

Carolina dos Santos Santinoni

Cicatrização óssea de defeitos de tamanho crítico tratados com aspirado de medula óssea, laser em baixa intensidade ou a associação de ambas as terapias. Estudo histológico e histométrico em calvárias de ratos.

ARAÇATUBA – SP

2012

Carolina dos Santos Santinoni

Cicatrização óssea de defeitos de tamanho crítico tratados com aspirado de medula óssea, laser em baixa intensidade ou a associação de ambas as terapias. Estudo histológico e histométrico em calvárias de ratos.

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araçatuba – UNESP, para a obtenção do Grau de “MESTRE EM ODONTOLOGIA” – Área de Periodontia

Orientadora: Professora Adjunto Maria José Hitomi Nagata

ARAÇATUBA – SP

2012

Catálogo na Publicação (CIP)

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

S235c Santinoni, Carolina dos Santos.
Cicatrização óssea de defeitos de tamanho crítico tratados com Aspirado de Medula Óssea, Laser em Baixa Intensidade ou a associação de ambas as terapias : estudo histológico e histométrico em calvárias de ratos / Carolina dos Santos Santinoni. - Araçatuba : [s.n.], 2012
90 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

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

1. Células-tronco 2. Medula óssea 3. Lasers 4. Terapia a laser de baixa intensidade 5. Regeneração óssea

Black D6
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 do Campus de Araçatuba – Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- UNESP

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

Dedicatória

Dedico este trabalho...

A Deus

Neste momento tão especial, volto a Ti o meu olhar e elevo o meu louvor. Não foram as idéias, a paixão pela pesquisa ou o referencial teórico que me ajudaram a chegar até aqui, mas sim Sua presença constante em minha vida. Como Pai zeloso, seguiu ao meu lado durante toda minha caminhada, carregando-me em Teus braços no momento do desmaio e do desânimo. Obrigada por poder exercer a profissão que amo.

Agradeço por tanto amor e por ter-me permitido chegar até aqui. Quero hoje, entrelaçando as minhas mãos em Suas mãos, pedir que continue a caminhar comigo por toda minha vida. Teu amor é o que me faz seguir em frente.

“Deu-me serenidade para aceitar tudo aquilo que não poderia ser mudado;

Deu-me força para mudar tudo o que pôde ser mudado;

E, acima de tudo, deu-me sabedoria para distinguir uma coisa da outra.”

A minha família,

Meus pais, Vanderlei e Ana

Jamais conseguirei demonstrar toda minha gratidão por vocês terem me presenteado com a riqueza do estudo. Estimuladores supremos de minhas vontades para a caminhada do amanhã, vocês nunca questionaram os meus sonhos e me apoiaram em todo caminho que escolhi seguir, mesmo sem entender ao certo para qual destino ele me levaria.

Muitas vezes deixaram de seguir seus sonhos para tornar os nossos realidade. Mãe, agradeço por ter se dedicado a nossa família todos esses anos. Pai, obrigada por ser esse exemplo de alegria e dignidade.

Minha irmã, Juliana

Desde criança, sempre tive grande admiração por sua sede inesgotável por conhecimentos e por sua inteligência. Essa admiração despertou em mim o interesse em querer aprender sempre mais e certamente me direcionou ao caminho das pesquisas que hoje sigo. Agradeço por respeitar minha ausência quando não pude estar ao seu lado e pelos momentos de apoio incondicional!

“Ainda que eu conhecesse todos os mistérios e toda a ciência

Se não tivesse amor, nada seria.”

Ao meu namorado,

Daniel

Descrever aqui os motivos pelos quais eu dedico este trabalho a você seria descrever cada minuto desde o dia em que nos conhecemos. Por tanto companheirismo, por tanto amor, pelo simples fato de estarmos juntos... Se hoje estou realizando meus sonhos, certamente, também devo isso a você que estive ao meu lado em cada momento.

Você foi um presente de Deus para completar minha vida e me fazer mais feliz! Um anjo que, desde o princípio, estive presente em cada momento importante para mim, compartilhando os momentos de alegria e me ajudando a crescer nos momentos de dificuldade.

Agradeço por ter compartilhado sua experiência, por compreender minhas ausências, pela paciência e por querer sempre o melhor de mim, pela Fé que compartilhamos e por estar ao meu lado SEMPRE. Agradeço, também, a Deus por ter a oportunidade de ter alguém tão especial em minha vida.

“O amor é perfeito quando encontramos alguém que nos
transforma no melhor que podemos ser.”

Agradecimentos

Especiais

Pela realização do sonho...

A minha Orientadora,

Maria José Hitomi Nagata

Sempre fui admiradora da prática da Ciência. Quando a conheci, ainda na Graduação, passei a admirá-la por ser essa professora e pesquisadora com tanto prestígio. Surgiu, então, a oportunidade de ser sua estagiária e passei a acreditar que o sonho de ser pesquisadora pudesse se tornar real. A minha escolha pela carreira acadêmica certamente foi encorajada pelas oportunidades que a senhora me ofereceu. E meu sonho tem se concretizado da melhor maneira que poderia ser: aprendendo com uma pesquisadora de excelência, de profissionalismo inquestionável. Quanto mais nós convivemos, mais crescem a admiração e o respeito que tenho pela senhora.

Além de ser uma excelente orientadora, sempre ressaltando o melhor de seus orientados e respeitando a individualidade de cada um, a senhora é uma verdadeira amiga, sempre disposta a ouvir e compartilhar uma palavra sincera. Obrigada pela oportunidade de realização desse curso e pelo orgulho de dizer que sou sua orientada. Espero continuar aprendendo muito caminhando ao seu lado.

“Ensinar é acreditar que se pode contribuir para a formação de um caráter,
é compartilhar de sua própria existência.”

*P*ela contribuição em minha formação e
no desenvolvimento desse trabalho

Ao Professor Dr. Alvaro Francisco Bosco,

Exemplo de profissional, professor e pesquisador, reconhecido por sua extrema competência. Fonte de sabedoria, mansidão e humildade. Com tanta generosidade, o senhor nos presenteia compartilhando o conhecimento adquirido com tantos anos de experiência. Agradeço imensamente por toda ajuda durante o curso de Mestrado e por me permitir ter o orgulho de dizer que sou sua aluna. O senhor me faz amar cada dia mais a Periodontia.

Aos Professores

Dr. Valdir G. Garcia e Dra. Leticia H. Theodoro,

Sinto-me muito honrada em poder dizer que faço parte de uma equipe com professores tão competentes e tão importantes para a Periodontia mundial. Agradeço infinitamente por toda ajuda dispensada e por sempre me receberem com tanto carinho nos momentos de dúvida. Vocês nos permitiram compartilhar com vocês momentos de muita alegria. Desejo continuar a aprender sempre mais na presença de vocês.

Ao Prof. Dr. Stephen E. Fucini

Agradeço pelos momentos em que compartilhamos seu conhecimento e sua experiência profissional; pelas traduções e pelas aulas de Periodontia e Implantodontia *in english*; pela doação de equipamentos e materiais para nosso melhor aprendizado durante o curso; por compartilhar nossas conquistas sempre com entusiasmo e alegria.

Ao Prof. Dr. Edilson Ervolino

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 na análise histológica deste trabalho.

A Profa. Dra. Suely R. Mogami Bomfim

e sua equipe do Curso de Medicina Veterinária

Agradeço infinitamente pelo auxílio profissional, sem o qual esse trabalho não seria realizado. Sempre disposta a nos ajudar, disponibilizou sua equipe incontáveis vezes para realização dos nossos experimentos. Por várias vezes nos incluiu nos seus inúmeros afazeres e dividiu o tempo que dedica a sua família para nos ajudar. Agradeço por tanta generosidade.

Agradecimentos

*P*ela possibilidade de realização deste curso,

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 Professora Dra **Maria José Hitomi Nagata** e Vice-Coordenador **Celso Koogi Sonoda**, por trabalharem com garra, determinação e generosidade em busca do bem comum aos pesquisadores de nosso Programa.

À FAPESP, pela concessão da Bolsa de Mestrado (Processo Nº 2010/04450-2) 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.

*P*ela amizade incondicional,

Aos 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, 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.

*Dona Cida e Sr. Argeu, Thiago, Raquel e Arthur, Carol
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.”

A amiga,

Bruna Soares

Como nossa amizade é importante para mim!

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.

"E, às vezes, quando os procuro,
Noto que eles não têm noção de como me são necessários,
De como são indispensáveis ao meu equilíbrio vital,
Porque eles fazem parte do mundo que eu tremulamente construí
E se tornaram alicerces do meu encanto pela vida..."

Vinicius de Moraes

As amigas Natália M. Pola e Natália de Campos

Minhas queridas, eu não poderia fazer o agradecimento a vocês de forma individual, pois separá-las até mesmo nesse momento seria um equívoco irreparável...

Com o ingresso na Pós-Graduação, pude conhecer melhor as autênticas Natália's da Periodontia de Araçatuba. Com pouco tempo de convivência percebi o motivo de andarem sempre juntas: vocês se completam... Cada uma com seus traços característicos que juntos formam essa dupla dinâmica, competente e maravilhosa que só poderia resultar em bons momentos.

Desde o começo vocês me acolheram com o maior carinho, me inseriram na vida pessoal e na amizade de vocês. Nossos encontros foram mais frequentes, a convivência se tornou mais intensa, os laços se tornaram mais estreitos e eu descobri em vocês novas amigas, com as quais eu pude contar em TODOS os momentos até aqui. Não houve situação em que eu tenha ouvido “não” de vocês! Diante dos momentos de angústia, vocês sempre compartilharam uma palavra de apoio e a certeza de que tudo ficaria bem. Também dividimos nessa caminhada, juntas, muitos momentos felizes e inesquecíveis. Sempre superamos nossas dificuldades, nossas diferenças e nos tornamos verdadeiras mosqueteiras: uma por todas e todas por uma!

Com vocês, todo o trabalho dispensado para realização dessa Dissertação tornou-se muito mais simples e feliz. Agradeço infinitamente toda a ajuda, todo conhecimento compartilhado, toda paciência e todo o tempo que vocês dedicaram a mim. Não poderia terminar esse agradecimento sem reconhecer a entrada de vocês em minha vida pelas mãos de Deus e, por esse feito, também serei eternamente grata a Ele.

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

Aos Pós-Graduandos da Periodontia,

Erivan, Mariéllen, Paula e Vivian

Durante esse curso, passamos a maior parte dos nossos dias juntos. Compartilhamos tantos sentimentos, tantos bons momentos que, de fato, vocês se tornaram minha segunda família. Nossa amizade é muito especial para mim! Os levarei para sempre na lembrança e no coração. Obrigada pelos bons momentos de convivência e por cada minuto que passaram comigo!

Erivan, sua **GENEROSIDADE** reflete como uma luz própria que te faz brilhar de maneira tão especial! Obrigada pelos conhecimentos compartilhados. Sua companhia é sempre muito agradável.

Mari, sua **ALEGRIA** contagiante faz nossos dias mais felizes! Se na Graduação não tivemos oportunidade para nos aproximar, na Pós-Graduação, a amizade construída será lembrada para sempre!

Paulinha, nossa **PEQUENA GIGANTE**! Sua força e seu profissionalismo fazem de você uma pessoa com potencial para brilhar muito mais do que você possa imaginar! Obrigada pela convivência agradável. Você é uma amiga muito especial...

Vivian, você chegou à Periodontia de mansinho e surpreendeu a todos com sua **EXPERIÊNCIA** e capacidade de ir além! Tornou-se uma verdadeira amiga, sempre nos incentivando a seguir em frente! Muito obrigada pela amizade incondicional...

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

Aos Professores e Amigos,

Dr. Michel R. Messoria e Dra. Flávia A. C. Furlaneto

Pela grande admiração que tive quando conheci um pouquinho da história e da determinação de vocês, eu me dei à liberdade de considerá-los grandes amigos! Vocês são exemplos de companheirismo, competência, persistência e garra!

Agradeço por toda contribuição para minha formação, por toda ajuda dispensada para que esse trabalho fosse realizado e pela confiança depositada. Agradeço a oportunidade de ter pessoas como vocês em minha vida, que hoje colhem os frutos de sua intensa dedicação, renovando nossas esperanças no futuro e assim nos ajudam a manter vivos os nossos sonhos.

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

Platão

Aos agregados da família Periodontia,

Alberto, Artur, Caril, Samuel e Pedro

A vocês cabe agradecer pelo companheirismo aos amigos da Periodontia. Certamente é o apoio de vocês que os impulsiona a superar limites e alcançar vitórias. Obrigada pelos momentos de convivência agradável e de diversão! Vocês são fundamentais para tornar nossa família completa e mais feliz!

João Guilherme

Nossa amizade me faz lembrar o início desse caminho que percorri para chegar até aqui... Você foi uma das primeiras pessoas com quem tive contato quando começamos a Graduação e por esse e outros tantos motivos, é tão especial para mim! Obrigada por sua amizade sincera em todos esses anos e pelos momentos de diversão em sua rara companhia.

Renata Reis

Sempre disposta a renovar o astral com momentos de muitas risadas quando o trabalho interminável da Pós-Graduação esgota nossas energias! 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

Ana Carolina, Josecarlos e Davi

Amigos que conheci por intermédio do Daniel, mas que se tornaram tão especiais para mim! Vocês são exemplo de que o amor que supera tudo. Obrigada pela amizade sincera, por dividirmos momentos tão especiais e alegres juntos.

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

Ao Dr. Mario Nagata e a Sra. Hermínia Nagata,

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

A Médica Veterinária Vanessa Borges

Agradeço por seu auxílio profissional de duas diferentes formas: pelo serviço prestado sem o qual esse trabalho não seria realizado e pela amizade que foi construída graças a ele. Muito obrigada pela disponibilidade e pelos momentos de convivência agradável.

Ao Prof. Dr. Juliano Milanezi de Almeida

Pela amizade incondicional, por estar sempre disposto a nos ajudar, por ser para nós exemplo de dedicação e competência. Obrigada pela convivência que nos possibilita compartilhar todo seu conhecimento.

Ao Prof. Dr. Leandro Araújo Fernandes

Em cada contato, a certeza de poder contar com você em todos os momentos! Compartilhando seus conhecimentos, mesmo distante, você contribuiu muito para que eu concluísse as etapas necessárias para chegar até aqui. Obrigada pela generosidade e pela amizade sincera.

Aos Professores e funcionários do

Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese

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

Aos funcionários

Joilson de Barros Lelis, do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada, pela contribuição direta ou indireta para realização do meu trabalho, auxiliando nos afazeres do dia-a-dia do laboratório, da Graduação ou da Pós-Graduação.

Odair Vicente, do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada, pela contribuição na fase experimental desse trabalho. Sempre pronto para ajudar com muita alegria. Muito obrigada por sua eficiência, dedicação e preocupação com nossas tarefas.

Arnaldo, por ter cuidado com tanto carinho e eficiência dos animais, sua colaboração foi muito importante para a realização desse trabalho.

Da **Seção de Pós-Graduação** da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, pelo excelente trabalho, atenção dispensada, grande disposição em atender e ótimo relacionamento.

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

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

Aos 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 Mestrado em Odontologia.

Aos colegas de Pós-Graduação,

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

Aos pacientes

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

Aos animais

Por servirem à humanidade com suas vidas.

*A*queles 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

*“A mente que se abre a uma nova idéia jamais
retornará ao seu tamanho original.”*

Albert Einstein

Resumo

SANTINONI CS. **Cicatrização óssea de defeitos de tamanho crítico tratados com aspirado de medula óssea, laser em baixa intensidade ou a associação de ambas as terapias. Estudo histológico e histométrico em calvárias de ratos.** [Mestrado em Periodontia]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2012.

O propósito deste estudo foi avaliar, histologicamente e histometricamente, o processo de cicatrização óssea em defeitos de tamanho crítico (DTC), criados cirurgicamente em calvárias de ratos e tratados com aspirado de medula óssea (AMO), laser em baixa intensidade (LLLT) ou a associação de ambas as terapias. 40 ratos foram divididos 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 foi preenchido com AMO. Nos grupos LLLT e AMO/LLLT, o defeito recebeu aplicação da LLLT (InGaAlP laser), foi preenchido com coágulo sanguíneo e AMO, respectivamente, e recebeu novamente a aplicação da LLLT. Todos os animais foram submetidos à eutanásia aos 30 dias pós-operatórios. Análises histomorfométrica, usando *software* de análise de imagem, e histológica foram realizadas. A Área de Osso Neoformado (AON) foi calculada como uma porcentagem da área total do defeito original. Os dados foram analisados estatisticamente (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$). O Grupo AMO/LLLT ($38,92 \pm 7,12\%$) apresentou AON significativamente maior que os grupos C ($13,75 \pm 4,32\%$), AMO ($28,71 \pm 10,42\%$) e LLLT ($18,40 \pm 7,41\%$). O Grupo AMO apresentou AON

significativamente maior que o controle. Não foram observadas diferenças significativas na AON dos grupos LLLT e C. Dentro dos limites desse estudo, pode-se concluir que a associação AMO/LLLT produziu formação óssea significativamente maior em DTC cirurgicamente criados em calvárias de ratos quando comparada ao controle ou a cada tratamento isoladamente.

Palavras-chave: Células-tronco, medula óssea, lasers, terapia a laser de baixa intensidade, regeneração óssea.

Abstract

SANTINONI CS. **Bone healing in critical-size defects treated with either bone marrow aspirate, low-level laser therapy or a combination of both therapies: a histologic and histometric study in rat calvaria** [dissertation]. Araçatuba: Univ Estadual Paulista; 2012.

The purpose of this study was to analyze, histologically and histometrically, the influence of bone marrow aspirate (BMA), low-level laser therapy (LLLT) or their combination on bone healing in surgically created critical-size defects (CSD) in rat calvaria. 40 rats were 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 bone marrow aspirate. In groups LLLT and BMA/LLLT, the defect received laser irradiation (InGaAlP laser), was filled with blood clot or BMA respectively, and then irradiated again. All animals were euthanized at 30 days postoperatively. Histometric, using image analysis software, and histologic analyses were performed. Amount of newly formed bone (NFB) was calculated as a percentage of the total area of the original defect. Data were statistically analyzed (ANOVA, Tukey $p < 0.05$). Group BMA/LLLT ($38.92 \pm 7.12\%$) had significantly greater NFB than groups C ($13.75 \pm 4.32\%$), BMA ($28.71 \pm 10.42\%$) and LLLT ($18.40 \pm 7.41\%$). Group BMA presented significantly greater NFB than control, while group LLLT did not. Within the limits of this study, it can be concluded that the combination of BMA/LLLT yielded significantly greater bone formation in surgically created CSD in rat calvaria when compared to control, or either treatment alone.

Keywords: Stem cells, bone marrow, lasers, low-level laser therapy, bone regeneration

Lista de Figuras

- Figura 1 - Punção da crista ilíaca esquerda do animal para coleta do AMO 67
(A). *Eppendorf* contendo 1 mL de AMO (B).
- Figura 2 - Defeito de tamanho crítico (5 mm de diâmetro) e as marcações de 68
referência criadas na calvária.
- Figura 3 - Esfregação das amostras de AMO (C) mostrando CM (setas 69
vermelhas) e plaquetas (setas pretas) com morfologia normal.
Panótico. Aumento original 1000x.
- Figura 4 - Visões panorâmicas dos defeitos cirúrgicos aos 30 dias pós- 70
operatórios. Grupo C (A); Grupo AMO (B); Grupo LLLT (C);
Grupo AMO/LLLT (D). H&E. Aumento original 1,25x.
- Figura 5 - Grupo AMO/LLLT. 30 dias pós-operatórios. Osso neoformado 71
(ON) rico em osteócitos e recoberto por osteoblastos em franca
atividade. Matriz osteóide (seta) entre as vertentes ósseas. H&E.
Aumento original 400x.
- Figura 6 - Média (%) e Desvio-Padrão da Área de Osso Neoformado (AON) 72
para os grupos C, AMO, LLLT e AMO/LLLT aos 30 dias pós-
operatórios.

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Média (%) e Desvio-Padrão da AON dentro da área do defeito cirurgicamente criado, com comparação entre os grupos. 30 dias pós-operatórios.	74
---	----

Lista de Anexos

Lista de Anexos

Anexo A - Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)	77
Anexo B - Normas para Publicação segundo o Periódico “Bone”	79

Lista de
Abreviaturas e
Siglas

Lista de Abreviaturas e Siglas

AMO	=	Aspirado de Medula Óssea
AMO/LBI	=	Aspirado de Medula Óssea associado ao Laser de Baixa Intensidade
ANOVA	=	Análise de Variância
AON	=	Área de Osso Neoformado
AT	=	Área Total
BMPs	=	Proteínas Ósseas Mrfogenéticas
C	=	Controle
CEEA	=	Comissão de Ética na Experimentação Animal
cm	=	Centímetro
CM	=	Células Medulares
cm ²	=	Centímetro Quadrado
CTMs	=	Células-Tronco Mesenquimais
DP	=	Desvio-Padrão
DTC	=	Defeito de Tamanho Crítico
EDTA	=	Ácido Etilenodiaminotetracético
<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
H&E	=	Hematoxilina e Eosina
InGaAlP	=	Índio-Gálio-Alumínio-Fósforo

<i>IU</i>	=	International Unit
J	=	Joule
Kg	=	Kilograma
LBI	=	Laser em Baixa Intensidade
LLLT	=	Terapia com laser em baixa intensidade
Ltda	=	Limitada
mg	=	Miligrama
mL	=	Mililitro
mm	=	Milímetro
mm ²	=	Milímetro Quadrado
n ^o	=	Número
nm	=	Nanômetro
ON	=	Oso Neoforado
<i>rp</i>	=	Coeficiente de Correlação de Pearson
s	=	Segundo
UNESP	=	Universidade Estadual Paulista
W	=	Watts
μL	=	Microlitro
μm	=	Micrometro

Lista de Símbolos

Lista de Símbolos

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

Sumário

Manuscrito para Publicação	41
Página de título	42
Resumo	43
Introdução	44
Material e métodos	45
Resultados	51
Discussão	53
Agradecimentos	58
Referências	59
Anexos	75

*Manuscrito para
Publicação**

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

Cicatrização óssea de defeitos de tamanho crítico tratados com aspirado de medula óssea, laser em baixa intensidade ou a associação de ambas as terapias. Estudo histológico e histométrico 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.

Palavras-Chave: Células-tronco, medula óssea, lasers, terapia a laser de baixa intensidade, regeneração óssea

Autora responsável pela correspondência:

Maria J. H. Nagata

Telefone: +55 18 3636 3271

Fax: +55 18 3636 3332

Rua José Bonifácio, 1193

CEP: 16015 - 050 Araçatuba, SP, Brasil

e-mail: mjnagata@foa.unesp.br

Resumo

O propósito deste estudo foi avaliar, histologicamente e histometricamente, o processo de cicatrização óssea em defeitos de tamanho crítico (DTC), criados cirurgicamente em calvárias de ratos e tratados com aspirado de medula óssea (AMO), laser em baixa intensidade (LLLT) ou a associação de ambas as terapias. 40 ratos foram divididos 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 foi preenchido com AMO. Nos grupos LLLT e AMO/LLLT, o defeito recebeu aplicação da LLLT (InGaAlP laser), foi preenchido com coágulo sanguíneo e AMO, respectivamente, e recebeu novamente a aplicação da LLLT. Todos os animais foram submetidos à eutanásia aos 30 dias pós-operatórios. Análises histomorfométrica, usando *software* de análise de imagem, e histológica foram realizadas. A Área de Osso Neoformado (AON) foi calculada como uma porcentagem da área total do defeito original. Os dados foram analisados estatisticamente (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$). O Grupo AMO/LLLT ($38,92 \pm 7,12\%$) apresentou AON significativamente maior que os grupos C ($13,75 \pm 4,32\%$), AMO ($28,71 \pm 10,42\%$) e LLLT ($18,40 \pm 7,41\%$). O Grupo AMO apresentou AON significativamente maior que o controle. Não foram observadas diferenças significativas na AON dos grupos LLLT e C. Dentro dos limites desse estudo, pode-se concluir que a associação AMO/LLLT produziu formação óssea significativamente maior em DTC cirurgicamente criados em calvárias de ratos quando comparada ao controle ou a cada tratamento isoladamente.

Palavras-chave: Células-tronco, medula óssea, lasers, terapia a laser de baixa intensidade, regeneração óssea.

1. Introdução

A regeneração de defeitos ósseos tem atraído o interesse de pesquisadores de várias áreas da saúde. Atualmente, a reconstrução óssea pode ser obtida, basicamente, com a aplicação de estímulos químicos, biomateriais, proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) ou físicos, tais como ultrassom, campos eletromagnéticos e, mais recentemente, o laser em baixa intensidade [1].

Vários estudos têm demonstrado que a terapia com laser em baixa intensidade (LLLT) promove a regeneração óssea [2-7]. Estudos *in vitro* têm sugerido que a LLLT poderia promover a formação de novo osso por induzir a proliferação e diferenciação de osteoblastos [8-10]. Além disso, a LLLT, quando aplicada durante a fase inicial do processo de cicatrização, pode interferir positivamente na angiogênese, que é um componente-chave da regeneração óssea [11,12]. Contudo, outros estudos não confirmaram o efeito positivo da LLLT na regeneração óssea [13,14]. Tais controvérsias podem ser atribuídas a variações nos protocolos de irradiação e modelos experimentais utilizados [9,15].

A engenharia de tecidos, um dos principais componentes da medicina regenerativa, segue os princípios do transplante de células para o desenvolvimento de substitutos biológicos que possam restaurar e manter a função normal de tecidos [16]. Nos últimos anos, tem-se observado um interesse crescente no potencial terapêutico de células derivadas da medula óssea para aplicações da engenharia tecidual [17]. Estudos recentes têm avaliado a terapia envolvendo cultivo de células-tronco mesenquimais (CTMs) derivadas da medula óssea com objetivo de promover o reparo ósseo [18-23]. O cultivo das CTMs é uma abordagem promissora, porém requer instalações especiais, consome tempo e é oneroso, o que poderia torná-lo desvantajoso na prática clínica. Com o objetivo de simplificar o uso dessas células para que seu potencial terapêutico possa

ser melhor explorado, o aspirado de medula óssea (AMO) tem sido proposto como uma fonte viável de CTMs [24-26]. O AMO contém uma porcentagem de células hematopoiéticas, endoteliais e CTMs significativamente maior que o sangue periférico [27]. O transplante de CTMs autógenas para o sítio da injúria tecidual é um instrumento promissor para estratégias baseadas em células necessárias para a regeneração óssea, reparo tecidual e cicatrização [27]. Poucos estudos *in vivo* foram realizados para avaliar o uso isolado do AMO [25] ou sua associação a enxertos ósseos ou biomateriais no reparo ósseo [24-30] e estes demonstraram resultados promissores. Contudo, como os enxertos ósseos e biomateriais são geralmente osteocondutores, eles poderiam potencialmente obscurecer o efeito genuíno do AMO. Até a presente data, a influência do uso isolado do AMO no reparo ósseo foi avaliada somente em um estudo [25].

Estudos *in vitro* que avaliaram a ação da LLLT sobre as CTMs têm demonstrado resultados promissores. Tem sido demonstrado que a LLLT promoveu aumento da proliferação de CTMs [31] e induziu sua diferenciação em osteoblastos [32]. Contudo, é importante ressaltar que, até a presente data, os efeitos desta associação ainda não foram avaliados *in vivo*.

O propósito deste estudo foi avaliar, histologicamente e histometricamente, o processo de cicatrização óssea em defeitos de tamanho crítico, criados cirurgicamente em calvárias de ratos e tratados com aspirado de medula óssea (AMO), laser em baixa intensidade (LLLT) ou a associação de ambas as terapias.

2. Materiais e Métodos

2.1. Modelo Experimental

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista – UNESP (2010/004818). Foram utilizados 40 ratos machos (*Rattus norvegicus, albinus*, Wistar), com idade entre 5 e 6 meses, pesando entre 350 e 450 g (UNESP, Biotério da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba-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 divididos 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 do AMO

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 da realização dos procedimentos cirúrgicos, os animais desses grupos foram submetidos à coleta de medula das cristas ilíacas direita e esquerda (Fig. 1A). 1 mL de medula (0,5 mL da crista ilíaca direita e 0,5 mL da crista ilíaca esquerda) 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. A medula retirada foi armazenada até o momento da aplicação clínica (Fig. 1B).

2.3. Procedimento Cirúrgico

Os ratos dos grupos C e LLLT foram anestesiados seguindo o mesmo protocolo descrito anteriormente para os grupos AMO e AMO/LLLT.

Os animais de todos os grupos experimentais foram submetidos ao seguinte procedimento cirúrgico: após preparo anti-séptico, foi realizada uma incisão semilunar na região anterior da calvária e um retalho de espessura total foi rebatido em direção posterior. Um defeito de tamanho crítico (DTC) de 5 mm de diâmetro foi criado com uma trefina acoplada em uma peça de mão de baixa rotação, sob irrigação abundante com solução salina estéril. O defeito incluiu uma porção da sutura sagital.

Uma marcação no formato de “L” foi feita 2 mm anterior e outra 2 mm posterior às margens do defeito cirúrgico utilizando uma broca carbide tronco-cônica e um guia cirúrgico. O maior eixo de cada “L” localizou-se sobre um eixo longitudinal que dividia o defeito cirúrgico ao meio. As marcações foram preenchidas com amálgama [33] (Fig. 2). Seu objetivo foi permitir a identificação do centro do defeito cirúrgico original durante o processamento laboratorial e, também, ser usado como referência para localizar precisamente as margens ósseas originais do defeito durante a análise histométrica.

No Grupo C, o defeito cirúrgico foi preenchido somente com coágulo sanguíneo. No Grupo AMO, o defeito foi preenchido com AMO. No Grupo LLLT, o defeito recebeu a aplicação do laser em baixa intensidade (LBI), foi preenchido com coágulo sanguíneo e recebeu novamente a aplicação do LBI. No Grupo AMO/LLLT, o defeito recebeu a aplicação do LBI, foi preenchido com AMO e recebeu novamente a aplicação do LBI. Os tecidos moles foram, então, reposicionados e suturados para obter-se um fechamento primário da ferida. Cada animal recebeu, no pós-operatório imediato, injeção intramuscular de morfina (1 mg/kg de peso corporal) para assegurar a analgesia e de 24.000 IU de penicilina G-benzatina (Pentabiótico* Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge® Saúde Animal Ltda., Campinas, SP, Brasil).

2.4. Protocolo de aplicação do AMO

No momento da aplicação clínica, um volume de 50 µl de AMO foi ativado com uma solução de cloreto de cálcio a 10% (Calcium Chloride 10% Solution, ScienceLab.com Inc., Houston, TX, EUA), na proporção de 0,05 mL de cloreto de cálcio para cada 1 mL de AMO, para promover a coagulação.

2.5. Protocolo de aplicação da LLLT

O laser em baixa intensidade utilizado neste estudo foi o de índio-gálio-alumínio-fósforo (InGaAlP) (TheraLase®, DMC Equipamentos Ltda, São Carlos, SP, Brasil), com comprimento de onda de 660 nm e uma área do spot de 0,0283 cm². A LLLT foi aplicada em 8 pontos equidistantes na porção interna do defeito cirúrgico (modo contato), de tal forma que toda extensão do mesmo recebesse o tratamento com laser. O laser foi aplicado com potência de 0,035 W por 4 s/ponto, irradiância de 1,23W/cm², energia de 0,14 J/ponto e densidade de energia de 4,9 J/cm².

Nos grupos LLLT e AMO/LLLT, cada defeito cirúrgico recebeu, imediatamente após o preparo, aplicação da LLLT seguindo o protocolo anteriormente descrito. Concluída a irradiação da parte interna do defeito cirúrgico, este foi preenchido com coágulo sanguíneo (Grupo LLLT) ou AMO (Grupo AMO/LLLT) e recebeu, novamente, aplicação da LLLT seguindo o mesmo protocolo.

2.6. Contagem de Plaquetas e Células Medulares (CM)

As contagens de plaquetas e CM nas amostras de AMO foram realizadas em câmara de Neubauer, manualmente. Para a contagem de plaquetas, líquido de Brecher foi usado para lisar os eritrócitos e diluir as amostras de AMO. Para a contagem de CM, as amostras de AMO foram separadas, diluídas e homogeneizadas em Líquido de Turk.

Além disso, foram realizados esfregaços de todas as amostras e coloração com “Panótico Rápido LB” (LaborClin, Pinhais, PR, Brasil) para avaliar a morfologia das plaquetas e CM. As contagens de plaquetas e CM e a análise de suas morfologias foram realizadas por um médico veterinário hematologista.

2.7. Processamento Tecidual

Todos os animais foram submetidos à eutanásia aos 30 dias pós-operatórios. A área do defeito cirúrgico original e os tecidos circunjacentes foram removidos em bloco. As peças foram fixadas em solução de formol neutro a 10%, lavadas em água corrente e então descalcificadas em solução de Ácido Etilenodiaminotetracético (EDTA) a 18%. Após descalcificação inicial, cada peça foi dividida longitudinalmente em dois blocos, exatamente ao longo do centro do defeito cirúrgico original, usando-se os maiores eixos de cada marcação de amálgama em formato de “L” como referência. Cortes transversais foram então realizados usando o menor eixo de cada marcação em “L” como referências. Cada espécime apresentou-se, então, com 9 mm de comprimento no eixo longitudinal tangenciando o centro do defeito, permitindo a identificação precisa das margens do defeito cirúrgico original durante as análises histológica e histométrica. Após um período de descalcificação adicional, as peças foram processadas e incluídas em parafina. Foram realizados cortes seriados longitudinais com 6 µm de espessura na direção longitudinal, a partir do centro do defeito cirúrgico original. Os cortes foram corados pelas técnicas de Hematoxilina e Eosina (H&E) para análises por microscopia de luz.

2.8. Análise Histomorfométrica

Foram selecionados 2 cortes histológicos, representando o centro do defeito cirúrgico original, para as análises histológica e histométrica. Essas análises foram realizadas por um examinador calibrado e cego aos tratamentos realizados. As imagens dos cortes histológicos foram capturadas por meio de uma câmera digital acoplada a um microscópio óptico com um aumento original de 1,25x. As imagens digitais foram salvas em um computador. O *software* “ImageLab 2000” (Dracon Bio Informática Ltda., Vargem Grande do Sul, SP, Brasil) foi utilizado para a análise histomorfométrica. Os seguintes critérios, baseados no trabalho de Messoria et al. [33], foram utilizados para padronizar a análise histomorfométrica das imagens digitais:

- 1) A Área Total (AT) a ser analisada correspondeu à área inteira do defeito cirúrgico original. Esta área foi determinada, primeiramente, pela identificação das superfícies externa e interna da calvária original nas margens direita e esquerda do defeito cirúrgico. Estas superfícies foram conectadas com linhas desenhadas seguindo suas respectivas curvaturas. Foram então medidos, a partir de ambas as extremidades do espécime, 2 mm em direção ao centro do defeito para estabelecer os limites do defeito cirúrgico original. A Área de Osso Neoformado (AON) foi delineada dentro dos limites da AT.
- 2) A AT foi medida em mm^2 e considerada 100% da área a ser analisada. A AON também foi medida em mm^2 e calculada como porcentagem da AT.

2.9. Análise Estatística

Os valores de AON para cada animal foram representados pela porcentagem média dos 2 cortes histológicos. Esses dados percentuais foram transformados em arco seno para análise estatística. A significância das diferenças entre os grupos em relação à AON foram determinadas pela análise de variância (ANOVA), seguida pelo Teste de Tukey

post hoc quando a ANOVA sugeriu uma diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

O coeficiente de correlação de Pearson (rp) foi calculado para demonstrar a relação e a AON e a contagem de CM, bem como a relação entre a AON e a contagem de plaquetas nas amostras de AMO dos grupos AMO e AMO/LLLT.

3. Resultados

Todos os animais toleraram bem o procedimento cirúrgico e mantiveram-se saudáveis durante todo o período experimental. O pós-operatório transcorreu sem complicações.

3.1. Estudo da Contagem de Plaquetas e CM

Os esfregaços das amostras de AMO mostraram plaquetas e CM com morfologia normal (Fig. 3). A média da contagem de plaquetas das amostras de AMO foi $421,75 \pm 83,11 \times 10^3$ e de CM foi $82,35 \pm 26,85 \times 10^3$ CM/ μ l.

3.2. Análise histológica qualitativa

Grupo C

Observou-se a presença de delgada camada de tecido ósseo neoformado restrita apenas às margens do defeito cirúrgico (Fig. 4A). Em quase toda extensão do mesmo, observou-se tecido conjuntivo com grande quantidade de fibras colágenas orientadas paralelamente à superfície do defeito, com moderada quantidade de fibroblastos e de vasos sanguíneos.

Grupo AMO

Observou-se uma delicada rede de trabéculas de osso imaturo, entremeadas por amplos espaços medulares, que progredia em direção ao centro do defeito (Fig. 4B). Dois espécimes apresentaram neoformação óssea em toda extensão do defeito cirúrgico e, em três espécimes, essa neoformação ocorreu em quase toda sua extensão. Nos demais espécimes, o osso neoformado ocupava mais da metade da ferida cirúrgica. Nestes casos, as vertentes ósseas voltadas para o centro do defeito mostraram-se repletas de grande quantidade de osteoblastos demonstrando características morfológicas de intensa atividade. Na parte central da ferida, observou-se tecido conjuntivo fibroso com moderada quantidade de fibroblastos, vasos sanguíneos e, na maioria dos espécimes, pequenos focos de células inflamatórias.

Grupo LLLT

Os defeitos apresentaram neoformação óssea mais acentuada que no Grupo C, mas ainda confinada às margens do defeito ósseo (Fig. 4C). Não houve reparo completo do defeito cirúrgico em nenhum dos espécimes deste grupo. No centro do defeito, observou-se grande quantidade de fibroblastos e fibras colágenas, ambos orientados paralelamente a sua superfície, além de uma abundância de vasos sanguíneos, nitidamente maior que no grupo C.

Grupo AMO/LLLT

A maioria dos espécimes analisados apresentou neoformação óssea em toda a extensão do defeito cirúrgico. Nos demais espécimes, observou-se neoformação óssea em quase toda a extensão do defeito, permanecendo uma pequena área ocupada por tecido conjuntivo fibroso entre as vertentes ósseas (Fig. 4D). As trabéculas de osso ainda

imaturu mostraram-se mais espessas que no Grupo AMO, ricas em osteócitos e recobertas por osteoblastos em franca atividade (Fig. 5). Os pequenos espaços medulares mostravam-se ocupados por medula óssea. O perióstio apresentou-se organizado e restituído na sua totalidade. Raras células inflamatórias foram observadas.

3.3. Análises histométrica e estatística

A normalidade e homocedasticidade dos dados foram verificadas. As médias e os desvios-padrão da AON para todos os grupos, assim como os resultados da comparação entre os grupos estão apresentados na Tabela 1 e na Fig. 6.

Não foram observadas correlações estatisticamente significativas entre a AON e a contagem de CM nas amostras de AMO dos grupos AMO e AMO/LLLT ($r^2 = 0,2230$; $p = 0,3587$). Também não foram observadas correlações estatisticamente significativas entre a AON e a contagem de plaquetas dos grupos AMO e AMO/LLLT ($r^2 = 0,03605$; $p = 0,8835$).

4. Discussão

No presente estudo, a densidade de energia utilizada nos grupos com LLLT foi 4,9 J/cm², em acordo com estudos prévios que têm mostrado que doses dentro da variação de 1 a 5 J/cm² são efetivas para o reparo ósseo [34-39]. Contudo, este protocolo de aplicação utilizado no Grupo LLLT não resultou em neoformação óssea significativamente maior que no Grupo C, aos 30 dias pós-operatórios. A importância de selecionar-se um adequado nível de energia tem sido discutida por vários autores [40,41], mas os níveis recomendados para obter-se a fotobiomodulação ideal têm variado grandemente na literatura. É possível que o efeito da LLLT sobre a regeneração óssea dependa não somente da dose total de irradiação como também do tempo e modo

de irradiação [42]. Apesar das diferenças nos modelos experimentais e metodologias, pode-se inferir que os resultados do presente estudo corroboram os achados de outros estudos em que, sob parâmetros de irradiação similares, não se observou melhora no reparo de levantamentos de seios maxilares ou defeitos ósseos tratados com LLLT quando comparados aos controles em períodos experimentais semelhantes [14,43,44]. Uma possível explicação para a ausência de efeito da LLLT na quantidade de neoformação óssea no presente estudo é a de que o comprimento de onda (660 nm) e densidade de energia (4,9 J/cm²) utilizados não foram adequados para estimular a proliferação de osteoblastos. Essa hipótese é suportada pelo estudo *in vitro* realizado por Renno et al. [45], que demonstrou que diferentes linhagens de células osteogênicas podem ser diferentemente sensíveis a vários comprimentos de onda e densidades de energia. Esses autores mostraram que a proliferação de células osteoblastos-*like* de camundongos (MC3T3) aumentou significativamente com 830 nm, mas diminuiu com 780 nm (1, 5 e 10 J/cm²), ao contrário da proliferação de células de osteossarcoma humano (MG63), que aumentou usando 780 nm (1, 5 e 10 J/cm²) ou 670 nm (5 J/cm²), mas não com 830 nm. Autores têm sugerido que os resultados da LLLT sobre a proliferação celular podem ser influenciados pela intensidade do feixe de radiação, nível de energia do laser durante aplicação e aspectos físicos dos raios de laser (reflexão, refração e absorção). A combinação específica de comprimento de onda e dose pode influenciar respostas diferentes para cada linhagem de células [46]. É importante salientar que, embora o protocolo de LLLT utilizado no presente estudo não tenha promovido a regeneração óssea, também não atuou de maneira negativa, pois os grupos LLLT e C apresentaram quantidades similares de neoformação óssea.

No presente estudo, o Grupo AMO apresentou neoformação óssea significativamente maior que os grupos C e LLLT. Esses resultados corroboram os achados de Krzymanski

et al. [25], que também obtiveram resultados animadores no reparo ósseo de defeitos mandibulares tratados com AMO somente, em coelhos. Por outro lado, os resultados do presente estudo e os de Krzymanski et al. [25] contradizem a opinião de alguns autores que acreditam que o AMO sozinho não é consistente ou suficientemente rico em CTMs para usá-lo sem modificação como uma fonte primária [19,47]. Em relação à consistência, deve-se ressaltar que, no presente estudo, a ativação da coagulação do AMO com solução de cloreto de cálcio a 10% tornou-o um material geleificado e manipulável, facilitando sua aplicação clínica. Em relação às CTMs, sabe-se que são um dos tipos celulares presentes na medula óssea, capazes de se diferenciarem em linhagens de tecidos mesenquimais, incluindo o tecido ósseo [48,49]. Estudos recentes têm mostrado que as CTMs da medula óssea apresentam maior potencial osteogênico que aquelas de outras origens anatômicas [22,50,51]. Pode-se inferir que os resultados positivos na regeneração óssea observados no Grupo AMO do presente estudo sejam devidos a um aumento significativo de CTMs no sítio da ferida cirúrgica. Apesar da contagem específica de CTMs não ter sido realizada no presente estudo, esta hipótese é suportada pelos achados do estudo de Smiler et al. [27] que analisaram amostras de AMO e de sangue periférico autógenos de pacientes, com idades variando de 23 a 73 anos, com citometria de fluxo de 6 colunas utilizando marcadores para células-tronco relacionadas com cicatrização e crescimento ósseos. Os autores concluíram que o AMO parece conter uma percentagem significativamente maior de CTMs, células-tronco hematopoiéticas e células endoteliais que o sangue periférico.

Deve-se ressaltar ainda que, no presente estudo, além da contagem de CM, foi realizada, também, a contagem de plaquetas nas amostras de AMO. Os fatores de crescimento liberados pelas plaquetas certamente contribuíram no processo regenerativo, estimulando células dentro e fora do sítio cirúrgico a trabalharem vigorosamente para a

osteoindução, osteocondução e angiogênese [52]. Contudo, é provável que a diferença na quantidade de neoformação óssea observada entre os grupos AMO e C, deveu-se, principalmente, à presença de um número aumentado de CTMs, como sugerido anteriormente. Esta hipótese é suportada por dados de estudos prévios [53,54] que utilizaram o mesmo modelo experimental e realizaram a contagem de plaquetas de amostras de sangue periférico, com médias de $474,80 \pm 80,38 \times 10^3$ plaquetas/ μL e $465,80 \pm 93,46 \times 10^3$ plaquetas/ μL , ou seja, similares à média observada nas amostras de AMO do presente estudo ($421,75 \pm 83,11 \times 10^3$ plaquetas/ μL). Assim, apesar da contagem de plaquetas não ter sido realizada no Grupo C, pode-se inferir que o coágulo naturalmente formado neste grupo, originado do sangue periférico, tenha apresentado uma quantidade de plaquetas similar àquela do AMO.

É importante considerar que alterações relacionadas à idade no microambiente da medula óssea resultam em diminuição no número e declínio na função das CTMs que se diferenciam em osteoblastos [55]. Além disso, pode haver também uma depleção no *pool* de CTMs em indivíduos mais jovens como um resultado do tratamento radioterápico para câncer [56]. Assim, uma redução nas CTMs endógenas devido ao avanço da idade ou a uma condição médica poderia ter um impacto negativo no reparo ósseo [57,58]. Tem sido mostrado que a exposição ao laser em baixa intensidade pode acelerar a proliferação de CTMs [31] e, também, de células já diferenciadas, como fibroblastos e osteoblastos [59-61]. Além disso, a LLLT tem efeitos bioestimulatórios sobre a conversão de CTMs em células formadoras de osso e sobre a indução de ossificação *ex-vivo* [32]. Portanto, a utilização da LLLT associada ao AMO poderia constituir-se em uma abordagem muito promissora para o reparo ósseo, o que foi confirmado pelos resultados do presente estudo, onde o Grupo AMO/LLLT apresentou quantidade de formação óssea significativamente maior que todos os demais grupos

analisados (C, AMO e LLLT). Além disso, observou-se, também, características de um estágio mais avançado da neoformação óssea, tais como trabéculas ósseas mais espessas, ricas em osteócitos e espaços medulares menos amplos e preenchidos com medula óssea. Pode-se sugerir que, no Grupo AMO/LLLT, assim como no Grupo AMO, havia, provavelmente, um número maior de CTMs no sítio da ferida cirúrgica devido à presença do AMO [27] e que a LLLT deve ter atuado não somente estimulando a proliferação destas células [31], como também a sua diferenciação na linhagem osteoblástica [32], resultando em um reparo ósseo melhor e mais rápido. Essa hipótese é suportada, ainda, pelos achados do estudo clássico de Ozawa et al. [62], que avaliaram a LLLT em vários estágios da cultura de células de calvária de ratos e sugeriram que este tipo de irradiação pode atuar através de dois mecanismos principais na estimulação da formação óssea: estimulação da proliferação de células precursoras osteoblásticas e posterior estimulação da diferenciação celular, aumentando o número de células osteoblásticas, com subsequente aumento na formação óssea. Sabe-se que o potencial osteogênico das CTMs depende de vários fatores genéticos, bem como de fatores indutores locais e sistêmicos [63] e a LLLT poderia atuar como um deles [44]. É importante, ainda, ressaltar que, no Grupo AMO/LLLT do presente estudo, foram utilizados parâmetros de irradiação similares aos utilizados no estudo *in vitro* de Eduardo et al. [31], onde se observou que a LLLT promoveu uma melhora da proliferação de CTMs cultivadas sob condições de déficit nutricional.

Os resultados do presente estudo sugerem que a associação AMO/LLLT parece ser uma abordagem muito promissora para promover o reparo ósseo de defeitos críticos, com possíveis aplicações futuras em várias áreas da Odontologia e Medicina. Contudo, muitos estudos serão ainda necessários para a completa avaliação desta nova modalidade terapêutica.

Dentro dos limites desse estudo, pode-se concluir que a associação AMO/LLLT produziu formação óssea significativamente maior em DTC cirurgicamente criados em calvárias de ratos quando comparada ao controle ou a cada tratamento isoladamente.

6. Agradecimentos

À Professora Dra. Suely Regina Mogami Bomfim do Curso de Medicina Veterinária do Campus de Araçatuba – UNESP, pela assistência nos procedimentos experimentais relacionados ao preparo do AMO; ao Professor Dr. Edilson Ervolino da FOA – UNESP, pela assistência na análise histológica; à FAPESP, pela concessão da Bolsa de Mestrado (Processo 2010/04450-2) à pós-graduanda Carolina dos Santos Santinoni.

Referências

- [1] H. Pretel, R.F.Z. Lizarelli, L.T.O. Ramalho, Effect of Low-Level Laser Therapy on Bone Repair: Histological Study in Rats, *Lasers in Surg. Med.* 39 (2007) 788-796
- [2] P. Angeletti, M.D. Pereira, H.C. Gomes, C.T. Hino, L.M. Ferreira, Effect of low-level laser therapy (GaAlAs) on bone regeneration in midpalatal anterior suture after surgically assisted rapid maxillary expansion, *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 109 (2010) e38-46
- [3] E. Fávaro-Pípi, S.M. Feitosa, D.A. Ribeiro, P. Bossini, P. Oliveira, N.A. Parizotto, A.C. Renno. Comparative study of the effects of low-intensity pulsed ultrasound and low-level laser therapy on bone defects in tibias of rats. *Lasers Med. Sci.* 25 (2010) 727-732
- [4] L.A. Merli, M.T. Santos, W.J. Genovese, F. Faloppa, Effect of low-intensity laser irradiation on the process of bone repair, *Photomed. Laser Surg.* 23 (2005) 212-215
- [5] C.B. Lopes, M.T.T. Pacheco, L. Silveira-Jr, M.C.T. Cangussú, A.L.B. Pinheiro, The effect of the association of near infrared laser therapy, bone morphogenetic proteins, and guided bone regeneration on tibial fractures treated with internal rigid fixation: A Raman spectroscopic study, *J. Biomed. Mater. Res. A* 94A (2010) 1257-1263
- [6] D.A. Pires-Oliveira, R.F. Oliveira, S.U. Amadei, C. Pacheco-Soares, R.F. Rocha, Laser 904 nm action on bone repair in rats with osteoporosis, *Osteoporos. Int.* 21 (2010) 2109-2114
- [7] R. Ré Poppi, A.L. da Silva, R.S. Nacer, R.P. Vieira, L.V. de Oliveira, N.S. de Faria Júnior, P.T.C Carvalho, Evaluation of the osteogenic effect of low-level laser therapy (808 nm and 660 nm) on bone defects induced in the femurs of female rats submitted to ovariectomy, *Lasers Med. Sci.* 26 (2011) 515-22
- [8] N.A. Fujihara, K.R.N. Hiraki, M.M Marques, Irradiation at 780 nm Increases Proliferation Rate of Osteoblasts Independently of Dexamethasone Presence, *Lasers Surg. Med.* 38 (2006) 332-336

- [9] M. Khadra, S.P. Lyngstadaasb, H.R. Haanæs, K. Mustafa, Effect of laser therapy on attachment, proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells cultured on titanium implant material, *Biomaterials* 26 (2005) 3503-3509
- [10] A. Stein, D. Benayahu, L. Maltz, U. Oron, Low-Level Laser Irradiation Promotes Proliferation and Differentiation of Human Osteoblasts in vitro, *Photomed. Laser Surg.* 23 (2005) 161-166
- [11] I.F. Garavello, V. Baranauskas, M.A. Cruz-Höfling, The effects of low laser irradiation on angiogenesis in injured rat tibiae, *Histol. Histopathol.* 19 (2004) 43-48
- [12] I. Garavello-Freitas, V. Baranauskas, P.P. Joazeiro, C.R. Padovani, M. Dal Pai-Silva, M.A. da Cruz-Höfling. Low-power laser irradiation improves histomorphometrical parameters and bone matrix organization during tibia wound healing in rats, *J Photochem. Photobiol. B* 70 (2003) 81-89
- [13] J.M. García-Morales, P. Tortamano-Neto, F.F. Todescan, J.C.S. Andrade-Jr, J. Marotti, D.M. Zezell, Stability of dental implants after irradiation with an 830-nm low-level laser: a double-blind randomized clinical study, *Lasers Med. Sci.* DOI 10.1007/s10103-011-0948-4 (2011)
- [14] N. Jakse, M. Payer, S. Tangl, A. Berghold, R. Kirmeier, M. Lorenzoni, Influence of low-level laser treatment on bone regeneration and osseointegration of dental implants following sinusaugmentation. An experimental study on sheep, *Clin. Oral Implants Res.* 18 (2007) 517-524
- [15] S. Bashardoust Tajali, J.C. Macdermid, P. Houghton, R. Grewal, Effects of low power laser irradiation on bone healing in animals: a meta-analysis, *J. Orthop. Surg. Res.* 5 (2010) 1-10
- [16] A. Atala, Tissue engineering and regenerative medicine: concepts for clinical application, *Rejuvenation Res.* 7 (2004) 15-31
- [17] D. Kaigler, G. Pagni, C.H. Park, S.A. Tarle, R.L. Bartel, W.V. Giannobile, Angiogenic and osteogenic potential of bone repair cells for craniofacial regeneration, *Tissue Eng. Part A* 16 (2010) 2809-2820

- [18] H. Behnia, A. Khojasteh, M. Soleimani, A. Tehranchi, A. Atashi, Repair of alveolar cleft defect with mesenchymal stem cells and platelet derived growth factors: A preliminary report, *J. Craniomaxillofac Surg.* 40 (2012) 2-7
- [19] G. Burastero, S. Scarfì, C. Ferraris, C. Fresia, N. Sessarego, F. Fruscione, F. Monetti, F. Scarfò, P. Schupbach, M. Podestà, G. Grappiolo, E. Zocchi, The association of human mesenchymal stem cells with BMP-7 improves bone regeneration of critical-size segmental bone defects in athymic rats, *Bone* 47 (2010) 117-126
- [20] Z. Hamidouche, O. Fromigué, U. Nuber, P. Vaudin, J.C. Pages, R. Ebert, F. Jakob, H. Miraoui, P.J. Marie, Autocrine fibroblast growth factor 18 mediates dexamethasone-induced osteogenic differentiation of murine mesenchymal stem cells, *J. Cell Physiol.* 224 (2010) 509-515
- [21] H. Lu, N. Kawazoe, T. Tateishi, G. Chen, X. Jin, J. Chang, In vitro proliferation and osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells cultured with hardystonite ($\text{Ca}_2\text{ZnSi}_2\text{O}_7$) and β -TCP ceramics, *J. Biomater. Appl.* 25 (2010) 39-56
- [22] R.K. Schneider, A. Puellen, R. Kramann, K. Raupach, J. Bornemann, R. Knuechel, A. Pérez-Bouza, S. Neuss, The osteogenic differentiation of adult bone marrow and perinatal umbilical mesenchymal stem cells and matrix remodelling in three-dimensional collagen scaffolds, *Biomaterials* 31 (2010) 467-480
- [23] C. Zong, D. Xue, W. Yuan, W. Wang, D. Shen, X. Tong, D. Shi, L. Liu, Q. Zheng, C. Gao, J. Wang, Reconstruction of rat calvarial defects with human mesenchymal stem cells and osteoblast-like cells in poly-lactic-co-glycolic acid scaffolds, *Eur. Cell Mater.* 20 (2010) 109-120
- [24] S. Bansal, V. Chauhan, S. Sharma, R. Maheshwari, A. Juyal, S. Raghuvanshi, Evaluation of hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate mixed with bone marrow aspirate as a bone graft substitute for posterolateral spinal fusion, *Indian J. Orthop.* 43 (2009) 234-239

- [25] G. Krzymanski, M. Kalczak, W. Wiktor-Jedrzejczak, 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.* 26 (1997) 55-60
- [26] M. Soltan, D. Smiler, H.S. Prasad, M.D. Rohrer, Bone block allograft impregnated with bone marrow aspirate, *Implant. Dent.* 16 (2007) 329-339
- [27] D. Smiler, M. Soltan, M. Albitar, Toward the identification of mesenchymal stem cells in bone marrow and peripheral blood for bone regeneration, *Implant. Dent.* 17 (2008) 236-247
- [28] A. Koga, Y. Tokuhashi, A. Ohkawa, T. Nishimura, K. Takayama, J. Ryu, Effects of fibronectin on osteoinductive capability of fresh iliac bone marrow aspirate in posterolateral spinal fusion in rabbits, *Spine* 33 (2008) 1318-1323
- [29] D. Smiler, M. Soltan, J.W. Lee, A histomorphogenic analysis of bone grafts augmented with adult stem cells, *Implant. Dent.* 16 (2007) 42-53
- [30] M. Soltan, D. Smiler, C. Soltan, H.S. Prasad, M.D. Rohrer, Bone grafting by means of a tunnel dissection: predictable results using stem cells and matrix, *Implant. Dent.* 19 (2010) 280-287
- [31] F.P. Eduardo, D.F. Bueno, P.M. de Freitas, M.M. Marques, M.R. Passos-Bueno, C.P. Eduardo, M. Zatz, Stem cell proliferation under low intensity laser irradiation: a preliminary study, *Lasers Surg. Med.* 40 (2008) 433-438
- [32] L. Abramovitch-Gottlib, T. Gross, D. Naveh, S. Geresh, S. Rosenwaks, I. Bar, R. Vago, Low level laser irradiation stimulates osteogenic phenotype of mesenchymal stem cells seeded on a three-dimensional biomatrix, *Lasers Med. Sci.* 20 (2005) 138-146
- [33] M.R. Messoro, M.J. Nagata, R.C. Mariano, R.C. Dornelles, S.R. Bomfim, S.E. Fucini, V.G. Garcia, A.F. Bosco, Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma: a histologic and histometric study in rat calvaria, *J. Periodontal Res.* 43 (2008) 217-223

- [34] S. Saito, N. Shimizu, Stimulatory effects of low power laser irradiation on bone regeneration in midpalatal suture during expansion in the rat, *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.* 111 (1997) 525-532
- [35] M.A. Trelles, E. Mayayo, Bone fracture consolidates faster with low-power laser, *Lasers Surg. Med.* 7 (1987) 36-45
- [36] E. Mester, A.F. Mester, A. Mester, The biomedical effects of laser application, *Lasers Surg. Med.* 5 (1985) 31-39
- [37] T. Yaakobi, L. Maltz, U. Oron, Promotion of bone repair in the cortical of the tibia in rats by low energy laser (He-Ne) irradiation, *Calcif. Tissue Int.* 59 (1996) 297-300
- [38] A.L.B. Pinheiro, E.T. Cavalcanti, T.I. Pinheiro, M.J. Alves, C.T. Manzi, Low-level laser therapy in management of disorders of the maxillofacial region, *J. Clin. Laser Med. Surg.* 15 (1997a) 181-183
- [39] A.L.B. Pinheiro, E.T. Cavalcanti, C.T. Manzi, T. Rego, M. Pinheiro, LILT in the treatment of disorders of the maxillofacial region, *Laser in Dent.* III 2973 (1997b) 227-234
- [40] A. Schindl, M. Schindl, H. Pernerstorfer-Schön, L. Schindl, Low-intensity laser therapy: a review, *J. Investig. Med.* 48 (2000) 312-326
- [41] F.A. Al-Watban, W.Y. Zhang, The acceleration of wound healing is not attributed to laser skin transmission. *Laser Ther.* 11 (2001) 6-11
- [42] A.L.B. Pinheiro, M.E. Gerbi. Photoengineering of bone repair processes. *Photomed. Laser Surg.* 24 (2006) 169-178
- [43] J. Nissan, D. Assif, M.D. Gross, A. Yaffe, I. Binderman, Effect of low-intensity laser irradiation on surgically created bony defects in rats, *J. Oral Rehabil.* 33 (2006) 619-624
- [44] A.N. Silva Junior, A.L. Pinheiro, M.G. Oliveira, R.A. Nicolau, L.M. Ramalho, R. Weismann, Computerized morphometric assessment of the effect of low-level laser therapy on bone repair: an experimental animal study, *J. Clin. Laser Med. Surg.* 20 (2002) 83-87

- [45] A.C. Renno, P.A. McDonnell, N.A. Parizotto, E.L. Laakso, The effects of laser irradiation on osteoblast and osteosarcoma cell proliferation and differentiation in vitro, *Photomed. Laser Surg.* 25 (2007) 275-280
- [46] H.O. Schwartz-Filho, A.C. Reimer, C. Marcantonio, E. Marcantonio Jr, R.A. Marcantonio, Effects of low-level laser therapy (685 nm) at different doses in osteogenic cell cultures, *Lasers Med. Sci.* 26 (2011) 539-543
- [47] K.H. Kraus, C. Kirker-Head. Mesenchymal stem cells and bone regeneration. *Vet. Surg.* 35(2006) 232-242
- [48] M.F. Pittenger, A.M. Mackay, S.C. Beck, R.K. Jaiswal, R. Douglas, J.D. Mosca, M.A. Moorman, D.W. Simonetti, S. Craig, D.R. Marshak, Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells, *Science* 284 (1999) 143-147
- [49] O.M. Maria, R. Khosravi, E. Mezey, S.D. Tran, Cells from bone marrow that evolve into oral tissues and their clinical applications, *Oral Dis.* 13 (2007) 11-16
- [50] R.A. Panepucci, J.L.C. Siufi, W.A. Silva Jr, R. Proto-Siquiera, L. Neder, M. Orellana, V. Rocha, D.T. Covas, M.A. Zagoa, Comparison of Gene Expression of Umbilical Cord Vein and Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells, *Stem Cells* 22 (2004) 1263-1278
- [51] Z.Y. Zhang, S.H. Teoh, M.S.K. Chong, J.T. Schantz, N.M. Fisk, M.A. Choolani, J. Chan, Superior Osteogenic Capacity for Bone Tissue Engineering of Fetal Compared with Perinatal and Adult Mesenchymal Stem Cells, *Stem Cells* 27 (2009) 126-137
- [52] S. Nishimoto, T. Oyama, K. Matsuda, Simultaneous concentration of platelets and marrow cells: a simple and useful technique to obtain source cells and growth factors for regenerative medicine, *Wound Repair Regen.* 15 (2007) 156-162
- [53] M. Nagata, M. Messori, R. Okamoto, N. Campos, N. Pola, L. Esper, M. Sbrana, S. Fucini, V. Garcia, A. Bosco, 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* 45 (2009) 339-345

- [54] M.J. Nagata, M. Messori, N. Pola, N. Campos, R. Vieira, L.A. Esper, M. Sbrana, S. Fucini, V. Garcia, A. Bosco, Influence of the ratio of particulate autogenous bone graft/platelet-rich plasma on bone healing in critical-size defects: a histologic and histometric study in rat calvaria, *J. Orthop. Res.* 28 (2010) 468-473
- [55] D. Duque, Bone and fat connection in aging bone, *Curr. Opinion Rheumatol.* 20 (2008) 429-434
- [56] J. Greenberger, M. Epperly, Bone marrow derived stem cells and radiation response. *Semin. Radiat. Oncol.* 19 (2009) 133-139
- [57] G. Clines, Prospects for osteoprogenitor stem cells in fracture repair and osteoporosis, *Curr. Opin. Organ. Transplant.* 15 (2010) 73-78
- [58] C. Gao, J. Seuntjens, G.N. Kaufman, N. Tran-Khanh, A. Butler, A. Li, H. Wang, M.D. Buschmann, E.J. Harvey, J.E. Henderson, Mesenchymal stem cell transplantation to promote bone healing, *J. Orthop. Res.* DOI: 10.1002/jor.22028 (2012)
- [59] L. Almeida-Lopes, J. Rigau, R.A. Zangaro, J. Guidugli-Neto, M.M. Jaeger, Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence, *Lasers Surg. Med.* 29 (2001) 179-184
- [60] A.N. Pereira, C.P. Eduardo, E. Matson, M.M. Marques, Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts, *Lasers Surg. Med.* 31 (2002) 263-267
- [61] M.M. Marques, A.N. Pereira, N.A. Fujihara, F.N. Nogueira, C.P. Eduardo, Effect of low-power laser irradiation on protein synthesis and ultrastructure of human gingival fibroblasts, *Lasers Surg. Med.* 34 (2004) 260-265
- [62] Y. Ozawa, N. Shimizu, G. Kariya, Y. Abiko, Low energy laser irradiation stimulates bone nodule formation at early stages of cell culture in rat calvarial cells, *Bone* 22 (1998) 347-354
- [63] E. Katchburian, V.E. Arana-Chavez, *Histologia e Embriologia Oral: Texto-Atlas Correlações Clínicas*, second ed., São Paulo, Brazil, 2004.

Figuras

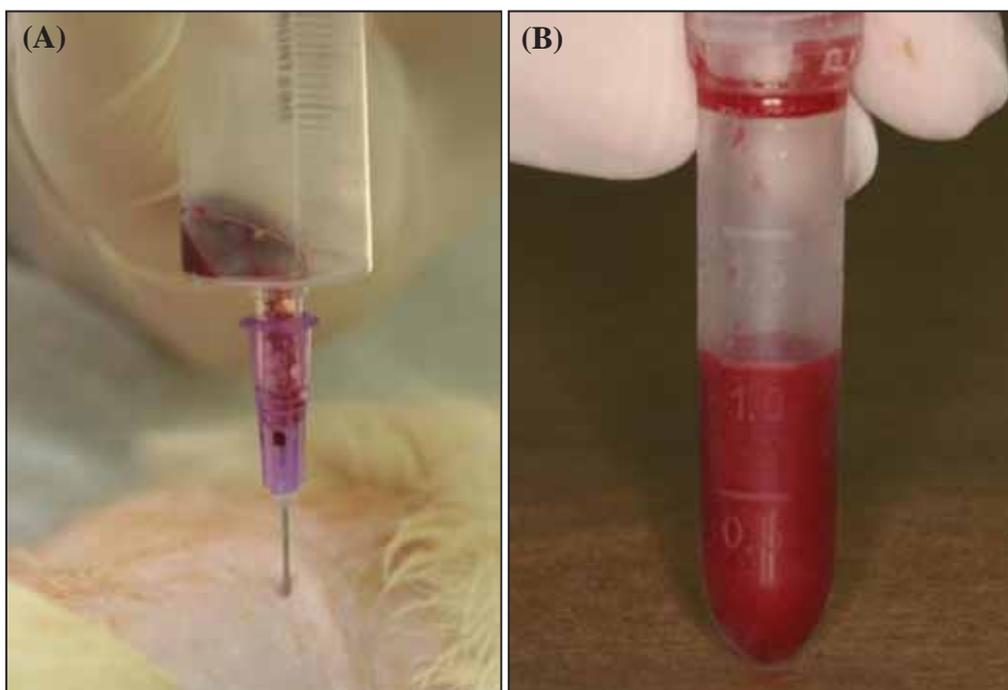


Fig. 1. Punção da crista ilíaca esquerda do animal para coleta do AMO (A).
Eppendorf contendo 1 mL de AMO (B).

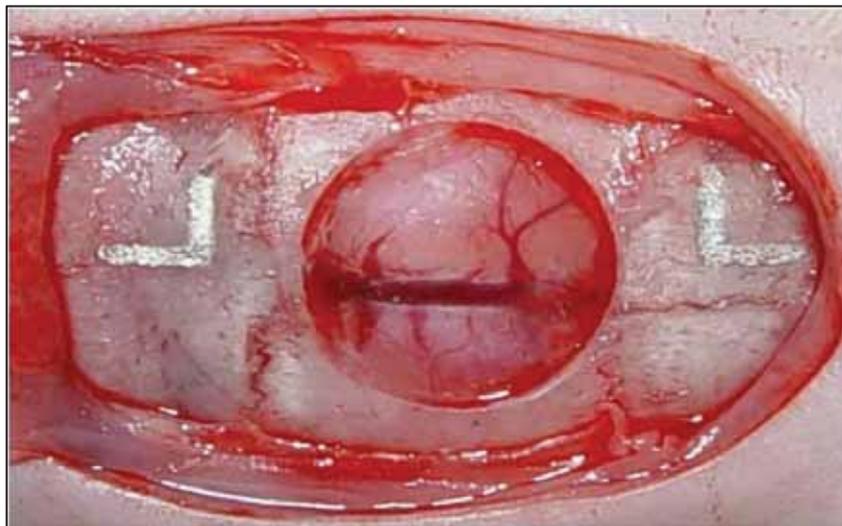


Fig. 2. Defeito de tamanho crítico (5 mm de diâmetro) e as marcações de referência criadas na calvária.

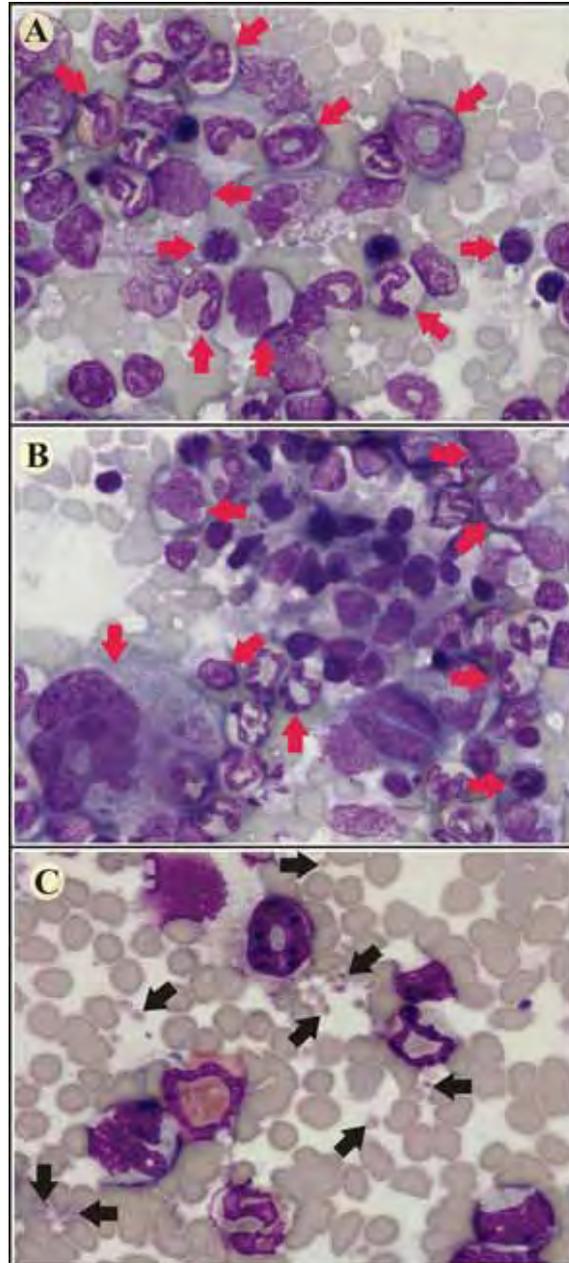


Fig. 3. Esfregaço das amostras de AMO: (A) e (B) CM com morfologia normal (setas vermelhas); (C) plaquetas com morfologia normal (setas pretas). Panótico. Aumento original 1000x.

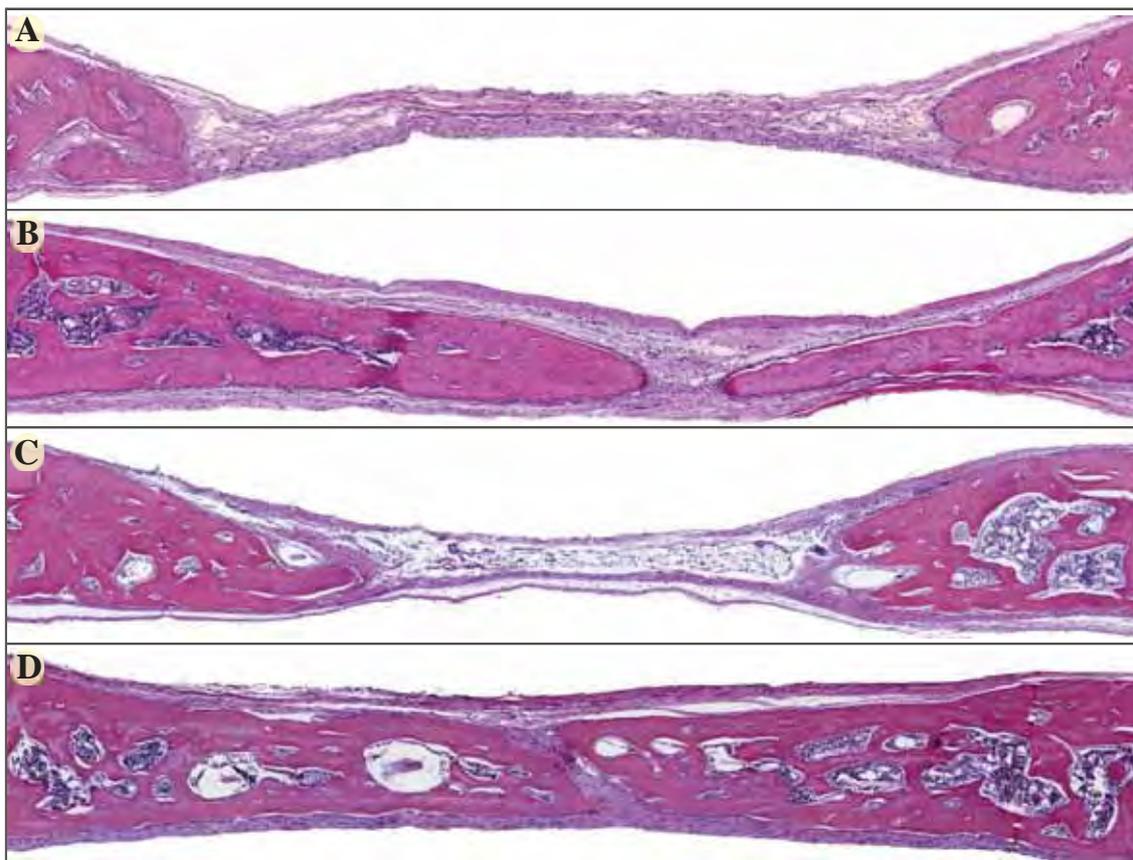


Fig. 4. Visões panorâmicas dos defeitos cirúrgicos aos 30 dias pós-operatórios. Grupo C (A); Grupo AMO (B); Grupo LLLT (C); Grupo AMO/LLLT (D). H&E. Aumento original 1,25x.

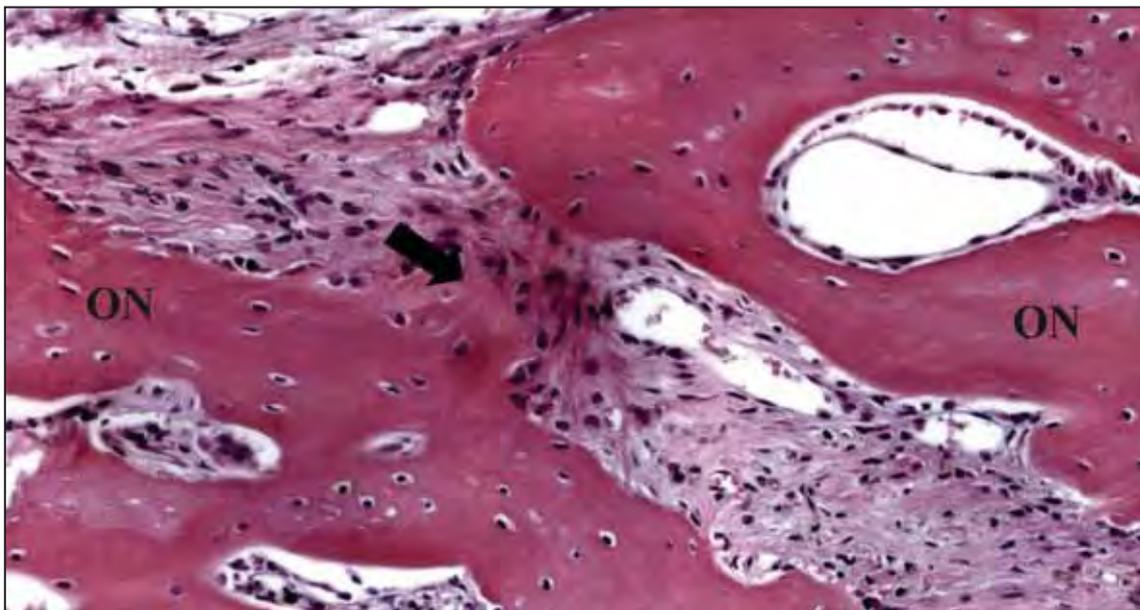


Fig. 5. Grupo AMO/LLLT. 30 dias pós-operatórios. Osso neoforado (ON) rico em osteócitos e recoberto por osteoblastos em franca atividade. Matriz osteóide (seta) entre as vertentes ósseas. H&E. Aumento original 400x.

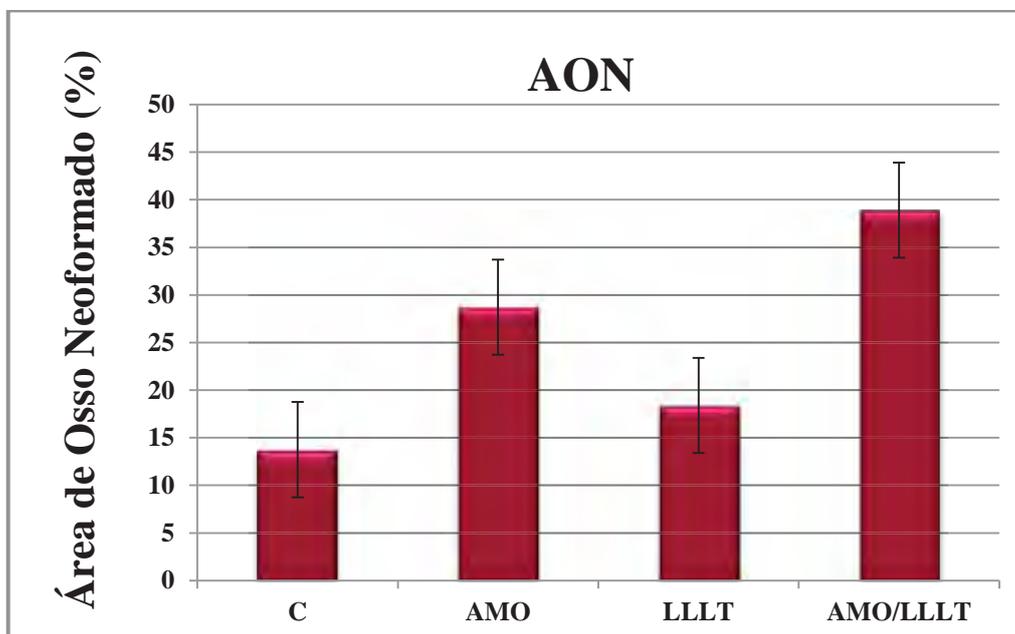


Fig. 6. Média (%) e Desvio-Padrão da Área de Osso Neoformado (AON) para os grupos C, AMO, LLLT e AMO/LLLT aos 30 dias pós-operatórios.

Tabelas

Tabela 1. Média (%) e Desvio-Padrão da AON dentro da área do defeito cirurgicamente criado, com comparação entre os grupos. 30 dias pós-operatórios.

Grupo	N	Média e Desvio Padrão da AON (%)
Controle	10	13,75 ± 4,32
AMO	10	28,71 ± 10,42 ^{a,b}
LLLT	10	18,40 ± 7,41
AMO/LLLT	10	38,92 ± 7,12 ^{a,b,c}

^acomparado ao Grupo C ($p < 0,001$); ^bcomparado ao Grupo LLLT ($p < 0,05$ para AMO; $p < 0,001$ para AMO/LLLT); ^ccomparado ao Grupo AMO ($p < 0,05$).

Anexos

Anexo A

*Certificado da Comissão de Ética na
Experimentação Animal (CEEAA)*

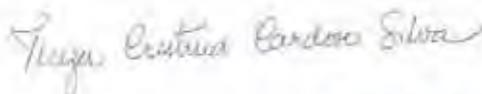


*COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
(CEEA)*

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto **"CICATRIZAÇÃO ÓSSEA DE DEFEITOS DE TAMANHO CRÍTICO TRATADOS COM ASPIRADO DE MEDULA ÓSSEA, LASER DE BAIXA INTENSIDADE OU A ASSOCIAÇÃO DE AMBAS AS TERAPIAS. ESTUDO HISTOLÓGICO, HISTOMÉTRICO EM CALVÁRIAS DE RATOS"** sob responsabilidade do **Profa. Dra. Maria José Hitomi Nagata** e colaboração de **Carolina dos Santos Santinoni** está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) foi aprovado pela CEEA em 21/06/2010 de acordo com os protocolos 2010-004818

Araçatuba, 21 de Julho de 2010



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

Anexo B

Normas para Publicação segundo o
Periódico “Bone”

GUIDE FOR AUTHORS

Types of article

Types of articles Bone accepts include:

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

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

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

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

Policy and ethics

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

Conflict of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or 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. See also www.elsevier.com/conflictsofinterest.

Submission declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its

publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

Authorship

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

Changes to authorship

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

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

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see www.elsevier.com/copyright). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult 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 www.elsevier.com/permissions.

Retained author rights

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

Role of the funding source

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

Funding body agreements and policies

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

Open access

This journal offers you the option of making your article freely available to all via the ScienceDirect platform. To prevent any conflict of interest, you can only make this choice after receiving notification that your article has been accepted for publication. The fee of \$3,000 excludes taxes and other potential author fees such as color charges. In some cases, institutions and funding bodies have entered into agreement with Elsevier to meet these fees on behalf of their authors. Details of these agreements are available at www.elsevier.com/fundingbodies. Authors of accepted articles, who wish to take advantage of this option, should complete and submit the order form (available at www.elsevier.com/locate/openaccessform.pdf). Whatever access option you choose, you retain many rights as an author, including the right to post a revised personal version of your article on your own website. More information can be found here: www.elsevier.com/authorsrights.

Language and language services

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit webshop.elsevier.com/languageservices or our customer support site at support.elsevier.com for more information.

Submission

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

Referees

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

PREPARATION

Use of wordprocessing software

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns.

The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: www.elsevier.com/guidepublication). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your wordprocessor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

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

Introduction

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

Material and methods

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

Theory/calculation

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

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

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

Conclusions

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

Essential title page information

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

Abstract

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

Graphical abstract

A Graphical abstract is optional and should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See www.elsevier.com/graphicalabstracts for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

Highlights

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

See 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 and Accession numbers

Elsevier aims at connecting online articles with external databases which are useful in their respective research communities. If your article contains relevant unique identifiers or accession numbers (bioinformatics) linking to information on entities

(genes, proteins, diseases, etc.) or structures deposited in public databases, then please indicate those entities according to the standard explained below.

Authors should explicitly mention the *database abbreviation (as mentioned below) together with the actual database number*, bearing in mind that an error in a letter or number can result in a dead link in the online version of the article.

Please use the following format: **Database ID: xxxx**

Links can be provided in your online article to the following databases (examples of citations are given in parentheses):

- **GenBank**: Genetic sequence database at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) (GenBank ID: BA123456)
- **PDB**: Worldwide Protein Data Bank (PDB ID: 1TUP)
- **CCDC**: Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC ID: AI631510)
- **TAIR**: The Arabidopsis Information Resource database (TAIR ID: AT1G01020)
- **NCT**: ClinicalTrials.gov (NCT ID: NCT00222573)
- **OMIM**: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM ID: 601240)
- **MINT**: Molecular INTeractions database (MINT ID: 6166710)
- **MI**: EMBL-EBI OLS Molecular Interaction Ontology (MI ID: 0218)
- **UniProt**: Universal Protein Resource Knowledgebase (UniProt ID: Q9H0H5)

Genbank

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as 'graphics' or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

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

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 finalised, 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: Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

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

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

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

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

Please do not:

- Supply files that are optimised 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, EPS or MS Office files) and with

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

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

Figure captions

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

Tables

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

References

Citation in text

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

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

Web references

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

References in a special issue

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

Reference management software

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

Reference style

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

Example: '..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result...'

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

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, *J. Sci. Commun.* 163 (2010) 51–59.

Reference to a book:

[2] W. Strunk Jr., E.B. White, *The Elements of Style*, fourth ed., Longman, New York, 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to Index Medicus journal abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>; List of title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>; CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/sent.html>.

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 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: 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 www.elsevier.com/artworkinstructions.

Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research.

Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, highresolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: 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 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 and fax numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

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

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at 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. The correct format for citing a DOI is shown as follows (example taken from a document in the journal *Physics Letters B*): doi:10.1016/j.physletb.2010.09.059 When you use the DOI to create URL hyperlinks to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from

get.adobe.com/reader. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: www.adobe.com/products/reader/tech-specs.html.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately – please let us have all your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

AUTHOR INQUIRIES

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher. You can track accepted articles at www.elsevier.com/trackarticle. You can also check our Author FAQs (www.elsevier.com/authorFAQ) and/or contact Customer Support via support.elsevier.com.

© Copyright 2011 Elsevier | <http://www.elsevier.com>

AUTHOR INFORMATION PACK 17 Jan 2012 - www.elsevier.com/locate/bone