

Eliana Aparecida Caliente

**Aspirado de medula óssea e plasma rico em
plaquetas associados ou não ao enxerto de osso
autógeno no reparo ósseo de defeitos de tamanho
crítico criados cirurgicamente em calvárias de ratos.
Estudo histomorfométrico e imunoistoquímico**

ARAÇATUBA - SP
2016

Eliana Aparecida Caliente

**Aspirado de medula óssea e plasma rico em
plaquetas associados ou não ao enxerto de osso
autógeno no reparo ósseo de defeitos de tamanho
crítico criados cirurgicamente em calvárias de ratos.
Estudo histomorfométrico e imunoistoquímico**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba - UNESP, para a obtenção do Título de MESTRE EM ODONTOLOGIA (Área de Periodontia).

Orientadora: Prof^a Adj. Maria José H. Nagata

Coorientador: Prof. Ass. Dr. Edilson Ervolino

ARAÇATUBA - SP

2016

Catálogo na Publicação
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - FOA / UNESP

C153a Caliente, Eliana Aparecida
Aspirado de medula óssea e plasma rico em plaquetas associados ou não ao enxerto de osso autógeno no reparo ósseo de defeitos de tamanho crítico criados cirurgicamente em calvárias de ratos: estudo histomorfométrico e imunoistoquímico / Eliana Aparecida Caliente. -- Araçatuba, 2016.
79 f.: 8 il. + CD-ROM.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia de Araçatuba.

Orientadora: Profa. Maria José Hitomi Nagata

Coorientador: Prof. Edilson Ervolino

1. Medula óssea. 2. Células-tronco. 3. Regeneração óssea.
4. Plasma rico em plaquetas. 5. Transplante ósseo. 6. Ratos I. T.

Black D6
CDD 617.601

A Deus

Senhor, ao escrever esta dedicatória tenho dentro de mim uma alegria imensa por poder confirmar cada vez mais que minha fé tem fundamentos. Posso dizer que creio em Deus real e presente em minha vida, que não me impediu de sofrer, mas fez com que eu entendesse muito do que realmente é importante nesta breve existência. Sinto que vossas mãos me sustentam nos momentos mais difíceis e me sinto em seu colo quando as forças dentro de mim já se esgotaram. Obrigada por tudo que o Senhor me proporcionou: minha família, meus amigos, minha vida. Obrigada por ter nos dado Jesus, como exemplo de mestre, que através da sua humildade, sempre escolheu os que eram rejeitados por suas imperfeições por uma sociedade que também é imperfeita e ter acreditado no crescimento deles. Um mestre que nos ensina que a caridade deve ser feita sem pretensões, de forma que a mão direita não saiba o que fez a esquerda. Um mestre que ensina o perdão para que alcancemos o perdão de Deus. Creio em ti Senhor, e sei que tens sempre o melhor para mim. Entrego minha vida em tuas mãos, e assim como fez com Davi, sei que sempre me fortalecerá ao enfrentar os Golias da minha vida. Louvado seja Senhor pelos séculos dos séculos.

“Eu sou aquilo que Deus pensa de mim.”

Santa Teresinha do Menino Jesus

Aos meus amados pais, **Rosa e Alcides**

Mãe,

A senhora é a mulher mais importante da minha vida, meu exemplo de mulher forte e corajosa. Mesmo depois de ter adoecido e precisar de nós para executar às vezes tarefas simples, minha força está em você. Mãe, teu olhar cura as minhas dores mais profundas. Teu abraço é meu porto seguro. Quando olho para a senhora, vejo que nossos traços são muito parecidos, minha personalidade é forte como a sua e isto me orgulha muito, pois você é minha inspiração. Obrigada por ser veículo de Deus para me trazer ao mundo. Obrigada pelo seu ventre que me gerou e abrigou, obrigada por ter me ajudado a crescer e me desenvolver, obrigada por me ensinar o voo e me deixar voar, mas, sobretudo obrigada por permitir que eu volte sempre que minhas asas pesarem.

Pai,

Você é meu presente do céu. Deus lhe deu a tarefa de ser meu pai e você cumpriu muito bem. Quanto orgulho sinto de você, que sempre falou pouco, mas me ensinou pelos seus exemplos. Tenho orgulho de saber que suas mãos calejadas e sua pele queimada pelo sol são provas do seu amor por mim e pelos meus irmãos, para que nunca nos faltasse nada. Obrigada por respeitar minha mãe e ter ficado conosco quando a doença se abateu sobre ela. Pai, meu amor por você é tão grande que faltam palavras para expressá-lo. Obrigada por todo amor e dedicação por mim. Peço a Deus que me possibilite retribuir tudo que fizeste por mim.

“Quando os meus olhos não podiam ver

Tua mão segura me ajudou a andar

Quando eu não tinha mais amor no peito

Teu amor me ajudou a amar”

Padre Fábio de Melo

AOS meus amados irmãos, **Juliana e Henrique**

Juliana,

Minha Tata, digo que tenho o privilégio de ter duas mães. Você significa muito na minha história, pois sempre fez o possível e o impossível por mim. A sua preocupação comigo é admirável, seu coração é imenso. Obrigada por cuidar dos nossos pais enquanto eu me ausentei, obrigada por me ligar todos os dias e me oferecer seu apoio, obrigada por muitas vezes sofrer no meu lugar. Tenho orgulho de você e agradeço a Deus por ter lhe enviado como meu anjo da guarda. Espero retribuir toda a sua dedicação por mim e pela nossa família. Você é um ser iluminado, que me ensina todos os dias a doação e o respeito pelo próximo.

Amo você, minha melhor amiga!

Henrique,

Obrigada por sonhar meus sonhos comigo, estar presente nas minhas derrotas e vitórias. Amo você meu irmão.

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

Antoine de Saint - Exupéry

Agradecimentos

À minha orientadora **Professora Dra. Maria José H. Nagata,**

Professora, gostaria de agradecê-la por ter contribuído com a minha formação como cirurgiã dentista e pela orientação durante o curso de mestrado. Sempre muito criteriosa, procurou me ensinar o rigor científico e a observação dos detalhes. Agradeço pelos puxões de orelhas, pois sei que todos foram pensando no meu bem. Agradeço por ter se preocupado comigo quando adoeci e me ajudado com o tratamento médico, o qual contribuiu para grande melhora da minha saúde. Peço desculpas pelas vezes que agi mal com a senhora, que tenha a desrespeitado. Peço a Deus que lhe dê muita saúde e muitas alegrias.

Ao meu coorientador **Professor Dr. Edilson Ervolino,**

Professor, tenho muita gratidão por tudo que o senhor representou nesta minha passagem pela FOA. Obrigada por ter contribuído com a minha formação e pela coorientação durante o curso de mestrado. Admiro sua didática e a facilidade com que explica as coisas mais difíceis. Obrigada pelo apoio nas horas de desespero. Desejo que Deus o abençoe e lhe dê muita saúde.

À querida **Professora Dra. Suely Mogami Bomfim,**

Professora, agradeço pela honra de me permitir trabalhar com a senhora. Aprendi muito com os experimentos e me encantei com a sua bondade. Muito obrigada por ser uma super mãe para mim, auxiliando nos meus experimentos sempre com muito carinho e sempre sendo prestativa. Que Deus lhe dê o que há de melhor nesta vida.

À querida **Professora Dra. Elenice Deffune**,

Professora, foi um prazer conhecê-la e poder contar com a sua ajuda. Agradeço pelo carinho ao me ensinar e pela receptividade. A senhora me cativou com sua bondade e com seus conhecimentos. Muito obrigada por tudo.

À amiga **Eduarda**,

Duda, obrigada por ter dividido comigo as horas boas e ruins. Quantas coisas enfrentamos juntas, por vezes tivemos opiniões divergentes, mas sempre nos entendemos com maturidade, pois sabíamos que o ambiente de trabalho, quando livre de brigas e discussões, se torna agradável. Obrigada por muitas vezes ter cuidado de mim quando estava longe dos meus familiares e precisava de ajuda. Obrigada por ter me apresentado amigos novos. Obrigada por me ensinar a olhar as pessoas com menos julgamento e mais compaixão. Obrigada por ter sonhado muitos dos meus sonhos comigo. Obrigada por dividir o pouco que tínhamos; era pouco, mas Deus multiplicou e nunca faltou. Peço a Deus que guie seus passos, que você realize seus sonhos e seja muito feliz, e que no futuro possamos nos encontrar e chegar à conclusão que tudo valeu a pena e que cada lágrima Deus transformou em sorrisos.

Às amigas **Adrieli, Giovanna e Juliani**,

Muito obrigada meninas por tornarem nossa república um lar. Agradeço a Deus por que tive a graça de encontrar em vocês uma família, nós dividimos as contas, as dores e as alegrias. Nossa casa sempre foi um ambiente tranquilo e abençoado por Deus. Desejo que o caminho de cada uma de vocês seja iluminado e cheio de conquistas. Que vocês realizem seus sonhos e que a distância física nunca apague as lembranças boas dos momentos que tivemos juntas.

AO amigo **Marcelo Putte e sua família**

Muito obrigada por estarem comigo e me ajudarem a entender a vida sempre com bons olhos. Realmente, fui muito agraciada por Deus, pois vocês me acolheram como sendo parte da família de vocês e todo bem que me fazem não tem preço. São anos de amizade, de união, de viBrasilção com as minhas vitórias e apoio nas minhas derrotas. Amo vocês infinitamente e agradeço por tudo que fizeram e fazem por mim. Peço que Deus os proteja e dê muitas alegrias.

AO amigo **Everton Tavano e sua família**

Tom, confesso que ao escrever sobre você e o Celo fico emocionada, porque quantas provas de amizade vocês já me deram. Vocês foram meus apoios nas horas mais difíceis, crescemos juntos, não temos laços de sangue, mas nossos laços fraternos são muito grandes. Quero agradecer por ter me dado a honra de conviver com a sua família, amo vocês infinitamente e espero poder retribuir tudo que fazem por mim.

AO amigo **Lucas Esgalha e sua família**

Lucas, obrigada por ter sido meu companheiro durante meu curso de mestrado. Sua presença em minha vida foi muito importante, eu dividi com você meus momentos bons e ruins. Obrigada por tudo que sua família me proporcionou, por todo bem que me fizeram, obrigada por me mostrarem que o mar é imenso e lindo. Vocês são minha família em Araçatuba, obrigada pela honra de me permitir conviver com vocês tão intimamente.

À amiga **Aline Magalhães e sua família**

Aline, muito obrigada por todo carinho que recebi de você e da sua família. Obrigada por sempre me buscarem para passar os domingos com vocês, eram momentos em que eu estava longe da minha família e vocês me proporcionavam acolhimento. Tenho muita gratidão e espero que Deus abençoe muito essa família linda.

*A*O amigo **Marcus Vinicius Magalhães**

Vinicius, muito obrigada por ter sido meu anjo protetor quando eu mais precisei. Nunca esquecerei o quanto você me ajudou e tranquilizou. Peço que Deus o proteja e que torne seus dias todos muito felizes. Minha sincera gratidão.

A amiga **Ana Cláudia Manzatti**

Ana, muito obrigada por todo apoio que você me deu durante a faculdade. Sempre disposta a me ajudar, sempre com muito carinho. Desejo que Deus a abençoe muito e que você continue sendo essa profissional exemplar.

A minha sincera gratidão

*A*O Professor **Dr. Álvaro Francisco Bosco**

Muito obrigada professor pelos ensinamentos durante as clínicas e pelo carinho com que sempre fui tratada pelo senhor. Sua humildade e sabedoria me inspiram, muito obrigada pelos bons exemplos.

A Professora **Dra. Leticia Theodoro**

Obrigada professora por sempre me compreender e me estimular, aprendi muito todas as vezes em que tive contato com a senhora nas clínicas. Obrigada por sempre me receber com carinho todas as vezes que precisei.

*A*O Professor **Dr. Valdir Garcia**

Obrigada professor por sempre ter me tratado muito bem, por sempre me estimular durante suas passagens pelo laboratório. Suas palavras de incentivo me motivaram muito.

ÀO Professor Dr. Juliano Milanezi

Professor, levarei comigo lembranças muito boas das nossas clínicas. Nunca esquecerei que foi o senhor que me orientou na primeira vez em que fiz uma gengivoplastia. Admiro sua destreza manual ao realizar os procedimentos cirúrgicos e admiro também a forma como conduz suas pesquisas acompanhando sempre seus alunos de perto. Obrigada por ter contribuído com a minha formação e pelas vezes em que me ajudou quando precisei.

À Professora Dra. Carolina Santinoni

Carol, gostaria de agradecer por ter me ensinado todos os princípios para que eu realizasse meus experimentos.

À Professora Dra. Natália Campos

Natália, obrigada pelo auxílio nas atividades do mestrado e durante minha graduação.

ÀO Professor Dr. Michel Messoria

Professor, agradeço pelo auxílio nas análises estatísticas e por sempre me ajudar, respondendo minhas dúvidas por e-mail, por vezes até aos finais de semana e feriados. Muito obrigada.

À querida Professora Dra. Rita de Cássia Dorneles

Professora, obrigada por ter proporcionado minha iniciação científica. Obrigada por ter me possibilitado conhecer meus amigos do laboratório de Fisiologia, pelos quais tenho imenso carinho e gratidão; sinto que somos uma família. A senhora me ensinou muitas coisas e me amparou sempre como uma mãe, tenho admiração pela sua coragem, personalidade e inteligência. Tenho orgulho de ter sido sua orientada pela mulher, professora, pesquisadora e mãe que é. Muito obrigada por tudo, por sempre querer o melhor para mim.

Ao querido Professor **Dr. Wilson Poi**

Professor, muito obrigada por tudo que já fez por mim, por ter ajudado minha família quando minha mãe adoeceu, por ter me estimulado a participar da colação de grau junto a minha turma e ter me entregue o diploma. Obrigada por me estimular a manter os meus princípios e defender o que penso, a me estimular a lutar pelos meus sonhos. Obrigada por ter contribuído muito para que a minha visão sobre muitas situações melhorasse.

Aos queridos amigos do **Laboratório de Periodontia da FOA**

Vocês foram essenciais para que eu atravessasse essa parte da estrada, Muito obrigada por terem me auxiliado sempre que precisei e por me proporcionarem viver em um ambiente agradável. Admiro nossa turma, porque percebo que todos se ajudam, que ficam felizes uns com as vitórias dos outros. Mantenham esse espírito, a ciência precisa de mais pessoas assim, preocupadas em realmente descobrir o melhor para nossos pacientes. Nunca deixem que o espírito da competição desleal e da inveja influencie vocês. Muito obrigada por tudo.

Aos queridos amigos do **Laboratório de Fisiologia da FOA**

Minha sincera gratidão a todos vocês pelo acolhimento e por tudo que me ensinaram. Cresci muito vendo o comprometimento de vocês com as pesquisas e, sobretudo como ajudam uns aos outros. Aprendi com vocês que o trabalho em equipe só é possível quando existe companheirismo.

Ao Dr. **Stephen Fucini**

Professor, agradeço por todas as vezes que deixou seus afazeres de lado para se dedicar a nós. O senhor foi muito bom e nos ensinou muito. Que Deus o abençoe.

Ao Sr. Odair

Muito obrigada por ter nos ajudado em nossos experimentos com tanto carinho e dedicação, mesmo depois de aposentado, nunca nos negou ajuda. Que Deus lhe dê muitos anos de vida cheios de saúde.

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, nas pessoas de seu Diretor Prof. Dr. **Wilson Roberto Poi** e Vice-Diretor Dr. **João Eduardo Gomes Filho**.

Ao Programa de Pós-graduação em Odontologia, nas pessoas de seu coordenador Prof. Dr. **André Luiz Fraga Briso**, Vice-Coordenador Prof Dr. **Celso Koogi Sonoda** e de todo corpo docente.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da Bolsa de Mestrado à pós-graduanda Eliana Aparecida Caliente.

À Fundação de Amparo à Pesquisa, pela concessão da Bolsa de Mestrado (Processo nº 2014/01823-3) à pós-graduanda Eliana Aparecida Caliente.

A todos os funcionários da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP.

Aos funcionários da seção de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP por sempre estarem dispostos a ajudar.

Aos funcionários do Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, em especial o Sr. **Camilo**, pela disponibilização dos animais deste experimento.

Ao funcionário **Arnaldo** pela ajuda na manutenção dos animais deste experimento.

*“Importante não é ver o que ninguém nunca viu,
mas sim, pensar o que ninguém nunca pensou sobre
algo que todo mundo vê”*

Arthur Schopenhauer

RESUMO

Caliente EA. **Aspirado de medula óssea e plasma rico em plaquetas associados ou não ao enxerto de osso autógeno no reparo ósseo de defeitos de tamanho crítico criados cirurgicamente em calvárias de ratos. Estudo histomorfométrico e imunoistoquímico** [dissertação]. Araçatuba: UNESP – Univ. Estadual Paulista; 2016.

Este estudo avaliou a influência do aspirado de medula óssea (AMO) e do plasma rico em plaquetas (PRP) associados ou não ao enxerto de osso autógeno (OA) no reparo ósseo de defeitos de tamanho crítico (DTC), criados cirurgicamente em calvárias de ratos. 96 ratos foram divididos em 6 grupos: C, PRP, AMO, OA, PRP/OA e AMO/OA. Um DTC de 5 mm de diâmetro foi criado na calvária de cada animal. No grupo C, o defeito foi preenchido com coágulo sanguíneo somente. Nos grupos PRP e AMO, o defeito foi preenchido com PRP e AMO, respectivamente. No Grupo OA, o defeito foi preenchido com enxerto de OA. Nos grupos PRP/OA e AMO/OA, o defeito foi preenchido com enxerto de OA combinado com PRP ou AMO, respectivamente. Os animais foram submetidos à eutanásia aos 10 ou 30 dias pós-operatórios. Foram realizadas análises histomorfométrica e imunoistoquímica. A área de osso (AO) foi calculada como porcentagem da área total do defeito original. Foram realizadas reações imunoistoquímicas para detecção do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), proteínas morfogenéticas ósseas 2/4 (BMP-2/4) e osteocalcina (OCN). As células PCNA-positivas, BMP-2/4-positivas e OCN-positivas foram quantificadas. Os dados foram analisados estatisticamente. Aos 10 dias, os grupos OA, PRP/OA e AMO/OA apresentaram AO significativamente maior que o controle; e o grupo PRP/OA apresentou maior AO, bem como números significativamente maiores de células PCNA-positivas e BMP-2/4-positivas, que o grupo OA. Aos 30 dias, os resultados favoráveis dos grupos OA, PRP/OA e AMO/OA no reparo ósseo foram também observados, e o grupo AMO/OA apresentou maior AO, bem

como número significativamente maior de células OCN-positivas que o grupo OA. Além disso, o grupo AMO apresentou AO significativamente maior que o controle e similar a dos grupos OA e PRP/OA, mas menor que a do grupo AMO/OA. O grupo AMO apresentou números significativamente maiores de células PCNA-positivas, BMP-2/4-positivas e OCN-positivas que os grupos controle e PRP/OA. Pode-se concluir que, aos 10 dias, a associação PRP/OA proporcionou maior AO em DTC em calvárias de ratos quando comparada ao controle ou a cada terapia única; enquanto que, aos 30 dias, a associação AMO/OA foi a que promoveu maior AO que o controle ou cada terapia única. A terapia única com AMO promoveu AO semelhante àquela obtida com a terapia única com enxerto de OA aos 30 dias. Diferenças significativas na AO não foram observadas entre os grupos tratados com PRP/OA ou com AMO/OA em ambos os períodos de análise; contudo, um reparo ósseo mais avançado foi observado no grupo AMO/OA aos 30 dias.

Palavras-chave: Medula óssea. Plasma rico em plaquetas. Células-tronco. Regeneração óssea. Transplante ósseo. Ratos.

ABSTRACT

Caliente EA. **Bone marrow aspirate and platelet-rich plasma combined or not with autogenous bone graft on bone healing. A histomorphometric and immunohistochemical study** [dissertation]. Araçatuba: UNESP – Univ. Estadual Paulista; 2016.

This study evaluated the influence of bone marrow aspirate (BMA) and platelet-rich plasma (PRP) combined or not with the autogenous bone (AB) graft on bone healing in surgically created critical-size defects (CSD) in rat calvaria. 96 rats were divided into 6 groups: C, PRP, BMA, AB, PRP/AB and BMA/AB. A 5 mm diameter CSD was created in the calvarium of each animal. In Group C, the defect was filled by blood clot only. In groups PRP and BMA, the defects were filled with PRP and BMA, respectively. In Group AB, the defect was filled with AB graft. In groups PRP/AB and BMA/AB, the defect was filled with AB graft combined with PRP or BMA, respectively. Animals were euthanized at either 10 or 30 days postoperative. Histomorphometric and immunohistochemical analyses were performed. Bone area (BA) was calculated as a percentage of the total area of the original defect. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA), bone morphogenetic protein 2/4 (BMP-2/4) and osteocalcin (OCN) immunohistochemical staining were performed. PCNA-positive, BMP-2/4-positive and OCN-positive cells were quantified. Data were statistically analyzed. At 10 days, groups AB, PRP/AB and BMA/AB presented significantly greater BA than control; and group PRP/AB presented greater BA, as well as significantly higher numbers of PCNA-positive and BMP-2/4-positive cells than group AB. At 30 days, the favorable results of groups AB, PRP/AB and BMA/AB on bone healing were also observed; and group BMA/AB presented greater BA, as well as significantly higher number of OCN-positive cells than group AB. In addition, group BMA presented significantly greater BA than control and similar to groups AB and PRP/AB but lower than group BMA/AB. Group BMA presented significantly higher

numbers of PCNA-positive, BMP-2/4-positive, and OCN-positive cells than control and PRP/AB. It can be concluded that, at 10 days, the combination of PRP/AB promoted greater BA in CSD in rat calvaria when compared to control or either treatment alone; while, at 30 days, the combination of BMA/AB promoted greater BA than control or either treatment alone. The treatment with BMA only yielded BA similar to that obtained with the treatment with AB graft only at 30 days. Significant differences in BA were not observed between groups treated with PRP/AB or BMA/AB at both periods of analysis; however, a more advanced bone healing process was observed in group BMA/AB at 30 days.

Keywords: Bone marrow. Platelet-rich plasma. Bone transplantation. Stem cells. Bone regeneration. Rats.

Lista de Figuras

- Figura 1.** Células, isoladas da medula óssea de ratos, plaqueadas para verificação da capacidade de aderência ao plástico das mesmas. 7 dias de cultura: células com aspecto fibroblastóide aderidas ao plástico e células autofluorescentes não aderidas (A); 14 dias de cultura: células com prolongamentos maiores, citoplasma mais abundante e menor autofluorescência (B); 21 dias de cultura: células com citoplasma abundante, com aspecto fibrilar e presença de matriz extracelular (C). Aumento original de 400x. **56**
- Figura 2.** Células isoladas da medula óssea de ratos submetidas a diferentes meios indutores, para a verificação da capacidade de diferenciação das mesmas em tri-linhagem. Controle negativo (A). Diferenciação adipogênica: intensa trama de células fibroblastoídes, com presença evidente de vacúolos com lipídeos no interior. Coloração citoquímica *Oil red O*® (B). Diferenciação condrogênica: células arredondadas, citoplasmas abundantes, núcleos bem corados e um discreto aro mais claro perinuclear formando núcleos isogênicos. Coloração com Azul de Toluidina (C). Diferenciação osteogênica: depósitos exagerados de cálcio em marrom. Aspecto de tapete celular confluyente, sem espaços livres com deposição de cálcio de forma heterogênea, porém uniformemente distribuído em toda cultura. Coloração com *Alizarin red*® (D). Aumento original 200x. **57**
- Figura 3.** Visões panorâmicas dos defeitos cirúrgicos aos 10 dias pós-operatórios. Fotomicrografia dos grupos Controle (A); PRP (B); AMO (C); OA (D); PRP/OA (E) e AMO/OA (F). H&E. Barra de escala = 500 µm. Abreviaturas: C, controle; PRP, plasma rico em plaquetas; AMO, aspirado **58**

de medula óssea; OA, osso autógeno.

Figura 4. Visões panorâmicas dos defeitos cirúrgicos aos 30 dias pós-operatórios. **59**

Fotomicrografia dos grupos Controle (A); PRP (B); AMO (C); OA (D); PRP/OA (E) e AMO/OA (F). H&E. Barra de escala = 500 µm. Abreviaturas: C, controle; PRP, plasma rico em plaquetas; AMO, aspirado de medula óssea; OA, osso autógeno.

Figura 5. Visões detalhadas dos defeitos cirúrgicos aos 30 dias pós-operatórios. **60**

Fotomicrografia dos grupos OA (A) e AMO/OA (B). H&E. Barra de escala = 30 µm. Abreviaturas: OA, osso autógeno; AMO, aspirado de medula óssea.

Figura 6. Médias e desvios-padrão da Área de Osso (AO), com comparações inter- **61**
grupos aos 10 dias pós-operatórios.

Figura 7. Médias e desvios-padrão da Área de Osso (AO), com comparações inter- **62**
grupos aos 30 dias pós-operatórios.

Figura 8. Imunomarcações para PCNA, BMP 2/4 e OCN no defeito cirúrgico, aos 30 **63**
dias pós-operatórios. Fotomicrografias mostrando células PCNA-positivas (cabeça de seta preta) nos grupos Controle (A) e AMO/OA (B). Fotomicrografias mostrando células BMP 2/4-positivas (cabeça de seta vermelha) nos grupos Controle (C) e AMO/OA (D). Fotomicrografias mostrando células OCN-positivas (cabeça de seta azul) nos grupos Controle (E) e AMO/OA (F). Barra de escala = 40 µm. Abreviaturas: C, controle; AMO, aspirado de medula óssea; OA, osso autógeno; PCNA, antígeno nuclear de proliferação celular; BMP 2/4, proteína morfogenética óssea 2/4; OCN, osteocalcina; TO, tecido ósseo; TC, tecido conjuntivo; VS, vaso sanguíneo.

Lista de Tabelas

- Tabela 1.** Porcentagens médias (\pm desvios-padrão) de células positivas para cada marcador nas amostras de AMO dos grupos AMO e AMO/OA aos 10 e 30 dias pós-operatórios. **53**
- Tabela 2.** Médias e desvios-padrão das células PCNA-positivas, BMP2/4-positivas e OCN-positivas aos 10 dias pós-operatórios, com comparação inter-grupos. **54**
- Tabela 3.** Médias e desvios-padrão das células PCNA-positivas, BMP2/4-positivas e OCN-positivas aos 30 dias pós-operatórios, com comparação inter-grupos. **55**

Lista de Anexos

Anexo A - Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)	64
Anexo B - Normas para publicação segundo o periódico <i>Journal of Orthopaedic Research</i>	65

Lista de Abreviaturas

AMO	Aspirado de medula óssea
AO	Área de osso
APC	Alofocianina
AT	Àrea total
BMP 2/4	Proteínas morfogenéticas 2/4
C	Controle
CD	Conjunto de diferenciação
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CMN	Células mononucleares
CTH	Células tronco hematopoiéticas
CTM	Células tronco mesenquimais
DAB	3,3' tetracloridrato de diaminobenzidina
DTC	Defeito de tamanho crítico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EUA	Estados Unidos da América
FAPESP	Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo
FC	Fator de crescimento
Fig.	Figura
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
G	Força gravitacional
g	Gramas
H&E	Hematoxilina e Eosina
Kg	Kilograma
LMN	Linfomononuclear

μl	Microlitro
mm	Milímetro
μm	Micrômetro
OA	Ossó autógeno
°C	Grau Celsius
OCN	Osteocalcina
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PE	Ficoeritrina
PERCP	Proteína Clorofila Peridinina
PRP	Plasma rico em plaquetas
rpm	Rotações por minuto
TC	Tecido conjuntivo
TO	Tecido ósseo
VS	Vaso sanguíneo

Sumário

Manuscrito para publicação	25
Página de título	26
Resumo	27
Introdução	28
Materiais e Métodos	29
Resultados	35
Discussão	38
Agradecimentos	44
Referências	45
Anexos	64

Manuscrito para publicação^{*}

Aspirado de medula óssea e plasma rico em plaquetas no reparo de enxerto de osso autógeno

Eliana Aparecida Caliente, DDS* ; Maria J. H. Nagata, DDS, PhD^{*,1}

*Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP – Univ. Estadual Paulista, Araçatuba, São Paulo, Brasil.

¹Autora responsável pela correspondência:

Maria José Hitomi 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

Running title: Terapias otimizadoras do reparo ósseo

Resumo

Este estudo avaliou a influência do aspirado de medula óssea (AMO) e do plasma rico em plaquetas (PRP) associados ou não ao enxerto ósseo autógeno (OA) no reparo ósseo de defeitos em calvárias de ratos, divididos em 6 grupos segundo os tratamentos: C (controle), PRP, AMO, OA, PRP/OA e AMO/OA. Eutanásia realizada aos 10 ou 30 dias pós-operatórios. A área de osso (AO) foi calculada como porcentagem da área total do defeito original. Foram realizadas reações imunohistoquímicas para detecção do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), proteínas morfogenéticas ósseas 2/4 (BMP-2/4) e osteocalcina (OCN). Células imunopositivas foram quantificadas. Aos 10 dias, os grupos OA, PRP/OA e AMO/OA apresentaram maior AO que o controle; e o grupo PRP/OA apresentou maiores AO e números de células PCNA-positivas e BMP-2/4-positivas que o grupo OA. Aos 30 dias, os resultados favoráveis dos grupos OA, PRP/OA e AMO/OA foram mantidos, e o grupo AMO/OA apresentou maiores AO e número de células OCN-positivas que o grupo OA. O grupo AMO apresentou AO similar a dos grupos OA e PRP/OA, mas menor que do grupo AMO/OA. Conclui-se que, aos 10 dias, a associação PRP/OA proporcionou maior AO que o controle ou cada terapia única; aos 30 dias, a associação AMO/OA foi a que promoveu maior AO. A terapia com AMO promoveu AO semelhante àquela obtida com OA. Diferenças significativas na AO não foram observadas entre os grupos PRP/OA ou AMO/OA em ambos os períodos; contudo, reparo ósseo mais avançado foi observado no grupo AMO/OA aos 30 dias.

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

1 INTRODUÇÃO

2 Há interesse crescente no potencial terapêutico de células derivadas da medula óssea para
3 aplicações da engenharia tecidual. O cultivo de células tronco mesenquimais (CTM) com o
4 objetivo de promover o reparo ósseo é uma abordagem promissora,¹ porém requer instalações
5 especiais, consome tempo e é oneroso. Com o objetivo de simplificar o uso dessas células, o
6 aspirado de medula óssea (AMO) foi proposto como uma fonte viável de CTM.²⁻⁴ Somente
7 poucos estudos *in vivo* avaliaram o uso do AMO no reparo ósseo, sozinho⁴⁻⁶ ou combinado
8 com enxertos ósseos ou biomateriais,^{2-4, 7,8} demonstrando resultados promissores.

9 O AMO tem sido utilizado combinado a enxertos ósseos alógenos e xenógenos ou
10 biomateriais para promoção do reparo ósseo.^{3,4,8,9} Segundo o nosso conhecimento, a
11 associação do AMO a enxertos de osso autógeno (OA), considerado o “padrão-ouro” na
12 reconstrução óssea, ainda não foi avaliada. Esta associação terapêutica teria o potencial de
13 apresentar resultados sinérgicos muito vantajosos no reparo ósseo, principalmente nos casos
14 em que são utilizados enxertos de OA cortical que apresentam número de células muito
15 menor e revascularização, reabsorção e remodelação mais lentas que os enxertos de osso
16 medular de crista ilíaca.¹⁰

17 A regeneração óssea é um processo complexo, que *in vivo*, requer a apresentação altamente
18 coordenada de estímulos bioquímicos para promover os vários estágios da angiogênese e
19 osteogênese.¹¹ As plaquetas contêm diversos fatores de crescimento (FC) e citocinas que
20 desempenham papel fundamental na inflamação e reparo ósseo.^{12,13} Em 1998, Marx et al.¹⁴
21 propuseram o uso do plasma rico em plaquetas (PRP) autólogo como técnica economicamente
22 viável para obter-se alta concentrações de FC, no intuito de otimizar o processo de reparo de
23 enxertos ósseos. Outros estudos avaliaram os efeitos do PRP associado a enxertos de OA,
24 demonstrando resultados positivos muito promissores em relação à formação e maturação
25 ósseas.¹⁵⁻¹⁹ Contudo, em alguns outros estudos, a adição de PRP não resultou em benefícios

26 adicionais no reparo de enxertos de AO.²⁰⁻²² Assim, estudos adicionais ainda são necessários
27 para melhor compreensão dos mecanismos biológicos envolvidos no reparo de enxertos de
28 OA associados ao PRP.

29 Tanto a utilização do AMO como a do PRP, associados a enxertos ósseos e biomateriais,
30 apresentam vantagens e desvantagens na prática clínica. Até o presente, somente informações
31 fracionadas estão disponíveis na literatura científica sobre o AMO, o PRP e suas associações
32 com enxertos ósseos. Portanto, o propósito deste estudo foi avaliar a influência do AMO e do
33 PRP, associados ou não ao enxerto de OA, no reparo ósseo de defeitos de tamanho crítico
34 (DTC), criados cirurgicamente em calvárias de ratos.

35

36 **MÉTODOS**

37

38 *Modelo Experimental*

39 O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)
40 da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA), Universidade Estadual Paulista – UNESP
41 (2014-00546). 96 ratos machos (*Rattus norvegicus, albinus, Wistar*), com idade entre 5 a 6
42 meses, pesando 450 a 500 g (Biotério da FOA-UNESP), foram aleatoriamente divididos em 6
43 grupos: C, PRP, AMO, OA, PRP/OA e AMO/OA. Cada grupo foi subdividido para eutanásia
44 aos 10 ou 30 dias pós-operatórios.

45 Para todos os procedimentos experimentais, os animais foram anestesiados por injeção
46 intramuscular de xilazina (6 mg/kg de peso corporal) e quetamina (70 mg/kg de peso
47 corporal).

48

49 *Protocolo de preparo do PRP*

50 Imediatamente antes dos procedimentos cirúrgicos, 3,15 ml de sangue foi coletado de cada
51 animal dos grupos PRP e PRP/OA, via punção cardíaca, em seringa contendo 0,35 ml de 3,2
52 % de citrato de sódio. O PRP autólogo foi preparado seguindo protocolo descrito por Messori
53 et al.²³

54

55 ***Protocolo de coleta da medula óssea***

56 1 mL de medula óssea foi coletada das cristas ilíacas direita e esquerda (0,5 mL de cada
57 crista) de cada animal dos grupos AMO e AMO/OA, em seringa contendo 0,1 mL de citrato
58 de sódio a 3,2%. Uma alíquota do AMO foi transferida para um microtubo estéril e
59 armazenada até o momento da aplicação clínica. O restante da amostra foi preparada para a
60 citometria de fluxo e os testes de caracterização das CTM.

61

62 ***Preparo da amostra do AMO para a citometria de fluxo***

63 Amostras de AMO foram colocadas em tubo Falcon (15 mL) com 14 mL de Tampão de Lise
64 e centrifugadas a 1.200 rpm, durante dez minutos. Desprezou-se o sobrenadante e as amostras
65 foram transferidas para microtubos contendo 1 mL de Soro Fetal (SF) com Dimetil Sulfoxido
66 e imediatamente congeladas em freezer - 80 °C até o momento das análises.

67

68 ***Procedimento cirúrgico***

69 Após preparação anti-séptica, um DTC de 5 mm de diâmetro foi cirurgicamente criado na
70 calvária de cada animal, como descrito por Messori et al.²³ No Grupo C, o defeito foi
71 preenchido com coágulo sanguíneo. Nos grupos PRP e AMO, o defeito foi preenchido com
72 PRP e com AMO, respectivamente. No Grupo OA, o defeito foi preenchido com enxerto de
73 OA. Nos grupos PRP/OA e AMO/OA, o defeito foi preenchido com enxerto de OA
74 combinado com PRP ou AMO, respectivamente. Os tecidos moles foram reposicionados e

75 suturados. Cada animal recebeu injeção intra-muscular de morfina (1 mg/kg de peso corporal
76 - Dimorf[®], Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, São Paulo, Brasil) e 24.000 UI
77 de Penicilina G-benzatina (Pentabiótico* Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge[®] Saúde
78 Animal Ltda., Campinas, Brasil) após a cirurgia.

79

80 ***Protocolo de obtenção do enxerto de OA***

81 O OA obtido da calvária durante a criação do DTC foi preparado em um triturador de osso
82 tipo pilão.

83

84 ***Protocolo de aplicação do PRP e AMO***

85 No momento da aplicação clínica, os animais dos grupos PRP e PRP/OA receberam 50 µl de
86 PRP associado ou não a 0,1 ml de enxerto de OA, enquanto os animais dos grupos AMO e
87 AMO/OA receberam 50 µl de AMO associado ou não a 0,1 ml de enxerto de OA. O PRP e o
88 AMO foram ativados com solução de cloreto de cálcio a 10% (Calcium Chloride 10%
89 Solution, ScienceLab.com Inc., Houston, TX), na proporção de 0,05 ml de cloreto de cálcio
90 para cada 1 ml de PRP ou AMO, para promover sua coagulação.

91

92 ***Análises qualitativa e quantitativa de plaquetas***

93 Líquido de Brecher foi usado para lisar eritrócitos e diluir as amostras de sangue periférico e
94 PRP. Plaquetas das amostras de sangue periférico e PRP foram contadas manualmente em
95 câmara de Neubauer. Amostras de sangue periférico e de PRP foram coradas com “Panótico
96 Rápido LB” (LaborClin, Pinhais, Brasil) para avaliar a morfologia das plaquetas.

97

98 **Quantificação e caracterização das CTM**

99

100 ***Contagem celular***

101 Foi procedida a contagem celular automatizada das amostras obtidas no equipamento
102 HORIBA ABX Pentra 60[®] para calcular a quantidade de células necessárias para os
103 procedimentos de adesão celular ao plástico, citometria de fluxo e diferenciação em tri-
104 linhagem.

105

106 ***Viabilidade celular***

107 Para assegurar o índice de viabilidade das células linfomononucleares (LMN) obtidas,
108 procedeu-se à determinação da viabilidade celular pela coloração do azul de tripano a 0,4%
109 (*Tripan Blue Thermo Fisher Scientific*[®]). Considerou-se apenas as células viáveis.

110

111 ***Capacidade de adesão ao plástico e caracterização por diferenciação em meios indutores –*** 112 ***tri-linhagem***

113 Uma alíquota de células LMN foi reservada para a comprovação de outros parâmetros
114 característicos das CTM: adesão ao plástico quando cultivadas *in vitro* e potencial de
115 diferenciação em tri-linhagem.

116 Para o teste de capacidade de adesão ao plástico, foram plaqueadas 10⁵ células em placas de
117 24 poços, *Tissue-Treated Corning*[®], mantidos na presença de meio de cultura DMEM-F12
118 (*Dulbecco's Modified Minimal Essential Medium - Invitrogen*[®]) acrescido de 10% de SF
119 Bovino (*Invitrogen*[®]) aditivado com antibióticos-antimicótico. O conjunto foi colocado em
120 estufa com 5% de CO₂, a 37° C. Foram realizados o acompanhamento por visualização
121 microscópica e as fotomicrografia da cultura.

122 As CTM obtidas foram destinadas ao teste de comprovação do potencial de diferenciação em
123 adipócitos, condrócitos e osteócitos. Para tanto, foram submetidas a meios indutores
124 específicos para cada diferenciação, sendo eles: *Stempro*[®] *adipogen.*, *Stempro*[®] *chondro.* e

125 *Stempro*[®] *osteogen*. (Life technologies[™]). Para a diferenciação condrogênica, após 21 dias de
126 indução, as células foram coradas com Azul de Toluidina; para a diferenciação adipogênica,
127 após 14 dias de indução, foi procedida a coloração citoquímica *Oil red O*[®]; para a
128 diferenciação osteogênica, após 14 dias de indução, utilizou-se o corante *Alizarin red*[®]. As
129 trocas dos meios indutores de cada placa de 24 poços foi realizada 2 vezes na semana e
130 registros fotográficos foram realizados durante a evolução da diferenciação.

131

132 ***Citometria de Fluxo***

133 Amostras de AMO (grupos AMO e AMO/OA) foram submetidas à determinação fenotípica
134 (células LMN) pelo método de citometria de fluxo, utilizando equipamento FACSCalibur
135 BD[™], com leitura realizada pelo *software* Cell Quest Pro[™], do Hemocentro da Faculdade de
136 Medicina de Botucatu – UNESP. As células foram colocadas em suspensão em tampão
137 próprio Isoton II BD[™] e incubadas com painel de anticorpos monoclonais (anti-CDs) para
138 identificação fenotípica. A avaliação foi realizada a partir de um painel imunofenotípico
139 multicolor composto pelos marcadores positivos CD90-PERCP, CD71-FITC, CD73-FITC,
140 CD105-PE e negativos CD11b-APC, CD31-PE, CD45-PE, CD44-FITC e CD34-FITC.
141 Foi estabelecido um padrão de leitura conforme o percentual da média de intensidade de
142 fluorescência do marcador, após eliminar o percentual de autofluorescência encontrado nas
143 células do controle (aquelas que não receberam anticorpos específicos), respeitando as
144 orientações da *International Clinical Cytometry Society*²⁴ e de Gratama et al.²⁵

145

146 ***Processamento tecidual***

147 Os animais foram submetidos à eutanásia aos 10 ou 30 dias pós-operatórios. A área do defeito
148 cirúrgico original e tecidos circunjacentes foram removidos em bloco. Após descalcificação
149 inicial em solução de Ácido Etilenodiaminotetracético (EDTA) 10%, os espécimes foram

150 reduzidos utilizando as marcações em L como referência.²³ Após descalcificação adicional, as
151 peças foram processadas e incluídas em parafina. Foram realizados cortes seriados
152 longitudinais (5 µm), corados com hematoxilina e eosina (H&E) para análise
153 histomorfométrica ou submetidos às reações imunoistoquímicas para detecção das proteínas
154 PCNA, BMP-2/4 e OCN.

155 Para as reações imunoistoquímicas, os cortes histológicos foram submetidos à técnica da
156 imunoperoxidase indireta empregando-se os seguintes anticorpos primários: anti-PCNA anti-
157 PCNA do rato gerado em camundongo (1:200, VP-P980, Vector Laboratories Inc.,
158 Burlingame, CA, EUA), anti-BMP 2/4 do rato gerado em coelho (1:100, SC-9003, Santa Cruz
159 Biotechnology, Santa Cruz, CA) e anti-OCN do rato gerado em cabra (1:100, SC-18319,
160 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). O processamento imunoistoquímico foi
161 realizado como por Nagata et al.⁵ Todas as amostras foram acompanhadas por um controle
162 negativo.

163

164 *Procedimentos de análise microscópica*

165 Foram selecionados cinco cortes histológicos de cada animal, representando o centro do
166 defeito cirúrgico original, para as análises histomorfométrica (2 cortes) e imunoistoquímica (3
167 cortes), realizadas por examinadores calibrados e que desconheciam o tratamento realizado
168 (Axiovision v.4.8.2, Carl Zeiss, Jena, Alemanha).

169 Critérios baseados no estudo de Messoria et al.²³ foram utilizados para padronizar a análise
170 histomorfométrica das imagens digitais. Resumidamente, a área total (AT) correspondeu à
171 área total do defeito cirúrgico original e a área de osso (AO) foi calculada como uma
172 porcentagem de AT. Critérios baseados no estudo de Nagata et al.¹⁹ foram utilizados para a
173 análise imunoistoquímica das imagens digitais. Células PCNA-positivas, BMP-2/4-positivas e
174 OCN-positivas foram quantificadas dentro dos limites de AT

175

176 *Análise estatística*

177 A normalidade e homocedasticidade dos dados foram verificadas. Cada parâmetro (AO,
178 número de células PCNA-positivas, número de células BMP 2/4-positivas, número de células
179 OCN-positivas) foi avaliado separadamente. A significância das diferenças entre os grupos foi
180 determinada por análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey *post hoc* quando
181 a ANOVA sugeriu diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). A análise intra-grupo foi
182 realizada usando o teste *t*.

183

184 **RESULTADOS**

185

186 *Análises qualitativa e quantitativa de plaquetas*

187 As plaquetas exibiram morfologia normal. A média da contagem de plaquetas nas amostras de
188 sangue periférico foi de $552,29 \pm 148,12 \times 10^3$ plaquetas/ μ l, enquanto que a média da
189 contagem de plaquetas nas amostras de PRP foi de $3.547,11 \pm 1.421,72 \times 10^3$ plaquetas/ μ l.

190

191 **Quantificação e caracterização das CTM**

192

193 *Capacidade de adesão ao plástico e caracterização por diferenciação em meios indutores –* 194 *tri-linhagem*

195

196 As amostras de AMO dos grupos AMO e AMO/OA de 10 e 30 dias apresentaram células que
197 aderiram ao plástico e formaram unidades fibroblastóides (Figs. 1A, 1B e 1C), bem como
198 diferenciaram-se nas linhagens adipogênica, condrogênica e osteogênica (Figs. 2B, 2C e 2D).
199 Todas as culturas foram acompanhadas por um controle negativo (Fig. 2A).

200

201 *Citometria de fluxo*

202 Os resultados da citometria de fluxo das amostras de AMO dos grupos AMO e AMO/OA
203 estão apresentados na Tabela 1.

204

205 *Análises histológica e histométrica*

206 Grupo C: aos 10 e 30 dias, os defeitos ósseos mostravam-se quase totalmente preenchidos por
207 tecido conjuntivo denso (Fig. 3A e Fig. 4A). Uma faixa muito estreita de tecido ósseo
208 neoformado estava confinada exclusivamente às bordas do defeito cirúrgico.

209 Grupos PRP e AMO: Aos 10 dias, o defeito apresentava-se em sua maior parte ocupado por
210 tecido conjuntivo denso, com grande quantidade de fibras colágenas e vasos sanguíneos, e
211 moderada quantidade de fibroblastos. O tecido ósseo neoformado estava confinado às bordas
212 do defeito ósseo (Fig. 3B e Fig. 3C). Estas vertentes ósseas eram compostas por uma rede
213 muito delicada de trabéculas de osso imaturo que circunscreviam amplos espaços medulares.

214 As superfícies dessas trabéculas estavam repletas de osteoblastos demonstrando
215 características morfológicas de intensa atividade. Aos 30 dias, o tecido conjuntivo que
216 ocupava o centro dos defeitos ósseos mostrou-se mais denso, com moderada quantidade de
217 fibroblastos e vasos sanguíneos. Observou-se maior neoformação óssea tanto em direção ao
218 centro do defeito ósseo, quanto promovendo o espessamento das trabéculas ósseas
219 preexistentes, resultando em redução dos espaços medulares. Tal neoformação tecidual foi
220 nitidamente mais pronunciada no Grupo AMO (Fig. 4B e Fig. 4C).

221 Grupo OA: Aos 10 e 30 dias, observou-se uma faixa muito estreita de tecido ósseo
222 neoformado nas bordas da ferida cirúrgica. O defeito ósseo estava totalmente ocupado por
223 tecido conjuntivo com grande quantidade de partículas remanescentes do enxerto ósseo (Fig.
224 3D e Fig. 4D). Na superfície da maioria das partículas, constatou-se aposição de fina camada

225 de tecido ósseo imaturo aos 30 dias (Fig. 5A), o que foi raramente observado aos 10 dias. Em
226 ambos períodos, nos remanescentes do enxerto ósseo que não exibiam aposição de tecido
227 ósseo na superfície, constatou-se com frequência a presença de lacunas de reabsorção
228 ocupadas por osteoclastos. O tecido conjuntivo situado nas superfícies do defeito ósseo e
229 adjacências das partículas ósseas era do tipo denso fibroso, composto por grande quantidade
230 de fibras colágenas e vasos sanguíneos, moderada quantidade de fibroblastos e raros focos
231 isolados de células inflamatórias, especialmente nos locais onde a reabsorção óssea das
232 partículas do enxerto ocorria ativamente.

233 Grupos PRP/OA e AMO/OA: Aos 10 dias, apresentavam características histológicas muito
234 semelhantes às do Grupo OA, todavia, a aposição de tecido ósseo sobre as partículas
235 remanescentes do enxerto ósseo foi bem mais frequente (Fig. 3E e Fig. 3F). O tecido ósseo
236 formado na superfície das partículas apresentou fina espessura. Aos 30 dias, a espessura do
237 tecido ósseo depositado sobre as partículas aumentou pronunciadamente em ambos os grupos
238 (Fig. 4E e Fig. 4F), especialmente no Grupo AMO/OA, onde se constatava com frequência a
239 confluência das trabéculas ósseas depositadas sobre uma partícula com trabéculas ósseas
240 depositadas sobre partículas adjacentes (Fig. 5B). Neste período, no Grupo PRP/OA e,
241 especialmente no Grupo AMO/OA, à medida que a espessura do tecido ósseo neoformado
242 aumentava sobre as partículas, o tecido conjuntivo denso ficava confinado aos espaços
243 existentes entre tais trabéculas e a superfície do defeito, restabelecendo a estrutura do
244 perióstio.

245 Médias e desvios-padrão de AO para todos os grupos, bem como as comparações inter-
246 grupos, aos 10 dias e 30 dias, estão apresentadas nas figuras 6 e 7, respectivamente. A AO,
247 aos 30 dias, foi significativamente maior quando comparada com seu valor aos 10 dias, nos
248 grupos C, PRP, AMO e AMO/OA.

249

250 *Análise imunoistoquímica*

251 A técnica imunoistoquímica empregada mostrou alta especificidade na detecção das proteínas
252 analisadas. As células imunorreativas apresentaram uma coloração marrom escuro confinada
253 ao núcleo, no caso de PCNA, e ao citoplasma e à matriz extracelular, no caso de BMP 2/4 e
254 OCN.

255 Todos os grupos apresentaram imunomarcações para PCNA, BMP 2/4 e OCN aos 10 e 30
256 dias. Imunomarcações positivas para essas proteínas nos grupos C e AMO/OA, aos 30 dias,
257 estão apresentadas na figura 8. Imunomarcação para PCNA estava presente em células
258 situadas nas adjacências do tecido ósseo neoformado (bordas do defeito e superfície das
259 partículas remanescentes do enxerto ósseo). Células PCNA-positivas também estavam
260 difusamente distribuídas no tecido conjuntivo que preenchia o centro dos defeitos e que
261 circunscrevia as partículas do enxerto. As imunomarcações de BMP-2/4 e OCN foram
262 expressas predominantemente em osteoblastos e na matriz extracelular imediatamente
263 adjacente ao tecido ósseo neoformado.

264 Médias e desvios-padrão de células PCNA-positivas, BMP-2/4-positivas e OCN-positivas
265 para todos os grupos, bem como as comparações inter-grupos, aos 10 dias e 30 dias, estão
266 apresentadas nas Tabelas 2 e 3, respectivamente.

267 Os números de células PCNA-positivas e BMP-2/4-positivas, aos 10 dias, foram
268 significativamente maiores quando comparadas com seus valores aos 30 dias. O número de
269 células OCN-positivas, aos 10 dias, foi significativamente maior quando comparado com seu
270 valor aos 30 dias, nos grupos C, PRP e PRP/OA. Já no Grupo AMO, o número de células
271 OCN-positivas, aos 10 dias, foi significativamente menor quando comparado com seu valor
272 aos 30 dias.

273

274 **DISCUSSÃO**

275 Aos 10 dias pós-operatórios, todos os grupos tratados com enxerto de OA (grupos OA,
276 PRP/OA e AMO/OA) apresentaram área de osso (AO) significativamente maior que o
277 controle. Os grupos PRP/OA e AMO/OA apresentaram AO similares, mas somente o grupo
278 PRP/OA foi significativamente maior que o grupo OA. Os resultados favoráveis dos grupos
279 OA, PRP/OA e AMO/OA no reparo ósseo foram também observados aos 30 dias pós-
280 operatórios. Contudo, uma inversão de resultados entre os grupos PRP/OA e AMO/OA
281 ocorreu neste período, pois apesar desses grupos terem apresentado AO similares, somente o
282 grupo AMO/OA foi significativamente maior que o grupo OA. Essa superioridade do grupo
283 AMO/OA, aos 30 dias, foi confirmada pela análise histológica, que mostrou que a espessura
284 do tecido ósseo sobre as partículas do enxerto de OA aumentou de forma mais pronunciada
285 neste grupo quando comparada ao grupo PRP/OA. Um achado interessante foi o grupo AMO
286 ter apresentado, aos 30 dias, AO significativamente maior que o grupo controle e similar a dos
287 grupos OA e PRP/OA, sendo, no entanto, menor que o grupo AMO/OA.

288 Os melhores resultados observados pelo grupo PRP/OA quando comparados ao grupo OA,
289 aos 10 dias, são corroborados por vários estudos que demonstraram que o PRP melhora o
290 reparo de enxertos de OA em diferentes modelos experimentais.^{15,26,27} Contudo, aos 30 dias, o
291 PRP não adicionou nenhum efeito benéfico sobre o reparo do enxerto de OA, pois a AO dos
292 grupos PRP/OA e OA foram similares. Embora utilizando diferente modelo animal e
293 metodologia, os resultados do presente estudo são corroborados pelos estudos de Schlegel et
294 al.²⁸ e Wilfang et al.,²⁹ que também observaram efeito benéfico do PRP no reparo de enxertos
295 de OA somente nos períodos iniciais. A concentração aumentada de plaquetas no PRP provê
296 um veículo para levar concentrações supra-fisiológicas de FC em um sítio de injúria, que
297 estimulam a proliferação celular de várias células, especialmente a proliferação, diferenciação
298 e função de osteoblastos.³⁰⁻³² Apesar de vários autores terem afirmado que o PRP aumentou o
299 índice de formação óssea,^{14,22,33} nenhum deles realmente mediu este índice. Segundo Gerard

300 et al.,²⁷ o índice de aposição, ou seja, o índice no qual o novo osso se forma, somente pode ser
301 determinado histologicamente pela medição da distância entre as marcações de fluorocromo
302 existentes em intervalos específicos. Este índice foi efetivamente mensurado no estudo
303 realizado por Gerard et al.,²⁷ que avaliaram o efeito do PRP nos enxertos de OA em cães, e
304 constataram que este índice não foi afetado pela adição de PRP aos enxertos. Concluíram que
305 a nova formação óssea ocorre em período mais precoce com a adição de PRP, mas não de
306 forma mais rápida, e o produto final não é diferente do ponto de vista de volume ósseo e
307 densidade mineral entre os enxertos suplementados com PRP versus aqueles não
308 suplementados com PRP. Este raciocínio de Gerard et al.²⁷ poderia ser usado para explicar os
309 resultados do presente estudo, onde se observou que o grupo PRP/OA apresentou AO
310 significativamente maior que o grupo OA somente aos 10 dias, mas não aos 30 dias. Ou seja,
311 é provável que, aos 10 dias, tenha ocorrido aumento na AO no grupo PRP/OA devido à
312 existência de maior número de osteoblastos trabalhando no sítio enxertado como
313 consequência da liberação dos FC pelas plaquetas do PRP, resultando em aumento da
314 proliferação, diferenciação e função de osteoblastos.³⁰⁻³² Contudo, esses efeitos são
315 temporários e, com o passar do tempo, o grupo OA também vai apresentar aumento na
316 proliferação e diferenciação de osteoblastos, pois os enxertos de OA têm propriedades de
317 osteogênese e osteoindução, o que acaba por levar a resultados semelhantes em termos de AO
318 entre os grupos OA e PRP/OA em um período de tempo maior. Esta hipótese é corroborada
319 pelos achados imunoistoquímicos, pois, aos 10 dias, o grupo PRP/OA apresentou números
320 significativamente maiores de células PCNA-positivas e BMP-2/4-positivas que o grupo OA,
321 demonstrando proliferação celular e diferenciação de osteoblastos aumentadas no grupo com
322 adição de PRP. Já, aos 30 dias, esses grupos apresentaram números similares de células
323 PCNA-positivas, enquanto que, inversamente ao observado aos 10 dias, o grupo PRP/OA
324 apresentou número significativamente menor de células BMP-2/4-positivas que o grupo OA,

325 indicando haver ainda um estímulo aumentado na diferenciação de osteoblastos no grupo OA.
326 Além disso, o número de células OCN-positivas, que se apresentou significativamente maior
327 no grupo PRP/OA que no grupo OA aos 10 dias, passou a ser similar nesses dois grupos aos
328 30 dias, confirmando que o processo de síntese da matriz óssea e sua mineralização³⁴ ocorria
329 de forma semelhante nesses dois grupos no período mais tardio.

330 Em estudo anterior do nosso grupo, utilizando exatamente a mesma metodologia do presente
331 estudo, AO significativamente maior foi observada no grupo OA/ PRP que no grupo OA, aos
332 30 dias.¹⁸ Pode-se constatar, portanto, que realmente existe variabilidade na resposta biológica
333 ao PRP no reparo ósseo, corroborando as revisões de literatura que têm indicado resultados
334 inconsistentes do PRP neste tipo de reparo.^{16,35-37}

335 O grupo AMO/OA apresentou AO similar aos grupos OA e PRP/OA aos 10 dias. Contudo,
336 aos 30 dias, o grupo AMO/OA apresentou os melhores resultados, pois apresentou AO
337 significativamente maior que o grupo OA, e características histológicas de reparo ósseo mais
338 avançado que o grupo PRP/OA. Muito interessante foi o resultado apresentado pelo grupo
339 tratado somente com AMO, que apresentou AO significativamente maior que o controle e
340 similar àquela do grupo OA, aos 30 dias. É provável que esses resultados favoráveis na
341 neoformação óssea ou na reparo do enxerto de OA observadas nos grupos AMO e AMO/OA
342 foram devidos às propriedades biológicas inerentes do AMO.

343 Sabe-se que o AMO contém eritrócitos, plasma, lipídeos e uma fração de células
344 mononucleares (CMN), que são compostas por células-T, células-B, monócitos, células-
345 tronco hematopoiéticas (CTH), células progenitoras endoteliais e CTM. Smiler et al.³⁸
346 demonstraram que o AMO contém porcentagem significativamente maior de CTM, CTH e
347 células endoteliais que o sangue periférico. Tem sido demonstrado que as CTM apresentam
348 alta capacidade de diferenciação osteogênica,³⁹⁻⁴¹ principalmente as derivadas da medula
349 óssea.^{42,43} Na medula óssea, as CTM ocupam distintas localizações anatômicas e dividem seus

350 nichos com muitos outros tipos celulares, incluindo osteoblastos e CTH. Esses três tipos
351 celulares demonstram cross-talk e parecem regular, reciprocamente, o comportamento celular
352 e o compromisso com a linhagem.⁴⁴ Tem sido demonstrado que as CTH são capazes de
353 induzir a diferenciação osteogênica de CTM.⁴⁵ Assim, pode-se inferir que os resultados
354 positivos na regeneração óssea observados nos grupos AMO e AMO/OA do presente estudo
355 sejam devidos, principalmente, ao aumento significativo de CTM, CTH e células endoteliais
356 no sítio da ferida cirúrgica. Essa hipótese é corroborada pelos resultados da análise da
357 citometria de fluxo, onde se constatou que as amostras de AMO continham células que
358 expressaram marcadores de superfície utilizados para identificação de CTM, CTH, células
359 hematopoiéticas e células endoteliais, como observado em outros estudos.^{38,46,47} Além disso,
360 os testes *in vitro* comprovaram não somente a presença das CTM nas amostras de AMO, mas
361 também suas potencialidades de diferenciação em tri-linhagem.²⁴

362 É importante considerar que os defeitos cirúrgicos dos grupos AMO e AMO/OA receberam
363 células frescamente obtidas da medula óssea. Em uma revisão de literatura sobre CTM
364 derivadas da medula óssea, Bara et al.⁴⁴ constataram que a maioria das abordagens
365 terapêuticas com essas células conta com a fase de expansão celular *in vitro* para produzir
366 grande quantidade dessas células antes da implantação, e que a literatura mostra claramente
367 que a fase de expansão *in vitro* causa alterações dramáticas no fenótipo das CTM que podem
368 ter implicações muito significativas para o desenvolvimento de terapias efetivas. Essas
369 alterações fenotípicas pronunciadas associadas com as CTM expandidas *in vitro* tem
370 direcionado a atenção para o uso de medula óssea não processada ou de CMN frescamente
371 isoladas. Em um nível celular, estas abordagens terapêuticas podem preservar a
372 multipotencialidade das CTM e sua capacidade de auto-renovação. Isto pode não somente
373 fortalecer o potencial terapêutico das mesmas, mas evitar atrasos no tratamento e altos custos
374 financeiros associados com a fase de expansão *in vitro*.⁴⁴ Portanto, pode-se inferir que a

375 utilização do AMO frescamente obtido no presente estudo, proporcionou CTM em estado
376 mais primitivo no sítio cirúrgico, com características semelhantes às encontradas em seu
377 meio nativo na medula óssea, e com possibilidade de continuar a exibir interações com as
378 demais células da medula óssea que também constituem o AMO. As CTM podem ter efeito
379 reparativo através da sinalização parácrina pela liberação de moléculas biologicamente ativas
380 que afetam a migração e proliferação celular e sobrevivência das células circunjacentes.⁴⁸
381 Assim, pode-se hipotetizar que, no grupo AMO/OA, além da alta capacidade de diferenciação
382 osteogênica, as CTM tenham contribuído, também, para a maior sobrevivência das células do
383 enxerto de OA, auxiliando, assim, na incorporação mais rápida das partículas deste enxerto.
384 Deve-se considerar, também, a influência inversa, ou seja, que o enxerto de OA teve sobre as
385 CTM, pois sabe-se que a composição do arcabouço e propriedades de superfície podem ter
386 um papel principal na proliferação e diferenciação de CTM.⁴⁹ Essas hipóteses são
387 corroboradas pelos resultados da análise imunohistoquímica do presente estudo que mostraram,
388 aos 10 dias, números significativamente maiores de células PCNA-positivas e BMP-2/4-
389 positivas no grupo AMO/OA que no grupo OA. Já, aos 30 dias, o grupo AMO/OA apresentou
390 número significativamente maior de células OCN-positivas que o grupo OA, confirmando o
391 grau mais adiantado de reparo ósseo no grupo da terapia combinada. Finalmente, é
392 importante ressaltar que um componente significativo do mecanismo de ação das CTM é que
393 elas diretamente atenuam a resposta inflamatória.⁴⁸ Portanto, a ação anti-inflamatória das
394 CTM também pode ter contribuído para os resultados positivos obtidos nos grupos que
395 continham AMO no presente estudo.
396 Esse grande potencial biológico do AMO na regeneração óssea pôde ser confirmado no grupo
397 tratado somente com AMO, tanto pelos resultados da análise histométrica, como
398 anteriormente mencionado, como da análise imunohistoquímica, que apresentou proliferação

399 celular, diferenciação osteoblástica e maturação óssea mais pronunciadas no grupo AMO que
400 nos grupos OA e PRP/OA aos 30 dias.

401 Dentre dos limites deste estudo, pode-se concluir que, aos 10 dias, a associação PRP/OA
402 proporcionou maior AO em DTC em calvárias de ratos quando comparada ao controle ou a
403 cada terapia única (PRP, AMO e OA); enquanto que, aos 30 dias, a associação AMO/OA foi a
404 que promoveu maior AO que o controle ou cada terapia única. A terapia única com AMO
405 promoveu AO semelhante àquela obtida com a terapia única com enxerto de OA aos 30 dias.
406 Diferenças significativas na AO não foram observadas entre os grupos tratados com PRP/OA
407 e com AMO/OA em ambos os períodos de análise; contudo, uma reparo óssea mais avançada
408 foi observada no grupo tratado com AMO/OA aos 30 dias.

409

410 **AGRADECIMENTOS**

411 Os autores agradecem à “Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo –
412 FAPESP” (FAPESP - São Paulo, SP, Brasil), pela concessão de Bolsa de Mestrado (Processo
413 2014/01823-4) à Eliana Aparecida Caliente. Os autores agradecem, também, à professora
414 Suely Regina Mogami Bomfim, da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba –
415 UNESP, pela assistência nos procedimentos experimentais; à professora Elenice Deffune, da
416 Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, pela colaboração com as análises *in vitro* e por
417 citometria de fluxo; e ao professor Edilson Ervolino, da Faculdade de Odontologia de
418 Araçatuba – UNESP, pela assessoria prestada nas análises histomorfométrica e
419 imunoistoquímica deste estudo.

420

421 **CONFLITO DE INTERESSE**

422 Os autores declaram que não possuem nenhum conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

1. Hoch AI, Mittal V, Mitra D et al. 2015. Cell-secreted matrices perpetuate the bone-forming phenotype of differentiated mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 74:178-87.
2. Bansal S, Chauhan V, Sharma S et al. 2009. Evaluation of hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate mixed with bone marrow aspirate as a bone graft substitute for posterolateral spinal fusion. *Indian J Orthop* 43:234-9.
3. Soltan M, Smiler D, Prasad HS, Rohrer MD. 2007. Bone block allograft impregnated with bone marrow aspirate. *Implant Dent* 16:329-39.
4. Krzymanski G, Kalczak M, Wiktor-Jedrzejczak W. 1997. The use of bone-marrow-derived fibroblastoid cells and fresh bone marrow in the treatment of bone defects: an experimental study. *Int J Oral Maxillofac Surg* 26:55-60.
5. Nagata MJ, Santinoni CS, Pola NM et al. 2013. Bone marrow aspirate combined with low-level laser therapy: a new therapeutic approach to enhance bone healing. *J Photochem Photobiol B* 121:6-14.
6. Shirasu N, Ueno T, Hirata Y et al. 2010. Bone formation in a rat calvarial defect model after transplanting autogenous bone marrow with beta-tricalcium phosphate. *Acta Histochem* 112:270-7.
7. McDaniel JS, Pilia M, Raut V et al. 2016. Alternatives to autograft evaluated in a rabbit segmental bone defect. *Int Orthop* 40:197-203.
8. Odri GA, Revert R, Deschamps C et al. 2013. Effect of adding bone marrow to ceramic graft materials with different interconnectivities in lumbar arthrodesis: quantification of bone formation. *J Orthop Sci* 18:321-30.

9. Manrique E, Chaparro D, Cebrián JL, López-Durán L. 2014. In vivo tricalcium phosphate, bone morphogenetic protein and autologous bone marrow biomechanical enhancement in vertebral fractures in a porcine model. *Int Orthop* 38:1993-9.
10. Khan SN, Cammisa FP Jr, Sandhu HS et al. 2005. The biology of bone grafting. *J Am Acad Orthop Surg* 13:77-86.
11. Bayer EA, Gottardi R, Fedorchak MV, Little SR. 2015. The scope and sequence of growth factor delivery for vascularized bone tissue regeneration. *J Control Release* 219:129-40.
12. Malhotra A, Pelletier MH, Yu Y, Walsh WR. 2013. Can platelet-rich plasma (PRP) improve bone healing? A comparison between the theory and experimental outcomes. *Arch Orthop Trauma Surg* 133:153-65.
13. Nurden AT. 2011. Platelets, inflammation and tissue regeneration. *Thromb Haemost* 105: S13-33.
14. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM et al. 1998. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 85:638-46.
15. Kumar KA, Rao JB, Pavan Kumar B et al. 2013. A prospective study involving the use of platelet rich plasma in enhancing the uptake of bone grafts in the oral and maxillofacial region. *J Maxillofac Oral Surg* 12:387-94.
16. Magesh DP, Kumaravelu C, Maheshwari GU. 2013. Efficacy of PRP in the Reconstruction of Mandibular Segmental Defects Using Iliac Bone Grafts. *J Maxillofac Oral Surg* 12:160-7.
17. Inchingolo F, Tatullo M, Marrelli M. 2012. Regenerative surgery performed with platelet-rich plasma used in sinus lift elevation before dental implant surgery: an

- useful aid in healing and regeneration of bone tissue. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 16:1222-6.
18. Nagata M, Messori M, Okamoto R et al. 2009. Influence of the proportion of particulate autogenous bone graft/platelet-rich plasma on bone healing in critical-size defects: an immunohistochemical analysis in rat calvaria. *Bone* 45:339-45.
19. Raghoobar GM, Schortinghuis J, Liem RS et al. 2005. Does platelet-rich plasma promote remodeling of autologous bone grafts used for augmentation of the maxillary sinus floor? *Clin Oral Implants Res* 16:349-56.
20. Choi BH, Im CJ, Huh JY et al. 2004. Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in autogenous bone graft. *Int J Oral Maxillofac Surg* 33:56-9.
21. Aghaloo TL, Moy PK, Freymiller EG. 2002. Investigation of platelet-rich plasma in rabbit cranial defects: A pilot study. *J Oral Maxillofac Surg* 60:1176-81.
22. Nagata MJ, Messori M, Pola N et al. 2010. Influence of the ratio of particulate autogenous bone graft/platelet-rich plasma on bone healing in critical-size defects: a histologic and histometric study in rat calvaria. *J Orthop Res* 28:468-73.
23. Messori MR, Nagata MJ, Mariano RC et al. 2008. Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma: a histologic and histometric study in rat calvaria. *J Periodontol* 79:217-23.
24. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I et al. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8:315-7.
25. Gratama JW, D'hautcourt JL, Mandy F et al. 1998. Flow cytometric quantitation of immunofluorescence intensity: problems and perspectives. European Working Group on Clinical Cell Analysis. *Cytometry* 33:166-78.

26. Malhotra A, Pelletier M, Oliver R et al. 2014. Platelet-rich plasma and bone defect healing. *Tissue Eng Part A* 20:2614-33.
27. Gerard D, Carlson ER, Gotcher JE, Jacobs M. 2006. Effects of platelet-rich plasma on the healing of autologous bone grafted mandibular defects in dogs. *J Oral Maxillofac Surg* 64:443-51.
28. Schlegel KA, Donath K, Rupprecht S et al. 2004. De novo bone formation using bovine collagen and platelet-rich plasma. *Biomaterials* 25:5387-93.
29. Wiltfang J, Schlegel KA, Schultze-Mosgau S et al. 2003. Sinus floor augmentation with beta-tricalciumphosphate (beta-TCP): does platelet-rich plasma promote its osseous integration and degradation? *Clin Oral Implants Res* 14:213-8.
30. Chen W, Baylink DJ, Brier-Jones J et al. 2015. PDGFB-based stem cell gene therapy increases bone strength in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:E3893-900.
31. Zhao L, Jiang S, Hantash BM. 2010. Transforming growth factor beta1 induces osteogenic differentiation of murine bone marrow stromal cells. *Tissue Eng Part A* 16:725-33.
32. Ng F, Boucher S, Koh S et al. 2008. PDGF, TGF-beta, and FGF signaling is important for differentiation and growth of mesenchymal stem cells (MSCs): transcriptional profiling can identify markers and signaling pathways important in differentiation of MSCs into adipogenic, chondrogenic, and osteogenic lineages. *Blood* 112:295-307.
33. MARX RE. 2004. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg* 62:489-496.
34. Thorwarth M, Rupprecht S, Falk S, Felszeghy E. 2005. Expression of bone matrix proteins during de novo bone formation using a bovine collagen and platelet-rich plasma (prp)--an immunohistochemical analysis. *Biomaterials* 26:2575-84.

35. Plachokova AS, Nikolidakis D, Mulder J. 2008. Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in dentistry: a systematic review. *Clin Oral Implants Res* 19:539-45.
36. Pocaterra A, Caruso S, Bernardi S et al. 2016. Effectiveness of platelet-rich plasma as an adjunctive material to bone graft: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled clinical trials. *Int J Oral Maxillofac Surg* 45:1027-34.
37. Lemos CA, Mello CC, dos Santos DM et al. 2016. Effects of platelet-rich plasma in association with bone grafts in maxillary sinus augmentation: a systematic review and meta-analysis. *Int J Oral Maxillofac Surg* 45:517-25.
38. Smiler D, Soltan M, Albitar M. 2008. Toward the identification of mesenchymal stem cells in bone marrow and peripheral blood for bone regeneration. *Implant Dent* 17:236-47.
39. Panepucci RA, Siufi JL, Silva WA Jr et al. 2004. Comparison of gene expression of umbilical cord vein and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 22:1263-78.
40. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL et al. 2007. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418:41-9.
41. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC et al. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143-7.
42. Hutton DL, Grayson WL. 2014. Stem cell-based approaches to engineering vascularized bone. *Curr Opin Chem Eng* 3:75-82.
43. Schneider RK, Puellen A, Kramann R et al. 2010. The osteogenic differentiation of adult bone marrow and perinatal umbilical mesenchymal stem cells and matrix remodelling in three-dimensional collagen scaffolds. *Biomaterials* 31:467-80.

44. Bara JJ, Richards RG, Alini M, Stoddart MJ. 2014. Concise review: Bone marrow-derived mesenchymal stem cells change phenotype following in vitro culture: implications for basic research and the clinic. *Stem Cells* 32:1713-23.
45. Jung Y, Song J, Shiozawa Y et al. 2008. Hematopoietic stem cells regulate mesenchymal stromal cell induction into osteoblasts thereby participating in the formation of the stem cell niche. *Stem Cells* 26:2042-51.
46. Niu CC, Lin SS, Yuan LJ et al. 2014. Identification of mesenchymal stem cells and osteogenic factors in bone marrow aspirate and peripheral blood for spinal fusion by flow cytometry and proteomic analysis. *J Orthop Surg Res* 9:32.
47. Copland I, Sharma K, Lejeune L et al. 2008. CD34 expression on murine marrow-derived mesenchymal stromal cells: impact on neovascularization. *Exp Hematol* 36:93-103.
48. Maxson S, Lopez EA, Yoo D et al. 2012. Concise review: role of mesenchymal stem cells in wound repair. *Stem Cells Transl Med* 1:142-9.
49. Yousefi AM, James PF, Akbarzadeh R et al. 2016. Prospect of Stem Cells in Bone Tissue Engineering: A Review. *Stem Cells Int.* [Epub ahead of print].

LEGENDA DE FIGURAS

Fig.1. Células, isoladas da medula óssea de ratos, plaqueadas para verificação da capacidade de aderência ao plástico das mesmas. 7 dias de cultura: células com aspecto fibroblastóide aderidas ao plástico e células autofluorescentes não aderidas (A); 14 dias de cultura: células com prolongamentos maiores, citoplasma mais abundante e menor autofluorescência (B); 21 dias de cultura: células com citoplasma abundante, com aspecto fibrilar e presença de matriz extracelular (C). Aumento original de 400x.

Fig.2. Células isoladas da medula óssea de ratos submetidas a diferentes meios indutores, para a verificação da capacidade de diferenciação das mesmas em tri-linhagem. Controle negativo (A). Diferenciação adipogênica: intensa trama de células fibroblastóides, com presença evidente de vacúolos com lipídeos no interior. Coloração citoquímica *Oil red O*[®] (B). Diferenciação condrogênica: células arredondadas, citoplasmas abundantes, núcleos bem corados e um discreto aro mais claro perinuclear formando núcleos isogênicos. Coloração com Azul de Toluidina (C). Diferenciação osteogênica: depósitos exagerados de cálcio em marrom. Aspecto de tapete celular confluyente, sem espaços livres com deposição de cálcio de forma heterogênea, porém uniformemente distribuído em toda cultura. Coloração com *Alizarin red*[®] (D). Aumento original 200x.

Fig.3. Visões panorâmicas dos defeitos cirúrgicos aos 10 dias pós-operatórios. Fotomicrografia dos grupos Controle (A); PRP (B); AMO (C); OA (D); PRP/OA (E) e AMO/OA (F). H&E. Barra de escala = 500 µm. Abreviaturas: C, controle; PRP, plasma rico em plaquetas; AMO, aspirado de medula óssea; OA, osso autógeno.

Fig.4. Visões panorâmicas dos defeitos cirúrgicos aos 30 dias pós-operatórios. Fotomicrografia dos grupos Controle (A); PRP (B); AMO (C); OA (D); PRP/OA (E) e

AMO/OA (F). H&E. Barra de escala = 500 μm . Abreviaturas: C, controle; PRP, plasma rico em plaquetas; AMO, aspirado de medula óssea; OA, osso autógeno.

Fig.5. Visões detalhadas dos defeitos cirúrgicos aos 30 dias pós-operatórios.

Fotomicrografia dos grupos OA (A) e AMO/OA (B). H&E. Barra de escala = 30 μm .

Abreviaturas: OA, osso autógeno; AMO, aspirado de medula óssea.

Fig.6. Médias e desvios-padrão da Área de Osso (AO), com comparações inter-grupos aos 10 dias pós-operatórios.

Fig.7. Médias e desvios-padrão da Área de Osso (AO), com comparações inter-grupos aos 30 dias pós-operatórios.

Fig.8. Imunomarcações para PCNA, BMP-2/4 e OCN no defeito cirúrgico, aos 30 dias pós-operatórios. Fotomicrografias mostrando células PCNA-positivas (cabeça de seta preta) nos grupos Controle (A) e AMO/OA (B). Fotomicrografias mostrando células BMP-2/4-positivas (cabeça de seta vermelha) nos grupos Controle (C) e AMO/OA (D).

Fotomicrografias mostrando células OCN-positivas (cabeça de seta azul) nos grupos Controle (E) e AMO/OA (F). Barra de escala = 40 μm . Abreviaturas: C, controle; AMO, aspirado de medula óssea; OA, osso autógeno; PCNA, antígeno nuclear de proliferação celular; BMP-2/4, proteína morfogenética óssea 2/4; OCN, osteocalcina; TO, tecido ósseo; TC, tecido conjuntivo; VS, vaso sanguíneo.

Tabela 1.

Porcentagens médias (\pm desvios-padrão) de células positivas para cada marcador nas amostras de AMO dos grupos AMO e AMO/OA aos 10 e 30 dias pós-operatórios.

Marcador	AMO		AMO/OA	
	10 dias	30 dias	10 dias	30 dias
CD 71	10,282 \pm 2,47	9,99 \pm 2,22	9,34 \pm 2,47	10,23 \pm 4,21
CD 45	63,256 \pm 4,05	41,44 \pm 4,08	58,57 \pm 10,83	37,28 \pm 12,82
CD 11b	1,04 \pm 0,82	4,81 \pm 4,12	0,99 \pm 0,75	2,26 \pm 1,80
CD 44	88,322 \pm 8,23	86,22 \pm 3,28	83,83 \pm 5,36	75,10 \pm 24,08
CD 31	7,054 \pm 2,83	10,01 \pm 2,98	4,68 \pm 1,90	10,65 \pm 7,10
CD 90	12,23 \pm 1,93	18,47 \pm 5,49	11,41 \pm 1,68	14,72 \pm 3,22
CD 73	15,916 \pm 3,78	19,30 \pm 9,05	17,61 \pm 3,81	20,61 \pm 4,17
CD 105	34,848 \pm 4,60	55,08 \pm 7,23	38,81 \pm 0,85	53,40 \pm 24,17
CD 34	2,418 \pm 0,61	4,38 \pm 0,67	2,25 \pm 1,30	2,28 \pm 2,25

Tabela 2.

Médias e desvios-padrão das células PCNA-positivas, BMP2/4-positivas e OCN-positivas aos 10 dias pós-operatórios, com comparação inter-grupos.

Variável	C	PRP	AMO	OA	PRP/OA	AMO/OA
PCNA	96 ± 4,8	135,3 ± 4,2 [*]	141,3 ± 4,5 [*]	119 ± 4,3 ^{*¶§}	170,8 ± 7,4 ^{*¶§} ‡	130,3 ± 9,2 ^{*†‡#}
BMP2/4	101 ± 5,3	133 ± 7,5 [*]	125,6 ± 6,2 [*]	118,6 ± 5,1 ^{*¶}	137,8 ± 5,3 ^{*§‡}	130 ± 4,7 ^{*‡}
OCN	81,8 ± 2,8	124 ± 6,8 ^{*#}	115,7 ± 5,9 ^{*#}	117,2 ± 5,6 ^{*#}	165,7 ± 5,3 [*]	121,5 ± 3,7 ^{*#}

*Diferença significativa quando comparado ao Grupo C aos 10 dias (P < 0,01);

¶Diferença significativa quando comparado ao Grupo PRP aos 10 dias (P < 0,01);

§Diferença significativa quando comparado ao Grupo AMO aos 10 dias (P < 0,01);

†Diferença significativa quando comparado ao Grupo AMO aos 10 dias (P < 0,05);

‡Diferença significativa quando comparado ao Grupo OA aos 10 dias (P < 0,01);

‡Diferença significativa quando comparado ao Grupo OA aos 10 dias (P < 0,05);

#Diferença significativa quando comparado ao Grupo PRP/OA aos 10 dias (P < 0,01).

Tabela 3.

Médias e desvios-padrão das células PCNA-positivas, BMP2/4-positivas e OCN-positivas aos 30 dias pós-operatórios, com comparação inter-grupos.

<i>Variável</i>	<i>C</i>	<i>PRP</i>	<i>AMO</i>	<i>OA</i>	<i>PRP/OA</i>	<i>AMO/OA</i>
<i>PCNA</i>	24,7 ± 3,9	43,8 ± 10,4*	82,2 ± 7,6*¶	44,8 ± 3,9*§	45,2 ± 6,4*§	49,8 ± 5,4*§
<i>BMP2/4</i>	24,7 ± 3,7	40 ± 4,3*	103,1 ± 4,9*¶	88,8 ± 4,9*¶§†	49,5 ± 4,4*§	97 ± 7,4*¶†
<i>OCN</i>	37,1 ± 3,5	80,4 ± 9,3*	126,7 ± 4,9*¶	103 ± 5,7*¶§	105,6 ± 4,9*¶§	124,5 ± 4,2*¶†‡

*Diferença significativa quando comparado ao Grupo C aos 30 dias (P < 0,01);

¶Diferença significativa quando comparado ao Grupo PRP aos 30 dias (P < 0,01);

§Diferença significativa quando comparado ao Grupo AMO aos 30 dias (P < 0,01);

†Diferença significativa quando comparado ao Grupo PRP/OA aos 30 dias (P < 0,01);

‡Diferença significativa quando comparado ao Grupo OA aos 30 dias (P < 0,01).

Figura 1

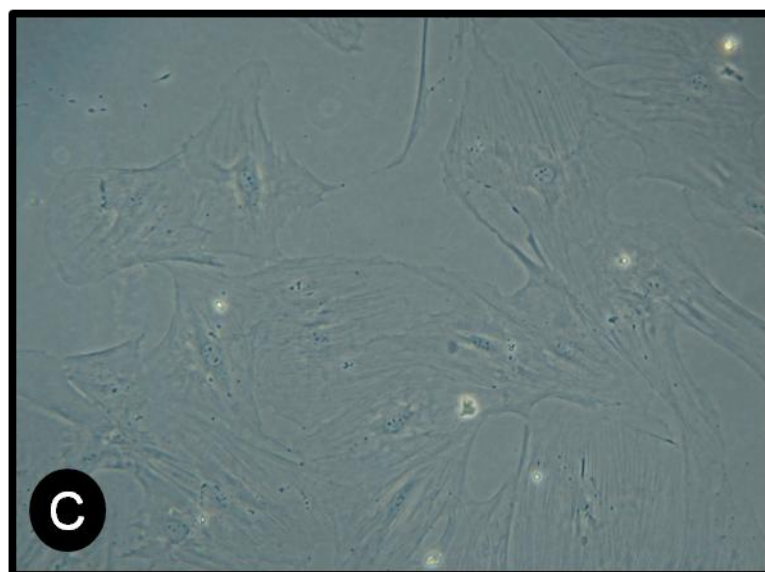
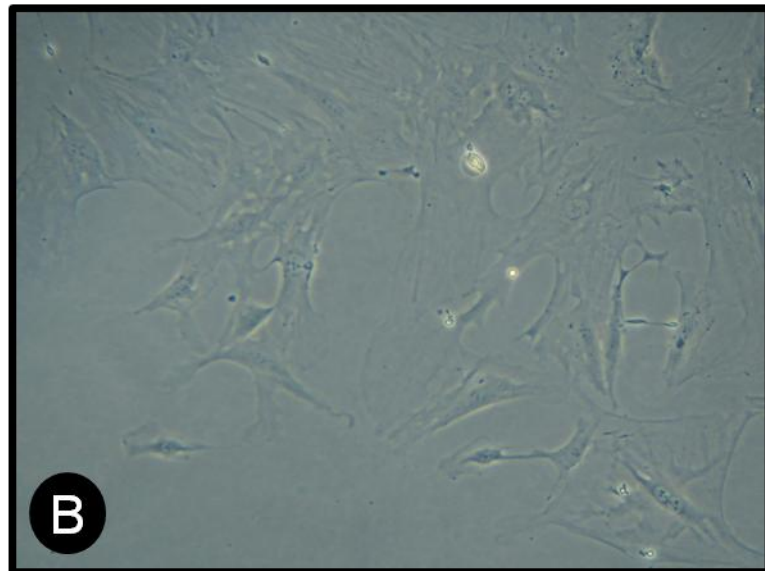
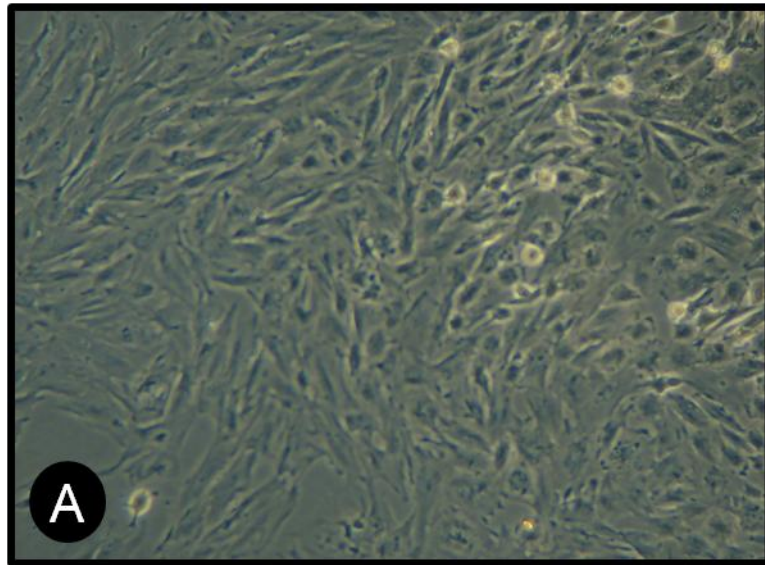


Figura 2

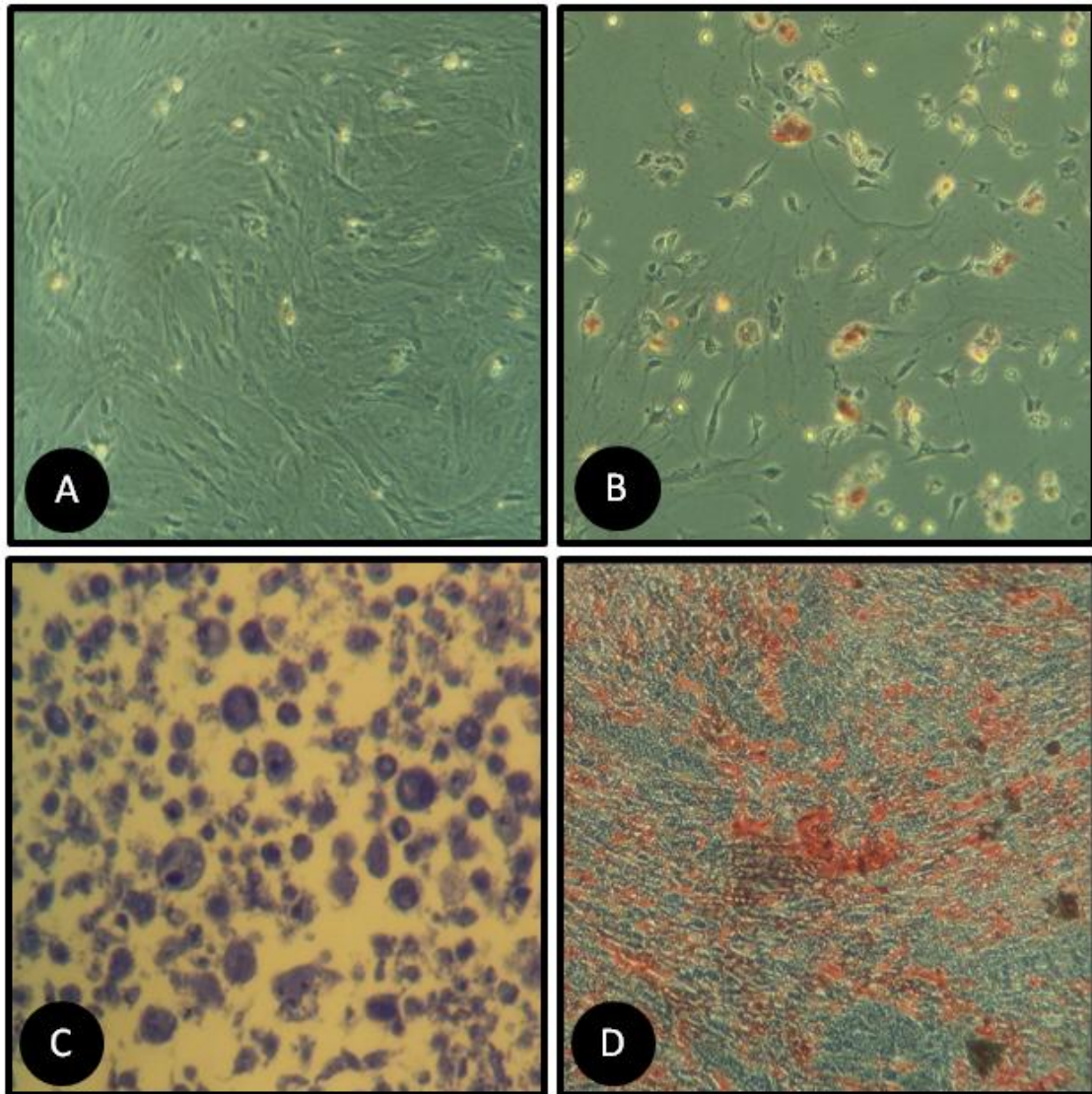


Figura 3

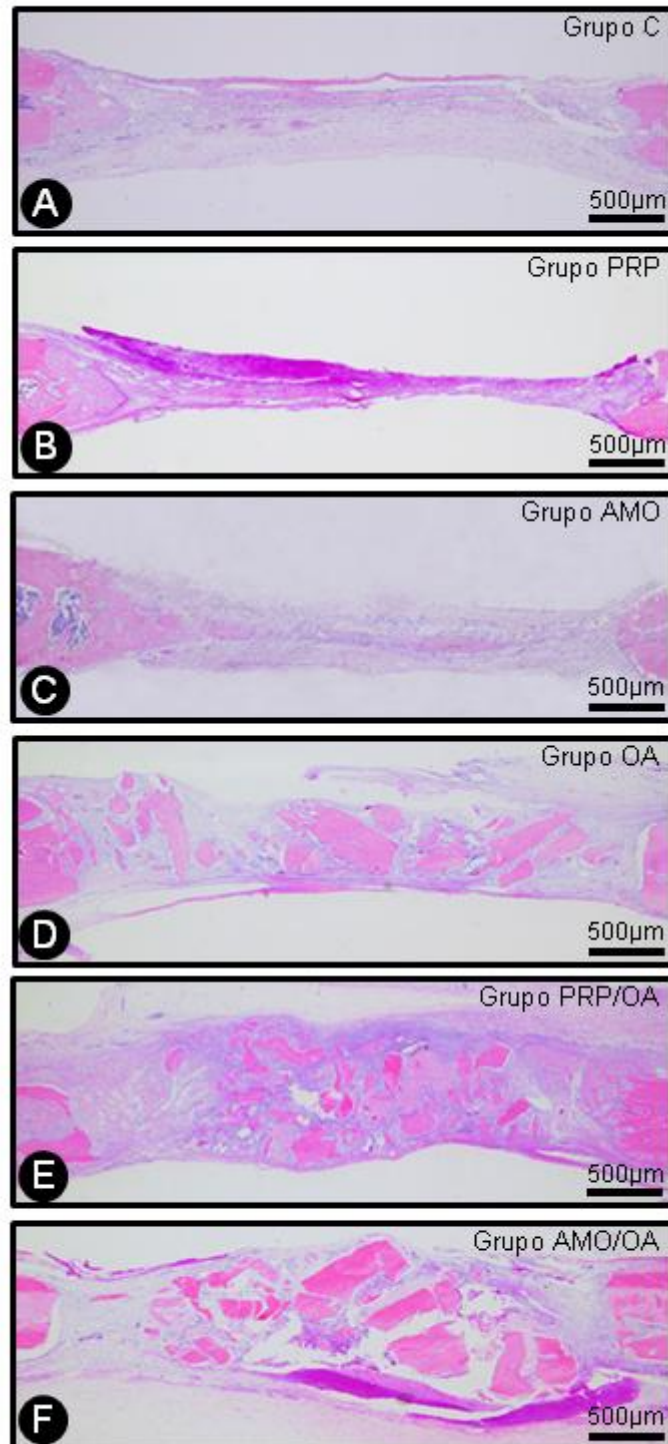


Figura 4

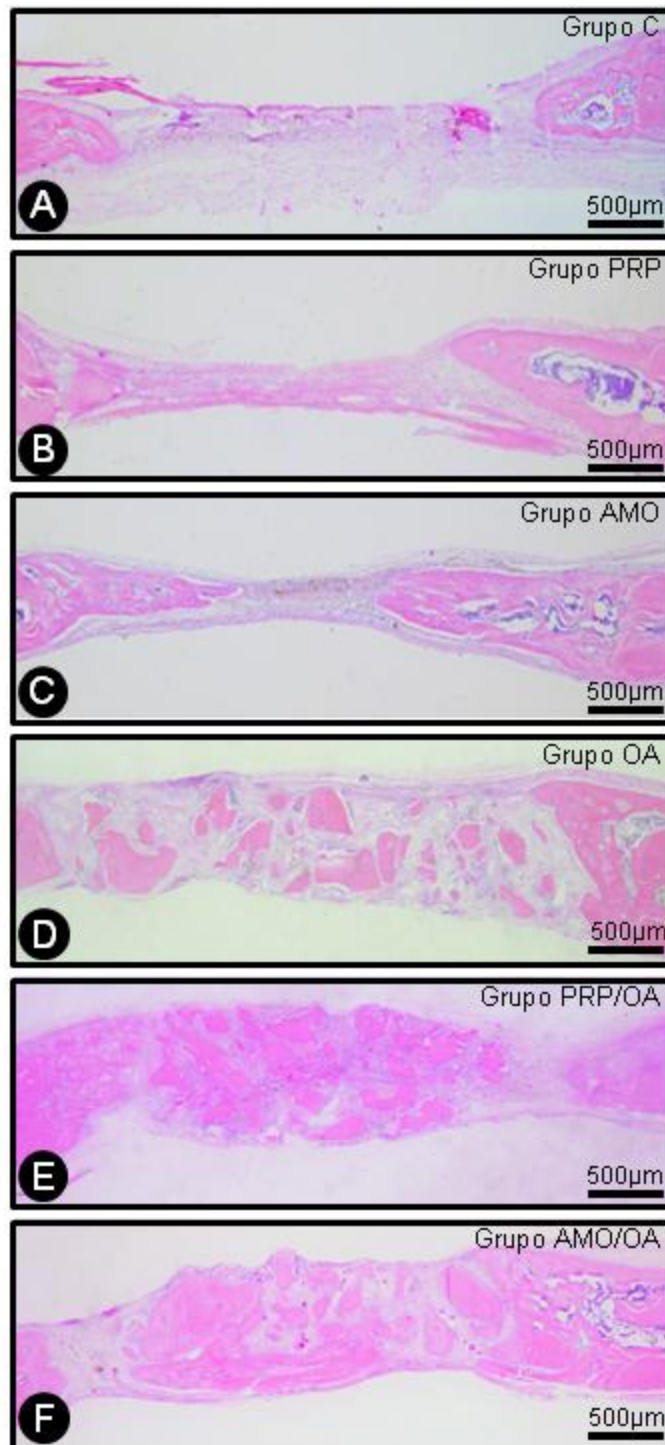


Figura 5

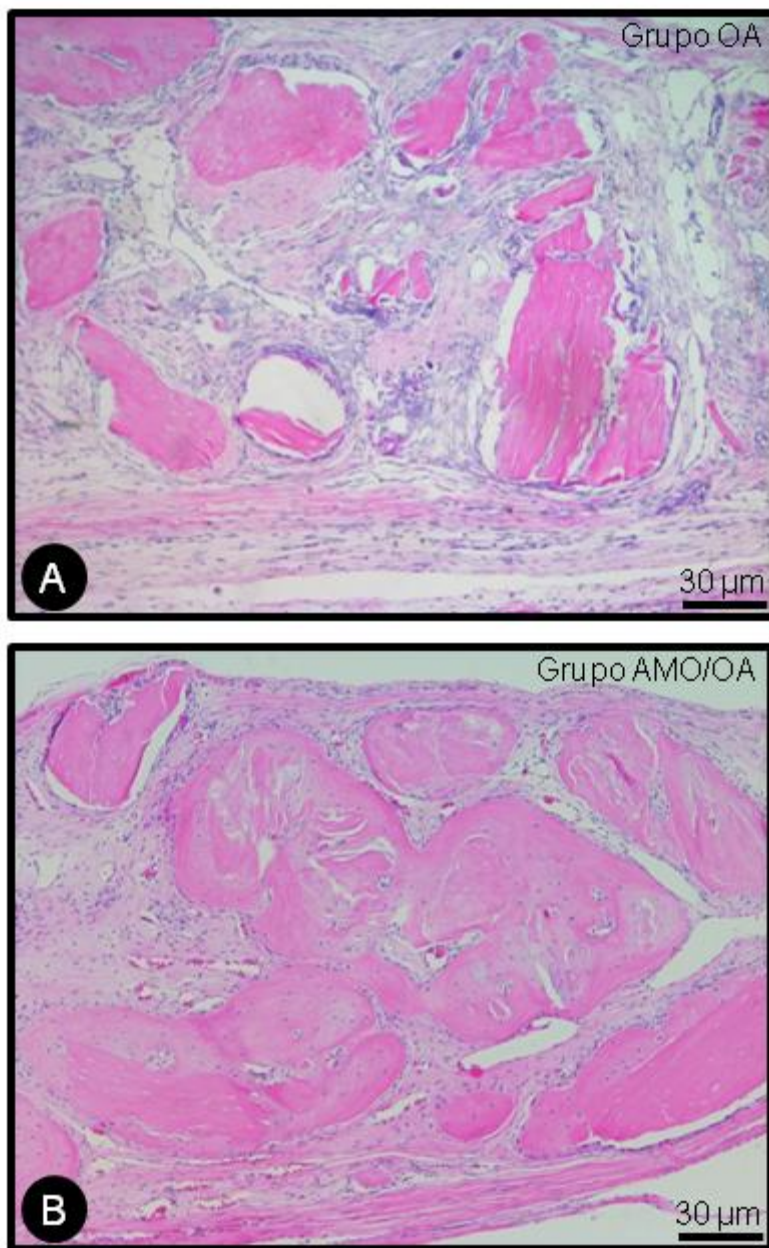
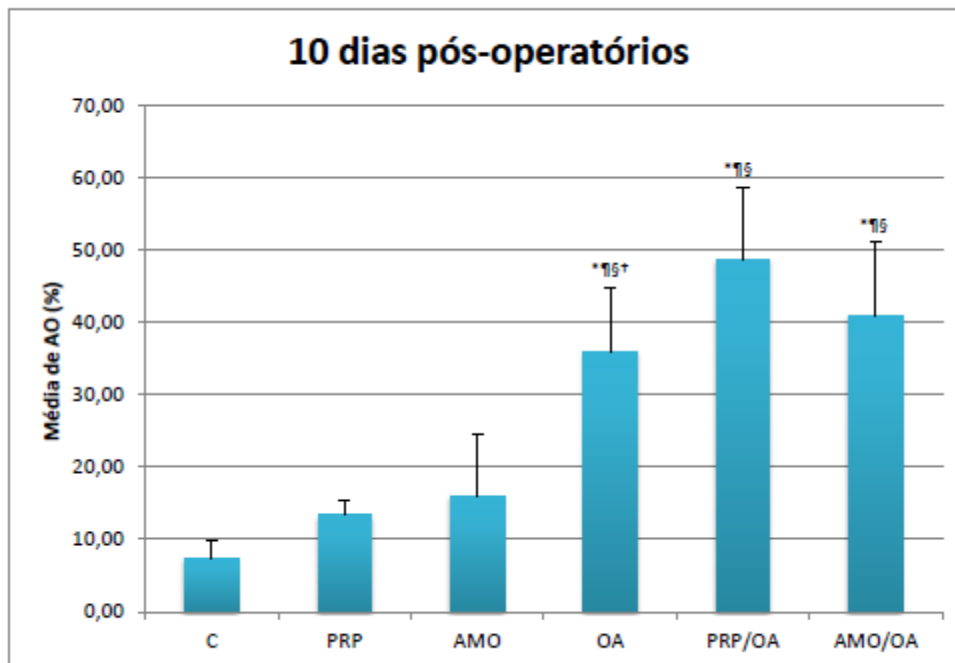


Figura 6



Comparações inter-grupos:

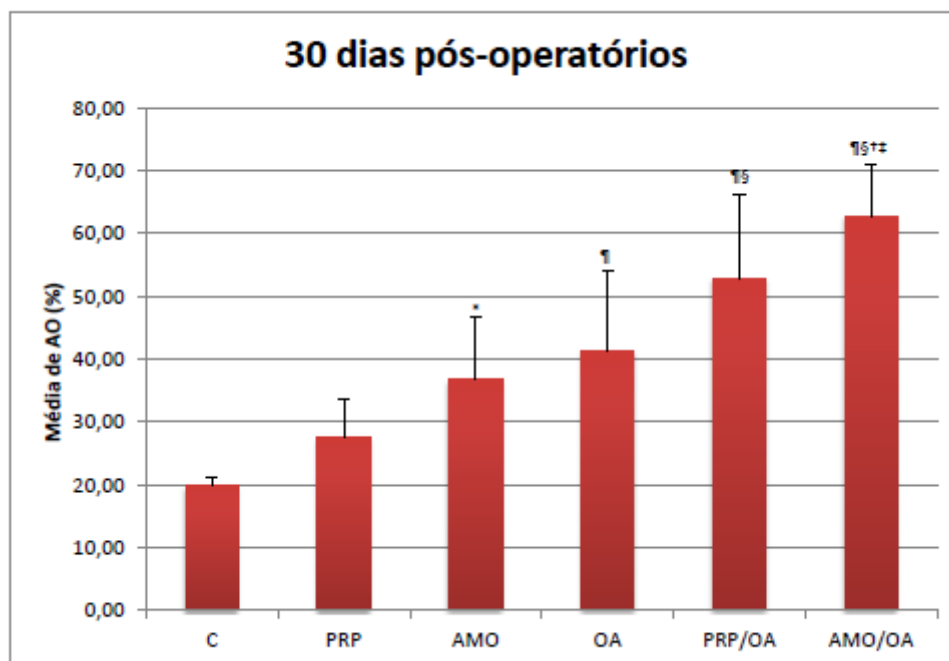
*Diferença significativa quando comparado ao Grupo C aos 10 dias ($P < 0,01$);

†Diferença significativa quando comparado ao Grupo PRP aos 10 dias ($P < 0,01$);

§Diferença significativa quando comparado ao Grupo AMO aos 10 dias ($P < 0,01$);

†Diferença significativa quando comparado ao Grupo PRP/OA aos 10 dias ($P < 0,05$).

Figura 7



Comparações inter-grupos:

*Diferença significativa quando comparado ao Grupo C aos 30 dias ($P < 0,05$);

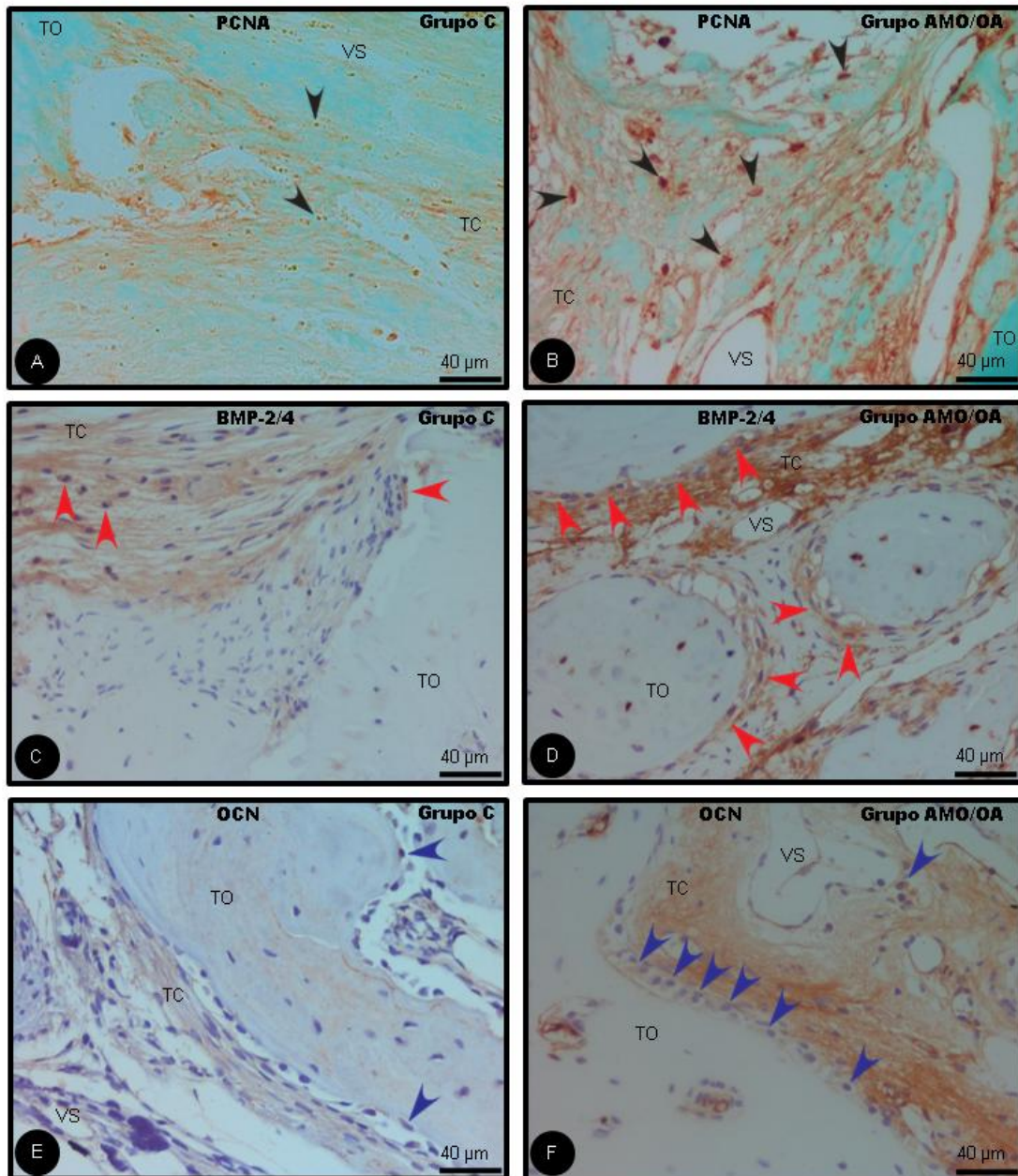
†Diferença significativa quando comparado ao Grupo C aos 30 dias ($P < 0,01$);

§Diferença significativa quando comparado ao Grupo PRP aos 30 dias ($P < 0,01$);

†Diferença significativa quando comparado ao Grupo AMO aos 30 dias ($P < 0,01$);

‡Diferença significativa quando comparado ao Grupo OA aos 30 dias ($P < 0,01$).

Figura 8



ANEXO A – Aprovação do projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Aspirado de medula óssea e plasma rico em plaquetas associados ou não ao enxerto de osso autógeno no reparo ósseo de defeitos ósseos de tamanho crítico criados cirurgicamente em calvárias de ratos. Estudo histomorfométrico e imunoistoquímico**", Processo FOA nº 2014-00546, sob responsabilidade de Maria José Hitomi Nagata apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 26 de junho de 2014.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 21 de Fevereiro de 2016.

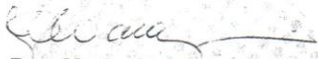
DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 21 de Março de 2016.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Bone marrow aspirate and platelet-rich plasma combined or not with autogenous bone graft on bone realing. A histomorphometric and immunochemical study**", Protocol FOA nº 2014-00546, under the supervision of Maria José Hitomi Nagata presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on June 26, 2014.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: February 21, 2016.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: March 21, 2016.


Prof. Dra. Maria Gisela Laranjeira
Vice-Coordenadora da CEUA
CEUA Vice-Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br

ANEXO B – Normas para publicação segundo o periódico *Journal of Orthopaedic Research*

Journal of Orthopaedic Research

© Orthopaedic Research Society



Edited By: Linda J. Sandell

Impact Factor: 2.807

ISI Journal Citation Reports © Ranking: 2015: 9/74 (Orthopedics)

Online ISSN: 1554-527X

Author Guidelines

Visit the new [Author Services](#) today! Features include:

- **Free access to your article for 10 of your colleagues;** each author of a paper may nominate up to 10 colleagues. This feature is retrospective—even articles already published offer this feature for free colleague access.
- **Access in perpetuity** to your published article.
- **Production tracking** for your article and **easy communication with the Production Editor** via e-mail.
- **A list of your favorite journals** with quick links to the Editorial Board, Aims & Scope, Author Guidelines and if applicable the Online Submission website; journals in which you have tracked production of an article are automatically added to your Favorites.
- Guidelines on [optimizing your article](#) for maximum discoverability.

JOR Early-Career Award

This award highlights the work of an early-career researcher to enhance the awardee's professional profile. A grant award of \$2000 will be presented to a single recipient at the ORS annual conference, selected by the Editors from eligible papers accepted by the *Journal of Orthopaedic Research* in the prior calendar year.

Eligibility Criteria:

Candidate must be an Assistant Professor (or equivalent) within 10 years of completion of terminal research degree.

Candidate must be a member of the ORS in good standing.

Candidate must be the **Lead author** on the submitted paper. (The work must clearly be that of the applicant and not that of any co-author.)

Potential candidates must indicate a desire to compete by checking the JOR Early-Career Award box during the online submission process. The applicant's professional credentials and eligibility must be outlined in the cover letter that accompanies the submission. Upon acceptance of their manuscript, applicant will be asked to submit a full curriculum vitae as well as a letter of endorsement from his/her department chair.

This award is sponsored by Wiley on behalf of the Journal of Orthopaedic Research.

Graphical Abstracts: JOR is excited to offer Graphical Abstracts! See Manuscript Preparation below for details on how to submit a graphical abstract with your manuscript.

Required Submission Forms

Authors submitting to JOR must include any of the below required forms that are relevant to their manuscripts.

Institutional Review Board / Animal Care and Use Committee approval: Manuscripts that describe experimental work using human or animal subjects must include approval from an Institutional Review Board or an Institutional Animal Care and Use Committee, obtained prior to performing the study. Authors must submit a copy of approval papers as a supplemental file.

ARRIVE Checklist: Authors describing experimental work using live animals must submit a completed ARRIVE (Animals in Research: Reporting In Vivo Experiments) Checklist with their manuscript. The Checklist must be submitted if the animals were alive at any point during the study. The ARRIVE Checklist can be downloaded as a [PDF fillable form](#) or a [Microsoft Word document](#). Please download and save the form to your computer before you fill it out; changes will not be saved in an internet browser.

Permission to re-use: Authors who need to secure permission to re-use tables, figures, or other text and materials from previously published works can use this standard [Permission Request Form](#).

Author Guidelines

[Editorial Office Information](#)

[Manuscript Submission Information](#)

[Manuscript Preparation](#)

[Editorial Policies](#)

[Copyright/Licensing](#)

[Proofs and Reprints](#)

Editorial Office Information

To contact the Editorial Office, please write to the Managing Editor, Ms. Elizabeth Brenner, at JOReditorial@wiley.com. Ms. Brenner can also be reached by telephone between the hours of 8:30 AM and 4:30 PM EST Monday through Friday at 1-781-388-8550.

Manuscript Submission Information

Articles considered by *Journal of Orthopaedic Research*: Journal of Orthopaedic Research is the forum for the rapid publication of high quality reports of new information on the full spectrum of orthopaedic research, integrating life sciences, engineering, clinical and translational studies. We consider for publication Research Articles, Review Articles, Perspectives Review Articles, Letters to the Editor, and Society News.

The Journal accepts Research Article manuscripts reporting original research only. Studies should include some element of basic science. Levels of Evidence IV and V will not be considered. Case reports will not be considered. Letters to the Editor must be in response to a published article.

Review Articles. The journal invites Review Articles, and will also consider proposals for unsolicited Review Article manuscripts. Authors of unsolicited Reviews must query the editorial office with an abstract, outline, and all author information; approved Reviews will be issued an invitation to submit. Review Articles are subject to the same length restrictions as Research Articles. Meta-analysis and systematic reviews should be submitted as Research Articles.

Perspectives Review Articles, (Invited). A Perspectives Review is submitted from two or more labs working together to offer more than one perspective. The meetings of the Orthopaedic Research Society (ORS) provide a worldwide forum for the presentation and discussion of important advances in musculoskeletal research. Critical components are spotlight and workshop sessions focused on emerging research that has the potential to change clinical practice. These sessions bring together outstanding investigators from a wide variety of

scientific disciplines. Recognizing the importance of the sessions for promoting innovative musculoskeletal research, the Journal of Orthopaedic Research Editorial Advisory Board and the journal editors invite review articles based on the ORS workshops and spotlight sessions as well as other selected topics presented at the ORS meetings. The purpose of these articles is to place in perspective important research developments and directions. (See the Editors' Editorial regarding Perspectives:<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jor.21391/pdf>) The invited reviews will focus on specific topics that will be of broad interest to ORS members and all of those engaged in musculoskeletal research. The reviews will be concise, and the editors will ensure that these reviews are published as soon as possible after the meetings. Unsolicited Perspectives Review manuscripts may be rejected without peer review at the discretion of the Editors.

How to Submit

Journal of Orthopaedic Research is pleased to offer authors web-based submission and peer-review.

Submit your manuscripts online using our ScholarOne Manuscript Central site <http://mc.manuscriptcentral.com/jores>. If you do not already have an account, please click the "Create an Account" button. After you have created your account, you can submit your article for consideration. At the end of a successful submission, a confirmation screen with a manuscript number will appear, and you will receive an email confirming that the manuscript has been received by the journal. Through your Author Center on this website, you can view the status of your manuscripts as they progress through the review process. Notification of the disposition of each manuscript will be sent by email to the corresponding author on the day of decision.

Submission Fee The Journal of Orthopaedic Research charges a standard fee of \$50.00 US for all unsolicited nonmember submissions with the exception of revised manuscripts, invited reviews and commentaries, and Letters to the Editor. This fee covers expenses for the processing and evaluation of your submission by office staff and Editors. External peer review is not guaranteed by payment of the submission fee. **Orthopaedic Research Society (ORS) members are not subject to submission fees.** The submitting author does not have to be a member; if any co-author of the paper is an active member of the ORS, the submitting author may select Member article.

Manuscript Preparation

Manuscripts that do not adhere to the below instructions **WILL BE RETURNED** to the corresponding author for correction before being sent out for peer review.

Useful information for writing your manuscript is available in: Wright TM, Hayes WC, Buckwalter JA: Writing for the Journal of Orthopaedic Research. J Orthop Res 17:459-468, 1999.

Author Formatting. Journal of Orthopaedic Research is pleased to offer an **Author Formatted** submission option. Tables and figures may be embedded smoothly and closely into the flow of text for a quicker review. If your tables and figures are not suitable for this style, please use the more traditional submission style of submitting tables and figures in separate files. Authors of accepted papers will be expected to provide table and figure files to the production-level specifications outlined in the below instructions. All other guidelines must be adhered to in Author Formatted submissions.

Titles and Abstracts. As you prepare your manuscript, please consider how best to optimize your visibility in search engines by following these tips for titles and abstracts:

Meaningful Titles

Be succinct: 16 words or less, with the most important words first and last. Use MeSH terms (<http://www.nlm.nih.gov/mesh/>).

Use only commonly accepted acronyms.

Use active voice.

Mention the organism studied; use the most common names for gene, organism, etc.

Mention the technique if it is the primary focus.

If you state that X affects Y, include the affect.

Don't use a question or complete sentence.

Ask yourself: Can you tweet it? Does your title clearly reflect the content?

Abstracts

Be concise, succinct, descriptive, and engaging.

Include synonyms for words and concepts that are in the title.

Avoid abbreviations.

Focus on 3-4 keyword phrases and use throughout.

Ask yourself: What terms would you use when searching for your article?

For more information on Search Engine Optimization, please visit Wiley's website: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/seo.asp>.

English Language: All manuscripts must be written in clear, correct English. Authors whose “first” language is not English should arrange for their manuscripts to be written in idiomatic English before submission. The text should also be carefully checked for errors. Please visit the following page on Wiley-Blackwell's Author Services site for language editing resources http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp

Author Information: The submitting author should be prepared to list all co-authors electronically in the system. Existing accounts can be searched by email address. New accounts must be created using a valid email address unique to each author.

Overall formatting: Manuscripts must be submitted in .doc or .rtf file format, using standard 8.5 x 11 inch (21 x 28 cm) paper with at least 1 inch (2.5 cm) margins on all sides. All text must be Times New Roman font, size 12 point, with double-spaced lines and a ragged right margin. Please do not use any text linking, such as for references, as this sort of formatting causes errors when text is displayed for review.

Details of Style: The Editors reserve the right to adjust style to certain standards of uniformity. For matters of style, follow the Scientific Style and Format: The CBE Manual for Authors, Editors, and Publishers (6th edition), published by Cambridge University Press. Keep abbreviations to the minimum, and define each at its first use. Do not use acronyms or abbreviations in the abstract. For reference to the sources of equipment or supplies, use a generic description to refer to the item in the body of the text, followed by the model number, vendor name, city, and state or country, enclosed in parentheses: e.g., electrohydraulic materials test system (model 1331; Instron, Canton, MA). If a trade name is used for a drug, provide the name of the generic along with the manufacturer's information. Abbreviations and units of measurement should all be in SI units. Sufficient detail should be provided that the experiments can be reproduced.

Clinical Trials must be registered with <https://clinicaltrials.gov/>. Authors must provide confirmation of registration in their manuscript or as a supplemental file.

Institutional Review Board / Animal Care and Use Committee approval: Manuscripts that describe experimental work using human or animal subjects must include approval from an Institutional Review Board or an Institutional Animal Care and Use Committee, obtained prior to performing the study. Authors must submit a copy of approval papers as a supplemental file.

Manuscript Text

Research and Review Articles are restricted to 4,200 words of body text (Introduction through Discussion/Conclusion). Title page, abstract and keywords, references, and legends are not considered in the word count. Perspectives Review articles have no length restriction.

The text of a *Research Article* should be organized as follows: Title page, Abstract, Introduction, Methods, Results, Discussion, Acknowledgments, References, Tables, and Figure legends. Pages should be numbered in succession, the title page being page 1, and all lines should be numbered.

The text of a *Review Article* or a *Perspectives Review Article* should be organized as follows: Title Page; Abstract; Introduction explaining and defining the topic and its importance; Body of the manuscript organized according to the author's preference, but including concise summaries of the information presented at the workshop or spotlight session; Conclusion section defining the important unanswered questions related to the topic and providing clear directions for future research related to the topic; Acknowledgments; References; Tables; and Figure legends.

Title page: The title page should be the first page of the manuscript text document and provide the following: Full article title. Full name of each author, with affiliation. Full name, address, telephone and fax numbers, and e-mail address of the corresponding author (to whom proofs and reprint requests should be addressed). Running title of 5 words or less. Author Contributions Statement. Any necessary footnotes to these items.

Author Contributions Statement: Credit for authorship should be based on: [1] substantial contributions to research design, or the acquisition, analysis or interpretation of data; [2] drafting the paper or revising it critically; [3] approval of the submitted and final versions. All title pages must include a brief description of each authors' contribution and a statement that all authors have read and approved the final submitted manuscript.

Corresponding author: Corresponding author should take responsibility for communicating with all other authors and getting their approval for the final version to be published.

Abstract and Keywords. On the page following the title page, please provide an **unstructured** abstract of up to 250 words, a single paragraph describing the purpose, methods, results, and conclusions of the study. Where applicable, the abstract should include a **labeled** Statement of Clinical Significance. Authors should also supply up to five keywords suitable for indexing. Keywords may be modified by the Editors.

Methods: For studies involving human subjects, authors should identify the [type of study and level of evidence](#) at the beginning of the Methods Section (Levels of Evidence IV and V will not be considered). Manuscripts that describe experimental work using human or animal subjects must include a statement in the Methods section that approval was obtained from an Institutional Review Board or an Institutional Animal Care and Use Committee prior to performing the study. Authors must perform appropriate and rigorous statistical analysis. *Clinical Trials* must be registered with <https://clinicaltrials.gov/>. Authors must provide confirmation of registration in their manuscript or as a supplemental file.

Institutional Review Board / Animal Care and Use Committee approval: Authors must submit a copy of approval papers as a supplemental file.

Acknowledgments: In the acknowledgments, the authors must: (1) identify the sources of all funding for the study including internal sources; and (2) provide information concerning all of the authors' professional and financial affiliations that may be perceived to have biased the presentation.

References: A full list of all publications cited in the text should be provided in numerical order, sequentially as they appear in the text. Do not alphabetize. The titles of journals should be abbreviated as in Index Medicus. If there are four or fewer authors, they should all be listed; if there are five or more, the first three authors should be listed, followed by et al. Double-space the reference list. The reference list should not exceed 50 papers. References should take the following form:

Journal Article (issue published)

Mackay D, Wood L, Rangan A. 2000. The treatment of isolated ulnar fractures in adults: a systematic review. *Injury* 31: 565–573.

Journal Article (epub ahead of print)

Norambuena GA, Patel R, Karau M, et al. 2016. Antibacterial and Biocompatible Titanium-Copper Oxide Coating May Be a Potential Strategy to Reduce Periprosthetic Infection: An In Vitro Study. *Clin Orthop Relat Res*. [Epub ahead of print].

Journal Article (web only, no volume/issue)

Odekerken JCE, Welting TJM, Arts JJC, Walenkamp GHIM, Emans PJ. 2013. Modern Orthopaedic Implant Coatings — Their Pro's, Con's and Evaluation Methods, Modern Surface Engineering Treatments, Dr. M. Aliofkhaezai (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/55976. Available from: <http://www.intechopen.com/books/modern-surface-engineering-treatments/modern-orthopaedic-implant-coatings-their-pro-s-con-s-and-evaluation-methods>.

Journal Article (in press)

Brown JE. The relation between citations and references. *J Med Style*. In press.

Chapter in a Book

Richards RR, Corley FG. 1996. Fractures of the shafts of the radius and ulna. In: Rockwood CA Jr, Green DP, Bucholz RW, et al., editors. *Fractures in adults*, 4th ed. Philadelphia: Lippincott; p 120–134.

Book

Rockwood CA Jr, Green DP, Bucholz RW, et al. 1996. *Fractures in adults*, 4th ed. Philadelphia: Lippincott; 234 p.

If your manuscript has been accepted for publication and it becomes necessary to add a reference after your article has been typeset, the reference should be placed at the end of the reference list. Do not renumber all the references and all the citations in the text to reflect the correct location of the citation. Simply cite the reference where needed in the text, but use the last number plus one in the existing reference list.

Figure Legends: Figure legends should be concise descriptions of the figures. Type figure legends double-spaced on a page separate from the text and tables. Provide one legend for each figure, and number legends in sequence. For photomicrographs, indicate the stain used and include a size marker (scale bar) on the image.

Tables: Tables must be typed, created using the tables function in a word processing program, and provided as text in .doc or .rtf file format. Each table should begin at the top of a new page (tables should not share pages with other tables or other manuscript text). Each table must have a self-explanatory title, be numbered in order of appearance with Arabic numerals, and be cited in the text. A table should have a legend or notes when appropriate. Tables should only be used for data that cannot be included in the written text and should not duplicate material in the text or figures. Tables should be as small as possible and should not exceed one standard-sized manuscript page. (Tables exceeding one standard-sized manuscript page must be submitted as Supplementary Material. See below.)

Figures: Authors may submit figures in PDF or .doc(x) files for review. Figures must be clear and readable in the system-rendered HTML or PDF for review. Authors of accepted papers will be expected to provide figure files to the production-level specifications outlined in the below instructions.

To ensure publication of high-quality figures, when preparing digital art, please submit figures in separate .tif or .eps file formats, with the following attributes for the output size of the file:

CMYK format for color figures

300 DPI/PPI for picture-only figure files, in grey-scale or color

600 DPI/PPI for figures containing pictures and line elements (i.e., text labels, thin lines, arrows, etc.)

1200 DPI/PPI for black and white images such as line drawings, graphs, or charts (bitmapped line art)

We recommend creating your graphics, with all fonts and scale bars included, using Photoshop or Illustrator and then uploading the figure files into Manuscript Central. *File formats that are NOT* acceptable are JPG/JPEG, GIF, ONG, PCX, PNG, XBM, PDFs, PowerPoint, Word, and Excel.

Creating, Sizing and Labeling Figures: Authors should prepare figures so that they can be printed in the smallest size consistent with conveying essential information. Figures should be submitted as electronic images to fit either one column (82.5 mm) or as a series of images that fill part or a full-page width (169 mm). The vertical length of an illustration cannot exceed 228 mm. Final figure size is at the discretion of the journal. All scaling, cropping, and rotating should be performed by the authors to minimize white space prior to submission. It is essential that figures be cropped to focus only on the area of interest. An example of this would be, if a figure is demonstrating a repair of the femoral head, it would not be appropriate to include the entire femur in the image.

Helvetica typeface is preferred for lettering of figures. To ensure clarity of presentation, all letters, numbers and symbols in the figure must be a single size, which will reduce to no less than 2 mm high (in the published figure) and be contained *within the boundaries of the figure* . All figures, when appropriate, must contain a scale bar (within the boundary of the figure itself) to show the final magnification.

The Journal prefers that authors use line drawings rather than photographs of cadaveric material or experimental animals. Photographs of human subjects are acceptable if the authors have received appropriate permission for publication of the photographs or taken appropriate measures to disguise the individual's identity.

Figures should be numbered by the order they are referenced in the text. If a figure consists of several images this should be noted with consecutive letters (e.g., Figure 1a, 1b, etc). Please

do not embed figure numbers or component letters in the images; indicate figure numbers in figure file names (e.g., Figure 1.tif, Figure 2a-d.eps). Abbreviations used in figures and legends must match exactly those used in the text. Each figure should have a title and a brief descriptive legend (see Figure Legends above); results should not be repeated in the legend. The publisher reserves the right to regroup illustrations and change their size and position to utilize pages efficiently.

Please select LWZ compression (an option in the "save" process of programs such as Photoshop) when saving your figures. This is a lossless compression routine that reduces the size of your figures without compromising their quality.

Previously Published Figures and Tables: If an author wishes to include Figures and Tables that have been previously published, they must cite the previous publication and secure permission from the copyright holder. A template permissions letter can be found here:<http://authorservices.wiley.com/bauthor/author.asp>. Please include permissions for re-used figures and tables at time of manuscript submission.

Color Charge Policy: Color images are reproduced for free in the online version of an article with grayscale reproduction in print. Print reproduction of color images is at cost to the author of \$700 per page.

Graphical Abstract: Authors are encouraged to submit abstracts in graphical form. To submit a graphical abstract, prepare a .doc file which includes the article title, the authors' names (with the corresponding author indicated by an asterisk), and an 80-words abstract summarizing the key findings presented in the paper. The .doc must be accompanied by a figure from the manuscript that best represents the scope of the paper. The supplied image (e.g. tiff, eps, jpeg, file formats) should be re-scaled to fit within the dimensions of 50mm x 60mm and have a minimum resolution of 300 dpi. (Please avoid graphs and other figures with fine detail due to the relatively small size of this image.) The .doc file and figure file should be entitled 'Graphical Abstract' and uploaded to ScholarOne Manuscript (S1M) during the manuscript submission process. *(Please note, graphical abstract will be published at the discretion of the editors.)*

Cover Photos: Submission of potential cover photos is encouraged; upon submission, these should be uploaded as a supplemental figure entitled, "for consideration as a cover photo". A minimum resolution of 300 dpi size of 8.5 × 11" is required for consideration. Images must look good on a white background.

Supplementary Material: Authors are encouraged to submit supplementary material that could aid readers in understanding the authors' findings and where appropriate to ensure that the length restrictions are met. Supplementary material for articles published in the *Journal of Orthopaedic Research* will be available in the online version of the journal. This accompanying information may include (but is not limited to) figures, tables, video clips, large sections of movies (.mov, .mpeg, .mpg4, .avi, .wav, and .wmv), data sets, program code, and electronic graphical files. Supplementary material must be submitted at the time of peer review, although the reviewers and editors may also suggest that figures or table(s) be provided as supplementary material during the review process. Each piece of supplementary material should be referenced within the text (e.g. Figure 1 is primary, and Figure S-1 is supplementary). Please note that supplementary material is NOT edited by the publisher after final acceptance by the editors, and is posted online in the format in which it is supplied. Supplementary material is available online with published articles to licensed subscribers.

Submitting a Revision: Please make every effort to return a requested revision within the two-month deadline. Requests for deadline extension will be considered. Revised papers must be accompanied by a clean revised text (primary file), a marked revised text (supplemental file), and a detailed response to reviewer comments (authors should respond to each individual comment, including both the comments and responses in the system field provided).

Editorial Policies

Review Criteria. Criteria for acceptance of a manuscript for publication include outstanding quality and originality of the research, excellence in the writing and organization of the manuscript, and the priority and potential impact of the manuscript to readers of the *Journal of Orthopaedic Research*. Manuscripts must, therefore, not only be technically competent, but also significantly impact orthopaedic research.

All submitted manuscripts are reviewed initially by the Editors for quality, novelty, scientific importance, and relevance to the journal's general readership. Manuscripts with insufficient priority for publication or those that are outside the scope of the journal are not reviewed further, and are returned to the authors. Manuscripts judged worthy of further consideration are sent to Deputy Editors for assignment of referees.

Manuscripts will be reviewed by peer experts chosen by the editors and/or suggested by the authors. The editors make every effort to have reviews returned within two weeks. If the reviewers provide comments and suggestions and recommend that a revised manuscript be

resubmitted for review, authors will have two months to return a revision. If the deadline is exceeded, it will be viewed as a new submission requiring new, initial reviews. This policy is intended to avoid long delays in resubmission and to ensure publication of high quality, timely orthopaedic research. Requests for deadline extensions will be considered.

Reviewers. Authors should submit the names, institutional affiliations, and e-mail addresses of three reviewers who have the necessary expertise to evaluate the submitted manuscript. The editorial office has the responsibility of assigning reviewers but will take into consideration the individuals named by the authors.

Conflict of Interest Disclosure. The purpose of this policy is to provide readers of your manuscript with information about your other interests that could influence how they receive and understand your work. We ask that you err on the side of full disclosure; it is better to disclose a relationship than not to do so.

The *Journal of Orthopaedic Research* and Wiley-Blackwell requires that all authors disclose any potential sources of conflict of interest. Any interest or relationship, financial or otherwise, that might be perceived as influencing an author's objectivity is considered a potential source of conflict of interest. These must be disclosed when directly relevant or indirectly related to the work that the authors describe in their manuscript. Potential sources of conflict of interest include but are not limited to: Board membership, Consultancy, Employment, Grants/grants pending, Patents (planned, pending, or issued), Royalties, Stock/Stock Options, Speaker's fees, and/or payment for development of educational presentations.

The existence of a conflict of interest does not preclude publication in this journal. If the authors have no conflict of interest to declare, they must also state this at submission. It is the responsibility of the corresponding author to review this policy with all authors and to collectively list in the cover letter to the Editor-in-Chief, in the manuscript (under the Acknowledgment section), and in the online submission system ALL pertinent commercial and other relationships.

Scientific Misconduct. The editors of the *Journal of Orthopaedic Research* strongly condemn all forms of scientific misconduct. New submissions are actively scrutinized for signs of misconduct and all allegations are taken seriously. The Journal will investigate any suspicion of misconduct and, if proof of misconduct is discovered, notify the corresponding author's institution and funding agencies. Additionally, the Journal will not consider

publication of any papers by the offending authors for at least one year, subject to the editors' judgment of the severity of the case.

The *Journal of Orthopaedic Research* adheres to the definitions and guidelines of the [Committee on Publication Ethics](#) (COPE). Scientific misconduct includes, but is not limited to the following:

Data falsification: fabrication, omission, or distortion of data.

Plagiarism: appropriation of language, data, or ideas without due credit.

Self-plagiarism, redundancy, or duplicate publication: publication of an article that significantly overlaps with another the author(s) published previously. This may be accomplished by reusing the same data with similar findings, implementing superficial changes to disguise the similarity between the two articles, or publishing the same article in two different languages.

Journal of Orthopaedic Research uses a plagiarism detection system. By submitting your manuscript to us, you agree that your manuscript may be screened for plagiarism against previously published works.

Authorship issues: improperly assigning credit by excluding legitimate authors or including authors who did not significantly contribute to the research, submitting a multi-authored paper without consent of all authors; failing to fully disclose funding or conflicts of interest.

Deviation from standard research practices or legislative and regulatory requirements: including but not limited to use of funds, care of animals, human subjects or tissues, drugs, devices, or radioactive, biological or chemical materials.

Image manipulation: enhancing, obscuring, moving, removing, or introducing a specific element of an image is considered data falsification. Adjustments that affect the whole image (e.g., brightness or contrast) are generally acceptable provided all data from the original image are still present. All image modifications must be noted in the figure legend.

Resources

Committee on Publication Ethics (COPE). 1999. *Guidelines on Good Publication Practice*. <http://publicationethics.org/static/1999/1999pdf13.pdf>

Graf C. et al. 2007. Best Practice Guidelines on Publication Ethics: A Publisher's Perspective. *Int J Clin Pract* 61: 1-26. <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1742-1241.2006.01230.x>

Nakamura, Y. and Christensen, N.B. 2009. Plagiarism. *Cancer Sci* 100:1563-1565. <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1349-7006.2009.01254.x>

Copyright/Licensing

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agreement:

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

CTA Terms and Conditions http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp

For authors choosing OnlineOpen:

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

Creative Commons Attribution License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author

Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and

visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>

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

Proofs and Reprints

Proofs must be reviewed within 48 hours of receipt; late return may cause a delay in publication of an article. Please check text, tables, legends, and references carefully. To expedite publication, page proofs rather than galleys will be sent electronically to the author.

Return proofs to: jorprod@wiley.com.

Reprints may be purchased

at <https://caesar.sheridan.com/reprints/redirect.php?pub=10089&acro=jor>.