em terreno sempre fértil e se encantar com a colheita.”

Gabriel Chalita

Agradecimentos Especiais

Pela contribuição em minha Formação Profissional,

Professor Dr. Alvaro F. Bosco,

O senhor é um exemplo para mim como Profissional, Docente, Pesquisador e ser humano. Com muito mérito, o senhor é reconhecido por sua extrema competência clínica. Com tanta generosidade, o senhor me presenteou com seus ensinamentos durante a pós-graduação, compartilhando seu conhecimento adquirido com tantos anos de experiência. Agradeço imensamente por toda ajuda durante os cursos de Mestrado e Doutorado e por me permitir ter o orgulho de dizer que sou sua aluna. O senhor me fez amar ainda mais a Periodontia....

Professora Dra. Leticia H. Theodoro,

Muito obrigada por toda ajuda dispensada durante o curso de Pós-Graduação, seja com ensinamentos científicos, clínicos ou para a vida pessoal. Foi uma honra poder contar com uma Pesquisadora tão competente em minha formação acadêmica. Durante meu curso de Doutorado, quando tivemos a oportunidade de trabalhar mais próximas, pude acompanhar com a senhora uma forma muito dinâmica de trabalhar, que certamente será sempre lembrada por mim na vida profissional.

A senhora e o Prof. Valdir nos permitiram compartilhar com vocês momentos de muita alegria. Dividiram com seus alunos o seu lar, seus conhecimentos e muitos exemplos de vida. Muito obrigada por tudo!

Professor Dr. Juliano Milanezi de Almeida,

Obrigada por todos os conhecimentos compartilhados, por estar sempre disposto a nos ajudar e por ser para nós exemplo de dedicação profissional. Os ensinamentos clínicos e científicos que você compartilhou comigo durante o curso de Doutorado, quando tivemos um contato maior, me fizeram crescer muito como profissional e como pessoa. Muito obrigada pela contribuição em minha formação acadêmica e pessoal!

Professora Dra. Suely R. Mogami Bomfim,

Agradeço infinitamente pelo auxílio profissional, sem o qual esse trabalho não seria realizado. A senhora assumiu meu trabalho como seu, realizando vários procedimentos quando nem eu pude estar presente. Portanto, esta vitória também é da senhora! Muito obrigada por tanta generosidade. A senhora recebeu a mim e a minha família como a Profissional de excelência que é e serei eternamente grata! A considero muito mais que uma Pesquisadora Colaboradora de nossos trabalhos. És uma amiga por quem eu torço muito e que desejo ter sempre por perto! Muito obrigada por tudo!

Professor Stephen E. Fucini,

Agradeço pelos momentos em que compartilhou sua experiência profissional e pelos ensinamentos clínicos e científicos, pelas traduções e pelas aulas de Periodontia e Implantodontia... Pela doação de materiais e por compartilhar nossas conquistas sempre com entusiasmo e alegria.

“A tarefa essencial do Professor é despertar a alegria de trabalhar e de conhecer.”

Albert Einstein

Agradecimentos Especiais

Pela contribuição no Desenvolvimento deste Trabalho,

Amiga Adrieli de Paula Neves,

Você se tornou orientada da Profa. Maria José por acaso... e foi um presente de Deus para mim! Ele sabia que eu ia precisar de uma pessoa tão companheira para desenvolver minhas atividades no Doutorado... E pra minha sorte, além de tudo, você se mostrou essa pessoa cheia da graça de Deus, iluminando a vida daqueles que a cercam com sua alegria, tornando as atividades do dia-a-dia muito mais leves e divertidas... A convivência com você me fez crescer muito como pessoa... Por seu jeito de encarar a vida com tanta generosidade, pelo amor que tem pelas pessoas e por sua Fé.

Dizer apenas “obrigada” por tudo que você fez por mim, por toda ajuda dispensada seria pouco... Minha gratidão será eterna! Saiba que, onde quer que você esteja, pode contar comigo com a mesma intensidade que pude contar com você incondicionalmente quando precisei... Você é uma amiga que estará pra sempre no meu coração!

Amigo Fôilson de Barros Lellis,

Você contribuiu direta e indiretamente para a realização deste trabalho. Sempre disposto a me auxiliar nos afazeres do dia-a-dia, do laboratório, da Graduação ou da Pós-Graduação. Com sua ajuda e companheirismo, a caminhada para chegar até aqui foi muito mais simples! Obrigada por ser essa pessoa competente, amiga e tão fácil de conviver. Foi uma honra poder trabalhar com você.... Você se tornou um grande amigo. Onde quer que estejamos no futuro, pode contar sempre comigo!

Mestrandas Eduarda e Diana,

Vocês se tornaram minhas companheiras de Pós-Graduação no final do meu Curso de Doutorado, mas nem por isso foram menos importantes. Trabalhamos juntas em diversas atividades e pude contar com vocês em todos os momentos para a execução do meu trabalho e de todos os outros que desenvolvemos juntas. Muito obrigada pela amizade, pelo companheirismo e por me permitirem colocar em prática aquilo que eu venho buscando durante a pós-graduação: compartilhar meus conhecimentos.

A convivência com vocês foi sempre muito agradável e tornou meus dias mais alegres! Muito obrigada por tudo!

“Unir-se é um bom começo. Manter a união é um progresso.

Trabalhar em conjunto é uma vitória.”

Henry Ford

Médico Veterinário Breno F. Martins de Almeida,

Agradeço por seu auxílio profissional sem o qual esse trabalho não seria realizado. Você dividiu o pouco tempo que você tinha disponível para cuidar dos seus experimentos com o desenvolvimento do meu Projeto. Juntamente com a Profa. Suely, assumiu meu trabalho como de vocês, desenvolvendo várias atividades em momentos que nem eu mesma pude estar presente. Lutamos juntos para fazer com que este trabalho desse certo e para que eu pudesse chegar aqui hoje. Muito obrigada pela disponibilidade, pela generosidade e pelos momentos de convivência agradável.

“Sempre fica um pouco de perfume nas mãos de quem oferece flores.”

Provérbio Chinês



Agradecimientos

Agradecimentos

Pela possibilidade de Realização do Curso de Doutorado,

À Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, nas pessoas de sua Diretora Professora Dra. Ana Maria Pires Soubhia e Vice-Diretor Professor Dr. Wilson Roberto Poi,

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, nas pessoas de sua Coordenadora Profa. Dra. Maria José Hitomi Nagata e Vice-Coordenador Prof. Dr. Celso Koogi Sonoda, por trabalharem com garra, determinação e generosidade em busca do bem comum aos pesquisadores de nosso Programa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão da Bolsa de Doutorado à pós-graduanda Carolina dos Santos Santinoni.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pela concessão da Bolsa de Doutorado (Processo Nº 2012/15138-5) a pós-graduanda Carolina dos Santos Santinoni.

A todos os funcionários de todos os setores da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, por proporcionarem o bom funcionamento desta instituição.

Agradecimentos

Pelo Amor e pela Amizade Incondicionais,

Meus Familiares, Avó Maria, Tios e Tias, Primos e Primas...

Os anos passaram e a infância ficou na lembrança... Hoje, os caminhos seguidos por cada um de nós foram diferentes e tantas vezes nos impediram de nos encontrar. Mas permanecemos sempre juntos em nossos corações, compartilhando o amor fraterno que nos une e fazendo com que em cada reencontro, as horas que foram roubadas de nosso convívio fossem esquecidas e recompensadas pela alegria de estarmos juntos. Obrigada pela torcida, pelo apoio e pelo amor incondicional.

Meus Sogros, D. Cida e Sr. Argeu, Cunhados Thiago, Raquel, e Carol, sobrinho

Arthur e Familiares...

Agradeço por terem me acolhido como membro de uma família tão bonita. Pela amizade, pelo carinho e por compartilharem minhas vitórias. Também agradeço pelo bem precioso que uniu nossas vidas.

“Deus é família e a família é o caminho da esperança.”

Autor desconhecido

Amiga Bruna Soares,

Aprendemos a viver sem cobranças, aproveitando a liberdade para nutrir a saudade que torna nossa amizade tão especial! Ainda que estivéssemos distantes, você se fez presente em todos os momentos importantes da minha vida, comemorou minhas vitórias e me deu apoio nos momentos de dificuldade. As circunstâncias da vida me fizeram ter poucos, mas verdadeiros amigos como você, com quem eu sei que sempre posso contar. A alegria com que você compartilha comigo minhas conquistas é rara.

Peço desculpas pelas longas ausências em que eu tive que me dedicar integralmente ao meu curso e agradeço por compreender que isso fazia parte da minha caminhada para realização de um sonho.

" Nenhum caminho é longo demais quando um amigo nos acompanha. "

Autor desconhecido

Amiga Renata,

Fomos companheiras de casa, de vida, de alegria, de aprendizado, de frustrações e da luta em busca dos sonhos... Você é a pessoa de mais fácil convivência com quem já dividi os meus dias em toda minha vida! Sempre disposta a renovar o astral com momentos alegria mesmo quando estávamos sem forças para seguir em frente! A sua amizade é especial demais para mim! Obrigada pela convivência agradável e pela disponibilidade incansável.

" Não importa quanta seriedade a vida exija de você, cada um de nós precisa de um amigo brincalhão para se divertir. "

William Shakespeare

Amigos Natália de Campos Kajimoto e Alberto Kajimoto

À amiga Nati, obrigada pela amizade, por todo conhecimento e paciência compartilhados e todo o tempo que você dedicou a mim durante todo o período que convivemos. Eu devo muito a você por todo meu crescimento profissional e pessoal durante a Pós-Graduação. Ao Alberto, agradeço pela amizade sincera, pela convivência sempre agradável, pela paciência e por compreender os momentos de ausência em que a Nati teve que estar presente na faculdade. Sem seu companheirismo, certamente não teríamos chegado ao final de nossa batalha na Pós-Graduação. Desejo toda felicidade do mundo à vocês! Contem sempre comigo!

Amiga Paula L. Faleiros

Durante o Doutorado nossa amizade se fortaleceu... E como foi bom contar com sua alegria e competência durante as clínicas de Pós-Graduação. Você carregou a nossa clínica praticamente sozinha durante todo o meu Doutorado, sempre cuidando de todos os preparativos e me incentivando a superar minhas dificuldades, com tanta generosidade. Sem seu apoio, eu jamais teria conseguido concluir este curso com toda a experiência clínica que estou concluindo. Nós traçamos metas e conseguimos alcançá-las trabalhando sempre juntas! E que continue assim para sempre... Trabalhando juntas, dividindo experiências, dúvidas, “artes”, alegrias, tristezas e tudo que vier! Você será uma amiga pra vida toda! Muito obrigada por tudo!

“E amigo é isso: aquele que a presença conforta...”

Autor desconhecido

Amiga Natália M. Pola

Acredito que a maior satisfação que um “Mestre” deve ter seja a de ver seus “Discípulos” aprendendo a caminhar sozinhos, desenvolvendo tudo aquilo que lhes foi ensinado. E posso dizer que você fez isso muito bem comigo... Grande parte da minha formação acadêmica eu devo a você. Durante o meu curso de Mestrado, você preparou todo o terreno para que eu pudesse caminhar sozinha, plantar e colher bons frutos durante o meu curso de Doutorado. Obrigada por toda dedicação enquanto estivemos trabalhando juntas e por toda atenção que teve comigo mesmo com a grande distância. Desejo todo sucesso profissional e pessoal a você. Que você realize todos os seus sonhos!

Professores e Amigos Michel Messoria e Flávia Furlaneto Messoria

Em cada contato, a certeza de sempre poder contar com vocês. Mesmo com tantos afazeres relacionados às suas próprias atividades, eu nunca ouvi uma resposta negativa de vocês. Sempre atenderam aos nossos pedidos e necessidades com generosidade, aos sábados, domingos e feriados... Em qualquer momento necessário, vocês estavam lá! E eu tive a felicidade de poder retribuir um pouco de toda essa generosidade no tempo em que a Flavinha esteve aqui na nossa Faculdade e eu pude me aproximar um pouco mais de vocês.

Obrigada pela contribuição para minha formação acadêmica, por toda ajuda dispensada para que este e tantos outros trabalhos pudessem ser realizados, pela amizade incondicional e pela confiança depositada a mim. Minha eterna e sincera gratidão!

“Aqueles que passam por nós não vão sós. Deixam um pouco de si...

Levam um pouco de nós...”

Antoine de Saint-Exupéry

Amigos Ana Carolina, Josecarlos e Davi,

Como a amizade de vocês é importante para mim! A família que vocês constituíram é um exemplo de que o amor supera tudo! Obrigada por dividirmos momentos tão especiais e alegres juntos.

Professor e Amigo Fellippo R. Verri e Amiga Ana Caroline G. Verri

Ao Fellippo, agradeço por toda contribuição para minha formação e por sempre nos impulsionar na direção da realização de nossos sonhos. Você se tornou um exemplo de Docente e de Profissional a ser seguido por nós, por toda sua dedicação, competência e generosidade. Você trabalha com humanidade, tendo uma grande consideração por todos aqueles que o cercam e se tornou um exemplo de pessoa e de profissional para mim. À amiga Carol, por ser tão querida e companheira em todos os momentos. Pelos momentos de convivência agradável e pela cumplicidade. Ao casal, por nossa amizade e por nos proporcionar tantos momentos de alegria na presença de vocês, que serão inesquecíveis!

*“A amizade é uma predisposição recíproca que torna dois seres igualmente ciosos da
felicidade um do outro.”*

Platão

Pós-Graduandos da Periodontia

Mariellen, Erivan e Vivian...

Nós caminhamos juntos durante um longo período na Pós-Graduação. Compartilhamos diversos momentos de nossas vidas... de alegria, de dificuldade, de ansiedade, de frustração, de felicidade, de conquista.... É impossível pensar em tudo que eu vivi na Periodontia e não lembrar de vocês que foram meus amigos, minha família e meus colegas de trabalho de maneira tão intensa durante todos estes anos. Obrigada por toda cumplicidade, companheirismo, amizade e pelos momentos que vivemos juntos! Só consegui chegar ao final desta etapa porque em meu caminho pude contar com a presença de pessoas tão especiais!

“Todas as riquezas do mundo não valem um bom amigo.”

Autor desconhecido

Náida e Fabrizio...

Obrigada pela convivência agradável e pela amizade que construímos durante o desenvolvimento de nossas atividades na Pós-Graduação. Vocês se tornaram não só meus colegas de trabalho, mas amigos com quem eu quero conviver para sempre!

Alessandra e Márcio...

Obrigada pelos momentos agradáveis que vivemos durante o nosso curso. Muitas vezes nossa vida acadêmica se torna uma caminhada difícil e nessas horas, poder contar com os amigos para momentos de diversão e descontração é muito importante. Obrigada!

Estagiários da Periodontia, em especial Nayara Y. Hano e Michele M.A.E. Maria

Por poder contar com o auxílio e disponibilidade de vocês nas atividades do dia-a-dia é que podemos desenvolver todas as nossas obrigações com dinamismo. Vocês nos dão oportunidade de exercer a Docência que é o que estamos buscando aprender durante a realização do curso de Pós-Graduação. Além disso, é graças aos seus Projetos e Trabalhos de Conclusão de Curso que aprimoramos o “ser Pesquisador”, ampliando os nossos conhecimentos e praticando a redação de textos científicos, planejando e executando os trabalhos de pesquisa... Por todas essas razões, não poderia deixar de agradecer a todos vocês! Muito obrigada!

Pós-Graduandos da Prótese

Ajomar, Ceidiel, Carol Cantieri e Víctor...

Muito obrigada pela amizade, pelo companheirismo e pelos bons momentos que compartilhamos durante os congressos, as viagens, as festas, os estudos e muito trabalho. Vocês foram minha família e meus colegas de trabalho de maneira tão intensa durante todos estes anos. Obrigada por toda cumplicidade, companheirismo, amizade e pelos bons momentos que vivemos juntos!

“Amigos são a família que Deus nos permite escolher...”

Autor desconhecido

Professor Leandro Araújo Fernandes

Não posso deixar de agradecê-lo pelo meu curso de Doutorado pois foi graças à sua disponibilidade incondicional aos Professores de Araçatuba que eu pude finalizar o meu Mestrado e iniciar o caminho trilhado até aqui. Sua gratidão à casa em que se formou será para sempre lembrados por mim como um exemplo a ser seguido. Muito obrigada pela possibilidade de realização do meu Curso de Doutorado!

Professora Sandra H. P. de Oliveira

A senhora me acolheu nos tempos de dificuldade da execução deste trabalho, como um guia que tem o conhecimento para nos ajudar a trilhar um caminho desconhecido. Muito obrigada por toda consideração que a senhora teve comigo, por me apoiar e se preocupar em me proporcionar os conhecimentos que eu precisava para poder executar o meu trabalho.

Dr. Mario Nagata e Sra. Hermínia Nagata

Pelo carinho e pela atenção que sempre tiveram conosco. Que Deus os abençoe.

Professores e Funcionários do Depto. de Cirurgia e Clínica Integrada

Pela disponibilidade, pelos serviços prestados, pela contribuição em minha formação acadêmica e por todos os anos de trabalho em conjunto, muito obrigada!

Professores e Funcionários do Depto. de Materiais Odontológicos e Prótese

Agradeço pela contribuição em minha formação acadêmica, pela amizade que nos possibilita aprender sempre mais e pelo carinho com que sempre me receberam.

Professores e Funcionários do Depto. de Ciências Básicas

Por dividirem sua casa, sempre com tanto carinho e generosidade. Os trabalhos desenvolvidos junto ao departamento foram muito importantes para nosso crescimento científico. Muito obrigada!

Funcionários da Faculdade de Odontologia de Araçatuba...

Sr. Adair Vicente, do Depto. de Cirurgia e Clínica Integrada

Pela confiança depositada, pela possibilidade de aprender novas técnicas na prática clínica, pela contribuição no desenvolvimento de tantos trabalhos e por estar sempre pronto para ajudar com muita alegria. Muito obrigada por sua eficiência, dedicação e preocupação com nossas tarefas.

Sr. Arnaldo, da Seção de Atividades Auxiliares

Por ter auxiliado no cuidado dos animais com tanto carinho e eficiência, sua colaboração foi muito importante para a realização desse trabalho.

Marina, Diogo, Valéria, Cristiane e Lilian, da Seção Técnica Acadêmica

Pelo excelente trabalho, por toda atenção dispensada, pela disposição em sempre nos atender e pela grande competência e eficiência.

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

Do Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP. Obrigada pela prontidão em ajudar!

Professores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia...

Por dividirem seu conhecimento e sua experiência, contribuindo para minha formação e de todos os colegas do Curso de Doutorado em Odontologia.

Colegas do Programa de Pós-Graduação em Odontologia...

Pela troca de conhecimento e amizade demonstrados ao longo do Curso. Obrigada a todos pela ajuda e companheirismo.

Pacientes... Que nos depositando confiança, deram-nos a oportunidade de aprender e a satisfação de tratá-los no decorrer deste curso.

Animais... Por servirem à humanidade com suas vidas.

Àqueles que contribuíram direta ou indiretamente para realização desse trabalho...

Aos amigos não tenham sido mencionados de maneira individual, mas que torcem por mim e que compartilham minhas vitórias...

A todos que, de alguma forma, tenham feito parte da minha vida, enriquecendo o caminho trilhado em minha jornada...

...*Minha sincera Gratidão.*



Epígrafe

*“O mais importante de tudo é nunca deixar
de se perguntar. A curiosidade tem sua
própria razão de existir.”*

Albert Einstein



Resumo

Santinoni CS. **Reparo ósseo de defeitos de tamanho crítico tratados com aspirado de medula óssea associado ou não à terapia com laser em baixa intensidade. Estudo imunoistoquímico em calvárias de ratos** [Tese]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2015.

Este estudo imunoistoquímico avaliou a influência do aspirado de medula óssea (AMO) associado ou não à terapia com laser em baixa intensidade (LLLT) no processo de reparo de defeitos de tamanho crítico (DTC), criados cirurgicamente em calvárias de ratos. 64 ratos foram aleatoriamente distribuídos em 4 grupos: C (controle), AMO, LLLT e AMO/LLLT. Um DTC de 5 mm de diâmetro foi criado na calvária de cada animal. No Grupo C, o defeito foi preenchido com coágulo sanguíneo somente. No Grupo AMO, o defeito preenchido com AMO. Nos grupos LLLT e AMO/LLLT, o defeito recebeu irradiação com laser (InGaAlP laser), foi preenchido com coágulo sanguíneo ou AMO, respectivamente, e irradiado novamente. Os animais foram submetidos à eutanásia aos 15 e 30 dias pós-operatórios. Foram realizadas reações imunoistoquímicas para detecção do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), fator de transcrição relacionado à Runt (Runx2), proteína óssea morfogenética-2 (BMP-2), osteopontina (OPN) e osteocalcina (OCN). Um método semi-quantitativo foi usado para avaliar a imunomarcagem para VEGF. As células PCNA-positivas, Runx2-positivas, BMP-2-positivas, OPN-positivas e OCN-positivas foram quantificadas. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente. Aos 15 dias pós-operatórios, o Grupo LLLT apresentou números de células OPN-positivas e OCN-positivas significativamente maiores que o Grupo C; o Grupo AMO apresentou números de células PCNA-positivas, Runx2-positivas, BMP-2-positivas e OPN-positivas significativamente

maiores do que os grupos C e LLLT, além de número de células OCN-positivas significativamente maior que o controle; o Grupo AMO/LLLT apresentou imunomarcção para VEGF e números de células Runx2-positivas, OPN-positivas e OCN-positivas significativamente maiores que o Grupo C. Aos 30 dias pós-operatórios, o Grupo LLLT apresentou imunomarcção para VEGF e números de células OPN-positivas e OCN-positivas significativamente maiores que o Grupo C; o Grupo AMO apresentou números de células Runx2-positivas, BMP-2-positivas e OCN-positivas significativamente maiores que o Grupo C; o Grupo AMO/LLLT apresentou números de células PCNA-positivas, BMP-2-positivas, OPN-positivas e OCN-positivas significativamente maiores que os grupos C, LLLT e AMO. Pode-se concluir que a terapia combinada de AMO/LLLT acelerou significativamente a produção de mediadores relacionados com proliferação celular e com diferenciação e maturação de osteoblastos, quando comparada ao controle ou a cada tratamento isolado, no processo de reparo de DTC cirurgicamente em calvárias de ratos.

Palavras-chave: medula óssea; células-tronco mesenquimais; terapia a laser em baixa intensidade; regeneração óssea; imuno-histoquímica.



Abstract

Santinoni CS. **Bone healing in critical-size defects treated with bone marrow aspirate combined or not with low-level laser therapy. An immunohistochemical study in rat calvaria** [Thesis]. Araçatuba: Univ Estadual Paulista; 2014.

This immunohistochemical study evaluated the influence of bone marrow aspirate (BMA) combined or not with low-level laser therapy (LLLT) on bone healing in surgically created critical-size defects (CSDs) in rat calvaria. 64 rats were randomly divided into 4 groups: C (control), BMA, LLLT and BMA/LLLT. A 5 mm diameter CSD was created in the calvarium of each animal. In Group C, the defect was filled by blood clot only. In Group BMA, the defect was filled with BMA. In groups LLLT and BMA/LLLT, the defect received laser irradiation (InGaAlP laser), was filled with blood clot or BMA respectively, and irradiated again. Animals were euthanized at either 15 or 30 days postoperative. Vascular endothelial growth factor (VEGF), proliferating cell nuclear antigen (PCNA), runt-related transcription factor-2 (Runx2), bone morphogenetic protein-2 (BMP-2), osteocalcin (OCN) and osteopontin (OPN) immunohistochemical staining were performed. A semi-quantitative method was used to evaluate VEGF immunolabeling. PCNA-positive, Runx2-positive, BMP-2-positive, OPN-positive and OCN-positive cells were quantified. Data were statistically analyzed.

At 15 days postoperative, Group LLLT presented a significantly higher number of OPN-positive and OCN-positive cells than Group C; Group BMA presented a significantly higher number of PCNA-positive, Runx2-positive, BMP-2-positive and OPN-positive cells than groups C and LLLT, and a significantly higher number of OCN-positive cells than control; Group BMA/LLLT presented significantly higher VEGF immunolabeling and number of Runx2-positive, OPN-positive and OCN-positive cells than Group C. At 30 days postoperative,

Group LLLT presented significantly higher VEGF immunolabeling and number of OPN-positive and OCN-positive cells than Group C; Group BMA presented a higher number of Runx2-positive, BMP-2-positive and OCN-positive cells than Group C; Group BMA/LLLT presented a significantly higher number of PCNA-positive, BMP-2-positive, OPN-positive and OCN-positive cells than groups C, LLLT and BMA. It can be concluded that the combination of BMA/LLLT significantly accelerated the production of mediators related to cell proliferation and osteoblast differentiation and maturation in surgically created CSD in rat calvaria when compared to control, or either treatment alone.

Keywords: Bone marrow; mesenchymal stem cells; low-level laser therapy; bone regeneration; immunohistochemistry.



Lista de Figuras

- Figura 1** - Defeito preenchido com coágulo sanguíneo (A); Defeito 77
preenchido com AMO (B). Abreviaturas: AMO, aspirado de
medula óssea.
- Figura 2** - Resultados representativos da análise das amostras de AMO por 78
citometria de fluxo para cada um dos seguintes marcadores de
superfície celular: CD90, CD44, CD54, CD45 e CD31.
Histogramas vermelhos identificam a porcentagem de células
positivas para cada anticorpo e os histogramas azuis identificam
os controles isotípicos (negativos). Abreviaturas: AMO, aspirado
de medula óssea.
- Figura 3** - Imunomarcações para VEGF e PCNA no defeito cirúrgico, aos 15 79
dias pós-operatórios. Fotomicrografias mostrando células VEGF-
positivas (setas azuis) nos grupos C (A), LLLT (B), AMO (C) e
AMO/LLLT (D). Fotomicrografias mostrando células PCNA-
positivas (setas pretas) nos grupos C (E), LLLT (F), AMO (G) e
AMO/LLLT (H). Barra de escala = 50 μ m. Abreviaturas e
símbolos: AMO, aspirado de medula óssea; C, controle; LLLT,
terapia com laser em baixa intensidade; NO, osso neoformado;
PCNA, antígeno nuclear de proliferação celular; TC, tecido
conjuntivo; VEGF, fator de crescimento vascular endotelial.

Figura 4 - Imunomarcações para Runx2 e BMP-2 no defeito cirúrgico, aos 15 dias pós-operatórios. Fotomicrografias mostrando células Runx2-positivas (setas vermelhas) nos grupos C (A), LLLT (B), AMO (C), AMO/LLLT (D). Fotomicrografias mostrando células BMP-2-positivas (setas pretas) nos grupos C (E), LLLT (F), AMO (G), AMO/LLLT (H). Barra de escala = 50 µm. Abreviaturas e símbolos: AMO, aspirado de medula óssea; BMP-2, proteína morfogenética óssea 2; C, controle; LLLT, terapia com laser em baixa intensidade; NO, osso neoformado; Runx2, fator de transcrição relacionado à Runt 2; TC, tecido conjuntivo. 80

Figura 5 - Imunomarcações para OPN e OCN no defeito cirúrgico, aos 15 dias pós-operatórios. Fotomicrografias mostrando células OPN-positivas (setas pretas) nos grupos C (A), LLLT (B), AMO (C) e AMO/LLLT (D). Fotomicrografias mostrando imunomarcação para OCN (setas azuis) nos grupos C (E), LLLT (F), AMO (G) e AMO/LLLT (H). Barra de escala = 50 µm. Abreviaturas e símbolos: AMO, aspirado de medula óssea; C, controle; LLLT, terapia com laser em baixa intensidade; OCN, osteocalcina; NO, osso neoformado; OPN, osteopontina; TC, tecido conjuntivo. 81

Figura 6 - Gráficos mostrando frequência dos escores atribuídos para VEGF (A), bem como médias e desvios-padrão do número de células PCNA-positivas (B) aos 15 e 30 dias pós-operatórios, com comparações inter-grupos e intra-grupos. Abreviaturas e símbolos: AMO, aspirado de medula óssea; C, controle; LLLT, terapia com 82

laser em baixa intensidade; PCNA, antígeno nuclear de proliferação celular; VEGF, fator de crescimento vascular endotelial; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Figura 7 - Gráficos mostrando médias e desvios-padrão dos números de células Runx2-positivas (A) e BMP-2-positivas (B) aos 15 e 30 dias pós-operatórios, com comparações inter-grupos e intra-grupos. Abreviaturas e símbolos: AMO, aspirado de medula óssea; BMP-2, proteína morfogenética óssea 2; C, controle; LLLT, terapia com laser em baixa intensidade; Runx2, fator de transcrição relacionado à Runt 2; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. 83

Figura 8 - Gráficos mostrando médias e desvios-padrão dos números de células OPN-positivas (A) e OCN-positivas (B) aos 15 e 30 dias pós-operatórios, com comparações inter-grupos e intra-grupos. Abreviaturas e símbolos: AMO, aspirado de medula óssea; C, controle; LLLT, terapia com laser em baixa intensidade; OCN, osteocalcina; OPN, osteopontina; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. 84



Lista de Tabelas

Tabela 1 - Perfil de superfície das células das amostras de AMO

76



Lista de Anexos

Anexo A - Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)	86
Anexo B - Normas para Publicação segundo o Periódico “Bone”	88



*Lista de Abreviaturas
e Siglas*

Lista de Abreviaturas e Siglas

AMO	= Aspirado de Medula Óssea
AMO/LLLLT	= Aspirado de medula óssea associado à terapia com laser em baixa intensidade
ANOVA	= Análise de Variância
AT	= Área Total
BMP-2	= Proteína Óssea Morfogenética-2
C	= Controle
CAPES	= Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CEUA	= Comissão de Ética no Uso de Animais
cm	= Centímetro
cm ²	= Centímetro Quadrado
CD	= <i>Cluster of differentiation</i>
CSS	= Carolina dos Santos Santinoni
CTM	= Células-tronco mesenquimais
DTC	= Defeito de Tamanho Crítico
EDTA	= Ácido etilenodiaminotetracético
EE	= Edilson Ervolino
<i>et al.</i>	= <i>et alii</i>
FAPESP	= Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
Fig.	= Figura
FOA	= Faculdade de Odontologia de Araçatuba
g	= grama

InGaAlP	= Índio-Gálio-Alumínio-Fósforo
IU	= International Unit
J	= Joule
Kg	= Kilograma
LLLT	= Terapia com laser em baixa intensidade
Ltda	= Limitada
mg	= Miligrama
mL	= Mililitro
mm	= Milímetro
mm ²	= Milímetro quadrado
n°	= Número
nm	= Nanômetro
OCN	= Osteocalcina
OPN	= Osteopontina
PBS	= Tampão fosfato salino
PCNA	= Antígeno nuclear de proliferação celular
Prof.	= Professor
RPM	= Rotações por minuto
Runx2	= Fator de transcrição relacionado à runt-2
s	= Segundo
UNESP	= Universidade Estadual Paulista
VEGF	= Fator de crescimento vascular endotelial
W	= Watts
μL	= Microlitro
μm	= Micrometro



Lista de Símbolos

@	=	Arroba
n	=	Tamanho da Amostra
<i>p</i>	=	Probabilidade do valor do teste
°C	=	Graus Celsius
%	=	Por cento
<	=	Menor
®	=	Marca Registrada
S/A	=	Sociedade Anônima
+	=	Mais
-	=	Menos



Sumário

Manuscrito para Publicação	49
Página de título	50
Resumo	51
Introdução	53
Material e métodos	55
Resultados	60
Discussão	62
Agradecimentos	66
Referências	67
Anexos	85



*Manuscrito para
Publicação **

**Segundo as normas do Periódico “Bone” – Anexo B*

Reparo ósseo de defeitos de tamanho crítico tratados com aspirado de medula óssea associado ou não à terapia com laser em baixa intensidade.

Estudo imunoistoquímico em calvárias de ratos

Carolina S. Santinoni^a, Maria J. H. Nagata^a

^aDepartamento de Cirurgia e Clínica Integrada, Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Brasil. Rua José Bonifácio, 1993, CEP 16015-050. Araçatuba – SP/Brasil.

Autora responsável pela correspondência:

Maria José H. Nagata

Depto. Cirurgia e Clínica Integrada

Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP

Rua José Bonifácio, 1193

CEP: 16015-050 Araçatuba, SP, Brasil

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

e-mail: mjnagata@foa.unesp.br

RESUMO

Este estudo imunoistoquímico avaliou a influência do aspirado de medula óssea (AMO) associado ou não à terapia com laser em baixa intensidade (LLLT) no processo de reparo de defeitos de tamanho crítico (DTC), criados cirurgicamente em calvárias de ratos. 64 ratos foram aleatoriamente distribuídos em 4 grupos: C (controle), AMO, LLLT e AMO/LLLT. Um DTC de 5 mm de diâmetro foi criado na calvária de cada animal. No Grupo C, o defeito foi preenchido com coágulo sanguíneo somente. No Grupo AMO, o defeito preenchido com AMO. Nos grupos LLLT e AMO/LLLT, o defeito recebeu irradiação com laser (InGaAlP laser), foi preenchido com coágulo sanguíneo ou AMO, respectivamente, e irradiado novamente. Os animais foram submetidos à eutanásia aos 15 e 30 dias pós-operatórios. Foram realizadas reações imunoistoquímicas para detecção do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), fator de transcrição relacionado à Runt (Runx2), proteína óssea morfogenética-2 (BMP-2), osteopontina (OPN) e osteocalcina (OCN). Um método semi-quantitativo foi usado para avaliar a imunomarcção para VEGF. As células PCNA-positivas, Runx2-positivas, BMP-2-positivas, OPN-positivas e OCN-positivas foram quantificadas. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente. Aos 15 dias pós-operatórios, o Grupo LLLT apresentou números de células OPN-positivas e OCN-positivas significativamente maiores que o Grupo C; o Grupo AMO apresentou números de células PCNA-positivas, Runx2-positivas, BMP-2-positivas e OPN-positivas significativamente maiores do que os grupos C e LLLT, além de número de células OCN-positivas significativamente maior que o controle; o Grupo AMO/LLLT apresentou imunomarcção para VEGF e números de células Runx2-positivas, OPN-positivas e OCN-positivas significativamente maiores que o Grupo C. Aos 30 dias pós-operatórios, o Grupo LLLT apresentou imunomarcção para VEGF e números de células OPN-positivas e OCN-positivas significativamente maiores que o Grupo C; o Grupo AMO apresentou números de células Runx2-positivas, BMP-2-positivas e OCN-positivas significativamente maiores que o Grupo

C; o Grupo AMO/LLLT apresentou números de células PCNA-positivas, BMP-2-positivas, OPN-positivas e OCN-positivas significativamente maiores que os grupos C, LLLT e AMO. Pode-se concluir que a terapia combinada de AMO/LLLT acelerou significativamente a produção de mediadores relacionados com proliferação celular e com diferenciação e maturação de osteoblastos, quando comparada ao controle ou a cada tratamento isolado, no processo de reparo de DTC cirurgicamente em calvárias de ratos.

Palavras-chave: medula óssea; células-tronco mesenquimais; terapia a laser em baixa intensidade; regeneração óssea; imuno-histoquímica.

1. INTRODUÇÃO

Defeitos ósseos extensos constituem um grande desafio para a cirurgia reconstrutiva. Uma estratégia emergente e alternativa para o tratamento desses defeitos é a engenharia tecidual. Há um interesse crescente no potencial terapêutico de células derivadas da medula óssea para aplicações da engenharia tecidual [1]. Estudos recentes têm avaliado a terapia envolvendo cultivo de células-tronco mesenquimais (CTM) derivadas da medula óssea com objetivo de promover o reparo ósseo [2-6]. O cultivo de CTM é uma abordagem promissora, porém a expansão *in vitro* causa dramáticas alterações no fenótipo dessas células, o que pode ter implicações muito significativas para o desenvolvimento de terapias efetivas. Essas pronunciadas alterações fenotípicas associadas com a expansão *in vitro* das CTM têm levado os pesquisadores a voltarem sua atenção para o uso de medula óssea não processada ou de células mononucleares isoladas [7]. Em um nível celular, essas abordagens terapêuticas poderiam preservar a multipotência das CTM e das suas capacidades de auto-renovação, o que poderia não somente fortalecer o potencial terapêutico, mas evitaria o atraso no tratamento e os grandes custos associados com a fase de expansão *in vitro* [7]. Assim, o uso do aspirado de medula óssea (AMO), sozinho ou combinado com outras modalidades terapêuticas, tem sido avaliado em diversos estudos para a promoção da regeneração óssea, demonstrando resultados promissores [8-14]. O AMO contém uma porcentagem de células-tronco hematopoiéticas, células endoteliais e CTM significativamente maior que o sangue periférico [15]. Contudo, é importante considerar que alterações relacionadas à idade no microambiente da medula óssea resultam em diminuição no número e declínio na função das CTM [16]. Além disso, pode haver também uma depleção no pool de CTM em indivíduos mais jovens como um resultado do tratamento radioterápico para câncer [17] ou de ovariectomia realizada antes da menopausa [18]. Portanto, uma redução nas CTM endógenas devido ao avanço da idade ou a uma condição médica poderia dificultar o uso do AMO como uma rica fonte dessas células. Uma possível alternativa para esses casos seria a combinação do AMO à terapia com laser em baixa

intensidade (LLLT), considerando que a exposição à LLLT pode acelerar a proliferação de CTM [19-21] e aumentar a liberação de fatores de crescimento dessas células [20], além de acelerar a proliferação de células já diferenciadas, como osteoblastos e fibroblastos [22-25]. Assim, desenvolvemos um estudo pioneiro *in vivo* em que a terapia combinada AMO/LLLT foi avaliada no reparo de defeitos ósseos críticos em calvárias de ratos [8]. O uso isolado do AMO e da LLLT também foram avaliados. O grupo tratado somente com AMO apresentou formação óssea significativamente maior que o controle, confirmando que o AMO possui células que são capazes de promover significativa neoformação óssea, enquanto o grupo tratado somente com LLLT apresentou maior quantidade de vasos sanguíneos, mas a formação óssea foi semelhante ao controle. Já a associação AMO/LLLT proporcionou resultados sinérgicos muito vantajosos. O grupo tratado com essa terapia combinada apresentou neoformação óssea significativamente maior que todos os demais grupos (controle, tratado somente com AMO e tratado somente com LLLT), além de apresentar um estágio mais avançado do reparo ósseo. Considerando os excelentes resultados obtidos com a terapia combinada de AMO/LLLT na regeneração óssea e, também, os resultados favoráveis obtidos somente com o AMO, é de fundamental importância realizar uma análise mais detalhada dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos nesses processos.

Portanto, o propósito deste estudo foi avaliar, através de imunorreações, a influência do aspirado de medula óssea (AMO) associado ou não à terapia com laser em baixa intensidade (LLLT) no processo de reparo de defeitos de tamanho crítico (DTC), criados cirurgicamente em calvárias de ratos. Esta avaliação consistiu de análise imunoistoquímica para detecção de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF); antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA); fator de transcrição relacionado à Runt 2 (Runx2); proteína morfogenética óssea 2 (BMP-2); osteopontina (OPN) e osteocalcina (OCN).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Modelo experimental

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP (Processo 2012-01113). Foram utilizados 64 ratos machos (*Rattus norvegicus, albinus*, Wistar), com idade entre 5 e 6 meses, pesando entre 450 e 500 g (UNESP, Biotério da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba - SP). Os animais foram mantidos em ambiente com ciclo de 12 horas de luz por dia e temperatura entre 22 e 24° C. Durante todo o experimento, os animais consumiram ração sólida selecionada e água *ad libitum*. Eles foram aleatoriamente distribuídos em 4 grupos experimentais: C (controle), AMO (aspirado de medula óssea), LLLT (terapia com laser em baixa intensidade) e AMO/LLLT (aspirado de medula óssea associado à terapia com laser em baixa intensidade).

2.2. Protocolo de coleta da medula óssea

Os animais dos grupos AMO e AMO/LLLT foram anestesiados por injeção intramuscular de xilazina (6 mg/kg de peso corporal) e quetamina (70 mg/kg de peso corporal). Imediatamente antes dos procedimentos cirúrgicos, a medula óssea foi coletada das cristas ilíacas direita e esquerda dos animais. Um volume de 1 ml de medula (0,5 ml de cada crista ilíaca) foi coletado de cada animal usando uma seringa descartável de 10 ml contendo 0,1 ml de citrato de sódio a 3,2% para prevenir coagulação.

2.3. Procedimento cirúrgico

Os ratos dos grupos C e LLLT foram anestesiados seguindo o mesmo protocolo descrito para os grupos AMO e AMO/LLLT. Após preparação anti-séptica, uma incisão semilunar foi realizada na região anterior da calvária, permitindo que um retalho de espessura total fosse

rebatido na direção posterior. Um defeito de tamanho crítico (DTC) de 5 mm de diâmetro foi criado com uma trefina acoplada em peça de mão de baixa rotação, sob irrigação constante com solução salina estéril. Uma marcação em forma de L foi realizada 2 mm anterior e uma outra 2 mm posterior às margens do defeito cirúrgico utilizando uma broca carbide tronco-cônica e um guia cirúrgico. As marcações foram preenchidas com amálgama. Seu propósito foi permitir a identificação da linha central do defeito cirúrgico original durante o processamento laboratorial, bem como serem usadas como referências para a localizar precisamente as margens ósseas originais do defeito cirúrgico durante a análise imunoistoquímica [26].

No Grupo C, o defeito foi preenchido com coágulo sanguíneo somente (Fig. 1A). No Grupo AMO, o defeito foi preenchido com 50 µL de AMO (Fig. 1B). Nos grupos LLLT e AMO/LLLT, o defeito recebeu aplicação da LLLT (InGaAIP), foi preenchido com coágulo sanguíneo ou 50 µL de AMO, respectivamente, e irradiados novamente. Os tecidos moles foram, então, reposicionados e suturados. Cada animal recebeu uma injeção intra-muscular pós-cirúrgica de 24.000 IU de Penicilina G-benzatina (Pentabiótico* Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge® Saúde Animal Ltda., Campinas, SP).

2.4. Protocolo de aplicação do AMO

A aplicação clínica do AMO foi realizada seguindo o protocolo proposto por Nagata et al. [8]. No momento da aplicação clínica, 50 µl de AMO foi ativado com 1,25 µl de solução de cloreto de cálcio a 10% (Calcium Chloride 10% Solution, ScienceLab.com Inc., Houston, TX, EUA), usando uma proporção de 0,05 ml de cloreto de cálcio para cada 1 ml de AMO.

2.5. Protocolo de aplicação da LLLT

O laser utilizado neste estudo foi o de índio-gálio-alumínio-fósforo (InGaAIP) (TheraLase®, DMC Equipamentos Ltda, São Carlos, SP, Brasil), com comprimento de onda de 660 nm e área do spot de 0,0283 cm². Imediatamente após o preparo do defeito cirúrgico, a

LLLT foi aplicada no modo contato, em 8 pontos equidistantes no seu aspecto interno (modo contato), de tal forma que toda extensão do mesmo recebesse a irradiação com laser. O laser foi utilizado com uma potência de 0,035 W, 4s, 0,14 J (energia), densidade energética pontual de 4,9 J/cm² e total de 39,2 J/cm². O defeito foi preenchido com coágulo sanguíneo (Grupo LLLT) ou foi preenchido com AMO (Grupo AMO/LLLT) e, a seguir, irradiado novamente usando o mesmo protocolo descrito acima.

2.6. Caracterização celular por citometria de fluxo

Após a punção das cristas ilíacas, amostras de AMO de cada animal foram submetidas à reação com tampão de lise para rompimento das hemácias, na proporção de 14,5 ml de tampão para cada 0,5 ml de medula. Foi realizada a centrifugação a 1200 RPM por 7 minutos e o sobrenadante resultante desta reação foi desprezado. As células resultantes foram, então, diluídas com tampão fosfato salino (PBS) para que fosse obtida uma concentração de 1×10^6 . Esta concentração de células foi verificada através de contagem manual em câmara de Neubauer. Foi realizado, então, o bloqueio dos sítios inespecíficos das amostras através da incubação com soro fetal bovino a 4°C, por 30 minutos. As amostras foram centrifugadas a 2000 RPM por 3 minutos e o sobrenadante resultado da centrifugação foi desprezado. Alíquotas das amostras foram, então, incubadas com anticorpos individuais (anti-CD90, anti-CD44, anti-CD54, anti-CD45 e anti-CD31) conjugados a fluorocromos, a 4°C, por 30 minutos. Isotipos idênticos aos anticorpos foram usados como controle. Após este período, as amostras foram novamente centrifugadas a 2000 RPM por 3 minutos a 4°C e o sobrenadante foi desprezado. As amostras foram diluídas com 300 µL de PBS e homogeneizadas. A análise das amostras foi realizada utilizando o citômetro de fluxo (BD AccuriTM C5 flow cytometer, BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) e o “BD Accuri C6 *software* V.1.0.264.21” (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA).

2.7. Processamento tecidual

Os animais foram submetidos à eutanásia aos 15 e 30 dias pós-operatórios. A área do defeito cirúrgico original e os tecidos circunjacentes foram removidos em bloco. Após descalficação inicial em solução de Ácido Etilenodiaminotetracético (EDTA) a 10%, cada espécime foi dividido longitudinalmente em dois blocos, exatamente ao longo da linha central do defeito cirúrgico original, usando o longo eixo de ambas as marcações em L como referências. Foram realizados, também, cortes transversais que tangenciavam o eixo menor de cada marcação em L, permitindo a identificação precisa das margens do defeito cirúrgico original durante o procedimento de análise imunoistoquímica [26, 27]. Após descalficação adicional, as peças foram processadas e incluídas em parafina. Foram realizados cortes seriados longitudinais, com 5 µm de espessura e submetidos ao método da imunoperoxidase indireta. Para as reações imunoisquímicas, os cortes histológicos foram desparafinizados e reidratados em série decrescente de etanol. Para a recuperação antigênica, as lâminas foram incubadas em uma solução tampão (*Diva Decloaker*®, Biocare Medical, CA, EUA), em uma câmara pressurizada (*Decloaking Chamber*®, Biocare Medical, CA, EUA), a 95°C, por 10 minutos. Ao final de cada passo das reações imunoistoquímicas, as lâminas histológicas foram lavadas com PBS (0,1M, pH 7,4). Subsequentemente, as lâminas foram imersas em peróxido de hidrogênio a 3%, por 1 hora e, então, soro albumina bovino por 12 horas, para o bloqueio da peroxidase endógena e dos sítios inespecíficos, respectivamente. Lâminas histológicas contendo amostras de cada grupo experimental foram divididas em seis lotes, e cada lote foi incubado com um dos seguintes anticorpos primários: anti-VEGF gerado em camundongo (1:150; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), anti-PCNA gerado em ovelha (1:150; Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA), anti-Runx2 gerado em coelho (1:100; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), anti-BMP-2 gerado em camundongo (1:100; Sigma-Aldrich Corporate Offices, St. Louis, MO, EUA), anti-OCN gerado em ovelha (1:100; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) e anti-OPN gerado em coelho

(1:150; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA). Os cortes foram incubados com anticorpo secundário biotilado por 2 horas e subsequentemente tratados com estreptavidina conjugada com a peroxidase da raiz forte (Universal Dako Labeled HRP Streptavidin-Biotin Kit[®], Dako Laboratories, Carpinteria, CA, EUA) por 1 hora. A reação foi desenvolvida usando o cromógeno 3,3'Diaminobenzidina (DAB chromogen Kit[®], Dako Laboratories, CA, EUA) e contra-corados com hematoxilina de Harris (VEGF, BMP-2, OCN e OPN) ou *fast green* (PCNA e Runx2). Todas as amostras foram acompanhadas por um controle negativo (espécimes submetidos aos procedimentos descritos anteriormente, suprimindo-se a utilização dos anticorpos primários).

2.8. Análise imunoistoquímica

Seis cortes histológicos, representando o centro do defeito original, foram analisados sob iluminação de campo claro em microscópio óptico por investigadores (CSS e EE) calibrados e que desconheciam o tratamento realizado.

CrITÉrios baseados no trabalho de Nagata et al. [27] foram usados para padronizar a análise imunoistoquímica. Resumidamente, a AT correspondeu à área total do defeito cirúrgico original. Células PCNA-positivas, Runx2-positivas, BMP-2-positivas, OCN-positivas e OPN-positivas foram quantificadas dentro dos limites de AT. Para a análise da imunomarcção para VEGF, escores foram atribuídos com base no trabalho de Pedrosa et al. [28]: (0) ausência de imunomarcção, (1) padrão de imunomarcção extremamente baixo, (2) baixo padrão de imunomarcção, (3) moderado padrão de imunomarcção, (4) alto padrão de imunomarcção e (5) padrão de imunomarcção extremamente alto.

2.9. Análise estatística

A normalidade e homocedasticidade dos dados foram verificados. Cada parâmetro foi avaliado separadamente. Para os escores de VEGF, a significância das diferenças entre os

grupos foi determinada pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn *post hoc* quando o teste de Kruskal-Wallis sugeriu uma diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). Para os números de células PCNA-positivas, Runx2-positivas, BMP-2-positivas, OCN-positivas e OPN-positivas, a significância das diferenças entre os grupos foi determinada por uma análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey *post hoc*, quando a ANOVA sugeriu uma diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS

3.1. Caracterização celular por citometria de fluxo

Todas as amostras de AMO apresentaram marcadores de superfície celular de CTM (CD90, CD44, CD54), células hematopoiéticas (CD45) e células endoteliais (CD31). A porcentagem média e desvios-padrão das células positivas para cada marcador nas amostras de AMO estão apresentados na Tabela 1. A Figura 2 apresenta resultados representativos da análise de citometria de fluxo para cada um dos marcadores.

3.2. Análise imunoistoquímica

A técnica imunoistoquímica empregada para a detecção de VEGF, PCNA, Runx2, BMP-2, OCN e OPN mostrou alta especificidade na detecção dessas proteínas, como evidenciado pela ausência total de imunomarcção nos controles negativos das reações imunoistoquímicas. A imunomarcção foi definida como um precipitado de coloração acastanhada confinado ao compartimento nuclear para PCNA e Runx2; ao compartimento citosólico para OPN e OCN; e ao compartimento citosólico e matriz extracelular para VEGF e BMP-2.

Os grupos C, LLLT, AMO e AMO/LLLT apresentaram imunomarcações positivas para as proteínas VEGF, PCNA, Runx2, BMP-2, OPN e OCN aos 15 dias (Figs. 3, 4 e 5) e aos 30 dias pós-operatórios. Em todos os grupos e tempos experimentais, as distribuições das células imunomarcadas seguiram padrões semelhantes: a) as imunomarcações para VEGF estavam presentes em fibroblastos e osteoblastos e, em menor intensidade, na matriz extracelular adjacente a estas células; b) as células PCNA-positivas foram observadas nas adjacências do tecido ósseo neoformado, nos espaços medulares e periósteo, e no tecido conjuntivo localizado no centro do defeito naqueles casos sem completa regeneração óssea; c) as células Runx2-positivas foram observadas adjacentes aos osteoblastos localizados na superfície do tecido ósseo neoformado, próximas aos osteoblastos; d) as imunomarcações para BMP-2 foram observadas em osteoblastos e em fibroblastos localizados na superfície do tecido ósseo neoformado; e) as imunomarcações para OPN foram observadas predominantemente em osteoblastos, que exibiram morfologia consistente com alta atividade de síntese e estavam localizados na superfície do tecido ósseo neoformado e, também, em osteócitos localizados nas margens deste tecido; f) as imunomarcações para OCN foram observadas em osteoblastos maduros, localizados na superfície da matriz óssea, que exibiram morfologia consistente com alta atividade de síntese.

3.3. Análise estatística

A frequência dos escores atribuídos para VEGF, bem como as médias e desvios-padrão do número de células PCNA-positivas aos 15 e 30 dias pós-operatórios, com comparações inter-grupos e intra-grupos, estão apresentados na Fig. 6. As médias e desvios-padrão do número de células Runx2-positivas e BMP-2-positivas aos 15 e 30 dias pós-operatórios, com comparações inter-grupos e intra-grupos, estão apresentados na Fig. 7. As médias e desvios-padrão do número de células OPN-positivas e OCN-positivas aos 15 e 30 dias pós-operatórios, com comparações inter-grupos e intra-grupos, estão apresentados na Fig. 8.

4. DISCUSSÃO

Os resultados imunoistoquímicos do Grupo AMO corroboram os achados de estudo prévio do nosso grupo [8] e de outros estudos em animais que também observaram melhora no processo de reparo ósseo em defeitos tratados somente com AMO [9, 14]. Assim, como no estudo prévio de nosso grupo [8], o Grupo AMO apresentou quantidade de células OCN-positivas significativamente maior que o grupo controle, aos 30 dias pós-operatórios, sugerindo uma promoção da regeneração óssea neste grupo experimental. Com o presente estudo, foi possível verificar que, já aos 15 dias pós-operatórios, houve aceleração dos mediadores relacionados com proliferação celular e com diferenciação e maturação de osteoblastos, pois o Grupo AMO apresentou números significativamente maiores de células PCNA-positivas, Runx2-positivas, BMP-2-positivas, OPN-positivas e OCN-positivas quando comparado ao controle, sugerindo um processo mais rápido de regeneração óssea. De forma semelhante, Shirasu et al. [9] observaram porcentagens maiores de células PCNA-positivas, Runx2-positivas e OPN-positivas em defeitos de calvária não-críticos tratados com enxerto de medula óssea aos 5 e aos 10 dias pós-operatórios quando comparados aos defeitos sem tratamento (controle), resultando em maior formação óssea aos 30 dias pós-operatórios. Achado também observado em nosso estudo anterior [8]. Krzymanski et al. [14] também observaram, em defeitos mandibulares cirurgicamente criados em coelhos e tratados com AMO, quantidade de formação óssea significativamente maior que defeitos não tratados aos 30 e 60 dias pós-operatórios.

No presente estudo, a análise por citometria de fluxo mostrou que todas as amostras de AMO continham células que expressaram marcadores de superfície utilizados para identificação de CTM, células hematopoiéticas e células endoteliais, como observado em outros estudos [15, 29-31], indicando que o processo utilizado para aspiração da medula óssea foi adequado. Considerando esses achados e os de Smiler et al. [15] que demonstraram que o AMO contém porcentagem significativamente maior de CTM, células-tronco hematopoiéticas e

células endoteliais que o sangue periférico, pode-se inferir que a aceleração dos mediadores relacionados com proliferação celular e com diferenciação e maturação de osteoblastos observados no Grupo AMO foram devidos, principalmente, a aumento significativo das CTM e das células-tronco hemopoiéticas no sítio da ferida. Isso porque tem sido demonstrado que as CTM apresentam alta capacidade de diferenciação osteogênica [32-34] e que as células-tronco hematopoiéticas são capazes de induzir essa diferenciação [35]. Na medula óssea, as CTM ocupam distintas localizações anatômicas e dividem seus nichos com muitos outros tipos celulares, incluindo osteoblastos e células-tronco hematopoiéticas. Esses três tipos celulares demonstram *cross-talk* e parecem regular, reciprocamente, o comportamento celular e *lineage commitment* [7]. Assim, pode-se sugerir que uma das vantagens do uso do AMO comparado ao uso de CTM expandidas *in vitro*, seria a possibilidade da ocorrência desse *cross-talk* entre as células presentes no AMO e, também, com as do sítio receptor, o que favoreceria a osteogênese. Portanto, os resultados positivos observados no Grupo AMO do presente estudo, bem como aqueles observados no estudo prévio do nosso grupo [8] e no estudo de Krzymanski et al. [14], suportam os achados de Shirasu et al. [9], que demonstraram que o enxerto de medula óssea continha células que se proliferaram espontaneamente e, então, diferenciaram-se em osteoblastos no defeito, sem a necessidade de qualquer meio de diferenciação osteogênico. É importante ressaltar que esses resultados positivos do AMO na aceleração dos mediadores relacionados com proliferação celular e com diferenciação e maturação de osteoblastos contradizem a opinião de alguns autores que acreditam que o AMO sozinho não é consistente ou rico suficiente em CTM para ser usado sem modificações como fonte primária [36, 37]. De fato, há pouca evidência científica para correlacionar o número de células com eficácia clínica em termos de reparo/regeneração tecidual [38].

No Grupo LLLT do presente estudo, a densidade de energia utilizada foi $4,9 \text{ J/cm}^2$, de acordo com estudos anteriores que demonstraram que doses variando entre $1-5 \text{ J/cm}^2$ são efetivas na melhora da regeneração óssea [39-41]. Aos 30 dias pós-operatórios, o Grupo LLLT

apresentou imunomarcção para VEGF significativamente maior que o Grupo C. Esses resultados corroboram os achados da análise histológica do nosso estudo prévio [8], em que o grupo tratado com LLLT, seguindo o mesmo protocolo do Grupo LLLT do presente estudo, apresentou uma grande quantidade de vasos sanguíneos, consideravelmente maior que o grupo controle, aos 30 dias pós-operatórios. Outros estudos *in vivo* também relataram que a LLLT estimula a expressão e imunomarcção para VEGF [42-44]. Aos 30 dias pós-operatórios, o Grupo LLLT apresentou, também, números de células OPN-positivas e OCN-positivas significativamente maiores e número de células Runx2-positivas significativamente menor quando comparado ao Grupo C. Esses achados indicam que o processo de diferenciação osteoblástica foi acelerado nesse grupo. É interessante notar que esses achados foram distintos dos observados em estudo prévio do nosso grupo [8], mas são suportados por outros estudos *in vivo* [45] e *in vitro* [22] que mostraram que a LLLT promove um significativo aumento na diferenciação osteoblástica.

Em relação ao protocolo de LLLT, tem sido demonstrado que várias linhagens de células osteogênicas respondem diferentemente a combinações específicas de comprimentos de onda e doses [46]. Tanto os resultados do nosso estudo prévio [8], como os do presente estudo suportam essas observações de Renno et al. [46]. No presente estudo, o protocolo de LLLT utilizado no Grupo LLLT parece ter sido apropriado para estimular fibroblastos e osteoblastos presentes no sítio cirúrgico a produzirem VEGF, como também para acelerar a diferenciação de precursores osteoblásticos, aos 30 dias pós-operatórios. Contudo, o mesmo protocolo de LLLT parece ter atuado de forma muito mais expressiva nas células do AMO, pois o Grupo AMO/LLLT apresentou, nesse mesmo período de avaliação, números de células PCNA-positivas, BMP-2-positivas, OPN-positivas e OCN-positivas significativamente maiores que todos os demais grupos experimentais. Esses resultados suportam aqueles demonstrados em nosso estudo prévio [8], em que a associação AMO/LLLT resultou em significativo aumento da formação de novo osso, com regeneração óssea mais rápida e melhor quando comparado a

cada tratamento isolado (AMO ou LLLT) e ao controle. Além disso, com a análise realizada aos 15 dias pós-operatórios no presente estudo, foi possível constatar que os processos de diferenciação osteoblástica e maturação óssea foram acelerados no Grupo AMO/LLLT quando comparado ao Grupo AMO, pois a terapia combinada apresentou números de células BMP-2-positivas e OPN-positivas significativamente menores e uma tendência a um maior número de células OCN-positivas que a terapia de AMO somente. Nesse contexto, a análise da evolução temporal desses dois grupos demonstrou que enquanto o Grupo AMO/LLLT apresentou aumento significativo nos números de células BMP-2-positivas, OPN-positivas e OCN-positivas dos 15 para os 30 dias pós-operatórios, o Grupo AMO apresentou queda significativa no número de células BMP-2 positivas e OPN-positivas nesse período. Com esses dados, associados às observações de que o Grupo AMO/LLLT apresentou números de células PCNA-positivas e OCN-positivas significativamente maiores que o todos os demais grupos experimentais aos 30 dias pós-operatórios, pode-se sugerir que a terapia combinada promoveu uma aceleração no processo de regeneração óssea quando comparado ao controle e a cada terapia isolada. Isto porque um indicativo do amadurecimento ósseo é o processo de remodelação deste tecido, quando os espaços medulares e a medula óssea são formados. Assim, os significativos aumentos na imunomarcagem de mediadores relacionados com proliferação celular e com diferenciação e maturação de osteoblastos observados no Grupo AMO/LLLT quando comparado aos demais grupos, aos 30 dias pós-operatórios, seriam indicativos de que este grupo encontrava-se em um estágio mais tardio do processo de reparo ósseo, ou seja, na fase de remodelação e formação da medula óssea.

Considerando os achados de Smiler et al. [15] de que o AMO contém uma porcentagem significativamente maior de CTM, células-tronco hematopoiéticas e células endoteliais que o sangue periférico e os resultados da análise de citometria de fluxo do presente estudo, pode-se sugerir que houve aumento do número dessas células no sítio cirúrgico devido à presença do AMO. A LLLT deve ter estimulado não somente a proliferação das CTM, mas também a

diferenciação destas na linhagem osteoblástica, resultando em regeneração óssea melhor e mais rápida no Grupo AMO/LLLT, como indicado pelo número significativamente maior de células OCN-positivas, quando comparado aos demais grupos (C, AMO e LLLT), aos 30 dias pós-operatórios. Esta hipótese é suportada por estudos que demonstraram que a exposição à LLLT pode acelerar a proliferação de CTM [19, 47, 48] e que a LLLT tem efeitos bioestimulatórios na conversão de CTM em células formadoras de osso e na indução da ossificação *ex vivo* [49]. É possível que, além das CTM, a LLLT também tenha tido uma influência positiva nas outras células do AMO, tais como progenitoras endoteliais e células-tronco hematopoiéticas, melhorando a sua capacidade de induzir a vasculogênese, recrutar outras células para o sítio da ferida e secretar fatores de crescimento e citocinas que tenham efeito parácrino nas células adjacentes [50, 51], assim melhorando a regeneração óssea [52].

Dentro dos limites deste estudo, pode-se concluir que a terapia combinada de AMO/LLLT acelerou significativamente a produção de mediadores relacionados com proliferação celular e com diferenciação e maturação de osteoblastos, quando comparada ao controle ou a cada tratamento isolado, no processo de reparo de DTC cirurgicamente em calvárias de ratos. Esses resultados suportam aqueles do nosso estudo anterior [8] e sugerem que esta terapia combinada é uma abordagem muito promissora na promoção da regeneração óssea, com possíveis aplicações na medicina e na odontologia.

AGRADECIMENTOS

À Profa Dra. Suely Regina Mogami Bomfim da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba - UNESP, pela assistência profissional nos procedimentos experimentais relacionados à coleta do AMO e execução da citometria de fluxo; ao Médico Veterinário Breno Fernando Martins de Almeida, pela assistência profissional nos procedimentos experimentais relacionados à execução da citometria de fluxo; ao Departamento de Clínica, Cirurgia e

Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba - UNESP e à Profa. Dra. Valéria Marçal Felix de Lima, pelo empréstimo de alguns equipamentos necessários para realização deste estudo; ao Prof. Dr. Edilson Ervolino da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, pela assistência na análise imunoistoquímica; à FAPESP, pela concessão da Bolsa de Doutorado (Processo 2012/15138-5) à pós-graduanda Carolina dos Santos Santinoni.

REFERÊNCIAS

- [1] Kaigler D, Pagni G, Park CH, Tarle SA, Bartel RL, Giannobile WV. Angiogenic and osteogenic potential of bone repair cells for craniofacial regeneration. *Tissue Eng Part A* 2010;16: 2809-20.
- [2] Clough BH, McCarley MR, Krause U, Zeitouni S, Froese JJ, McNeill EP, Chaput CD, Sampson HW, Gregory CA. Bone regeneration with osteogenically enhanced mesenchymal stem cells and their extracellular matrix proteins. *J Bone Miner Res* 2015;30: 83-94.
- [3] Harada N, Watanabe Y, Sato K, Abe S, Yamanaka K, Sakai Y, Kaneko T, Matsushita T. Bone regeneration in a massive rat femur defect through endochondral ossification achieved with chondrogenically differentiated MSCs in a degradable scaffold. *Biomaterials* 2014;35: 7800-10.
- [4] He X, Liu Y, Yuan X, Lu L. Enhanced healing of rat calvarial defects with MSCs loaded on BMP-2 releasing chitosan/alginate/hydroxyapatite scaffolds. *PLoS One* 2014;9: e104061.
- [5] Gao C, Seuntjens J, Kaufman GN, Tran-Khanh N, Butler A, Li A, Wang H, Buschmann MD, Harvey EJ, Henderson JE. Mesenchymal stem cell transplantation to promote bone healing. *J Orthop Res* 2012;30: 1183-9.

- [6] Miranda SC, Silva GA, Mendes RM, Abreu FA, Caliari MV, Alves JB, Goes AM. Mesenchymal stem cells associated with porous chitosan-gelatin scaffold: a potential strategy for alveolar bone regeneration. *J Biomed Mater Res A* 2012;100: 2775-86.
- [7] Bara JJ, Richards RG, Alini M, Stoddart MJ. Concise review: Bone marrow-derived mesenchymal stem cells change phenotype following in vitro culture: implications for basic research and the clinic. *Stem Cells* 2014;32: 1713-23.
- [8] Nagata MJ, Santinoni CS, Pola NM, de Campos N, Messoria MR, Bomfim SR, Ervolino E, Fucini SE, Faleiros PL, Garcia VG, Bosco AF. Bone marrow aspirate combined with low-level laser therapy: a new therapeutic approach to enhance bone healing. *J Photochem Photobiol B* 2013;121: 6-14.
- [9] Shirasu N, Ueno T, Hirata Y, Hirata A, Kagawa T, Kanou M, Sawaki M, Wakimoto M, Ota A, Imura H, Matsumura T, Yamada T, Yamachika E, Sano K. Bone formation in a rat calvarial defect model after transplanting autogenous bone marrow with beta-tricalcium phosphate. *Acta Histochem* 2010;112: 270-7.
- [10] Bansal S, Chauhan V, Sharma S, Maheshwari R, Juyal A, Raghuvanshi S. Evaluation of hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate mixed with bone marrow aspirate as a bone graft substitute for posterolateral spinal fusion. *Indian J Orthop* 2009;43: 234-9.
- [11] Koga A, Tokuhashi Y, Ohkawa A, Nishimura T, Takayama K, Ryu J. Effects of fibronectin on osteoinductive capability of fresh iliac bone marrow aspirate in posterolateral spinal fusion in rabbits. *Spine (Phila Pa 1976)* 2008;33: 1318-23.
- [12] Soltan M, Smiler D, Prasad HS, Rohrer MD. Bone block allograft impregnated with bone marrow aspirate. *Implant Dent* 2007;16: 329-39.
- [13] Smiler D, Soltan M, Lee JW. A histomorphogenic analysis of bone grafts augmented with adult stem cells. *Implant Dent* 2007;16: 42-53.

- [14] Krzymanski G, Kalczak M, Wiktor-Jedrzejczak W. The use of bone-marrow-derived fibroblastoid cells and fresh bone marrow in the treatment of bone defects: an experimental study. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1997;26: 55-60.
- [15] Smiler D, Soltan M, Albitar M. Toward the identification of mesenchymal stem cells in bone marrow and peripheral blood for bone regeneration. *Implant Dent* 2008;17: 236-47.
- [16] Duque G. Bone and fat connection in aging bone. *Curr Opin Rheumatol* 2008;20: 429-34.
- [17] Greenberger JS, Epperly M. Bone marrow-derived stem cells and radiation response. *Semin Radiat Oncol* 2009;19: 133-9.
- [18] Tewari D, Khan MP, Sagar N, China SP, Singh AK, Kheruka SC, Barai S, Tewari MC, Nagar GK, Vishwakarma AL, Ogechukwu OE, Bellare JR, Gambhir S, Chattopadhyay N. Ovariectomized Rats with Established Osteopenia have Diminished Mesenchymal Stem Cells in the Bone Marrow and Impaired Homing, Osteoinduction and Bone Regeneration at the Fracture Site. *Stem Cell Rev* 2014.
- [19] Eduardo Fde P, Bueno DF, de Freitas PM, Marques MM, Passos-Bueno MR, Eduardo Cde P, Zatz M. Stem cell proliferation under low intensity laser irradiation: a preliminary study. *Lasers Surg Med* 2008;40: 433-8.
- [20] Hou JF, Zhang H, Yuan X, Li J, Wei YJ, Hu SS. In vitro effects of low-level laser irradiation for bone marrow mesenchymal stem cells: proliferation, growth factors secretion and myogenic differentiation. *Lasers Surg Med* 2008;40: 726-33.
- [21] Tuby H, Maltz L, Oron U. Low-level laser irradiation (LLLI) promotes proliferation of mesenchymal and cardiac stem cells in culture. *Lasers Surg Med* 2007;39: 373-8.
- [22] Jawad MM, Husein A, Azlina A, Alam MK, Hassan R, Shaari R. Effect of 940 nm low-level laser therapy on osteogenesis in vitro. *J Biomed Opt* 2013;18: 128001.

- [23] Bloise N, Ceccarelli G, Minzioni P, Vercellino M, Benedetti L, De Angelis MG, Imbriani M, Visai L. Investigation of low-level laser therapy potentiality on proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells in the absence/presence of osteogenic factors. *J Biomed Opt* 2013;18: 128006.
- [24] da Silva AP, Petri AD, Crippa GE, Stuani AS, Rosa AL, Stuani MB. Effect of low-level laser therapy after rapid maxillary expansion on proliferation and differentiation of osteoblastic cells. *Lasers Med Sci* 2012;27: 777-83.
- [25] Marques MM, Pereira AN, Fujihara NA, Nogueira FN, Eduardo CP. Effect of low-power laser irradiation on protein synthesis and ultrastructure of human gingival fibroblasts. *Lasers Surg Med* 2004;34: 260-5.
- [26] Messora MR, Nagata MJ, Mariano RC, Dornelles RC, Bomfim SR, Fucini SE, Garcia VG, Bosco AF. Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma: a histologic and histometric study in rat calvaria. *J Periodontal Res* 2008;43: 217-23.
- [27] Nagata M, Messora M, Okamoto R, Campos N, Pola N, Esper L, Sbrana M, Fucini S, Garcia V, Bosco A. Influence of the proportion of particulate autogenous bone graft/platelet-rich plasma on bone healing in critical-size defects: an immunohistochemical analysis in rat calvaria. *Bone* 2009;45: 339-45.
- [28] Pedrosa WF, Jr., Okamoto R, Faria PE, Arnez MF, Xavier SP, Salata LA. Immunohistochemical, tomographic and histological study on onlay bone graft remodeling. Part II: calvarial bone. *Clin Oral Implants Res* 2009;20: 1254-64.
- [29] Colenci R, da Silva Assuncao LR, Mogami Bomfim SR, de Assis Golim M, Deffune E, Penha Oliveira SH. Bone marrow mesenchymal stem cells stimulated by bFGF up-regulated protein expression in comparison with periodontal fibroblasts in vitro. *Arch Oral Biol* 2014;59: 268-76.

- [30] Niu CC, Lin SS, Yuan LJ, Chen LH, Pan TL, Yang CY, Lai PL, Chen WJ. Identification of mesenchymal stem cells and osteogenic factors in bone marrow aspirate and peripheral blood for spinal fusion by flow cytometry and proteomic analysis. *J Orthop Surg Res* 2014;9: 32.
- [31] Copland I, Sharma K, Lejeune L, Eliopoulos N, Stewart D, Liu P, Lachapelle K, Galipeau J. CD34 expression on murine marrow-derived mesenchymal stromal cells: impact on neovascularization. *Exp Hematol* 2008;36: 93-103.
- [32] Panepucci RA, Siufi JL, Silva WA, Jr., Proto-Siquiera R, Neder L, Orellana M, Rocha V, Covas DT, Zago MA. Comparison of gene expression of umbilical cord vein and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2004;22: 1263-78.
- [33] Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002;418: 41-9.
- [34] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284: 143-7.
- [35] Jung Y, Song J, Shiozawa Y, Wang J, Wang Z, Williams B, Havens A, Schneider A, Ge C, Franceschi RT, McCauley LK, Krebsbach PH, Taichman RS. Hematopoietic stem cells regulate mesenchymal stromal cell induction into osteoblasts thereby participating in the formation of the stem cell niche. *Stem Cells* 2008;26: 2042-51.
- [36] Burastero G, Scarfi S, Ferraris C, Fresia C, Sessarego N, Fruscione F, Monetti F, Scarfo F, Schupbach P, Podesta M, Grappiolo G, Zocchi E. The association of human mesenchymal stem cells with BMP-7 improves bone regeneration of critical-size segmental bone defects in athymic rats. *Bone* 2010;47: 117-26.

- [37] Kraus KH, Kirker-Head C. Mesenchymal stem cells and bone regeneration. *Vet Surg* 2006;35: 232-42.
- [38] Tolar J, Le Blanc K, Keating A, Blazar BR. Concise review: hitting the right spot with mesenchymal stromal cells. *Stem Cells* 2010;28: 1446-55.
- [39] Saito S, Shimizu N. Stimulatory effects of low-power laser irradiation on bone regeneration in midpalatal suture during expansion in the rat. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1997;111: 525-32.
- [40] Trelles MA, Mayayo E. Bone fracture consolidates faster with low-power laser. *Lasers Surg Med* 1987;7: 36-45.
- [41] Mester E, Mester AF, Mester A. The biomedical effects of laser application. *Lasers Surg Med* 1985;5: 31-9.
- [42] Park JB, Ahn SJ, Kang YG, Kim EC, Heo JS, Kang KL. Effects of increased low-level diode laser irradiation time on extraction socket healing in rats. *Lasers Med Sci* 2013.
- [43] Bossini PS, Renno AC, Ribeiro DA, Fangel R, Ribeiro AC, Lahoz Mde A, Parizotto NA. Low level laser therapy (830nm) improves bone repair in osteoporotic rats: similar outcomes at two different dosages. *Exp Gerontol* 2012;47: 136-42.
- [44] Bossini PS, Renno AC, Ribeiro DA, Fangel R, Peitl O, Zanotto ED, Parizotto NA. Biosilicate(R) and low-level laser therapy improve bone repair in osteoporotic rats. *J Tissue Eng Regen Med* 2011;5: 229-37.
- [45] Fernandes KR, Ribeiro DA, Rodrigues NC, Tim C, Santos AA, Parizotto NA, de Araujo HS, Driusso P, Renno AC. Effects of low-level laser therapy on the expression of osteogenic genes related in the initial stages of bone defects in rats. *J Biomed Opt* 2013;18: 038002.

- [46] Renno AC, McDonnell PA, Parizotto NA, Laakso EL. The effects of laser irradiation on osteoblast and osteosarcoma cell proliferation and differentiation in vitro. *Photomed Laser Surg* 2007;25: 275-80.
- [47] Giannelli M, Chellini F, Sassoli C, Francini F, Pini A, Squecco R, Nosi D, Bani D, Zecchi-Orlandini S, Formigli L. Photoactivation of bone marrow mesenchymal stromal cells with diode laser: effects and mechanisms of action. *J Cell Physiol* 2013;228: 172-81.
- [48] Wang J, Huang W, Wu Y, Hou J, Nie Y, Gu H, Li J, Hu S, Zhang H. MicroRNA-193 pro-proliferation effects for bone mesenchymal stem cells after low-level laser irradiation treatment through inhibitor of growth family, member 5. *Stem Cells Dev* 2012;21: 2508-19.
- [49] Abramovitch-Gottlieb L, Gross T, Naveh D, Geresh S, Rosenwaks S, Bar I, Vago R. Low level laser irradiation stimulates osteogenic phenotype of mesenchymal stem cells seeded on a three-dimensional biomatrix. *Lasers Med Sci* 2005;20: 138-46.
- [50] Kim KL, Han DK, Park K, Song SH, Kim JY, Kim JM, Ki HY, Yie SW, Roh CR, Jeon ES, Kim DK, Suh W. Enhanced dermal wound neovascularization by targeted delivery of endothelial progenitor cells using an RGD-g-PLLA scaffold. *Biomaterials* 2009;30: 3742-8.
- [51] Suh W, Kim KL, Kim JM, Shin IS, Lee YS, Lee JY, Jang HS, Lee JS, Byun J, Choi JH, Jeon ES, Kim DK. Transplantation of endothelial progenitor cells accelerates dermal wound healing with increased recruitment of monocytes/macrophages and neovascularization. *Stem Cells* 2005;23: 1571-8.
- [52] Matsumoto T, Kawamoto A, Kuroda R, Ishikawa M, Mifune Y, Iwasaki H, Miwa M, Horii M, Hayashi S, Oyamada A, Nishimura H, Murasawa S, Doita M, Kurosaka M, Asahara T. Therapeutic potential of vasculogenesis and osteogenesis promoted by peripheral blood CD34-positive cells for functional bone healing. *Am J Pathol* 2006;169: 1440-57.

LEGENDAS DE FIGURAS

Figura 1. Defeito preenchido com coágulo sanguíneo (A); Defeito preenchido com AMO (B).

Abreviaturas: AMO, aspirado de medula óssea.

Figura 2. Resultados representativos da análise das amostras de AMO por citometria de fluxo para cada um dos seguintes marcadores de superfície celular: CD90, CD44, CD54, CD45 e CD31. Histogramas vermelhos identificam a porcentagem de células positivas para cada anticorpo e os histogramas azuis identificam os controles isotópicos (negativos). Abreviaturas: AMO, aspirado de medula óssea.

Figura 3. Imunomarcações para VEGF e PCNA no defeito cirúrgico, aos 15 dias pós-operatórios. Fotomicrografias mostrando células VEGF-positivas (setas azuis) nos grupos C (A), LLLT (B), AMO (C) e AMO/LLLT (D). Fotomicrografias mostrando células PCNA-positivas (setas pretas) nos grupos C (E), LLLT (F), AMO (G) e AMO/LLLT (H). Barra de escala = 50 µm. Abreviaturas e símbolos: AMO, aspirado de medula óssea; C, controle; LLLT, terapia com laser em baixa intensidade; NO, osso neoformado; PCNA, antígeno nuclear de proliferação celular; TC, tecido conjuntivo; VEGF, fator de crescimento vascular endotelial.

Figura 4. Imunomarcações para Runx2 e BMP-2 no defeito cirúrgico, aos 15 dias pós-operatórios. Fotomicrografias mostrando células Runx2-positivas (setas vermelhas) nos grupos C (A), LLLT (B), AMO (C), AMO/LLLT (D). Fotomicrografias mostrando células BMP-2-positivas (setas pretas) nos grupos C (E), LLLT (F), AMO (G), AMO/LLLT (H). Barra de escala = 50 µm. Abreviaturas e símbolos: AMO, aspirado de medula óssea; BMP-2, proteína morfogenética óssea 2; C, controle; LLLT, terapia com laser em baixa intensidade; NO, osso neoformado; Runx2, fator de transcrição relacionado à Runt 2; TC, tecido conjuntivo.

Figura 5. Imunomarcações para OPN e OCN no defeito cirúrgico, aos 15 dias pós-operatórios. Fotomicrografias mostrando células OPN-positivas (setas pretas) nos grupos C (A), LLLT (B), AMO (C) e AMO/LLLT (D). Fotomicrografias mostrando imunomarcação para OCN (setas azuis) nos grupos C (E), LLLT (F), AMO (G) e AMO/LLLT (H). Barra de escala = 50 μ m. Abreviaturas e símbolos: AMO, aspirado de medula óssea; C, controle; LLLT, terapia com laser em baixa intensidade; OCN, osteocalcina; NO, osso neoformado; OPN, osteopontina; TC, tecido conjuntivo.

Figura 6. Gráficos mostrando frequência dos escores atribuídos para VEGF (A), bem como médias e desvios-padrão do número de células PCNA-positivas (B) aos 15 e 30 dias pós-operatórios, com comparações inter-grupos e intra-grupos. Abreviaturas e símbolos: AMO, aspirado de medula óssea; C, controle; LLLT, terapia com laser em baixa intensidade; PCNA, antígeno nuclear de proliferação celular; VEGF, fator de crescimento vascular endotelial; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Figura 7. Gráficos mostrando médias e desvios-padrão dos números de células Runx2-positivas (A) e BMP-2-positivas (B) aos 15 e 30 dias pós-operatórios, com comparações inter-grupos e intra-grupos. Abreviaturas e símbolos: AMO, aspirado de medula óssea; BMP-2, proteína morfogenética óssea 2; C, controle; LLLT, terapia com laser em baixa intensidade; Runx2, fator de transcrição relacionado à Runt 2; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Figura 8. Gráficos mostrando médias e desvios-padrão dos números de células OPN-positivas (A) e OCN-positivas (B) aos 15 e 30 dias pós-operatórios, com comparações inter-grupos e intra-grupos. Abreviaturas e símbolos: AMO, aspirado de medula óssea; C, controle; LLLT, terapia com laser em baixa intensidade; OCN, osteocalcina; OPN, osteopontina; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Tabela 1. Perfil de superfície das células das amostras de AMO

Marcadores	Média (%) ± desvio padrão
CD90	50,18 ± 15,06
CD44	76,85 ± 5,41
CD54	15,93 ± 6,05
CD45	99,38 ± 0,28
CD31	23,9 ± 15,56

Amostras analisadas por citometria de fluxo. A tabela mostra a porcentagem média das células positivas para cada marcador.

Figura 1

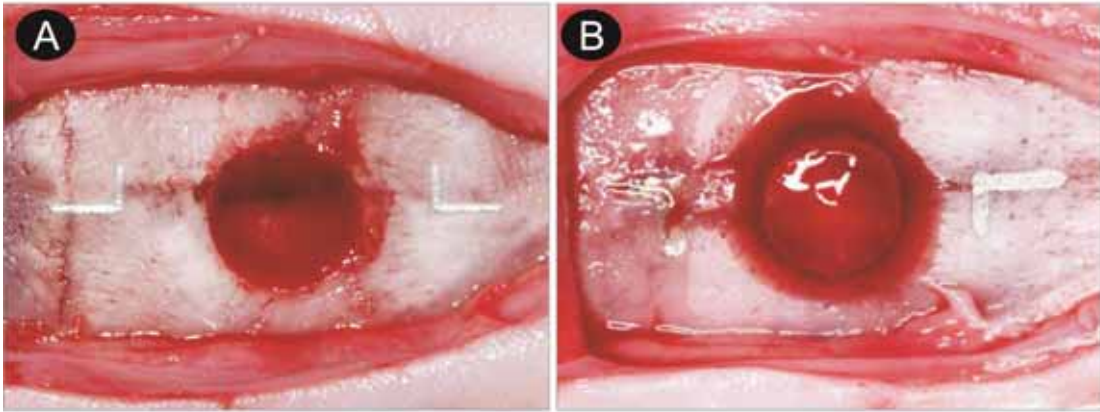


Figura 2

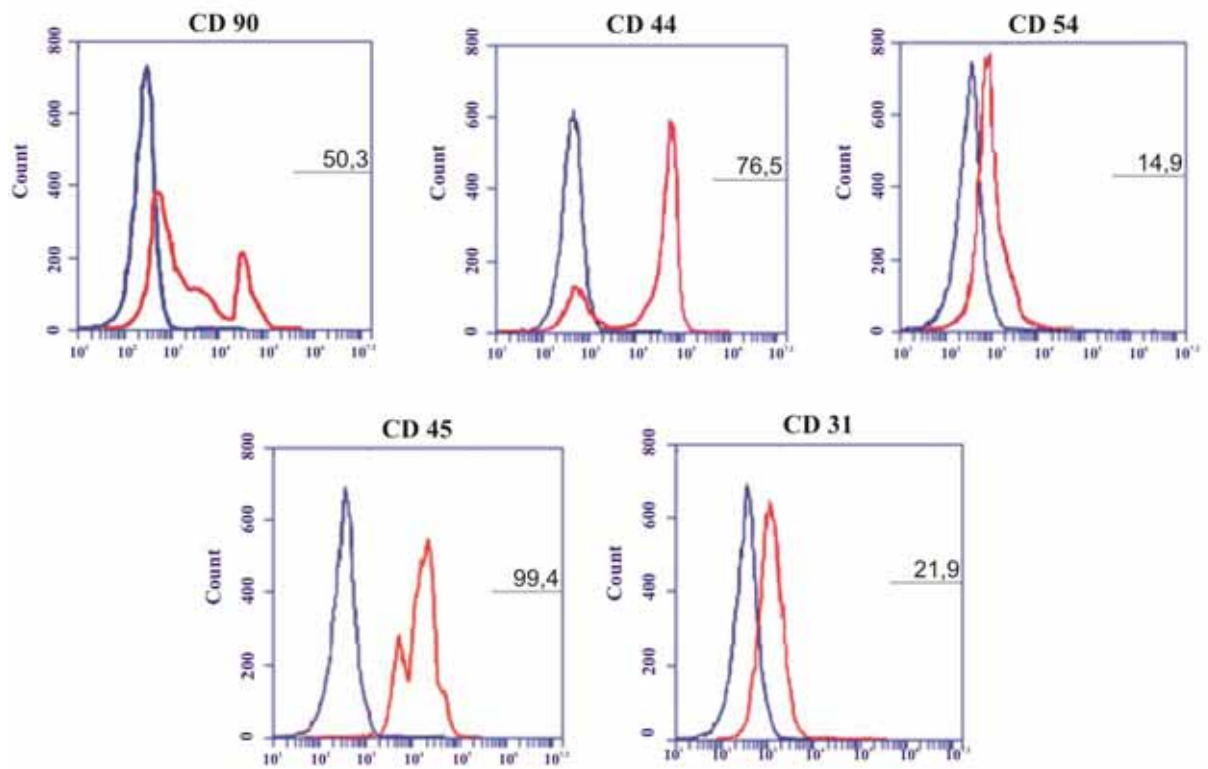


Figura 3

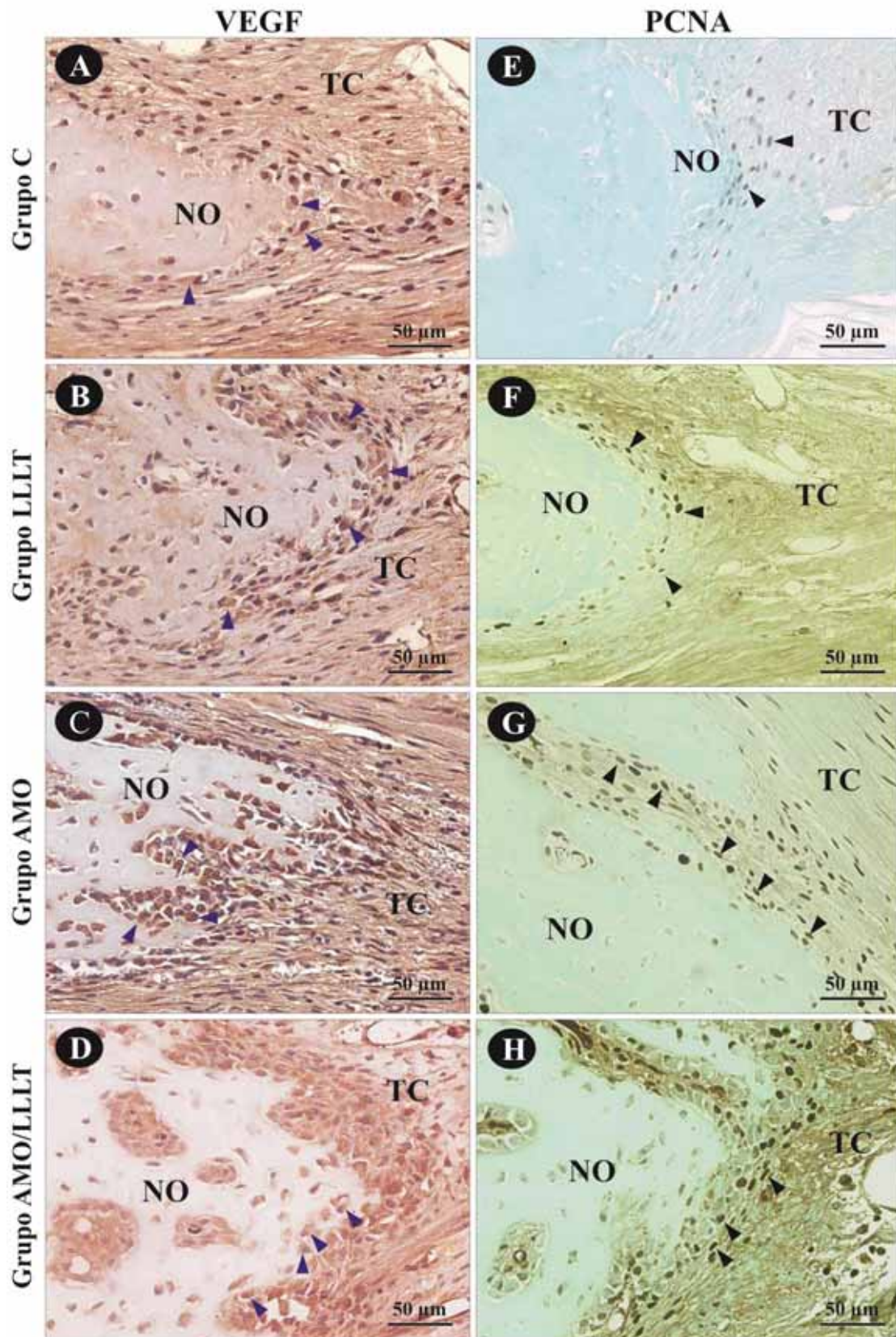


Figura 4

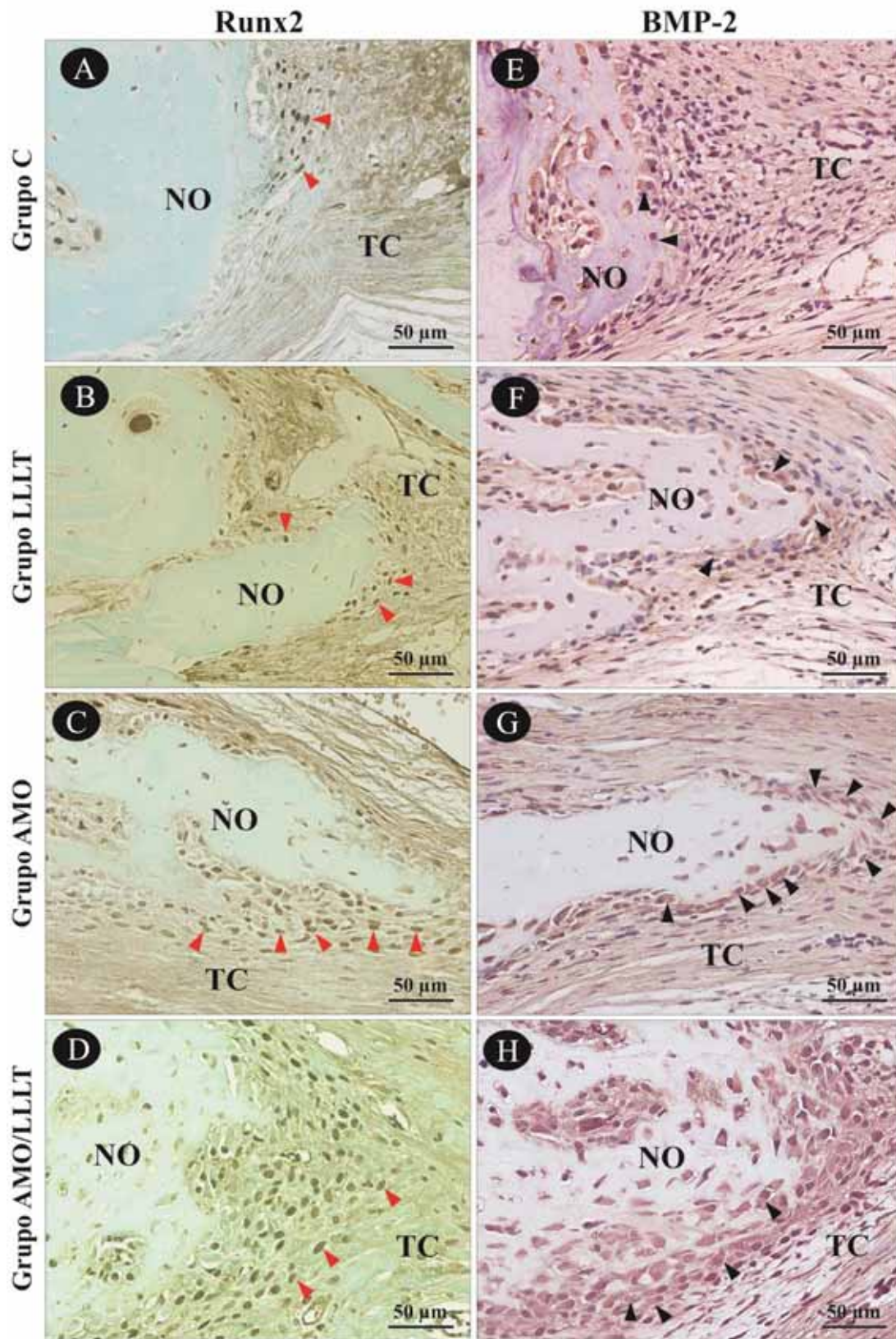
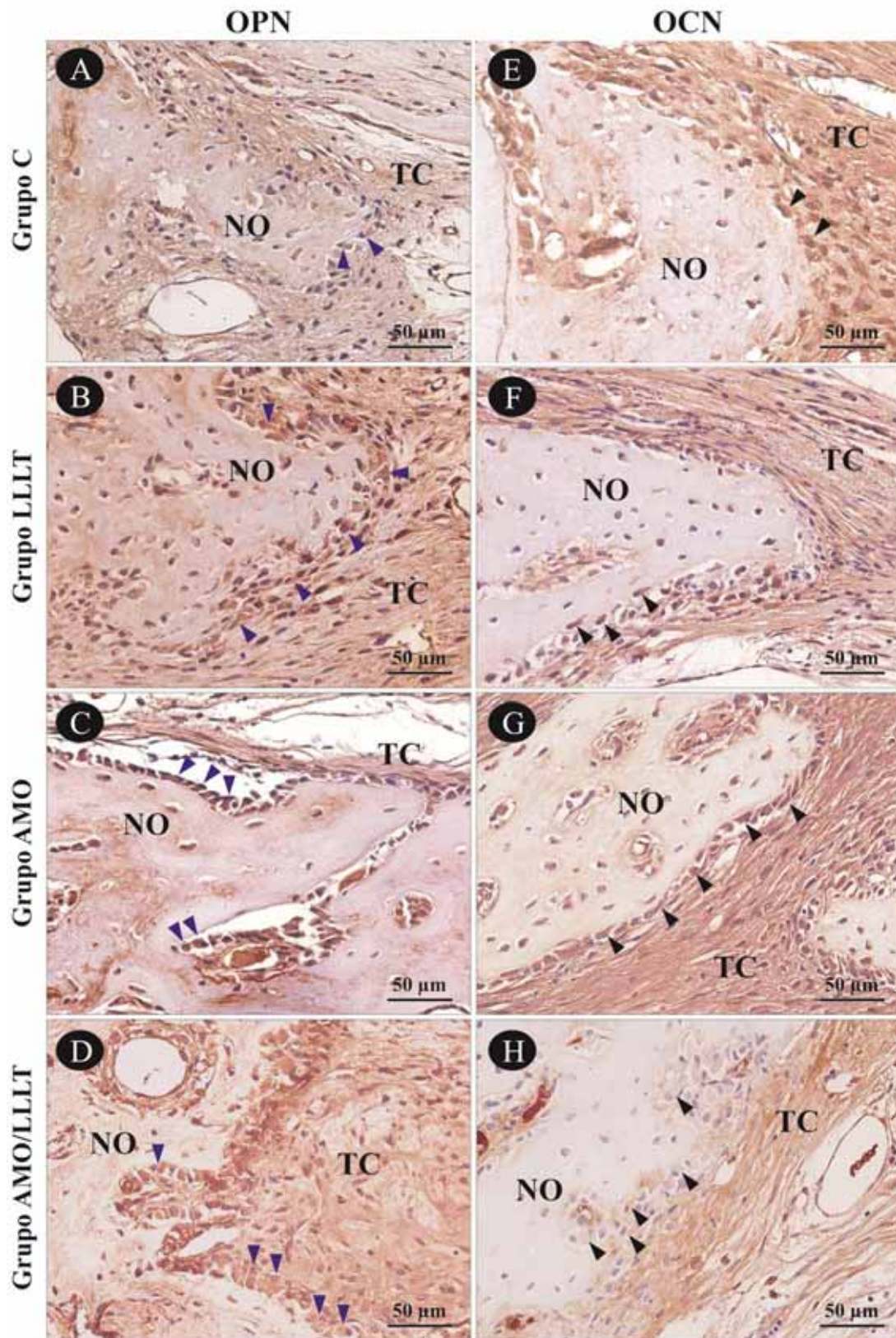
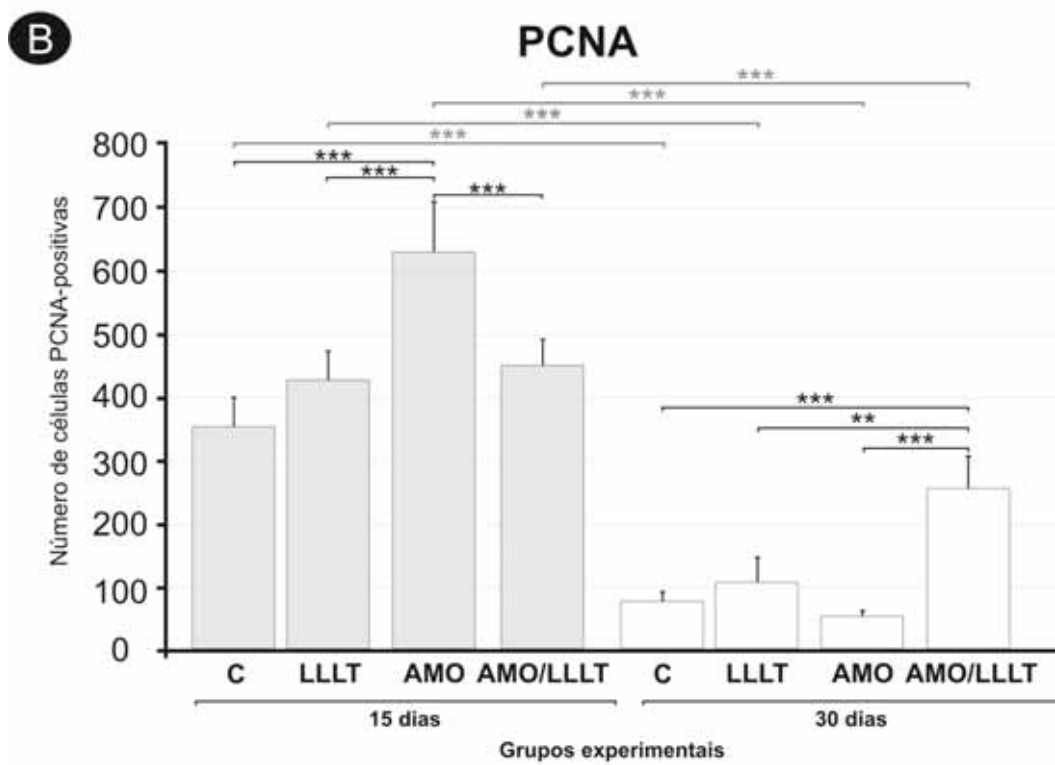
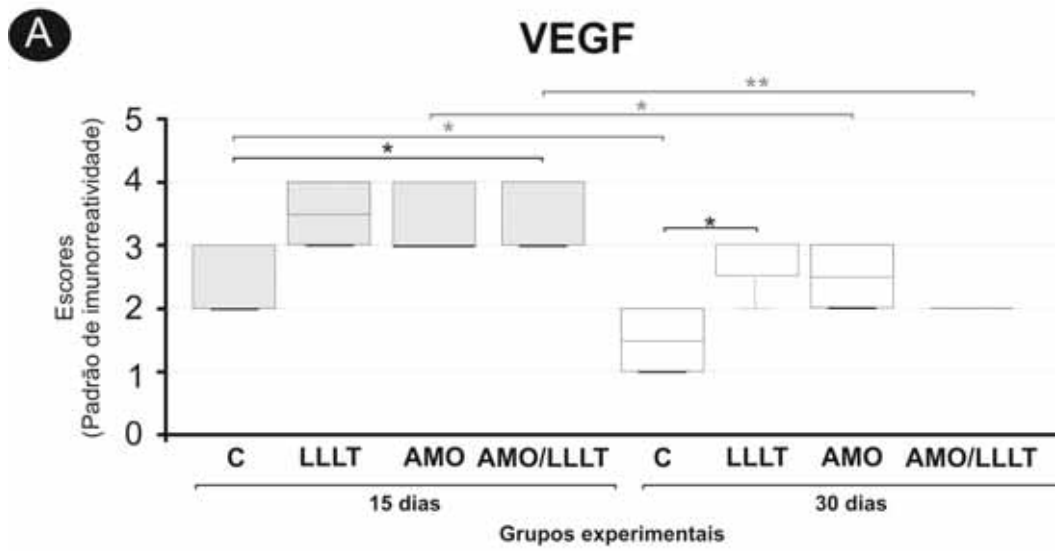
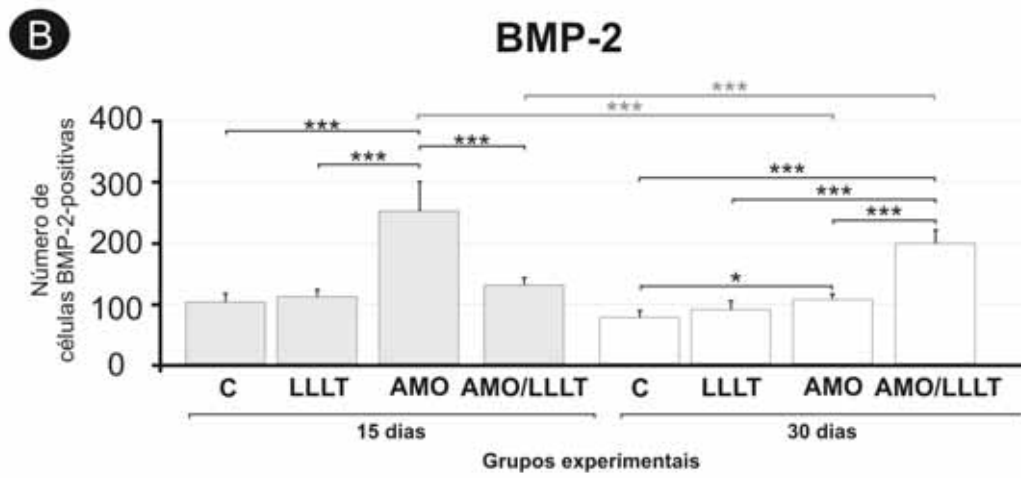
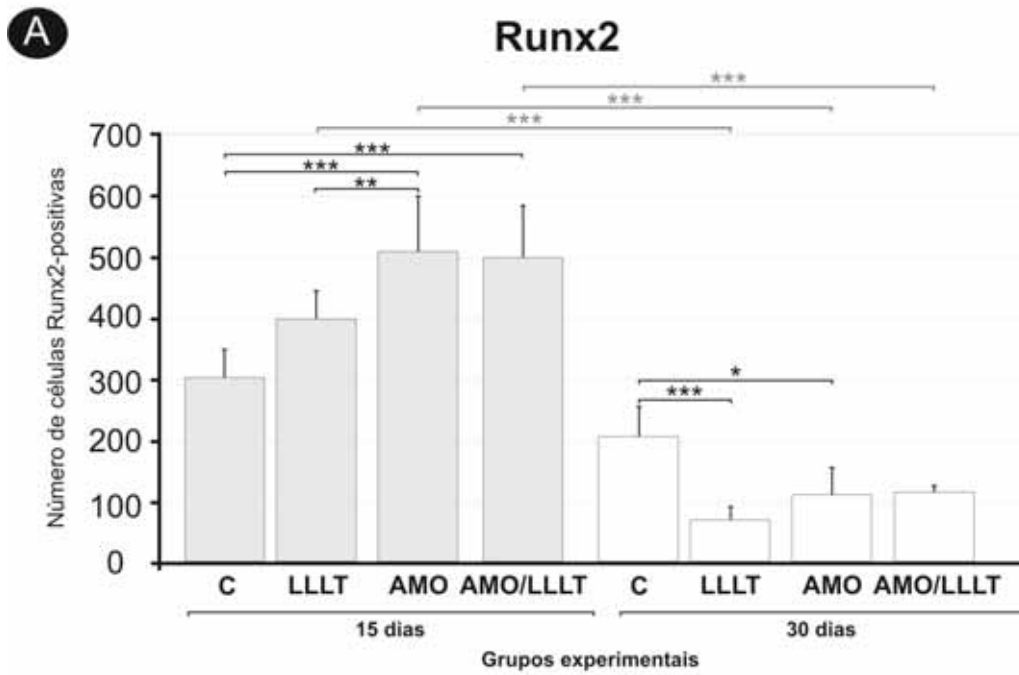
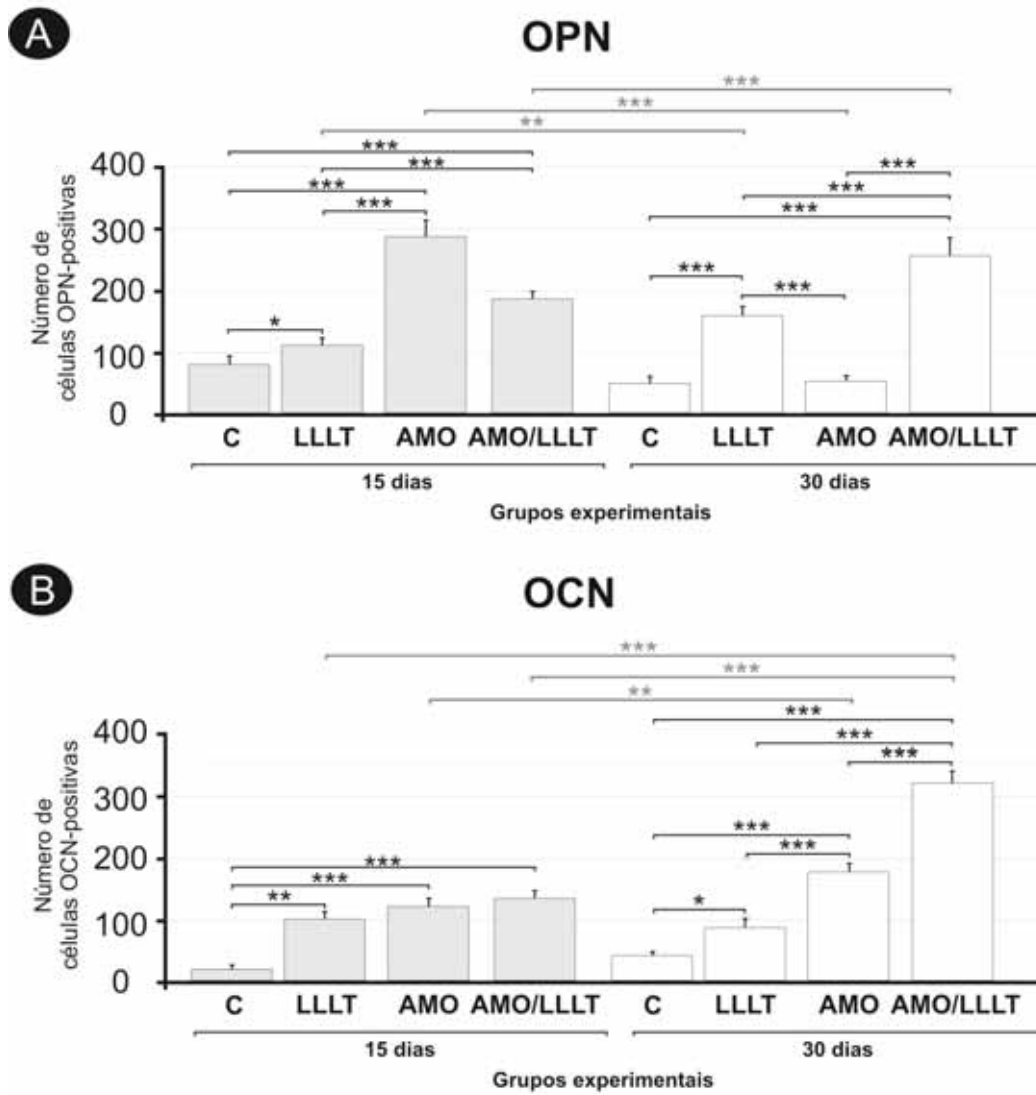


Figura 5











Anexos

Anexo A


*Certificado da Comissão de Ética no
Uso de Animais*

Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)
Committee for Ethical Use of Animals (CEUA)**CERTIFICADO**

Certificamos que o Projeto "Reparo ósseo de defeitos de tamanho crítico tratados com aspirado de medula óssea associado ou não a terapia com laser em baixa intensidade. Estudo imunistoquímico em calvária de ratos" sob responsabilidade da Pesquisadora **MARIA JOSÉ HITOMI NAGATA** e colaboração de Carolina dos Santos Santinoni, Natália Marcumini Pola, Natália de Campos, Valdir Gouveia Garcia e Alvaro Francisco Bosco está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo CEUA, de acordo com o protocolo **2012-01113**.

CERTIFICATE

We certify that the research "Bone healing in critical-size defects treated with bone marrow aspirate combined or not with low-level laser therapy. An immunohistochemical study in rat calvaria", protocol number **2012-01113**, under responsibility of **MARIA JOSÉ HITOMI NAGATA** and with collaboration of Carolina dos Santos Santinoni, Natália Marcumini Pola, Natália de Campos, Valdir Gouveia Garcia and Alvaro Francisco Bosco agree with Ethical Principles in Animal Research (COBEA) and was approved by CEUA.



Prof. Dr. Edilson Ervolino
CEUA Vice-Coordinator

Anexo B

*Normas para Publicação segundo o
Periódico “Bone”*

BONE

Cell Molecular Biology; Pathophysiology; Treatment
ISSN: 8756-3282

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

- **Description**
- **Audience**
- **Impact Factor**
- **Abstracting and Indexing**
- **Editorial Board**
- **Guide for Authors**

DESCRIPTION

BONE is an interdisciplinary forum for the rapid publication of original articles and reviews on basic, translational, and clinical aspects of bone and mineral metabolism. The Journal also encourages submissions related to interactions of bone with other organ systems, including cartilage, endocrine, muscle, fat, neural, vascular, gastrointestinal, hematopoietic, and immune systems. Particular attention is placed on the application of experimental studies to clinical practice. **US National Institutes of Health (NIH) voluntary posting ("Public Access") policy** Bone and Elsevier facilitate the author's response to the NIH Public Access Policy. For more details please see the [Guide for authors](#).

AUDIENCE

Bone Specialists, Orthopedists, Oncologists, Radiologists, Endocrinologists, Gynecologists, Rheumatologists, Cell and Molecular Biologists

IMPACT FACTOR

2013: 4.461 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2014

ABSTRACTING AND INDEXING

BIOSIS
Bioengineering Abstracts
Elsevier BIOBASE
Current Contents
MEDLINE®
EMBASE
PASCAL/CNRS
Reference Update
AUTHOR INFORMATION PACK 27 Jan 2015 www.elsevier.com/locate/bone 2

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief

Sundeep Khosla, Mayo Clinic, Rochester, Minnesota, USA

Senior Editors

R. Eastell, Northern General Hospital NHS Trust, Sheffield, UK

N. Sims, St. Vincent's Institute, Melbourne, Victoria, Australia

S. Tanaka, University of Tokyo, Tokyo, Japan

Reviews & Special Issue Editor

R. Baron, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA

Editors

M. Amling, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

J.E. Aubin, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada

D. Burr, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, Indiana, USA

M. Cooper

P. Croucher, Garvan Institute of Medical Research, Sydney, New South Wales, Australia

K. Ensrud

D. Fyhrie, University of California at Davis, Medical Center, Sacramento, California, USA

N. Guañabens, University of Barcelona, Barcelona, Spain

M. Johnson, University of Missouri at Kansas City, Kansas City, Montana, USA

M. Kassem, Odense University Hospital, Odense C, Denmark

H. Kim, Seoul National University (SNU), Seoul, South Korea

B. Langdahl, Aarhus University Hospital, Aarhus C, Denmark
S. Majumdar, University of California at San Francisco (UCSF), San Francisco, California, USA
R. O'Keefe, Washington University School of Medicine, St. Louis, Missouri, USA
R. Recker, Creighton University, Omaha, Nebraska, USA
S. Takeda, Keio University, Tokyo, Japan
Editorial Board
S. Adami, Verona, Italy
M.R. Allen, Indianapolis, Indiana, USA
N. Amizuka, Niigata, Japan
M. Ascenzi, Los Angeles, California, USA
T. Bellido, Indianapolis, Indiana, USA
M.L. Bianchi
H. Bone III, Detroit, Michigan, USA
L. Bonewald, Kansas, Missouri, USA
A. Boskey, New York, New York, USA
R. Bouillon, Leuven, Belgium
M. Bouxsein, Boston, Massachusetts, USA
B. Dawson-Hughes, Boston, Massachusetts, USA
B. de Crombrughe, Houston, Texas, USA
M.C. de Vernejoul, Paris, France
D. Dempster, West Haverstraw, New York, USA
A. Diez-Perez, Barcelona, Spain
S. Dixon, London, Ontario, Canada
F. Elefteriou
S.L. Ferrari, Genève, Switzerland
M. Forwood, Gold Coast, Queensland, Australia
S. Fukumoto, Tokyo, Japan
M. Garcia-Aznar, Zaragoza, Spain
J. Gasser, Basel, Switzerland
L. Gerstenfeld
M. Gillespie, Clayton, Victoria, Australia
M. Grynpas, Toronto, Ontario, Canada
H. Hagino, Tottori City, Japan
N. Harvey, Southampton, England, UK
J. Helms, Stanford, California, USA
D. Inoue, Chiba, Japan
R. Jilka, Little Rock, Arkansas, USA
D. Karasik, Boston, Massachusetts, USA
G. Karsenty, New York, New York, USA
T. Keaveny, Berkeley, California, USA
M. Kneissel, Basel, Switzerland
T. Komori, Nagasaki, Japan
B. Kream, Farmington, Connecticut, USA
R. Krumlauf, Kansas City, Missouri, USA
J.M. Lane, New York, New York, USA
B. Lanske, Boston, Massachusetts, USA
J. Lian, Worcester, Massachusetts, USA
J. Lorenzo, Farmington, Connecticut, USA
C.W. Lowik, Leiden, Netherlands
S. Manolagas, Little Rock, Arkansas, USA
P. Marie, Paris, France
R.J. Midura, Cleveland, Ohio, USA
S. Mohan, Loma Linda, California, USA
R. Mueller, Zurich, Switzerland
K.W. Ng, Melbourne, Victoria, Australia
J. Nyman, Nashville, USA
C. O'Brien
R. Okazaki
E. Orwoll, Portland, Oregon, USA
R. Pacifici, Atlanta, Georgia, USA
S. Papapoulos, Leiden, Netherlands
P. Peris, Spain
J. Pettifor, Johannesburg, South Africa
L. Plotkin, Indianapolis, Indiana, USA
J. Quinn, Melbourne, Victoria, Australia
F. Rauch, Montréal, Canada
I. R. Reid, MD, Auckland Mail Centre, Auckland, New Zealand
A. Robling
M.J. Rogers, Aberdeen, UK
E. Schipani, Boston, Massachusetts, USA
E. Seeman, MD, Melbourne, Victoria, Australia
Y. Seino, Okayama, Japan
E. Shane, New York, New York, USA

M. Silva, St Louis, Missouri, USA
R. St. Arnaud, Montreal, Quebec, Canada
G.S. Stein, Burlington, Vermont, USA
N. Takahashi, Nagano, Japan
H. Takayanagi, Toyko, Japan
Y. Takeuchi, Tokyo, Japan
A. Teti, L'Aquila, Italy
D. Towler, St. Louis, Missouri, USA
W. Van Hul, Antwerpen, Belgium
D. Vashishth, Troy, New York, USA
S. Warden, Bloomington, Indiana, USA
R. Weinstein, Little Rock, Arkansas, USA
J.J. Westendorf, Rochester, Minnesota, USA
M. Whyte, MD, St. Louis, Missouri, USA
T. Wronski, Gainesville, Florida, USA
A. Yamaguchi, Toyko, Japan
Y. Yeni, Detroit, Michigan, USA
T. Yoneda, Suita-Shi, Osaka, Japan

GUIDE FOR AUTHORS

Your Paper Your Way

We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article. **To find out more, please visit the Preparation section below.**

Types of article

Types of articles Bone accepts include:

- 1) Memoriam
- 2) Editorial or Commentary
- 3) Review
- 4) Original Articles
- 5) Rapid Communication
- 6) Case Report
- 7) Technical Note
- 8) Letters and Response to Letter to the Editor
- 9) Erratum/Corrigendum
- 10) Announcements

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

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Human and animal rights

If the work involves the use of animal or human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>;
EU Directive 2010/63/EU for animal experiments http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm; Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals <http://www.icmje.org>. Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

Conflict of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. If there are no conflicts of interest then please

state this: 'Conflicts of interest: none'. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/p/7923.

Submission declaration and verification

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

Authorship

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

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts: *Before the accepted manuscript is published in an online issue:* Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that

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

Article transfer service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. More information about this can be found here: <http://www.elsevier.com/authors/article-transfer-service>.

Copyright

This journal offers authors a choice in publishing their research: Open access and Subscription.

For subscription articles

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

For open access articles

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights. For more information on author rights for:

Subscription articles please see <http://www.elsevier.com/journal-authors/author-rights-and-responsibilities>.

Open access articles please see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>.

Role of the funding source

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

Funding body agreements and policies

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

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An open access publication fee is payable by authors or their research funder

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our access programs (<http://www.elsevier.com/access>)
- No open access publication fee

All articles published open access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CC BY): lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike (CC BY-NC-SA): for noncommercial purposes, lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text and data mine the article, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation, and license their new adaptations or creations under identical terms (CC BY-NC-SA).

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND): for noncommercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article. To provide open access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published open access.

Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles. The open access publication fee in this journal is **\$1,800**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English

Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Referees

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our [Support site](#). Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

PREPARATION

NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or layout that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions. If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes. Divide the article into clearly defined sections.

Figures and tables embedded in text

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file.

REVISED SUBMISSIONS

Use of word processing software

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

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

Introduction

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

Material and Methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described. Since there are significant differences in skeletal structure and remodeling between the sexes and strains, it is essential that all animal studies report the age, sex, and strain (e.g., C57BL/6) of animals used.

Theory/calculation

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

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

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

Conclusions

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

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

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

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples. Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

Highlights

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

Keywords

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

Abbreviations

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

Acknowledgements

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

Database linking

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

Genbank

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files. A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

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

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color

online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Please note: Because of technical complications that can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Illustration services

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

Figure captions

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

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

Web references

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

References in a special issue

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

Reference management software

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

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be

highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun* 2010;163:51–9.

Reference to a book:

[2] Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 4th ed. New York: Longman; 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. *Introduction to the electronic age*, New York: E-Publishing Inc; 2009, p. 281–304.

Note shortened form for last page number. e.g., 51–9, and that for more than 6 authors the first 6 should be listed followed by 'et al.' For further details you are referred to 'Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals' (*J Am Med Assoc* 1997;277:927–34) (see also http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html).

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations:

<http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-ltwa/>.

Video data

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

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

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Supplementary data

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

Submission checklist

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

Ensure that the following items are present:

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

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)

Printed version of figures (if applicable) in color or black-and-white

- Indicate clearly whether or not color or black-and-white in print is required.
- For reproduction in black-and-white, please supply black-and-white versions of the figures for printing purposes.

For any further information please visit our customer support site at

<http://support.elsevier.com>.

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the Publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>. When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors. If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a personalized link providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). This link can also be used for sharing via email and social networks. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/booklets>).

AUTHOR INQUIRIES

You can track your submitted article at

http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/89/p/8045/.

You can track your accepted article at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You are also welcome to contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

© Copyright 2014 Elsevier | <http://www.elsevier.com>