

Natália Marcumini Pola

*Reparo ósseo de defeitos de tamanho crítico
tratados com Plasma Rico em Plaquetas derivado
do sangue periférico ou do aspirado de medula
óssea associado ou não ao enxerto de osso autógeno.
Estudo histológico e histométrico em calvárias de
ratos.*

ARAÇATUBA -SP

2010

Natália Marcumini Pola

*Reparo ósseo de defeitos de tamanho crítico
tratados com Plasma Rico em Plaquetas derivado
do sangue periférico ou do aspirado de medula
óssea associado ou não ao enxerto de osso autógeno.
Estudo histológico e histométrico em calvárias de
ratos.*

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, para a obtenção do Título de MESTRE EM ODONTOLOGIA (Área de Periodontia).

Orientadora: Profa. Adj. Maria José Hitomi Nagata

ARAÇATUBA -SP

2010

Catálogo-na-Publicação

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

P762r Pola, Natália Marcumini
 Reparo ósseo de defeitos de tamanho crítico tratados com plasma rico em plaquetas derivado do sangue periférico ou do aspirado de medula óssea associado ou não ao enxerto de osso autógeno : estudo histológico e histométrico em calvária de ratos / Natália Marcumini Pola. - Araçatuba : [s.n.], 2010
 90 f. : 6 il. ;1 tab. + 1 CD-ROM

 Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba, 2010
 Orientadora: Profa. Maria José Hitomi Nagata

 1. Células-tronco 2. Plaquetas 3. Plasma rico em plaquetas
 4. Regeneração óssea 5. Transplante ósseo

Black D6
CDD 617.63

Dados Curriculares

Natália Marcumini Pola

Nascimento: 26.06.1985 – Bauru/SP

Filiação: Gilberto Pola

Maria Teresa Marcumini Pola

2004-2007: Curso de Graduação em Odontologia

Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – UNESP

2008-2010: Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Periodontia

Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – UNESP

Dedicatória

Dedicatória

A Deus:

Agradeço-te meu Deus,

Por todos os momentos vividos durante esses dois anos,

Pelas pessoas que colocaste em meu caminho,

Pela força do dia a dia,

Pelas dificuldades vividas,

Por sua proteção,

Pelos momentos de alegria,

Pelos momentos de aprendizado,

Por minha maravilhosa família,

Por meus amigos sinceros,

Por me dar forças nos momentos de fraqueza,

Por guiar meus passos e me proteger...

Por seu infinito amor...

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

Hoje estamos aqui, comemorando novamente...

Mais uma conquista nossa! Mais uma vitória nossa!

O caminho foi difícil, porém seus braços me empurraram...

Suas palavras me deram força, e sempre me apoiaram a continuar...

E hoje, o meu papel é agradecer!

Obrigada mãe, por cada momento juntas. Por cada conversa, cada abraço, cada telefonema, cada despedida na rodoviária...

Obrigada pai pelo seu carinho, sua preocupação, seu cuidado, sua espera em cada chegada de viagem, seus abraços...

Pelas noites que passaram em claro para que eu dormisse...

Por me defenderem quando eu ainda não conseguia...

Pelos exemplos de trabalho, e coragem...

Por tudo que sempre me ensinaram...

“A vocês, que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade, não bastaria um obrigado; a vocês, que se doaram inteiros e renunciaram aos seus sonhos, para que, muitas vezes, eu pudesse realizar os meus; a vocês, pais por natureza, por opção e amor, não bastaria dizer, que não tenho palavras para agradecer tudo isso. Mas, é o que acontece agora, quando procuro arduamente uma forma verbal de exprimir uma emoção ímpar, uma emoção que jamais seria traduzida por palavras...”

Amo vocês!!!

Ao meu irmão **Bruno**:

Um “bom filho, educado, trabalhador”....

Bruninho...

Você é meu companheiro. Uma pessoa maravilhosa, batalhadora, honesta, esforçada e que sempre admirei.

Às vezes um pouco ausente, mas sempre procurando me acompanhar meus passos...

Muito obrigada pelo apoio, incentivo, confiança, cumplicidade e por tudo que sempre fez por mim.

Obrigada por estar sempre ao meu lado.

Obrigada pelo seu amor, seu carinho, e seus abraços...

Você é de importância inestimável na minha formação como pessoa e como profissional!

*“Não importa a nossa distância sempre iremos nos amar,
Nossas almas são unidas pela força de nossos espíritos.
Seja por onde for nossas vidas irão ser fiéis e nos juntar,
Seja pelo céu, pela água ou o ar, seremos irmãos-amigos.”*

Te amo!

Ao meu namorado e amigo **Caril**:

Hoje é dia de agradecer!

E meu maior agradecimento é a VOCÊ!

O “culpado” por hoje estarmos vivendo mais esta conquista juntos...

Foi você quem me mostrou este caminho. Quem vivenciou ao meu lado o dia a dia de um mestrado na Periodontia de Araçatuba!

Rimos juntos, choramos juntos, vivemos cada etapa unidos... Uma união que se fortalece a cada dia.

Você me fez crescer. Apoiou-me em todos os sentidos. Ajudou-me a enxergar, quando eu não pude ver...

Amor, carinho, respeito e cumplicidade vivenciamos diariamente...

Sentimentos puros, verdadeiros, e intensos...

“Ter sua companhia é o mesmo que estar vivendo com a certeza de que existem pessoas as quais realmente se importam conosco. As quais sabem dizer palavras certas em momentos mais difíceis, Compartilham conosco nossas pequenas e grandes alegrias.

Sei...

Que você é muito mais que uma pessoa importante na minha vida,

É parte dela...”

Te amo!!!

À minha querida avó **Nair**:

Um poço de bondade... Um anjo em minha vida..

Obrigada minha “vó” por seu amor e sua dedicação com sua netinha aqui...

Obrigada por sua preocupação, seu carinho, afago, suas orações, seu companheirismo...

Minha jóia rara!!

Obrigada por ter acreditado em mim...

A cada partida, a lágrima da bênção... A cada volta, o abraço mais gostoso do mundo!

Obrigada por dividir comigo este momento tão importante de minha vida!

“Cada ruga tua representa uma história

E são tantas...

Quantas experiências, quantas histórias para contar...

Quantos conselhos para dar...

Quanta paciência para nos suportar...

Esquece a sua vida, para viver a nossa

Sempre cheia de atenção,

De carinho, de amor.

Você é o meio termo, o equilíbrio...

A palavra de esperança

O colo que aninha

O ombro que apesar de cansado... apóia

Você é tudo de bom e de belo...”

Aos meus avós

Eduardo, Emílio e Antônia *(in memoriam)*

Sei que por onde estiverem estarão olhando por mim...

E ajudando a dar cada passo novo, a enfrentar cada desafio.

Obrigada por terem acreditado nos meus sonhos comigo...

Obrigada pelas orações valiosas que contribuíram para esta vitória e pelo carinho que sempre tiveram por mim!

Vocês são exemplos de amor, serenidade, honestidade, fé, otimismo e esperança... Avós protetores e amigos!

A força da experiência e da juventude entrelaça nossos corações!

Nada nos separou e nada nos separará! Nem a morte e nem a vida...

Porque estamos unidos em um plano divinamente

atemporal!

Amo vocês!

Às minhas tias **Elizete e Valéria:**

Mais uma vez só tenho a agradecer.

Vocês estiveram em todos os momentos comigo nesta jornada.

Acompanharam cada passo, cada alegria, cada fraqueza, cada momento de dedicação...

Rimos juntas e choramos juntas...

Obrigada por serem minhas companheiras. Por cuidarem de mim.

Que Deus ilumine suas vidas a cada dia, enchendo de saúde e felicidade.

Amo vocês...

Às minhas tias **Marisa e Meire,**

Ao meu tio **Carlos, à Nádia e ao Edson:**

Obrigada por estarem comigo em mais esta conquista!

Obrigada por cada momento juntos, pelo carinho, pela atenção, pela preocupação... Pela torcida de cada dia!

Vocês são muito importantes na minha vida.

Que Deus os ilumine e os guarde com estes corações bondosos e alegres!

Amo vocês...

Aos meus primos **Leniza, Luciana, Ricardo, Rodrigo**
e a todos os **“Primuscos”**:

Vocês são verdadeiros irmãos para mim!

Obrigada por sempre estarem ao meu lado, me apoiando e me incentivando!

Vocês são pessoas essenciais na minha vida.

Obrigada por cada momento de alegria, de conversa, de descanso e de bobeira que vivemos juntos...

Que possamos conservar para sempre nossos laços de amizade e de irmandade. Obrigada pelo amor e carinho que vocês têm por mim!

“Somos pessoas diferentes,

Mas quando estamos juntos é como se fôssemos uma só brincadeira,

Uma só risada,

Uma só luz.

Quando nos encontramos o mundo inteiro parece mudar de cor,

O ar fica puro,

Os dias lindos e ensolarados...”

... Amo vocês!

*Agradecimentos
Especiais*

Agradecimentos Especiais

A minha orientadora

Profa. Dra. **Maria José Hitomi Nagata:**

Hoje posso demonstrar aqui o quanto lhe admiro e o quanto tenho a lhe agradecer. Durante esses 4 anos (dois de estágio e mais dois de mestrado), pude acompanhar a sua jornada diária e desfrutar de cada aprendizado ao seu lado. Uma pessoa paciente, dedicada, amorosa, um pouco “rigorosa”, mas que sabe o jeito e o momento certo para falar... Que cuida de seus orientados como seus filhos! Um exemplo de pessoa, de pesquisadora e de profissional. Uma “pequena” muito GRANDE! Grande nos conhecimentos, grande na competência e grande no coração!!!

Muito obrigada por cada momento ao seu lado. Obrigada por cada palavra, cada ajuda e zelo para conosco. Obrigada por dividir comigo os bons e os maus momentos. Por estar sempre disposta a ouvir...

Hoje comemoramos mais uma conquista nossa! Obrigada por acreditar em mim e me ajudar a alcançar meus sonhos... Sou e sempre serei grata por tudo. Desejo-lhe cada vez mais sucesso e felicidades, e que Deus continue abençoando sua vida e sua família.

MUITO OBRIGADA!!!

 família **Periodontia - Araçatuba**

Profa. Dra. **Maria José Hitomi Nagata,**

Prof. Dr. **Alvaro Francisco Bosco,**

Prof. Dr. **Valdir Gouveia Garcia:**

Após conviver 2 anos ao lado de vocês, aprendi que ser mestre não é somente preparar aulas e provas, selecionar temas de seminários, ensinar os procedimentos clínicos, preparar listas de chamadas... Ser mestre é poder compartilhar todos os conhecimentos um com o outro. É desenvolver um aprendizado a partir do auxílio do outro. É dividir alegrias e tristezas, vitórias e dificuldades... É isto que quero levar desta família que é a Periodontia de Araçatuba. Um lutando pelo outro. Um torcendo pelo outro...

A maneira como vocês vivem o dia a dia dentro desta disciplina é admirável, enfrentando todas as dificuldades e superando os momentos difíceis. Vocês são exemplos de bons profissionais! Admiro a fé, a simplicidade e a humildade que vocês possuem. Muito obrigada pelos ensinamentos profissionais e pelas lições de vida.

Obrigada por confiarem em mim!

“Deus não coloca as pessoas em nossas vidas por acaso...”

Agradecimientos

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, nas pessoas de seu Diretor Prof. Dr. **Pedro Felício Estrada Bernabé** e Vice-Diretora Profa. Dra. **Ana Maria Pires Soubhia**

Pela oportunidade de realizar este curso e esta pesquisa.

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

À **FAPESP**, pela concessão da Bolsa de Mestrado (Processo No 08/52602-6) a pós-graduanda Natália Marcumini Pola.

Ao Professor da Disciplina de Periodontia Dr. **Valdir Gouveia Garcia** Professor, sempre tive uma simpatia pelo senhor, desde a graduação, e pudemos conviver mais próximos durante estes dois anos. Esta simpatia somente aumentou. Pude ver o quanto o senhor, além de ser um professor brilhante, é uma pessoa com um coração enorme. Possui qualidades difíceis de serem vistas nas pessoas... Vibra com a vitória do próximo e está sempre disposto a ajudar. Torce pelo nosso sucesso e nosso crescimento. É uma pessoa iluminada! Muito obrigada por dividir esta conquista comigo. Por me ajudar a crescer, como pessoa e como profissional. Obrigada por cada palavra de apoio, pelas conversas, pela paciência, pelas diversas vezes que me acalmou e escutou minhas reclamações... Muito obrigada pelo seu exemplo e excelência como educador, pesquisador, profissional respeitado e batalhador incansável... Obrigada por acreditar em mim e dividir comigo mais esta alegria! Que Deus continue abençoando o seu caminho. MUITO OBRIGADA POR TUDO!

Ao Professor da Disciplina de Periodontia Dr. **Alvaro Francisco Bosco** Professor, durante a graduação não cheguei a ter muito contato com o senhor. Mas durante a nossa convivência na pós-graduação, pude perceber o grande professor, educador e clínico que estava do meu lado. Um exemplo a ser seguido. Sempre de bom humor, todas as manhãs das quartas-feiras sempre chegava brincando, disposto a ajudar, a ensinar cheio de entusiasmo com os casos clínicos. Preserva a humildade e olha seus pacientes de maneira especial. Além de um excelente clínico, um competente pesquisador. Sempre me ajudou quando precisei. Obrigada pelas palavras de conforto e pelo apoio nos momentos difíceis. O senhor é uma pessoa admirável, honesta, um exemplo de profissional ético e com um valor imensurável. Serei eternamente grata por todos os ensinamentos transmitidos, pelo seu apoio e incentivo e pelos momentos de convívio tão agradáveis. O senhor muito contribuiu para minha formação pessoal e profissional. Obrigada por acreditar em mim e por me ajudar a crescer. Que Deus ilumine sua vida e sua família. **MUITO OBRIGADA POR TUDO!**

Ao Professor e amigo Dr. **Michel Reis Messoria**

Tantos foram os nossos convívios e nossos aprendizados até eu chegar aqui. Hoje, conquisto esse sonho e muito devo a você. Quem me acompanhou desde o início, quando não sabia nem anestésias um ratinho!!! Foi você quem acompanhou cada passo, cada crescimento, cada idéia nova... Sempre disposto a ajudar e a ensinar. Você é uma pessoa iluminada, que tem muito conhecimento para passar ao próximo. Um verdadeiro exemplo a ser seguido. Admiro muito sua fé e sua conduta profissional. Obrigada pela paciência, pelas conversas, pelo apoio, pelas palavras de amizade, pelos momentos de alegria, pelas risadas que tivemos juntos. Nossa amizade tem um valor enorme para mim. Mesmo longe, me ajudou em todas as etapas deste

trabalho. Obrigada por dividir comigo esta conquista. Que Deus ilumine seu caminho, te dê forças todos os dias para que você possa dissipar seu conhecimento às pessoas que estão a sua volta. **MUITO OBRIGADA POR TUDO!**

À Professora do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal **Suely Regina Mogami Bomfim**

Acompanhou todas as etapas deste trabalho. Foi uma verdadeira “co-orientadora”! Sempre sorrindo, alegre, disposta a atender mesmo com seus horários reduzidos. Muito obrigada por sua dedicação, carinho e cuidado com este trabalho. Seus ensinamentos e sua contribuição foram essenciais para concluí-lo. Obrigada pelas conversas, pelo apoio e pela ajuda nos momentos difíceis. Foi um prazer poder trabalhar com a senhora! Muito obrigada por tudo!

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

Muito obrigada por sua contribuição na análise histológica deste trabalho. Obrigada por seus ensinamentos, sua ajuda e por sua dedicação.

Ao Professor da Disciplina de Cirurgia Dr. **Tetuo Okamoto**

Exemplo de profissional e de dedicação à pesquisa. Agradeço pela amizade, por nossas conversas e por sempre estar disposto a ajudar. Muito obrigada por seus ensinamentos.

Ao Departamento de Ciências Básicas, e em especial à Profa. Dra. **Rita de Cássia Menegati Dornelles**

Por sua contribuição na realização deste trabalho.

Ao querido Professor Dr. **Stephen E. Fucini**

Obrigada pela ajuda nas traduções e correções dos artigos científicos. Pelo empenho na aquisição de materiais para nossas pesquisas. E por compartilhar nossas conquistas sempre com entusiasmo e alegria.

À minha grande amiga **Natália de Campos**

Você é a irmã que eu ganhei em Araçatuba. Um presente de Deus em minha vida! Sempre companheira, verdadeira, honesta, dedicada. Sempre disposta a me ajudar. Foi com você que pude dividir minhas angústias, minhas tristezas, minhas alegrias... Uma pessoa admirável! De repente nos tornamos uma só pessoa: Aonde uma ia a outra estava ao lado. E quando não estávamos juntas, todos estranhavam!!! Hoje só tenho a lhe agradecer pelo seu companheirismo, por sua amizade, seu carinho, seu cuidado, sua preocupação... Sem você não conseguiria realizar este trabalho... Obrigada por me ajudar a conquistar este sonho! MUITO OBRIGADA POR TUDO!

Ao meu grande amigo **Luis Augusto Esper**

O que seria de mim sem você neste trabalho! Ajudou-me em todas as etapas cirúrgicas, nos procedimentos laboratoriais, nas análises estatísticas... Esteve sempre de prontidão para me ajudar! E quantas caronas para a veterinária! Quantas fotografias no laboratório da Profa. Suely!!! Nestes dois anos, dividimos as alegrias e as tristezas... e sempre estivemos prontos para fortalecer uns aos outros. Você é uma pessoa especial! Tem o dom e o prazer de ensinar! Sou muito grata pela sua amizade e vou levá-la comigo para toda a vida! Obrigada por sua paciência, por sua dedicação, pelas brincadeiras, pelas risadas, e por me ajudar a conquistar este sonho! MUITO OBRIGADA POR TUDO!

À minha grande amiga **Michyele Cristhiane Sbrana**

Uma pessoa maravilhosa! Amiga, verdadeira, sincera, sempre disposta a ajudar! Quantas madrugadas estudando e quantos cafezinhos na sua casa! Passamos por momentos muito difíceis durante esses anos, mas que serviram somente para nosso aprendizado e nosso crescimento. Obrigada por sua dedicação, sua preocupação e seu cuidado comigo... Obrigada pelas risadas, pelas conversas, pelo apoio e por me ajudar a realizar este trabalho. Conte comigo sempre! **MUITO OBRIGADA POR TUDO!**

À minha grande amiga **Flávia A. C. Furlaneto**

Obrigada por estar sempre disposta a ajudar. Você está sempre do nosso lado, mesmo distante, participando e dividindo nossas dificuldades e nossas conquistas. É uma pessoa iluminada! Obrigada por suas palavras, seu companheirismo, sua amizade. Admiro muito sua fé, sua força de vontade e sua sabedoria. Que Deus continue iluminando seu caminho! **MUITO OBRIGADA POR TUDO!**

Aos meus companheiros de pós-graduação: **Erivan, Leandro, Thiago, Ricardo, Luis Augusto, Michyele e Natália de Campos**

Embora as afinidades sejam diversas, um só ideal é compartilhado, uma só meta é almejada... Obrigada por tudo o que pude aprender com vocês! Sucesso em suas carreiras profissionais!

Às minhas companheiras de república: **Natália Manrique, Tamara, Jorgiana, Cris, Pâmela, Carol, Jéssica e Ana Luiza**

Muito obrigada pela boa convivência, pelo respeito e pela amizade que nós tivemos em nossa casa. Desejo muito sucesso na vida profissional de vocês!

À estagiária de iniciação científica e amiga: **Carolina Santinoni**

Muito obrigada pelos bons momentos de convívio e pela inestimável ajuda na realização deste trabalho.

Ao Sr. **Edson L. de Campos e a Rosmeire A. M. de Campos**

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

Aos meus grandes amigos **Kléber e Sandra**

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

Às minhas amigas **Nairana e Tamara**

Sempre de bem com a vida, alegres, amigas queridas... Muito obrigada pelas conversas, pelas palavras de apoio e amizade. O nosso convívio é sempre muito especial e prazeroso. Que Deus abençoe vocês e suas famílias! Sucesso em suas carreiras profissionais!

Ao Médico Veterinário e amigo **Guillermo C. V. de Oliveira**

Pela amizade, companheirismo, troca de experiências tão engrandecedoras. Você é um profissional exemplar... Boa sorte e sucesso em sua vida pessoal e profissional!

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

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

Obrigada!

À minha amiga **Natália Manrique**

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

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

Às minhas amigas **Jorgiana Sangalli e Caroline Vital**

O início de uma amizade que será eterna... Independente do tempo e da distância, pois tenho certeza do respeito, da cumplicidade e da confiança que temos umas pelas outras! Obrigada pelo carinho e amizade de vocês! Obrigada por todos os momentos vividos, por partilharmos nossas experiências, nossas dificuldades e nossas conquistas umas com as outras. SUCESSO na vida de vocês!

Ao meu amigo **Alberto Kajimoto**

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

Ao querido amigo e funcionário **Odair**

Sempre pronto para ajudar com muita alegria. Muito obrigada por sua eficiência, dedicação e preocupação com nossas tarefas. Obrigada por

todas as alegrias e dificuldades compartilhadas. Que Deus ilumine seu caminho...

À minha amiga **Marli de Angeli**

Obrigada por cuidar de mim durante todos esses anos. Você foi uma “segunda mãe”... Sempre deixando a roupa limpa, a comida na mesa, a casa organizada... Cuidando de nós com todo zelo e amor... Obrigada por fazer parte dessa conquista! MUITO OBRIGADA POR TUDO!

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

Pela convivência tão agradável e pela disponibilidade em ajudar.

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

Por terem me recebido sempre tão bem, com sorriso nos lábios e um bom-humor contagiante, independentemente de qualquer contratempo... Pela eficiência e presteza de sempre, fundamentais ao prosseguimento dos nossos trabalhos. Muito obrigada!

Ao funcionário da Disciplina de Anatomia **Arnaldo**

Você é o exemplo de profissional dedicado! Muito obrigada por cuidar de meus animais. Por seu zelo e dedicação para com eles. Que Deus o abençoe...

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

Pela disponibilidade em ajudar sempre... Obrigada!

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

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

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

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

Epigrafe

“A coisa mais indispensável a um homem é reconhecer o uso que deve fazer do seu próprio conhecimento”.

(Platão)

Resumo

Resumo

POLA NM. **Reparo ósseo de defeitos de tamanho crítico tratados com Plasma Rico em Plaquetas derivado do sangue periférico ou do aspirado de medula óssea associado ou não ao enxerto de osso autógeno** [Mestrado em Periodontia]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2010.

Este estudo avaliou, histomorfometricamente, o reparo ósseo de defeitos de tamanho crítico (DTC) criados cirurgicamente em calvárias de ratos e tratados com Plasma Rico em Plaquetas (PRP) derivado do sangue periférico (SP) ou do aspirado de medula óssea (AMO) associado ou não ao enxerto de osso autógeno (OA). 60 ratos foram divididos em 6 Grupos: Grupo C (controle), Grupo OA, Grupo PRP-sp, Grupo PRP-amo, Grupo OA/PRP-sp e Grupo OA/PRP-amo. Um DTC de 5 mm de diâmetro foi criado na calvária de cada animal. No Grupo C, o defeito foi preenchido somente com coágulo sangüíneo. No Grupo OA, o defeito foi preenchido com enxerto de OA particulado. Nos grupos PRP-sp e PRP-amo, os defeitos cirúrgicos foram preenchidos com PRP-sp e PRP-amo, respectivamente. Nos grupos OA/PRP-sp e OA/PRP-amo, os defeitos foram preenchidos com enxerto de OA particulado associado ao PRP-sp e ao PRP-amo, respectivamente. Todos os animais foram submetidos à eutanásia aos 30 dias pós-operatórios. A quantidade de osso neoformado foi calculada como uma porcentagem da área total do defeito original. Esses valores foram transformados em arcoseno para a análise estatística (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$). O Grupo C apresentou formação óssea significativamente menor ($12,34 \pm 2,51\%$) que os grupos OA ($48,94 \pm 3,91\%$), PRP-sp ($31,48 \pm 14,05\%$), PRP-amo ($35,38 \pm 17,19\%$), OA/PRP-sp ($60,27 \pm 9,12\%$) e OA/PRP-amo ($44,19 \pm 16,49\%$). A quantidade de formação óssea do Grupo OA/PRP-sp foi significativamente maior que a do Grupo PRP-sp. Dentro dos limites deste estudo, pode-se concluir que todos os tratamentos realizados potencializaram o reparo ósseo em DTC em calvárias de ratos. A associação enxerto de OA/PRP-sp demonstrou uma tendência de apresentar a maior AO.

Palavras-chave: células-tronco; plaquetas; plasma rico em plaquetas; regeneração óssea; transplante ósseo.

Abstract

Abstract

POLA NM. **Bone healing in critical-size-defects treated with Platelet-Rich Plasma derived from either peripheral blood or bone marrow aspirate combined or not with autogenous bone graft. A histologic and histometric study in rat calvaria.** [dissertation]. Araçatuba: Unesp – Univ Estadual Paulista; 2010.

This study histomorphometrically evaluated the bone healing of critical-size defects (CSD) surgically created in rat calvaria and treated with Platelet-Rich Plasma (PRP) derived from either the peripheral blood (PB) or bone marrow aspirate (BMA) combined or not with autogenous bone (AB) grafts. 60 rats were divided into 6 groups: Group C (control), Group AB, Group PRP-pb, Group PRP-bma, Group AB/PRP-pb and Group AB/PRP-bma. A 5-mm diameter CSD was created in the calvarium of each animal. In Group C, the defect was filled with blood clot only. In Group AB, the defect was filled with AB graft. In groups PRP-pb and PRP-bma, the defects were filled with PRP derived from PB and BMA, respectively. In groups AB/PRP-pb and AB/PRP-bma, the defects were filled with AB grafts combined with PRP-pb and PRP-bma, respectively. All animals were euthanized at 30 days post-operatively. Bone Area (BA) was calculated as a percentage of the total area of the original defect. Percentage data were transformed into arccosine for statistical analysis (ANOVA, Tukey, $p < 0.05$). Group C presented significantly less bone formation ($12.34 \pm 2.51\%$) than groups AB ($48.94 \pm 3.91\%$), PRP-pb ($31.48 \pm 14.05\%$), PRP-bma ($35.38 \pm 17.19\%$), AB/PRP-pb ($60.27 \pm 9.12\%$) and AB/PRP-bma ($44.19 \pm 16.49\%$). Bone formation in Group AB/PRP-pb was significantly greater than in Group PRP-pb. Within the limits of this study, it can be concluded that all treatments promoted bone formation in CSD in rat calvaria. The combination AB/PRP-pb demonstrated a trend to present the largest BA.

Key words: stem cells; platelets; platelet-rich plasma; bone regeneration, bone transplantation.

*Lista de
Figuras*

Lista de Figuras

- Figura 1 - Punção da crista ilíaca esquerda do animal para coleta do AMO (A). 70
Obtenção de um volume total de 1 ml de medula de cada animal (B).
- Figura 2 - Esfregaços das amostras de SP (A) e de PRP-sp (B) mostrando 71
plaquetas (setas pretas) com morfologia normal. Esfregaços das
amostras de AMO (C) e de PRP-amo (D) mostrando plaquetas (setas
pretas) e CM (setas vermelhas) com morfologia normal. Panótico.
Aumento original 1000x.
- Figura 3 - Quantidade média de plaquetas/ μ l e desvios-padrão nas amostras de 72
SP, PRP-sp, AMO e PRP-amo.
- Figura 4 - Quantidade média de CM/ μ l e desvios-padrão nas amostras de AMO e 73
PRP-amo.
- Figura 5 - Visões panorâmicas dos defeitos cirúrgicos. Grupo C (A); Grupo OA 74
(B); Grupo PRP-sp (C); Grupo PRP-amo (D); Grupo OA/PRP-sp (E);
Grupo OA/PRP-amo (F). H&E. Aumento original 1,25x.
- Figura 6 - Médias (%) e desvios-padrão da Área de Osso (AO) para os grupos C, 75
OA, PRP-sp; PRP-amo; OA/PRP-sp; OA/PRP-amo aos 30 dias pós-
operatórios.

*Lista de
Cabelas*

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Média (\pm DP) da AO dentro da área do defeito cirurgicamente criado, com 76
comparação entre os grupos.

*Lista de
Anexos*

Lista de Anexos

Anexo A - Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) 78

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
ANOVA	=	Análise de Variância
AO	=	Área de Osso
AT	=	Área Total
C	=	Controle
CEEA	=	Comissão de Ética na Experimentação Animal
CM	=	Células Medulares
CTMs	=	Células-Tronco Mesenquimais
DP	=	Desvio-padrão
DTC	=	Defeito de Tamanho Crítico
EDTA	=	Ácido Etilenodiaminotetracético
FAPESP	=	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FCs	=	Fatores de Crescimento
Fig.	=	Figura
Figs.	=	Figuras
g	=	Gramma
G	=	Giros
H.E.	=	Hematoxilina e Eosina
kg	=	Quilograma
Ltda	=	Limitada
mg	=	Miligrama
ml	=	Militro
mm	=	Milímetro
mm ²	=	Milímetro Quadrado
Nº	=	Número

OA	=	Osso Autógeno
OA/PRP-amo	=	Osso Autógeno associado ao Plasma rico em Plaquetas derivado do Aspirado de Medula Óssea
OA/PRP-sp	=	Osso Autógeno associado ao Plasma rico em Plaquetas derivado do sangue periférico
PPP	=	Plasma Pobre em Plaquetas
PRP	=	Plasma Rico em Plaquetas
PRP-amo	=	Plasma Rico em Plaquetas derivado do Aspirado de Medula Óssea
PRP-sp	=	Plasma Rico em Plaquetas derivado do Sangue Periférico
<i>rp</i>	=	Coefficiente de Correlação de Pearson
SP	=	Sangue Periférico
μ l	=	Microlitro
μ m	=	Micrometro

*Lista de
Símbolos*

Lista de Símbolos

\pm	=	Desvio-padrão
&	=	E
$^{\circ}\text{C}$	=	Graus Celsius
=	=	Igual
<	=	Menor
/	=	Por
%	=	Por cento
p	=	Probabilidade do valor do teste
r^2	=	Qui-quadrado
n	=	Tamanho da amostra
x	=	Vezes

Sumário

Sumário

Manuscrito para Publicação	45
Página de título	46
Resumo	47
Introdução	48
Material e métodos	50
Resultados	56
Discussão	59
Agradecimentos	64
Referências	65
Anexos	77

*Manuscrito para
Publicação**

**Segundo as normas do periódico "BONE" – Anexo B*

Reparo ósseo de defeitos de tamanho crítico tratados com Plasma Rico em Plaquetas derivado do sangue periférico ou do aspirado de medula óssea associado ou não ao enxerto de osso autógeno. Estudo histológico e histométrico em calvárias de ratos.

Natália M. Pola¹, Maria J. H. Nagata¹

¹Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada, Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Brasil.

Título Resumido (“Running title”): PRP derivado do aspirado de medula óssea

Palavras-Chave: células-tronco, plaquetas, plasma rico em plaquetas, regeneração óssea, transplante ósseo.

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

Este estudo avaliou, histomorfometricamente, o reparo ósseo de defeitos de tamanho crítico (DTC) criados cirurgicamente em calvárias de ratos e tratados com Plasma Rico em Plaquetas (PRP) derivado do sangue periférico (SP) ou do aspirado de medula óssea (AMO) associado ou não ao enxerto de osso autógeno (OA). 60 ratos foram divididos em 6 Grupos: Grupo C (controle), Grupo OA, Grupo PRP-sp, Grupo PRP-amo, Grupo OA/PRP-sp e Grupo OA/PRP-amo. Um DTC de 5 mm de diâmetro foi criado na calvária de cada animal. No Grupo C, o defeito foi preenchido somente com coágulo sangüíneo. No Grupo OA, o defeito foi preenchido com enxerto de OA particulado. Nos grupos PRP-sp e PRP-amo, os defeitos cirúrgicos foram preenchidos com PRP-sp e PRP-amo, respectivamente. Nos grupos OA/PRP-sp e OA/PRP-amo, os defeitos foram preenchidos com enxerto de OA particulado associado ao PRP-sp e ao PRP-amo, respectivamente. Todos os animais foram submetidos à eutanásia aos 30 dias pós-operatórios. A quantidade de osso neoformado foi calculada como uma porcentagem da área total do defeito original. Esses valores foram transformados em arcoseno para a análise estatística (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$). O Grupo C apresentou formação óssea significativamente menor ($12,34 \pm 2,51\%$) que os grupos OA ($48,94 \pm 3,91\%$), PRP-sp ($31,48 \pm 14,05\%$), PRP-amo ($35,38 \pm 17,19\%$), OA/PRP-sp ($60,27 \pm 9,12\%$) e OA/PRP-amo ($44,19 \pm 16,49\%$). A quantidade de formação óssea do Grupo OA/PRP-sp foi significativamente maior que a do Grupo PRP-sp. Dentro dos limites deste estudo, pode-se concluir que todos os tratamentos realizados potencializaram o reparo ósseo em DTC em calvárias de ratos. A associação enxerto de OA/PRP-sp demonstrou uma tendência de apresentar a maior AO.

Palavras-chave: células-tronco; plaquetas; plasma rico em plaquetas; regeneração óssea; transplante ósseo.

Introdução

Recentes avanços na área da bioengenharia têm trazido um grande impacto na restauração e reabilitação de estruturas teciduais perdidas do corpo humano [1,2]. O campo da medicina regenerativa engloba diversas áreas da tecnologia, tais como engenharia de tecidos, células-tronco e clonagem. A engenharia de tecidos, um dos principais componentes da medicina regenerativa, segue os princípios do transplante de células, ciência de materiais e engenharia para o desenvolvimento de substitutos biológicos que podem restaurar e manter a função normal de tecidos [1]. Está consolidada na utilização de células, arcabouços biocompatíveis e fatores de crescimento (FCs) [3].

Em 1998, Marx et al. [4] propuseram o uso do Plasma Rico em Plaquetas (PRP) autólogo como uma técnica economicamente viável para obter-se uma alta concentração de FCs. Esses autores observaram uma maturação mais rápida dos enxertos ósseos autógenos associados ao PRP quando comparados aos enxertos sem PRP no tratamento de defeitos mandibulares. A racionalidade para o uso local do PRP está, sobretudo, no aumento dos níveis de FCs no sítio da ferida após a degranulação plaquetária. Devido à concentração e liberação aumentada desses FCs, o PRP pode potencialmente aumentar o recrutamento e a proliferação de células-tronco e células endoteliais [5].

Pesquisadores buscam continuamente melhorar as técnicas de enxerto ósseo para alcançar uma regeneração óssea mais rápida e com maior densidade [6]. Com este objetivo, a terapia envolvendo células-tronco mesenquimais (CTMs) derivadas da medula óssea associadas a enxertos ósseos e biomateriais tem sido avaliada em vários estudos [7-10]. Alguns estudos *in vitro* demonstraram a influência do PRP sobre as CTMs [11,12]. Lucarelli et al. [12] avaliaram os efeitos do PRP sobre CTMs de origem humana e observaram um aumento significativo no número dessas células no terceiro, sexto e nono dia do experimento quando estas foram cultivadas com 10% de PRP. A taxa de crescimento foi aproximadamente duas

vezes mais alta quando comparada com a das células controle (não tratadas). Os autores concluíram que este aumento na taxa de proliferação das CTMs poderia ser vantajoso para aplicações clínicas tais como o uso destas células para a reconstrução de grandes defeitos ósseos.

Uma vantagem potencial da associação CTMs-PRP é que ela é simultaneamente osteogênica, osteocondutiva e osteoindutiva, devido à capacidade de formação óssea das CTMs e à presença dos FCs secretados pelas plaquetas em um arcabouço tridimensional de fibrina [13]. Plaquetas são uma fonte segura, de baixo custo e facilmente acessível de FCs [10]. Além disso, esta associação CTMs-PRP é autógena, não-tóxica e possui ótima plasticidade [13].

Um estudo em mandíbulas de cães demonstrou que a associação CTMs-PRP foi vantajosa no tratamento de defeitos ósseos, promovendo formação de osso maduro e vascularizado significativamente maior quando comparada ao grupo controle [14]. Esta associação acelerou a regeneração óssea quando comparada ao uso de enxertos ósseos autógenos, xenógenos ou PRP somente no reparo de alvéolos de cães [15].

Outros estudos mais recentes, *in vitro* e *in vivo*, também relataram o cultivo de CTMs e sua associação com o PRP na terapia regenerativa [9,10,16-18]. Nesses estudos, as CTMs foram expandidas *in vitro* antes de sua aplicação com o PRP. É importante ressaltar que, para a expansão *in vitro* destas células, são necessários diversos materiais tais como diferentes meios de cultura, suplementos de crescimento celular e de indução osteogênica [19,20]. O cultivo *in vitro* é uma abordagem promissora, porém consome tempo e é oneroso, o que poderia torná-lo desvantajoso na prática clínica [21].

Assim, na tentativa de simplificar o processo de obtenção e concentração de CTMs, Oyama et al. [21] utilizaram o aspirado fresco de medula óssea centrifugado, o que denominaram “PRP derivado do aspirado de medula óssea”, que foi associado com fosfato beta-tricálcio para tratamento de fissuras de lábio e palato em 17 pacientes. Estes autores obtiveram uma boa

neoformação óssea nos pacientes tratados com este tipo de PRP em um período de 6 meses. A técnica de preparo deste tipo de PRP foi avaliada de forma mais completa em estudo em humanos realizado por Nishimoto et al. [22]. Segundo estes autores, esta técnica permite a concentração não somente de plaquetas com seus FCs, mas também de CTMs da medula óssea de forma simples e com baixo custo. Esta concentração simultânea de plaquetas e células da medula óssea, atuando como fontes de FCs e “células trabalhadoras”, pode atuar como importantes fatores na medicina regenerativa futura [22].

Estudos *in vivo* que avaliem o efeito biológico do PRP derivado do aspirado de medula óssea (PRP-amo) no processo de reparo ósseo são escassos. O propósito deste estudo foi avaliar, histologicamente e histometricamente, o reparo ósseo de defeitos de tamanho crítico (DTC) criados cirurgicamente em calvárias de ratos e tratados com Plasma Rico em Plaquetas derivado do sangue periférico (PRP-sp) ou do aspirado de medula óssea (PRP-amo) associado ou não ao enxerto de osso autógeno (OA).

Material e Métodos

Modelo experimental

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP. Todas as diretrizes relativas aos cuidados com a pesquisa animal foram estritamente seguidas. Para o presente estudo, foram utilizados 60 ratos machos (*Rattus norvegicus, albinus*, Wistar), com idade entre 5 e 6 meses, pesando entre 450 a 500 g (UNESP, Biotério da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba-SP). Os animais foram mantidos em ambiente com ciclo de 12 horas de luz por dia e temperatura entre 22 e 24 °C. Durante todo o experimento, os animais consumiram ração sólida selecionada

e água ad libitum. Eles foram aleatoriamente divididos em 6 grupos experimentais: Grupo C (controle), Grupo OA (osso autógeno), Grupo PRP-sp (PRP derivado do sangue periférico), Grupo PRP-amo (PRP derivado do aspirado de medula óssea), Grupo OA/PRP-sp (osso autógeno associado ao PRP derivado do sangue periférico) e Grupo OA/PRP-amo (osso autógeno associado ao PRP derivado do aspirado de medula óssea).

Procedimentos cirúrgicos

Para realização de todos os procedimentos experimentais, os ratos foram anestesiados por injeção intramuscular de xilazina (6 mg/kg de peso corporal) e quetamina (70 mg/kg de peso corporal). Além disso, os animais receberam injeção intramuscular de morfina (1 mg/kg de peso corporal), com o intuito de assegurar a analgesia.

Após tricotomia e anti-sepsia da parte dorsal do crânio de cada animal, foi feita 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. Com auxílio de um guia cirúrgico previamente confeccionado, uma marcação no formato de “L” foi feita 2 mm anterior e outra 2 mm posterior às margens do defeito cirúrgico. O maior eixo de cada “L” localizou-se sobre uma linha imaginária longitudinal crânio-caudal que dividia o defeito cirúrgico ao meio. As marcações foram feitas com uma broca carbide tronco-cônica sob irrigação contínua com solução salina estéril e, posteriormente, preenchidas com amálgama [23]. Estas marcações foram úteis para a identificação do meio do defeito cirúrgico original durante o processamento laboratorial e, também, para localizar as suas margens ósseas originais durante a análise histométrica.

No Grupo C, o defeito cirúrgico foi preenchido somente com coágulo sangüíneo. No Grupo OA o defeito foi preenchido com 0,01 ml de enxerto de OA particulado. No Grupo PRP-sp, o defeito foi preenchido com 50 µl de PRP-sp. No Grupo PRP-amo, o defeito foi preenchido com 50 µl de PRP-amo. Nos Grupos OA/PRP-sp e OA/PRP-amo, os defeitos cirúrgicos foram preenchidos com 0,01 ml de enxerto de OA particulado associado a 50 µl de PRP-sp e PRP-amo, respectivamente. O osso autógeno obtido da calvária durante a criação do defeito cirúrgico foi preparado em um triturador de osso (Triturador ósseo, tipo pilão, Pró-Implante Prod. Médicos e Odontológicos Ltda, Araçatuba, SP, Brasil). O osso foi triturado em partículas de 172 a 210 µm. Os tecidos moles foram, então, reposicionados e suturados para obter um fechamento primário da ferida. Cada animal recebeu uma injeção intra-muscular de 24.000 unidades de Penicilina G-benzatina (Pentabiótico* Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge® Saúde Animal Ltda., Campinas, SP) no pós-operatório imediato.

Coleta do sangue periférico (SP)

Anteriormente aos procedimentos cirúrgicos, os animais dos Grupos PRP-sp e OA/PRP-sp foram submetidos à punção cardíaca. Um volume de 3,15 ml de sangue foi coletado de cada animal usando uma seringa descartável de 5,0 ml contendo 0,35 ml de citrato de sódio a 3,2% para prevenir coagulação. Foi separado o volume de 0,1 ml do sangue coletado para a contagem de plaquetas. O volume restante (3,05 ml) foi destinado ao preparo do PRP-sp.

Coleta do aspirado de medula óssea (AMO)

Anteriormente aos procedimentos cirúrgicos, os animais dos Grupos PRP-amo e OA/PRP-amo foram submetidos à coleta de medula das cristas ilíacas direita e esquerda. Um volume de 1 ml de medula (0,5 ml de medula da crista ilíaca direita e 0,5 ml de medula 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 (Figs. 1A e 1B). Foi separado o volume de 0,075 ml do aspirado coletado para a contagem de plaquetas e células medulares (CM). O volume restante (0,925 ml) foi destinado ao preparo do PRP-amo.

Preparo do PRP-sp e PRP-amo

Tanto o PRP-sp como o PRP-amo foram preparados de acordo com uma adaptação do protocolo de Sonnleitner et al. [24]. Cada amostra coletada foi, inicialmente, centrifugada a 160 G por 20 minutos, à temperatura de 22°C, para separar o plasma contendo as plaquetas das células vermelhas (PRP-sp) ou para separar o plasma contendo as plaquetas das células vermelhas e CM (PRP-amo) (Beckman J-6M Induction Drive Centrifuge, Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, EUA). O plasma foi pipetado e centrifugado a 400 G por 15 minutos, à temperatura de 22°C, para separar as plaquetas (PRP-sp) ou as plaquetas e CM (PRP-amo). O Plasma Pobre em Plaquetas (PPP) foi pipetado do topo, deixando o PRP e o *buffy coat*, que foram então re-suspensos. Um volume de 50 µl de PRP foi pipetado e 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 PRP, no momento da aplicação clínica.

Contagem de plaquetas e CM

Líquido de Brecher foi usado para lisar os eritrócitos e diluir as amostras de SP, AMO, PRP-sp e PRP-amo. As plaquetas nessas amostras diluídas foram, então, contadas manualmente em uma câmara de Neubauer. Foi realizada, também, em câmara de Neubauer, a contagem total de CM presentes nas amostras de AMO e de PRP-amo. Para isso, estas amostras foram separadas, diluídas e homogeneizadas em Líquido de Turk. Além disso, todos os esfregaços foram corados com “Panótico Rápido LB” (LaborClin, Pinhais, PR, Brasil) para avaliar a

morfologia das plaquetas e CM. A contagem de plaquetas e CM e a análise de suas morfologias foram realizadas por um veterinário hematologista.

As concentrações de plaquetas nas amostras de PRP-sp e PRP-amo e as concentrações de CM nas amostras de PRP-amo foram calculadas, com base, em parte, no estudo de Tamimi et al. [25], a partir das seguintes equações:

Concentração de plaquetas (PRP-sp):

$$\text{Concentração de plaquetas (plaquetas}/\mu\text{l)} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de plaquetas do PRP-sp}}{\text{N}^{\circ} \text{ de plaquetas do SP}}$$

Concentração de plaquetas (PRP-amo):

$$\text{Concentração de plaquetas (plaquetas}/\mu\text{l)} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de plaquetas do PRP-amo}}{\text{N}^{\circ} \text{ de plaquetas do AMO}}$$

Concentração de CM (PRP-amo):

$$\text{Concentração de CM (CM}/\mu\text{l)} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de CM do PRP-amo}}{\text{N}^{\circ} \text{ de CM do AMO}}$$

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 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. Foram realizados, também, cortes transversais que tangenciaram o eixo menor de ambas as marcações em “L”, de modo que cada espécime apresentou-se com 9 mm de extensão no sentido longitudinal. Assim, tornou-se possível a

determinação precisa dos limites do defeito cirúrgico original para realização das análises histológica e histométrica [23]. Após um período de descalcificação adicional, as peças foram processadas e incluídas em parafina. Foram realizados cortes seriados longitudinais, com 6 μm de espessura, iniciados 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.

Análise histomorfométrica

Foram selecionados 2 cortes histológicos, representando o centro do defeito cirúrgico original, para as análises histológica e histométrica. As 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 160x e salvas em um computador. A análise histomorfométrica foi realizada com o auxílio do software “ImageLab 2000” (Dracon Bio Informática Ltda., Vargem Grande do Sul, SP, Brasil).

Os seguintes critérios, baseados no trabalho de Messoria et al. [23], foram usados para padronizar a análise histomorfométrica das imagens digitalizadas:

- 1) A Área Total (AT) a ser analisada correspondeu à área total do defeito cirúrgico original. Esta área foi determinada, primeiramente, pela identificação 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 (AO) foi delineada dentro dos limites da AT.
- 2) A AT foi medida em mm^2 e considerada 100% da área a ser analisada. A AO também foi medida em mm^2 e calculada como porcentagem da AT.

Análise estatística

Os valores de AO de cada animal foram representados pela porcentagem média dos 2 cortes histológicos. Esses dados percentuais foram transformados em arcoseno para análise estatística. A significância das diferenças entre os grupos em relação à AO 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 entre a AO e a contagem de plaquetas nas amostras de PRP dos grupos PRP-sp, PRP-amo, OA/PRP-sp e OA/PRP-amo, bem como entre a AO e a contagem de CM nas amostras de PRP dos grupos PRP-amo e OA/PRP-amo.

Resultados

Todos os animais toleraram bem o procedimento cirúrgico e mantiveram-se saudáveis durante todo o período experimental. Quatro espécimes foram perdidos devido a problemas no processamento laboratorial, sendo um do Grupo OA, um do Grupo PRP-sp, um do Grupo PRP-amo e um do Grupo OA/PRP-amo.

Estudo da Contagem de Plaquetas e CM

Os esfregaços do SP e do PRP-sp mostraram plaquetas com morfologia normal (Figs. 2A e 2B). Os esfregaços do AMO e do PRP-amo mostraram, além das plaquetas, CM com morfologia normal (Figs. 2C e 2D). A média da contagem de plaquetas das amostras de SP foi $511,95 \pm 74,64 \times 10^3$ plaquetas/ μ l, enquanto que a média de contagem de plaquetas das amostras de PRP-sp foi $2488,13 \pm 637,89 \times 10^3$ plaquetas/ μ l (Fig. 3). A concentração de plaquetas nas amostras de PRP-sp foi aumentada em aproximadamente 4,8 vezes. A média da

contagem de plaquetas das amostras de AMO foi $428,06 \pm 81,92 \times 10^3$ plaquetas/ μl , enquanto que a das amostras de PRP-amo foi $1263,34 \pm 372,72 \times 10^3$ plaquetas/ μl (Fig. 3). A concentração de plaquetas nas amostras de PRP-amo foi aumentada em aproximadamente 2,9 vezes. A média da contagem de CM das amostras de AMO foi $723,50 \pm 231,54 \times 10^3$ CM/ μl , enquanto que a das amostras de PRP-amo foi $2061,31 \pm 998,34 \times 10^3$ CM/ μl (Fig. 4). A concentração de CM nas amostras de PRP-amo foi aumentada em aproximadamente 2,8 vezes.

Análise histológica qualitativa

Grupo C

Observou-se a presença de tecido ósseo imaturo restrito apenas às margens do defeito cirúrgico (Fig. 5A). O padrão de neoformação óssea progrediu das margens do defeito cirúrgico para o seu centro, sendo que a espessura do tecido ósseo neoformado diminuía bruscamente em direção ao centro do defeito. Na parte mais central e nas margens do defeito, ou seja, circunscrevendo o tecido ósseo neoformado, observou-se tecido conjuntivo apresentando grande quantidade de fibras colágenas orientadas paralelamente à superfície do defeito, com moderada quantidade de fibroblastos, grande quantidade de vasos sanguíneos e raras células inflamatórias.

Grupo OA

Observou-se a presença de tecido ósseo imaturo nas margens do defeito cirúrgico, seguindo o padrão de neoformação óssea observado no Grupo C. No entanto, a região central do defeito apresentava, além do tecido conjuntivo bem organizado, muitas partículas do tecido ósseo remanescentes do enxerto (Fig. 5B). A presença destes remanescentes propiciou a aposição de uma fina camada de tecido ósseo imaturo em muitas de suas superfícies. Ainda, em algumas

dessas superfícies, eram freqüentes lacunas de reabsorção com a presença de alguns osteoclastos. O tecido conjuntivo situado no defeito cirúrgico recobria toda sua superfície e circunscrevia as partículas ósseas remanescentes do enxerto. Este tecido exibia grande quantidade de fibras colágenas, com moderada quantidade de fibroblastos, grande quantidade de vasos sanguíneos e focos isolados de células inflamatórias, especialmente nos locais onde a reabsorção óssea das partículas do enxerto estava ocorrendo ativamente.

Grupos PRP-sp e PRP-amo

A análise histológica demonstrou muita similaridade em relação às características estruturais apresentadas pelos defeitos cirúrgicos dos grupos PRP-sp e PRP-amo. O padrão de neoformação óssea progrediu das margens do defeito em direção ao seu centro. No entanto, esta progressão foi significativamente maior que a observada no Grupo C, o que propiciou o quase fechamento do defeito cirúrgico na maioria dos espécimes analisados (Figs. 5C e 5D). Observou-se a formação de centros osteogênicos isolados no interior do defeito cirúrgico em metade dos espécimes dos grupos PRP-sp e PRP-amo. Um animal do Grupo PRP-amo apresentou neoformação óssea em toda a extensão do defeito cirúrgico. O tecido conjuntivo situado no centro do defeito e na circunscrição das ilhotas de tecido ósseo imaturo neoformado mostrava-se bem organizado, com grande quantidade de fibras colágenas, moderada quantidade de fibroblastos e vasos sanguíneos.

Grupos OA/PRP-sp e OA/PRP-amo

A análise histológica demonstrou muita similaridade em relação às características estruturais apresentadas pelos defeitos cirúrgicos dos grupos OA/PRP-sp e OA/PRP-amo. A neoformação óssea assumiu dois padrões distintos, os quais contribuíram igualmente para que o tecido ósseo ocupasse a quase totalidade da extensão do defeito cirúrgico. No primeiro, a

neoformação óssea progrediu das margens do defeito em direção ao seu centro e foi significativamente maior que a constatada no Grupo C. No segundo, a aposição de moderada quantidade de tecido ósseo imaturo sobre os remanescentes do enxerto ósseo foi observada em todos os espécimes e a quantidade de tecido neoformado mostrou-se maior que a apresentada no Grupo OA (Figs. 5E e 5F). Raros osteoclastos foram observados no defeito cirúrgico reabsorvendo as partículas de enxerto de OA. O tecido conjuntivo que recobria toda a superfície do defeito cirúrgico e entremeava-se nas partículas ósseas remanescentes do enxerto mostrava-se composto por grande quantidade de fibras colágenas, moderada quantidade de fibroblastos e grande quantidade de vasos sanguíneos.

Análises histométrica e estatística

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

Correlação estatisticamente significativa foi observada entre a AO e a contagem de plaquetas nas amostras de PRP do grupo PRP-sp ($r^2 = 0,79$; $p = 0,0028$). Não foram observadas correlações estatisticamente significativas entre a AO e a contagem de plaquetas nas amostras de PRP dos grupos PRP-amo ($r^2 = 0,0488$; $p = 0,6339$), OA/PRP-sp ($r^2 = 0,0104$; $p = 0,7935$) e OA/PRP-amo ($r^2 = 0,4234$; $p = 0,0806$). Também não foram observadas correlações estatisticamente significativas entre a AO e a contagem de CM nas amostras de PRP dos grupos PRP-amo ($r^2 = 0,0379$; $p = 0,6754$) e OA/PRP-amo ($r^2 = 0,0195$; $p = 0,7410$).

Discussão

Pesquisas têm revelado que o papel das plaquetas no processo regenerativo é muito mais do que simplesmente promover a formação do coágulo sanguíneo, pois elas são responsáveis por

liberar FCs ativamente, os quais iniciam a cicatrização dos tecidos moles, a formação óssea e o recrutamento de células-tronco [5]. Os FCs liberados pelas plaquetas são fortes indutores angiogênicos e são conhecidos por serem mitogênicos para as CTMs *in vitro*. Contudo, a sua capacidade para melhorar a osteogenicidade das CTMs *in vivo* ainda não foi bem explorada. Estudos recentes têm sugerido efeitos sinérgicos positivos da mistura de CTMs e PRP no aumento da formação óssea em regiões orais e maxilofaciais [18].

No presente estudo, foram utilizados dois tipos de PRP, associados ou não ao enxerto de OA particulado para o tratamento de DTC. Os grupos OA, PRP-sp, PRP-amo, OA/PRP-sp e OA/PRP-amo apresentaram neoformação óssea significativamente maior que o Grupo C. Há muitos anos, o enxerto de OA tem sido considerado o “padrão ouro” nos procedimentos regenerativos ósseos, pois ele provê células osteogênicas, bem como elementos osteoindutivos e osteocondutores para a cicatrização [26,27]. Considerando a ação isolada do PRP nos grupos PRP-sp e PRP-amo, pode-se sugerir que o aumento significativo da neoformação óssea observado nestes grupos quando comparados ao Grupo C foi devido às propriedades biológicas inerentes destes compostos. Os resultados observados no Grupo PRP-sp corroboram os achados de Messoria et al. [23], que mostraram um aumento significativo da formação óssea em DTC criados em calvárias de ratos e tratados somente com PRP derivado do sangue periférico quando comparados com o grupo controle. Este aumento na formação óssea foi possivelmente causado pela interação de células formadoras de osso na dura-máter dos defeitos cirúrgicos com um aumento da concentração de FCs no PRP [28,29]. A dura-máter é a principal fonte de células formadoras de osso no crânio [30], portanto a preservação de sua integridade durante a criação dos defeitos cirúrgicos foi fundamentalmente importante para os resultados obtidos neste estudo. Além dos FCs, o PRP contém fibrina, fibronectina e vitronectina. Estas proteínas agem como moléculas de adesão celular para osteocondução e como matriz para a formação óssea [29]. Além disso, as membranas plaquetárias podem

estimular a atividade mitogênica de células ósseas, contribuindo assim para a regeneração de tecidos mineralizados [31].

Apesar de ambos os tipos de PRP utilizados isoladamente neste estudo apresentarem quantidade de formação óssea significativamente maior do que o grupo C, diferenças estatisticamente significativas não foram observadas entre esses grupos. Isto pode ter ocorrido devido à técnica de preparo do PRP-amo utilizada no presente estudo. A concentração de plaquetas observada nas amostras de PRP-amo foi aumentada em 2,9 vezes, que não é considerada uma concentração ideal de plaquetas para que o PRP apresente um bom efeito terapêutico, de acordo com Marx et al. [4]. Contudo, o aumento da neoformação óssea observado neste grupo, semelhante ao do Grupo PRP-sp, pode ter ocorrido devido à ação conjunta das plaquetas com as CTMs presentes no AMO. As CTMs possuem o potencial de diferenciarem-se de células imaturas a células semelhantes a osteoblastos na presença de diversos FCs (fator de crescimento derivado das plaquetas, fator de crescimento transformador, fator de crescimento semelhante à insulina e fator de crescimento vascular endotelial) presentes no PRP [18]. Portanto, o uso de um “coquetel” de vários tipos celulares pode ter um efeito positivo. Os FCs providos pelas plaquetas estimulam células dentro e fora do sítio cirúrgico a trabalharem vigorosamente para osteoindução, osteocondução e angiogênese [22].

Grageda [26] propôs um protocolo padronizado para futuros estudos avaliando os efeitos biológicos do PRP-sp e, como parte deste protocolo, sugeriu que estes estudos fossem realizados em modelos experimentais que permitissem a coleta de uma boa quantidade de sangue para o preparo adequado do PRP. No presente estudo, o protocolo de preparo do PRP-sp foi realizado de acordo com o proposto por Messoria et al. [23], com coleta de 3,15 ml de sangue periférico, o que permitiu a obtenção de aumento médio de 4,8 vezes na concentração de plaquetas nas amostras de PRP-sp. Contudo, para o preparo do PRP-amo, o volume

máximo de AMO que se conseguiu coletar no modelo animal utilizado neste estudo foi o de 1 ml, obtendo-se um aumento médio de 2,9 vezes na concentração de plaquetas nas amostras de PRP-amo. Portanto, este pequeno volume de AMO pode ter influenciado a eficiência da técnica de preparo do PRP-amo em relação à concentração de plaquetas e, também, em relação à concentração de CM. Estudos adicionais são necessários para estabelecer e padronizar um protocolo adequado de preparo do PRP-amo. Sabe-se que o PRP-sp considerado “terapêutico” é aquele que apresenta uma concentração de plaquetas de aproximadamente 390% quando comparado ao sangue periférico [4]. Contudo, a concentração ideal de plaquetas e de CM para se obter um efeito “terapêutico” do PRP-amo ainda deverá ser estabelecida em futuros estudos.

Um segundo aspecto sugerido por Grageda [26] para o protocolo padronizado de futuros estudos sobre os efeitos biológicos do PRP é a avaliação da correlação entre a análise histomorfométrica e o número de plaquetas das amostras de PRP. No presente estudo, correlações estatisticamente significativas não foram observadas entre a AO e a contagem de plaquetas das amostras de PRP dos grupos PRP-amo, OA/PRP-sp e OA/PRP-amo. Devido ao potencial regenerativo do PRP ser certamente dependente dos seus níveis de FCs, pode-se inferir que esses resultados suportam os achados de Weibrich et al. [32], que demonstraram que tanto a contagem de plaquetas do sangue periférico como a do PRP não são previsores confiáveis dos níveis de FCs resultantes no PRP. Estes resultados são também corroborados por estudos recentes que têm observado diferenças nos níveis de FCs nas amostras de PRP com a mesma concentração de plaquetas [33,34]. No presente estudo, contudo, foi observada correlação estatisticamente significativa entre a AO e a contagem de plaquetas das amostras de PRP do Grupo PRP-sp. Uma possível hipótese para explicar este resultado seria a de que, especificamente neste grupo de animais, apesar da seleção aleatória dos mesmos, possam ter

ocorrido similaridades nos níveis de FCs nas amostras de PRP. Estudos adicionais avaliando a correlação entre FCs e a análise histomorfométrica são necessários.

A associação do PRP-amo ao enxerto de OA não resultou em maior neoformação óssea que a observada no grupo tratado somente com OA. Uma das possíveis explicações para este resultado seria a proporção de enxerto de OA/PRP-amo utilizada. Segundo Nagata et al. [35,36] a proporção de enxerto de OA/PRP-sp influencia o reparo ósseo em DTC em calvárias de ratos. No estudo histométrico de Nagata et al. [36], a maior neoformação óssea foi obtida no grupo em que se utilizou a proporção de OA/PRP de 1/5, ou seja, a mesma proporção utilizada neste estudo para os grupos OA/PRP-sp e OA/PRP-amo. Contudo, deve-se considerar que, apesar das médias de contagem de plaquetas das amostras de AMO ($428,06 \pm 81,92 \times 10^3$) do presente estudo e das amostras de SP ($474,80 \pm 80,38 \times 10^3$) do estudo de Nagata et al. [36] terem sido semelhantes, a concentração de plaquetas obtida no PRP-amo do presente estudo foi muito menor (2,9 vezes) que a obtida no PRP-sp (5,7 vezes) do estudo de Nagata et al. [36], o que, provavelmente, inferiu nos resultados obtidos. Não existem ainda relatos de estudos padronizados que demonstrem a proporção adequada de enxerto de OA/PRP-amo para que esta associação apresente efeitos terapêuticos significativos nos procedimentos regenerativos.

Diversos estudos demonstraram efeitos biológicos positivos da associação de enxerto de OA e PRP-sp no reparo ósseo, principalmente nos estágios precoces da cicatrização [35-38]. No presente estudo, o aumento da AO no Grupo OA/PRP-sp quando comparado ao Grupo OA (Tabela 1, Fig. 6) também indicou uma clara tendência, apesar de diferenças estatisticamente significativas não terem sido observadas. A principal justificativa para a adição de PRP ao enxerto de OA é que altas concentrações de plaquetas em uma ferida óssea irão aumentar a concentração local de fatores de crescimento secretados e, subsequentemente, aumentar a resposta de cicatrização óssea inicial [38]. O potencial benéfico dessa associação de enxerto

de OA e PRP-sp na regeneração óssea foi também demonstrado, no presente estudo, pelo aumento significativo da AO no grupo OA/PRP-sp quando comparado ao grupo PRP-sp.

Atualmente, este estudo parece ser o primeiro a avaliar histomorfometricamente o efeito do PRP-amo usado isoladamente ou associado ao enxerto de OA no reparo ósseo de DTC criados cirurgicamente em calvária de ratos. O uso de CTMs na engenharia tecidual e medicina regenerativa futuras para substituir modalidades terapêuticas convencionais, tem sido objeto de interesse crescente em diferentes áreas [39]. O presente estudo indicou a potencialidade desta nova modalidade terapêutica. Contudo, muitos estudos ainda serão necessários para a sua completa avaliação.

Dentro dos limites deste estudo, pode-se concluir que todos os tratamentos realizados potencializaram o reparo ósseo em DTC em calvárias de ratos. A associação enxerto de OA/PRP-sp demonstrou uma tendência de apresentar a maior AO.

Agradecimentos

Ao Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba (FOA) – UNESP na pessoa do seu Chefe de Departamento, Prof. Dr. João César Bedran de Castro, pelo empréstimo de equipamentos essenciais para a realização deste estudo; à Prof^a Dr^a Suely Regina Mogami Bomfim do Curso de Medicina Veterinária do Campus de Araçatuba – UNESP, pela assistência profissional nos procedimentos experimentais relacionados ao preparo do PRP; ao Prof. Edilson Ervolino da FOA – UNESP, pela assistência na análise histológica. À FAPESP, pela concessão da Bolsa de Mestrado (Processo 08/52602-6) à pós-graduanda Natália Marcumini Pola.

Referências

- [1] Atala A. Tissue engineering and regenerative medicine: concepts for clinical application. *Rejuvenation Res* 2004;7:15-31.
- [2] Choumerianou DM, Dimitriou H, Kalmanti M. Stem cells: promises versus limitations. *Tissue Eng Part B Rev* 2008;14:53-60.
- [3] Kasten P, Vogel J, Geiger F, Niemeyer P, Luginbühl R, Szalay K. The effect of platelet-rich plasma on healing in critical-size long-bone defects. *Biomaterials* 2008;29:3983-92.
- [4] Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 1998;85:638-46.
- [5] Mehta S, Watson JT. Platelet rich concentrate: basic science and current clinical applications. *J Orthop Trauma* 2008;22:432-8.
- [6] Raghoobar GM, Schortinghuis J, Liem RS, Ruben JL, van der Wal JE, Vissink A. Does platelet-rich plasma promote remodeling of autologous bone grafts used for augmentation of the maxillary sinus floor? *Clin Oral Implants Res* 2005;16:349-56.
- [7] Soltan M, Smiler D, Prasad HS, Rohrer MD. Bone block allograft impregnated with bone marrow aspirate. *Implant Dent* 2007;16:329-39.
- [8] Smiler D, Soltan M, Lee JW. A Histomorphogenic Analysis of Bone Grafts Augmented With Adult Stem Cells. *Implant Dent* 2007;16:42-53.
- [9] Filho Cerruti H, Kerkis I, Kerkis A, Tatsui NH, da Costa Neves A, Bueno DF, et al. Allogeneous bone grafts improved by bone marrow stem cells and platelet growth factors: clinical case reports. *Artif Organs* 2007;31:268-73.

- [10] Pieri F, Lucarelli E, Corinaldesi G, Iezzi G, Piattelli A, Giardino R, et al. Mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma enhance bone formation in sinus grafting: a histomorphometric study in minipigs. *J Clin Periodontol* 2008;35:539-46.
- [11] Gruber R, Karreth F, Kandler B, Fuerst G, Rot A, Fischer MB, et al. Platelet-released supernatants increase migration and proliferation, and decrease osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells under in vitro conditions. *Platelets* 2004;15:29-35.
- [12] Lucarelli E, Beccheroni A, Donati D, Sangiorgi L, Cenacchi A, Del Vento AM, et al. Platelet-derived growth factors enhance proliferation of human stromal stem cells. *Biomaterials* 2003;24:3095-100.
- [13] Anitua E, Sánchez M, Nurden AT, Nurden P, Orive G, Andía I. New insights into and novel applications for platelet-rich fibrin therapies. *Trends Biotechnol* 2006;24:227-34.
- [14] Yamada Y, Ueda M, Naiki T, Takahashi M, Hata K, Nagasaka T. Autogenous injectable bone for regeneration with mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma: tissue-engineered bone regeneration. *Tissue Eng* 2004;10:955-64.
- [15] Ito K, Yamada Y, Naiki T, Ueda M. Simultaneous implant placement and bone regeneration around dental implants using tissue-engineered bone with fibrin glue, mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma. *Clin Oral Implants Res* 2006;17:579-86.
- [16] Dallari D, Fini M, Stagni C, Torricelli P, Nicoli Aldini N, Giavaresi G, et al. In Vivo Study on the Healing of Bone Defects Treated with Bone Marrow Stromal Cells, Platelet-Rich Plasma, and Freeze-Dried Bone Allografts, Alone and in Combination. *J Orthop Res* 2006;24:877-88.

- [17] Yamada Y, Ueda M, Hibi H, Baba S. A novel approach to periodontal tissue regeneration with mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma using tissue engineering technology: A clinical case report. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2006;26:363-69.
- [18] Pieri F, Lucarelli E, Corinaldesi G, Fini M, Aldini NN, Giardino R, et al. Effect of mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma on the healing of standardized bone defects in the alveolar ridge: a comparative histomorphometric study in minipigs. *J Oral Maxillofac Surg* 2009;67:265-72.
- [19] Ohya M, Yamada Y, Ozawa R, Ito K, Takahashi M, Ueda M. Sinus floor elevation applied tissue-engineered bone. Comparative study between mesenchymal stem cells/platelet-rich plasma (PRP) and autogenous bone with PRP complexes in rabbits. *Clin Oral Implants Res* 2005;16:622-29.
- [20] Ito K, Yamada Y, Naiki T, Ueda M. Simultaneous implant placement and bone regeneration around dental implants using tissue-engineered bone with fibrin glue, mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma. *Clin Oral Implants Res* 2006;17:579-86.
- [21] Oyama T, Nishimoto S, Takeda M. Alveolar bone regeneration utilizing b-TCP and platelet-rich plasma (PRP) derived from bone marrow aspirate. *Ann Plast Surg* 2005;54:222-23.
- [22] Nishimoto S, Oyama T, Matsuda K. 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* 2007;15:156-62.
- [23] Messoria MR, Nagata MJH, Mariano RC, Dornelles RCM, Bomfim SRM, Fucini SE, et al. Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma: a histologic and histometric study in rat calvaria. *J Periodontal Res* 2008;43:217-23.

- [24] Sonnleitner D, Huemer P, Sullivan DY. A simplified technique for producing platelet-rich plasma and platelet concentrate for intraoral bone grafting techniques: a technical note. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2000;15:879-82.
- [25] Tamimi FM, Montalvo S, Tresguerres I, Blanco Jerez L. A comparative study of 2 methods for obtaining platelet-rich plasma. *J Oral Maxillofac Surg* 2007;65:1084-93.
- [26] Grageda E. Platelet-rich plasma and bone graft materials: a review and a standardized research protocol. *Implant Dent* 2004;13:301-09.
- [27] Schlegel KA, Donath K, Rupprecht S, Falk S, Zimmermann R, Felszeghy E, et al. De novo bone formation using bovine collagen and platelet-rich plasma. *Biomaterials* 2004;25:5387-93.
- [28] Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent* 2001;10:225-28.
- [29] Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg* 2004;62:489-96.
- [30] Wang J, Glimcher MJ. Characterization of matrix-induced osteogenesis in rat calvarial bone defects. II. Origins of boneforming cells. *Calcif Tissue Int* 1999;65:486-93.
- [31] Gruber R, Varga F, Fischer MB, Watzek G. Platelets stimulate proliferation of bone cells: involvement of platelet-derived growth factor, microparticles and membranes. *Clin Oral Implants Res* 2002;13:529-35.
- [32] Weibrich G, Kleis WK, Hafner G, Hitzler WE. Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count. *J Cranio maxillofac Surg* 2002;30:97-102.

- [33] Martineau I, Lacoste E, Gagnon G. Effects of calcium and thrombin on growth factor release from platelet concentrates: kinetics and regulation of endothelial cell proliferation. *Biomaterials* 2004;25:4489–502.
- [34] Fréchet JP, Martineau I, Gagnon G. Platelet-rich plasmas: growth factor content and roles in wound healing. *Journal of Dental Research* 2005;84:434–9.
- [35] Nagata M, Messori M, Okamoto R, Campos N, Pola N, Esper L, et al. Influence of the proportion of particulate autogenous bone graft/platelet-rich plasma on bone healing in critical-size defects: an immunohistochemical analysis in rat calvaria. *Bone* 2009;45:339–45.
- [36] Nagata MJ, Messori M, Pola N, Campos N, Vieira R, Esper LA, et al. 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. [Epub ahead of print] DOI 10.1002/jor.21027.
- [37] Gerard D, Carlson ER, Gotcher JE, Jacobs M. Effects of platelet-rich plasma on the healing of autologous bone grafted mandibular defects in dogs. *J Oral Maxillofac Surg* 2006;64:443–51.
- [38] Nagata MJ, Melo LG, Messori MR, Bomfim SR, Fucini SE, Garcia VG, et al. Effect of platelet-rich plasma on bone healing of autogenous bone grafts in critical-size defects. *J Clin Periodontol* 2009;36:775–83.
- [39] Eduardo Fde P, Bueno DF, de Freitas PM, Marques MM, Passos-Bueno MR, Eduardo Cde P, et al. Stem cell proliferation under low intensity laser irradiation: a preliminary study. *Lasers Surg Med* 2008;40:433–8.

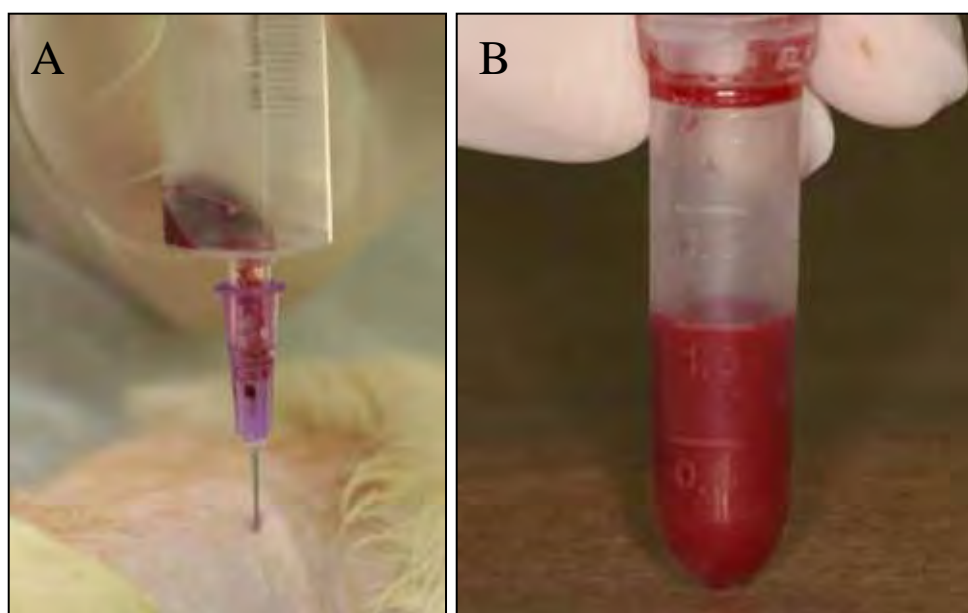


Fig. 1. Punção da crista ilíaca esquerda do animal para coleta do AMO (A). Obtenção de um volume total de 1 ml de medula de cada animal (B).

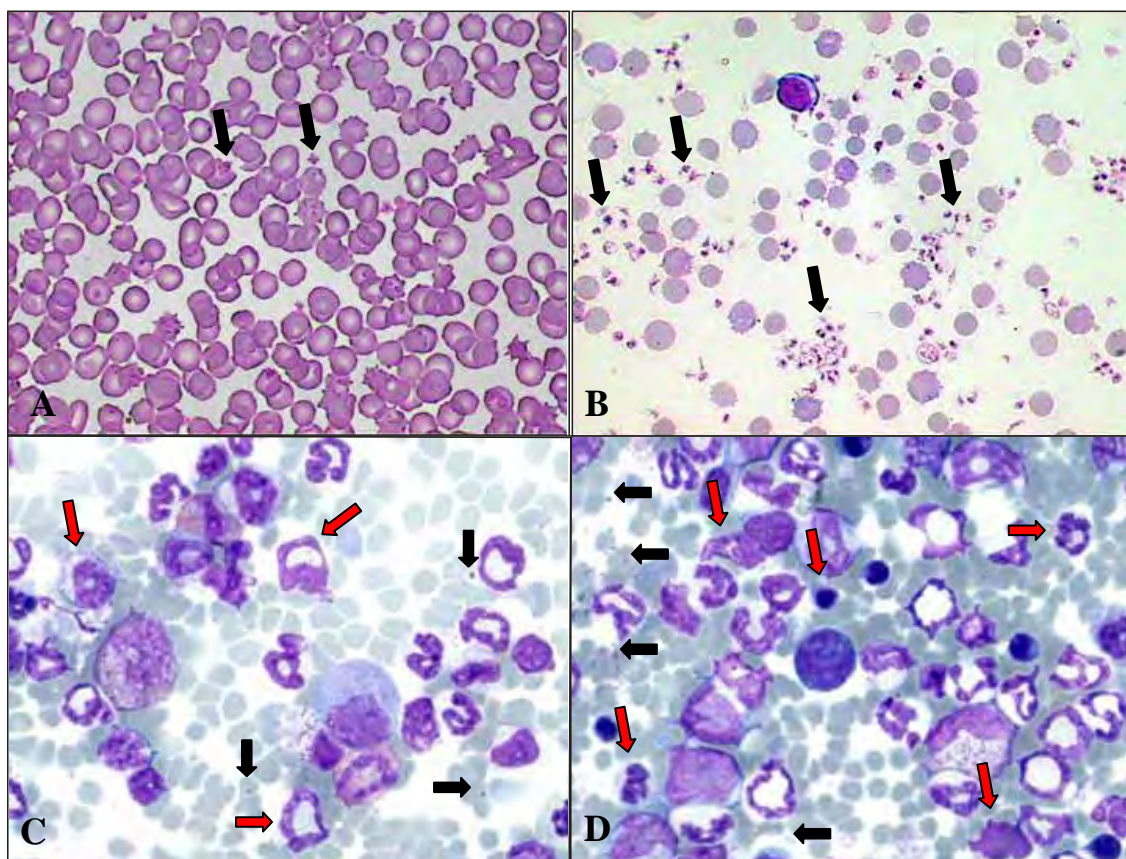


Fig. 2. Esfregações das amostras de SP (A) e de PRP-sp (B) mostrando plaquetas (setas pretas) com morfologia normal. Esfregações das amostras de AMO (C) e de PRP-amó (D) mostrando plaquetas (setas pretas) e CM (setas vermelhas) com morfologia normal. Panótico. Aumento original 1000x.

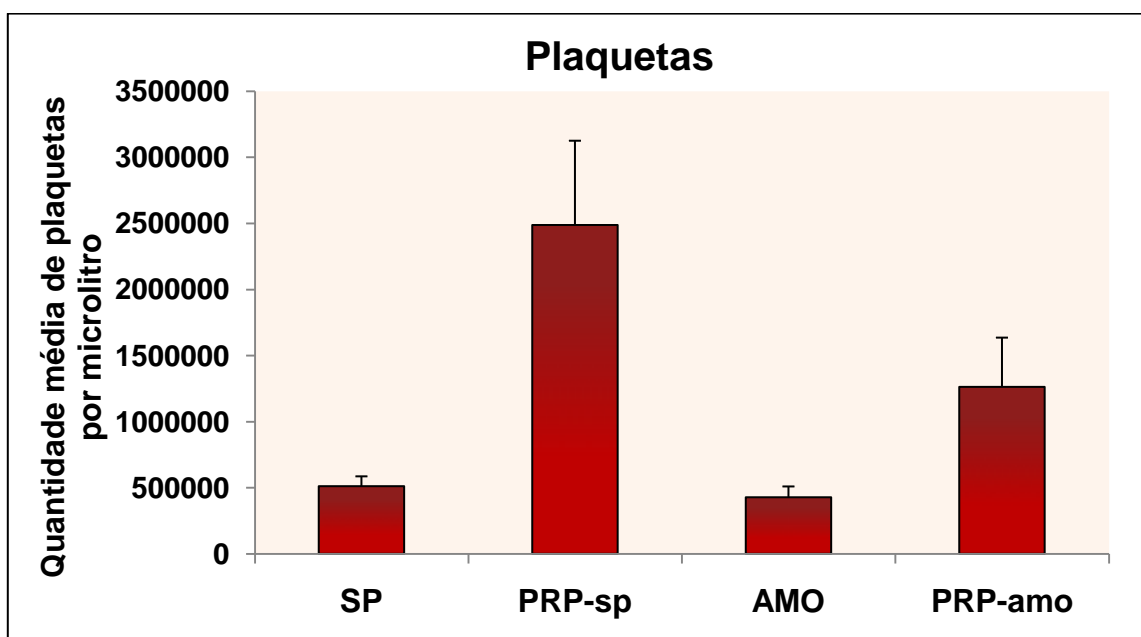


Fig. 3. Quantidade média de plaquetas/ μ l e desvios-padrão nas amostras de SP, PRP-sp, AMO e PRP-amo.

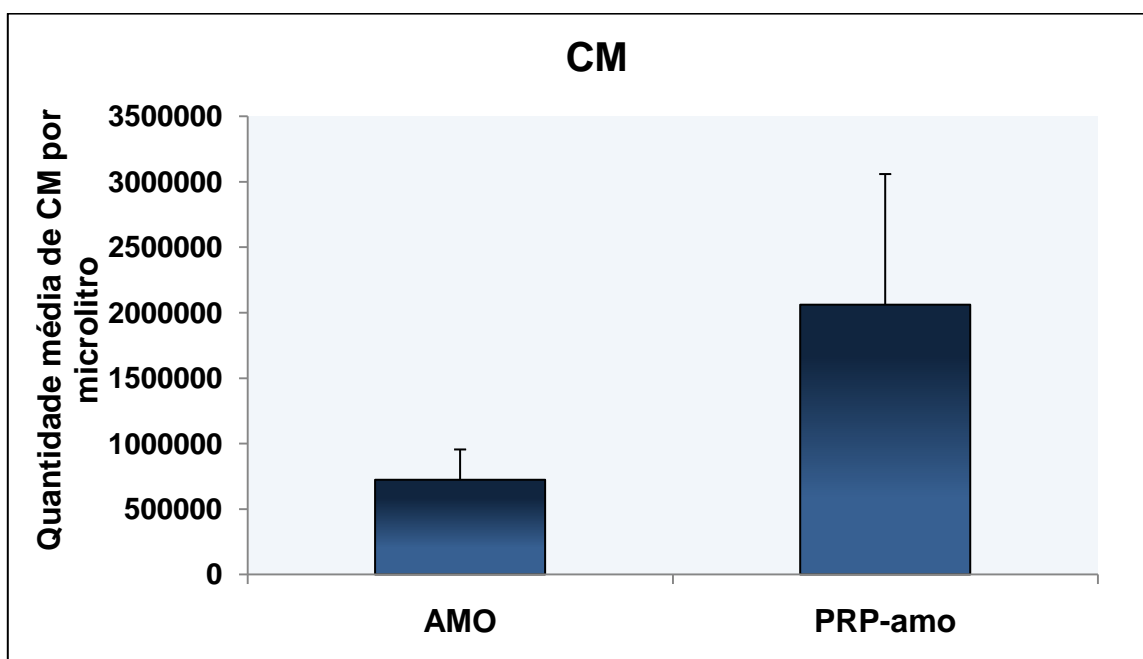


Fig. 4. Quantidade média de CM/ μ l e desvios-padrão nas amostras de AMO e PRP-amo.

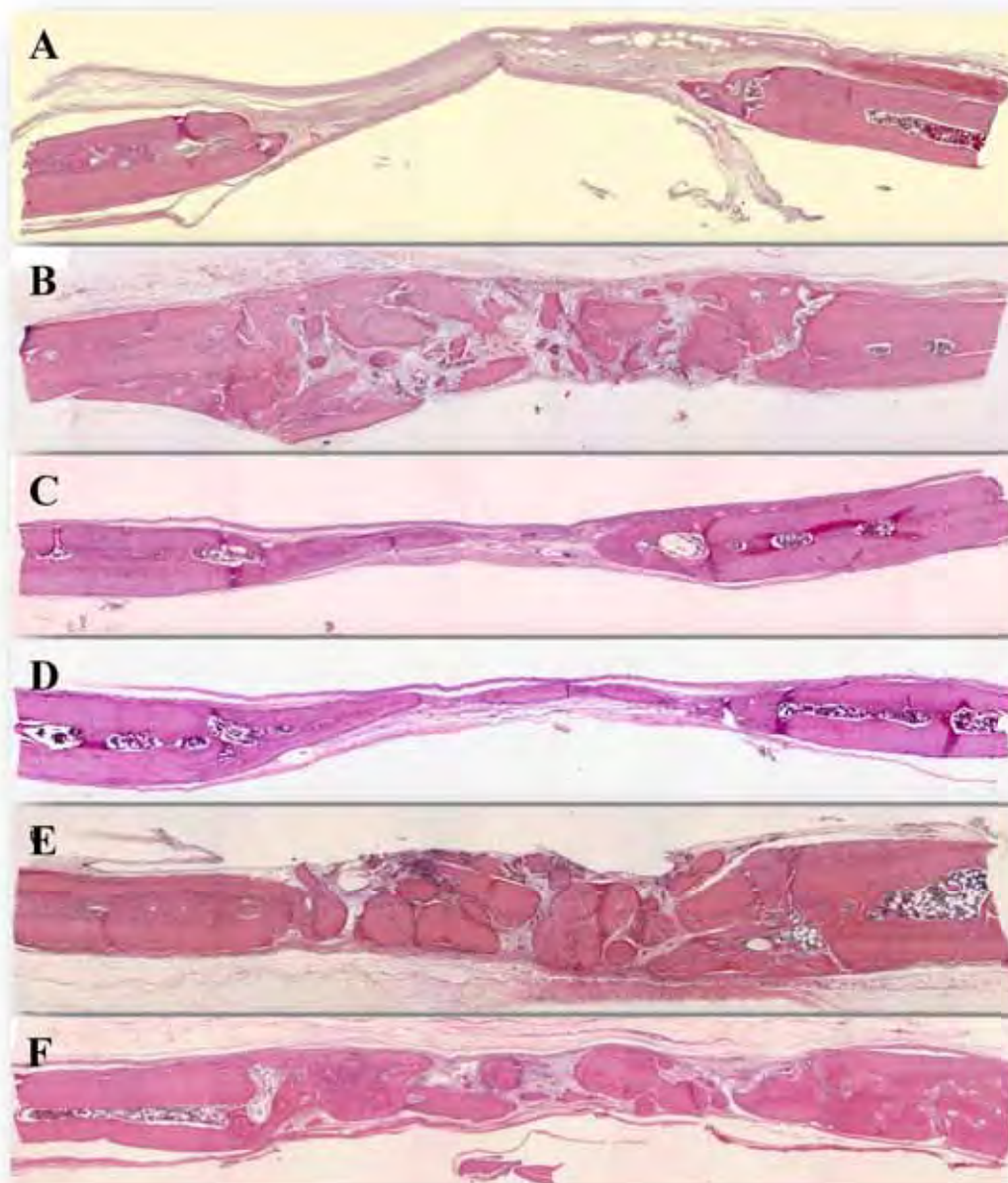


Fig. 5. Visões panorâmicas dos defeitos cirúrgicos. Grupo C (A); Grupo OA (B); Grupo PRP-sp (C); Grupo PRP-amo (D); Grupo OA/PRP-sp (E); Grupo OA/PRP-amo (F). H&E. Aumento original 1,25x.

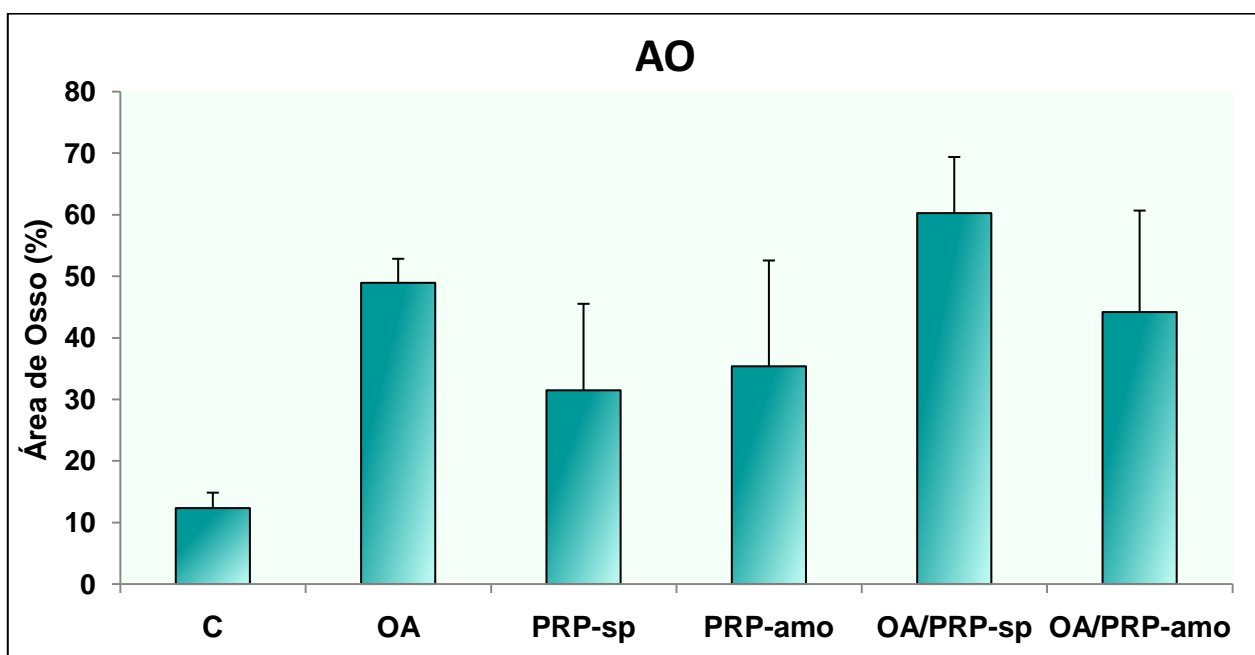


Fig. 6. Médias (%) e desvios-padrão da Área de Osso (AO) para os grupos C, OA, PRP-sp; PRP-amó; OA/PRP-sp; OA/PRP-amó aos 30 dias pós-operatórios.

Tabelas

Tabela 1. Média (\pm DP) da AO dentro da área do defeito cirurgicamente criado, com comparação entre os grupos.

Grupo	n	Médias de AO (%)	DP (%)
C	10	12,34	\pm 2,51
OA	9	48,94 ^a	\pm 3,91
PRP-sp	9	31,48 ^a	\pm 14,05
PRP-amo	9	35,38 ^a	\pm 17,19
OA/PRP-sp	10	60,27 ^{a,b}	\pm 9,12
OA/PRP-amo	9	44,19 ^a	\pm 16,49

^a Comparado a C ($p < 0,05$); ^b Comparado a PRP-sp ($p < 0,05$).

C= Controle; OA= Osso Autógeno; PRP-sp= Plasma Rico em Plaquetas derivado do Sangue Periférico; PRP-amo= Plasma Rico em Plaquetas derivado do Aspirado de Medula Óssea; AO= Área de Osso; DP= Desvio-padrão.

Anejos

Anexo A – Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal

	UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO" Campus de Araçatuba	
COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)		
CERTIFICADO		
<p>Certificamos que o Projeto "REPARO ÓSSEO DE DEFEITOS DE TAMANHO CRÍTICO TRATADOS COM PLASMA RICO EM PLAQUETAS DERIVADO DO SANGUE PERIFÉRICO OU DO ASPIRADO DE MEDULA ÓSSEA ASSOCIADO OU NÃO AO ENXERTO DE OSSO AUTÓGENO. ESTUDO HISTOLÓGICO E HISTOMÉTRICO EM CALVÁRIAS DE RATOS", sob responsabilidade da Prof. Dr. MARIA JOSÉ HITOMI NAGATA e colaboração de NATÁLIA MARCUMINI POLA, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela CEEA em 30 de maio de 2008 de acordo com o protocolo no. 2008-002902.</p>		
Araçatuba, 18 de junho de 2008		
 Profª Drª CRISTINA ANTONIALI SILVA Presidente da CEEA - FOA/UNESP		
<small>Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária Rua José Bonifácio, 1193 CEP 16015-050 Araçatuba - SP Tel (18) 3636-3200</small>		

Anexo – B – Normas para Publicação segundo o Periódico “BONE”

BONE



ISSN:8756-3282

Imprint: ELSEVIER

Statistics

Impact Factor: 4.145

5-Year Impact Factor: 4.597

Issues per year: 12

Guide for Authors

Cell Molecular Biology; Pathophysiology; Treatment Official Journal of the International Bone and Mineral Society

BONE provides a peer-reviewed, interdisciplinary forum for monthly publication of original, experimental, and clinical studies, along with review articles on normal and pathological processes occurring in bone and other tissues affecting calcium metabolism. Additionally, well-documented case reports are invited.

Submissions of manuscripts

Manuscripts must be submitted on BONE's submission and review Web site,

<http://ees.elsevier.com/bone>. If you have a preference, please indicate which editor or

Anexo – B – Normas para Publicação segundo o Periódico “BONE”

associate editor you would like to process your manuscript according to their expertise. The Editors, however, reserve the right to select a different editor or associate editor to monitor the review process, as the expertise of the proposed editor or associate editor should closely match the subject matter of the manuscript. Please also suggest five possible reviewers. When recommending reviewers, authors should avoid naming more than one scientist from any one institution or from closely related scientists/institutions. For each reviewer, please provide name of institution, telephone number, and e-mail address. 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 is carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the **copyright holder**. Manuscripts are published in English only.

For questions regarding submission, please contact:

Bone editorial office 525 B Street, Suite 1900 San Diego, CA 92101-4495, USA

Telephone: (619) 699-6782 Fax: (619) 699-6211 Email: bone@elsevier.com

English editing. The following individuals or services are members of the (United States) Council of Science Editors or other professional organizations and have expressed interest in helping authors of manuscripts submitted to BONE with English editing. Authors may contact these individuals or services directly by mail, phone, fax, or e-mail. All financial arrangements are strictly between the two parties. BONE neither

Anexo – B – Normas para Publicação segundo o Periódico “BONE”

endorses nor recommends any specific individual or service. Professional editing, while often recommended by reviewers, does not ensure acceptance or publication of a manuscript. Diana B. Mathis, ELS, 5559 Raleigh Street, Pittsburgh, PA 15217-1534, USA; telephone: 412-521-6346; fax: 412-422-5082; e-mail: dbmathis@fyi.net Lynda Charters, Medical International, P.O. Box 5966, Marlboro, MA 01752, USA; telephone: 508-788-0726; fax: 508-788-0742; e-mail: medintl@aol.com MedEdit, USA, 15101 Magnolia Boulevard, E24, Sherman Oaks, CA 91403, USA; telephone: 818-986-1715; fax: 818-986-5507; e-mail: adawson@hsc.usc.edu Karin Mesches, Ph.D., SciTechEdit International, 7012 East Mountain Brush Circle, Highlands Ranch, CO 80130, USA; fax: 303-773-6660; e-mail: editor@scitechedit.com; Web page: <http://www.scitechedit.com> Gary D. Novack, Ph.D., Member, AMWA, PharmaLogic Development, Inc., 17 Bridgegate Drive, San Rafael, CA 94903, USA; telephone: 415-472-2181; fax: 415-472-2183; e-mail: gary_novack@pharmalogic.com; Web page: www.pharmalogic.com Rhana Pike (Ms), ELS, Sydney, NSW 2001, Australia; telephone: 61-2-9569-7831; e-mail: rhana@australianeditor.com. Susan Erickson, 130 Winchester Street, Brookline, MA 02446, USA; telephone: 617-731-3415; e-mail: rhanap@ozemail.com.au.

Language Polishing: Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission, please visit <http://www.elsevier.com/locate/languagepolishing> or contact authorsupport@elsevier.com for more information. Please note Elsevier neither endorses nor take responsibility for any products, good or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our Terms and Conditions <http://www.elsevier.com/termsconditions>

Anexo – B – Normas para Publicação segundo o Periódico “BONE”

Only one revision will be permitted. A subsequent revision will be treated as a new submission.

Conflict of interest policy. Authors are required to disclose commercial or similar relationships to products or companies mentioned in or related to the subject matter of the article being submitted. Sources of funding for the article should be acknowledged on the title page. Affiliations of authors should include corporate appointments relating to or in connection with products or companies mentioned in the article, or otherwise bearing on the subject matter thereof. Other pertinent financial relationships, such as consultancies, stock ownership, or other equity interests or patent-licensing arrangements, should be disclosed in the cover letter at the time of submission. Such relationships may be disclosed in the journal at the discretion of the editor-in-chief in footnotes appearing on the title page. Questions about this policy should be directed to the editor-in-chief.

Copyright. Upon acceptance of an article, authors will be asked to sign a “Journal Publishing Agreement” (for more information on this and copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail (or letter) will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript with a “Journal Publishing Agreement” form or a link to the online version of this agreement. Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>).

Anexo – B – Normas para Publicação segundo o Periódico “BONE”

If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

Ethics:

When human subjects are used, manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject, with the approval of the appropriate local ethics committee, and in compliance with national legislation and the Code of Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) <http://www.wma.net/e/policy/b3.htm>.

When experimental animals are used, the materials and methods section must clearly indicate that adequate measures were taken to minimise pain or discomfort, and that the experiments were conducted in accordance with international standards on animal welfare as well as being compliant with local and national regulations. Studies are expected to be compliant with minimal standards as defined by the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC)

US National Institutes of Health (NIH) voluntary posting (“Public Access”) Policy

Anexo – B – Normas para Publicação segundo o Periódico “BONE”

Elsevier facilitates author response to the NIH voluntary posting request (referred to as the NIH "Public Access Policy"; see <http://www.nih.gov/about/publicaccess/index.htm>) by posting the peer-reviewed author's manuscript directly to PubMed Central on request from the author, 12 months after formal publication. Upon notification from Elsevier of acceptance, we will ask you to confirm via e-mail (by e-mailing us at NIHauthorrequest@elsevier.com) that your work has received NIH funding and that you intend to respond to the NIH policy request, along with your NIH award number to facilitate processing. Upon such confirmation, Elsevier will submit to PubMed Central on your behalf a version of your manuscript that will include peer-review comments, for posting 12 months after formal publication. This will ensure that you will have responded fully to the NIH request policy. There will be no need for you to post your manuscript directly with PubMed Central, and any such posting is prohibited. *Expedited review for Rapid Communications* provides authors the opportunity to rapidly publish data they consider particularly novel or valuable to the scientific community. If accepted, the paper will be inserted into the next available issue still in press (usually after approximately 3 months), provided that it is a maximum of 4000 words printed pages and does not require extensive revisions. Authors should note that **acceptance criteria for this category are significantly more stringent.**

Editorials, Reviews, and Minireviews. Although these are most often by invitation, authors who wish to express their opinion or write reviews about scientific matters of interest to the community can submit such manuscripts to BONE. Editorials and minireviews should be 2000-3000 words printed pages and not require extensive revisions to be acceptable for publication. Sponsored supplements and/or commercial reprints: for more information please contact

Anexo – B – Normas para Publicação segundo o Periódico “BONE”

Elsevier Life Sciences Commercial Sales, Radarweg 29, 1043 NX, Amsterdam, The Netherlands; phone (+31) (20) 4852939/2059; email: LSCS@elsevier.com.

Nomenclature

For *chemical nomenclature*, follow the Subject Index of Chemical Abstracts, capitalize trade names, and give manufacturers' or suppliers' names and addresses. Give the meaning of an abbreviation the first time it appears. Define a nonstandard abbreviation when it first appears in the text. For detailed text entry instructions, see <http://www.elsevier.com/locate/guidepublication>

For manuscripts dealing with *bone histomorphometry*, please use the nomenclature approved by the American Society for Bone and Mineral Research (Parfitt AM, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR. Bone histomorphometry nomenclature, symbols and units: report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. J Bone Min Res 1987;2:595-610).

For DXA nomenclature and decimal digits. The ISCD Official Position is as follows. DXA Nomenclature u DXA - not DEXA. u T-score - not T score, t-score, or t score u Z-score - not Z score, z-score, or z score DXA Decimal Digits Preferred number of decimal digits for DXA reporting: u BMD: 3 digits (example, 0.927 g/cm²) u T-score: 1 digit (example, -2.3) u Z-score: 1 digit (example, 1.7) u BMC: 2 digits (example, 31.76 g) u Area: 2 digits (example, 43.25 cm²) u % reference database: Integer (example, 82%)

For manuscripts dealing with *osteoclast differentiation and osteoclast function*, please use the Proposed Standard Nomenclature for New Tumor Necrosis Factor Members

Anexo – B – Normas para Publicação segundo o Periódico “BONE”

Involved in the Regulation of Bone Resorption (Report of the ASBMR President's Committee on Nomenclature. *Bone* 2000;27:761-4).

For manuscripts dealing with *bone markers*, please use the Recommendation for Bone Marker Nomenclature and Abbreviations (position paper, Committee of Scientific Advisors, International Osteoporosis Foundation. *Bone* 2001;28:575-6).

Preparation of manuscripts

Papers should be *double spaced* with at least 1-inch (2.5 cm) margins. Number all pages consecutively. Type tables, footnotes, and figure legends double spaced on separate pages.

The *title page* should show the paper's title, authors, and the complete names of institutions where work was done. Please include the name, mailing address, telephone and fax numbers, and e-mail address of the author to whom correspondence and proofs are to be sent. Each manuscript should include an *abstract* of not more than 350 words, intelligible to the general reader without reference to the text. List 5 *keywords* on a separate sheet for use by indexing and abstract services. Manuscript text should follow standard arrangement: *Introduction, Materials and methods, Results, and Discussion*. *Acknowledgments* should be on a separate page at the end of the text.

References should be cited in the text by a number in square brackets and listed at the end of the paper in numerical order. Only articles that have been published or are in press should be included in the references. Unpublished results or personal communications should be cited as such in the text. Include full article titles and

Anexo – B – Normas para Publicação segundo o Periódico “BONE”

abbreviate journal titles according to the List of Journals Indexed in Index Medicus.


Format references as shown in the examples below.

[1] Brockstedt H, Kassem M, Ericksen EF, Mosekilde L, Melsen F. Age- and sex-related changes in the iliac cortical bone mass and remodeling. *Bone* 1993;14:681-91.

[2] Coccia PF. Bone marrow transplantation for osteoporosis. In: Forman SJ, Blume KG, Thomas ED, editors. *Bone marrow transplantation*. Boston, MA: Blackwell; 1993; 874, 882.

[3] Lacowikz, J. R. *Principles of fluorescence*. New York: Plenum; 1983, p. 112-53.

Tables. Type each table on a separate page at the end of the manuscript, cite in order in the text, and number consecutively with Arabic numerals. Each table should have a title typed above it. Indicate table footnotes by superscript lowercase letters.

Figures must be self-explanatory, titled, cited in order in the text, and numbered consecutively with Arabic numerals. On separate pages, type figure titles with their (brief) legends. Figures should not be embedded in text. Several figures may be grouped into a plate on one page. Lettering on micrographs should be clearly legible. Letters 2 mm high are recommended. Limit the field of micrographs to structures specifically discussed in the report. Symbols and areas of special interest should not be close to the edges. Give figure magnification in the legends and on the figures (micrometer scale). Symbols (minimum 3 mm height) used on micrographs must be explained in the figure legends. For detailed artwork instructions, see 

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

Anexo – B – Normas para Publicação segundo o Periódico “BONE”

Color Figures 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 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. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions> [Please note: Because of technical complications that can arise in 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 files corresponding to all the color illustrations.]


Authors should not that a request to revert from full colour to colour only in the electronic publication at the stage of typesetting and proof correction, will require separate editorial agreement, with possible re-review if necessary, and may significantly delay publication of your manuscript.

Color cover photos. Authors are encouraged to include a color image of any subject in relation to their submitted manuscript for use as cover of the issue in which their manuscript will appear. If the image is also used as illustration within the original manuscript, the costs of the specific plate will be waived.

Supplementary material:

Electronic supplementary material is now accepted to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images,

Anexo – B – Normas para Publicação segundo o Periódico “BONE”

background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier web products, including ScienceDirect:  <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data is provided 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 Corporate Website at <http://www.elsevier.com/authors>



Proofs:

Proofs will be sent to the corresponding author. To avoid delay in publication, only necessary changes may be made, and corrections should be returned promptly.

Offprints:

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF offprint by default, but can choose to receive 50 paper copies instead.

Author enquiries:

For enquiries relating to the submission of articles (including electronic submission where available) please visit this journal's homepage at  <http://www.elsevier.com/locate/bone>. You can track accepted articles at  <http://www.elsevier.com/trackarticle> and set up e-mail alerts to inform you of when an article's status has changed, as well as copyright information, frequently asked questions

Anexo – B – Normas para Publicação segundo o Periódico “BONE”

and more. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, are provided after registration of an article for publication.

Disclaimer:

Whilst every effort is made by the publishers and editorial board to see that no inaccurate or misleading data, opinion or statement appears in this journal, they wish to make it clear that the data and opinions appearing in the articles and advertisements herein are the sole responsibility of the contributor or advertiser concerned. Accordingly, the publishers, the editorial board and editors and their respective employees, officers and agents accept no responsibility or liability.