

Eduarda de Lima Graciano Belem

***Aspirado de medula óssea e plasma rico em
plaquetas, associados ou não à terapia com
laser em baixa intensidade no reparo ósseo.
Estudo histomorfométrico e imunoistoquímico***

ARAÇATUBA - SP
2016

Eduarda de Lima Graciano Belem

***Aspirado de medula óssea e plasma rico em
plaquetas, associados ou não à terapia com
laser em baixa intensidade no reparo ósseo.
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. Titular Valdir G. Garcia
Coorientador: Prof. Ass. Dr. Edilson Ervolino

ARAÇATUBA - SP
2016

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

B428a

Belem, Eduarda de Lima Graciano

Aspirado de medula óssea e plasma rico em plaquetas associados ou não à terapia com laser de baixa intensidade no reparo ósseo: estudo histomorfométrico e imunoistoquímico / Eduarda de Lima Graciano Belem. -- Araçatuba, 2016.

87 f. : 8 il. + CD-ROM.

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

Orientadora: Profa. Maria José Hitomi Nagata

Coorientador: Prof. Valdir Gouveia Garcia

Coorientador: Prof. Edilson Ervolino

1. Medula óssea. 2. Plasma Rico em Plaquetas.
3. Terapia a laser de baixa intensidade. 4. Ratos. I. T.

Black D6
CDD 617.601

Dedicatória

Aos meus amados pais, **Sandra e Francisco**

Mãe,

A senhora dedicou a sua vida para que eu e meus irmãos tivéssemos uma excelente educação, senso crítico e respeito ao próximo. Deixou seus sonhos para sonhar o nosso! Você sempre foi meu porto seguro e minha melhor amiga. Mesmo sem entender, respeitou a minha escolha de fazer mestrado, e, mesmo à distancia sempre se fez presente, incentivando-me a não desistir dos meus sonhos. Meu maior objetivo de vida é dar orgulho a senhora e poder retribuir toda a dedicação que me ajudaram a chegar até aqui.

Pai,

Com o senhor aprendi, que se uma pessoa quer alcançar seus objetivos, deve se dedicar integralmente aquilo. O senhor é exemplo de trabalho e dedicação. Tivemos algumas divergências ao longo desses últimos anos, mas fico muito feliz por conseguirmos nos aproximar mais na relação pai e filha neste último semestre. Aprendemos juntos a sermos pessoas melhores e a nos respeitarmos, espero que um dia o senhor consiga ter a mesma relação com meus irmãos. Obrigada pelo incentivo em ser uma profissional cada vez melhor e por proporcionar condições para que eu concluísse mais esse sonho.

“Antes de sermos pais e mães, somos seres humanos, passíveis de falhas e erros.... então, a única coisa que podemos aconselhar aos nossos filhos, através de experiência já vivenciada, é como não repetirem os nossos erros.”

Cláudia Belucci

Aos meus irmãos **André e Fernanda**

Passamos por um momento muito difícil em nossas vidas, tivemos que amadurecer muito rápido, cicatrizes que levaremos para sempre. O importante é que conseguimos passar por tudo sempre unidos. Somos irmãos, amigos e, por vezes, pais um do outro. Vocês estiveram com nossa família quando eu não pude estar, e por isso sou muito grata a vocês! Tenho muito orgulho dos adultos que estão se tornando, pessoas que respeitam o próximo e suas diferenças. Vocês sonharam este sonho comigo, agora é a minha vez de ver e ajuda-los a conquistarem os de vocês.

“Ter uma irmão é ter, para sempre, uma infância lembrada com segurança em outro coração.”

Tatí Bernardi

Agradecimentos Especiais

À minha orientadora Professora Dra. **Maria José Hitomi Nagata**

Agradeço a senhora pela oportunidade de realizar o mestrado, pelo acolhimento no Programa de Pós-graduação em Odontologia, e pela orientação durante este período. Através da senhora eu conheci os aspectos mais importantes do cenário mundial de pesquisa, e melhorei meu senso crítico profissional. A senhora me orientou a realizar da melhor maneira os procedimentos clínicos, sempre valorizando muito os pacientes, alimentando assim, o meu desejo de oferecer o melhor tratamento a eles. Orientou-me também a ser rigorosa com minhas atividades acadêmicas, sempre com muito comprometimento e dedicação. Agradeço imensamente pela paciência com que lidou com minha inexperiência. Com dedicação integral da senhora este trabalho pôde ser concluído com alto rigor de qualidade. Muito obrigada!

“Um professor é a personificada consciência do aluno; confirma-o nas suas dúvidas; explica-lhes o motivo de sua insatisfação e lhe estimula a vontade de melhorar.”

Thomas Mann

Ao meu coorientador Professor Dr. **Valdir G. Garcia**

Agradeço imensamente ao senhor por nos oferecer um olhar de experiência sobre a vida acadêmica, e valorizar em nós, os sentimentos mais bonitos, como a alegria e a vontade de viver. O senhor quando chega em nosso laboratório leva um alto astral, que é muito importante para nos manter firmes em direção às nossas metas! Com muita simplicidade nos acolhe frente às preocupações que surgem durante a nossa vida de pós-graduação. No senhor encontramos um modelo de pesquisador, que tem sede do conhecimento e vê possibilidades em todas as coisas para se pesquisar e conquistar novos entendimentos. O senhor sempre esteve disposto a nos ajudar. Durante uma fase deste trabalho, tivemos um problema com o equipamento de laser e o senhor cuidou pessoalmente de resolver para que não houvesse atraso e prejudicasse o andamento dos experimentos. Só tenho a agradecê-lo por tudo e desejar que o senhor continue sendo essa pessoa agradável de se conviver!

Ao meu coorientador Professor Dr^o. **Edilson Ervolino**

Agradeço imensamente por poder contar com o senhor como meu coorientador e pela compreensão em todos os momentos do mestrado. O senhor é um exemplo de professor realmente comprometido com o aprendizado dos alunos, no qual todos querem se espelhar! É um pesquisador extremamente qualificado e isso é resultado do comprometimento com que o senhor realiza todas as coisas. Este trabalho não poderia ser realizado sem o seu empenho em fazer todas as coisas da melhor maneira. Muito obrigada por tudo professor!

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

Albert Einstein

À querida Professora Dr^a. **Suely Mogami Bonfim**

Agradeço pelo empenho em realizar essa pesquisa. Através do mestrado eu tive a satisfação de conhecê-la e em pouco tempo me identifiquei com a sua maneira tranquila de conduzir as coisas, tornando os experimentos momentos agradáveis. A senhora sempre foi muito receptiva com as nossas idéias e dúvidas, facilitando o desenvolvimento em cada metodologia. A senhora foi uma mãe enquanto estava longe da minha família. Sempre estive disposta a ouvir e aconselhar mesmo em assuntos pessoais. Vou levá-la para sempre em meu coração! Muito obrigada!

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

Gabriel Chalita

À querida Professora Dr^a. **Elenice Deffune**

Que bom que a vida nos deu a oportunidade de conhecer a senhora e formar uma parceria durante a execução deste trabalho. A senhora é exemplo de ser humano digno e de respeito ao próximo. Sempre estive disposta a nos orientar e ensinar. Que a sua vida seja repleta de luz e sabedoria. Muito obrigada!

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

Gabriel Chalita

À amiga **Carol**

Você acompanhou meu desenvolvimento desde a iniciação científica. Fico muito feliz de saber que o mestrado não foi só um momento de aperfeiçoamento profissional, mas também um momento de desenvolvimento pessoal, pois a relação que mantivemos foi nos dois sentidos muito satisfatória. Mais que uma companheira, você foi para mim uma amiga, que com sua experiência me ajudou a lidar com todos os obstáculos que tive durante este período. Cada vez que te conheço mais tenho certeza que você nasceu para a docência. Faz tudo com rigor de qualidade e ensina com prazer. Muitíssimo obrigada!

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”

Cora Coralina

À amiga **Eliana**

Você foi àquela pessoa de confiança com a qual eu podia compartilhar minhas confidências, sem medo de não ser compreendida. Somos dupla desde a Graduação, quanta coisa já passamos né? Partilhamos felicidades, vitórias, choros, ansiedade e o mais importante amadurecemos muito! Você é exemplo de determinação, garra e muita fé. Quase que você me converteu! Amiga, dizer apenas “obrigada” por tudo que você fez por mim, por toda ajuda dispensada seria pouco... Minha gratidão será eterna! Saiba que, onde quer que você esteja, pode contar comigo com a mesma intensidade que pude contar com você incondicionalmente quando precisei... Você é uma amiga que estará pra sempre no meu coração! Muito obrigada por tudo! Que nesta nova jornada que está por vir você tenha muita luz, sabedoria e sucesso! Você merece!

“A amizade desenvolve a felicidade e reduz o sofrimento, duplicando a nossa alegria e dividindo a nossa dor.”

Joseph Addison

Agradecimentos

Pela minha formação profissional. . .

Ao Professor Dr. **Álvaro Francisco Bosco**

A presença do senhor sempre alegrou nossas quartas-feiras e sua experiência profissional me estimulou a procurar cada vez mais, oferecer o melhor tratamento para os meus pacientes. O olhar compreensivo e descontraído com que o senhor nos olhava durante as cirurgias, me fazia se sentir mais tranquila e segura e é nisto que consiste o ensinar. Muito obrigada professor!

A Professora Dr^a. **Letícia Theodoro**

Agradeço por cuidar com muita dedicação do departamento da Pério e por ter atuado com muita compreensão com cada um de nós no dia-a-dia. Que a senhora continue sempre essa pessoa entusiasmada com tudo que faz, e assim alcance todas as suas metas. pude acompanhar com a senhora uma forma muito dinâmica de trabalhar, que certamente será sempre lembrada por mim na vida profissional. Muito obrigada!

Ao Professor Dr. **Juliano Milanezi**

Agradeço por todo o acompanhamento na pós-graduação, em especial, pelas clínicas de pós-graduação em que o senhor nos orientou desde as técnicas empregadas nas cirurgias, até a maneira como agir com o paciente. Sou muito grata pelo conhecimento adquirido durante esses anos. Quando eu crescer quero ser tão boa cirurgiã quanto o senhor! Muito obrigada por tudo!

À* Professor Dr. **Wilson Roberto Poi*

Tivemos maior contato durante o meu curso de mestrado, pudemos construir uma amizade que vai além do professor/aluna. O senhor é uma pessoa de muita luz e sabedoria. Sempre vou lembrar-me de um dia durante uma aula da disciplina de “Metodologia do Ensino”, que o senhor veio à minha carteira, pegou na minha mão e perguntou se estava tudo bem, mesmo eu estando quientinha no meu canto, como sempre faço. No dia eu falei que estava tudo bem, mesmo estando muito preocupada com alguns problemas pessoais. Achei uma sensibilidade de sua parte perceber o aluno como um todo. Sem dúvidas o senhor é um grande exemplo de Mestre! Muito obrigada por tudo!

À* Professor Dr. **Michel Messoria*

Agradeço pelo suporte, pois o senhor sempre esteve muito disposto a nos ajudar e mesmo distante sempre se esforçou em esclarecer nossas dúvidas. Muito obrigada!

À* Professora Dr^a. **Rita de Cássia Dorneles*

Agradeço por sempre poder contar com os equipamentos do laboratório da senhora e por estar sempre disposta a ajudar em qualquer momento. Muito obrigada!

À* Dr. **Renato Murakawa** e equipe **COIE Odontologia*

O tempo que fiquei na COIE Odontologia foi muito curto, mas de grande aprendizado. Dr. Renato, com você pude redescobrir a beleza da clínica geral, aprender o dia-a-dia da clínica e acompanhar seus procedimentos sempre feitos com muita qualidade e respeito ao paciente. Vou levar para sempre os conhecimentos adquiridos ao seu lado. Muito obrigada por tudo! E muito obrigada a equipe da COIE que sempre me recebeu muito bem. Muito sucesso a todos!

"Quando a gente ensina, a gente continua a viver na pessoa que foi ensinada!"

Rubem Alves

A pós-doutoranda **Natália Campos**

Agradeço por toda a ajuda que me concedeu, principalmente no final do mestrado, onde eu com minha inexperiência necessitei de um olhar compreensivo a me ensinar a fazer as coisas e você esteve lá me orientando em tudo! Muito obrigada!

Aos colegas da Periodontia **Paula, Vivian, Márcio, Alessandra, David, Natália, Nayara, Joílson e todos os alunos de iniciação científica**

Cada um de vocês participou desse período de minha vida e em cada momento me transmitiram ensinamentos que levarei para a vida toda. Que cada um possa alcançar seus objetivos!

Ao Dr. **Stephen Fucini**

Agradeço pelos aprendizados valiosos, principalmente na área clínica. O tempo que estivemos juntos foi pequeno, mas de grande valor, pois o senhor não mediu esforços para me dar o máximo de atenção e transmitir os valores clínicos adquiridos através de sua experiência. Nunca esquecerei dos ensinamentos transmitidos! Thank you very much!

Ao Sr. **Odair**

Agradeço pelo carinho com que o senhor cativa as pessoas! O senhor é uma pessoa cheia de vida e alegria que transmite sentimentos muito bons e por isso é querido por todos. Muito obrigada!

A Supervisora Técnica da Biblioteca **Ana Cláudia**

Agradeço pela receptividade, cuidado e atenção em me ajudar. Desejo muita luz e sabedoria em sua trajetória. Muito obrigada por tudo!

Aos porteiros **Márcio e Willian**

Obrigada por cada momento discontraído compartilhado. Pela preocupação quando eu ficava até tarde e também aos finais de semana no laboratório. Sei que torceram juntos para que tudo desse certo. Desejo a vocês muita felicidade e saúde. Daqui a pouco serão as filhas de vocês correndo atrás dos seus sonhos e enchendo vocês de orgulho. Muito obrigada por tudo!

“Unir-se é um bom começo. Manter a união é um progresso. Trabalhar em conjunto é uma vitória.”

Henry Ford

Pelo amor e pela amizade incondicionais

Ao meu amor **Otávio**

Se hoje eu cheguei até aqui, certamente foi motivada e impulsionada por seu amor, apoio, doação e companheirismo... Com você, pude aprender o verdadeiro significado do amor. Obrigada por ter compartilhado sua família, por compreender minhas ausências, pela paciência e por querer sempre o melhor de mim e para mim. Você tem o dom de me fazer bem pelo simples fato de estar presente em minha vida. Obrigada por estar sempre ao meu lado. Amo você!

“O amor só é lindo, quando encontramos alguém que nos transforme no melhor que podemos ser.”

Autor desconhecido

Aos meus sogros Jorge e Sandra, cunhados Letícia, Flávio e Nayara. À família Rodrigues e agregados, Dona Gê, Sr Acássio, Tia Kátia, Tio Junior, Tia Dé, Tio Ataíde, Tia Yara, Luiza, Laís, Carol, Daniel e Bento

Agradeço por terem me acolhido como membro de uma família tão bonita. Pela amizade, pelo carinho e por compartilharem minhas vitórias. Também agradeço pelo bem precioso que uniu nossas vidas. Dona Gê muito obrigada por colocar meu nome em suas orações, a senhora é exemplo de dedicação, amor e fé. Muito obrigada por serem minha família enquanto estava longe da minha.

“As melhores e as mais lindas coisas do mundo não se pode ver nem tocar. Elas devem ser sentidas com o coração.”

Charles Chaplin

Aos amigos Bárbara, Bruno e Sr. Nilton Flumian

Vai ser difícil agora sem o salário que o Nilton me paga para ser amiga de vocês (brincadeira). Fomos companheiros de casa, de vida, de alegria, de aprendizado, de frustrações e da luta em busca dos sonhos... Vocês são as pessoas de mais fácil convivência com quem já dividi os meus dias em toda minha vida! Agradeço a vocês pela amizade e apoio. Meninos, o pai de vocês é maravilhoso nunca se esqueçam disso! Muitíssimo obrigada por tudo!

“A amizade é o conforto indescritível de nos sentirmos seguros com uma pessoa, sem ser preciso pesar o que se pensa, nem medir o que se diz.”

George Eliot

Aos amigos Giovanni, Diego Watanabe e Diego Parisati

Vocês sempre estiveram dispostos a renovar o astral com momentos de alegria mesmo quando estava sem forças para seguir em frente! A amizade de vocês é especial demais para mim! Obrigada pela convivência agradável e pela disponibilidade incansável.

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

William Shakespeare

Aos meus queridos amigos Renan, Miwa, Laiane Natália, Pamela Maiara, Sheila, Bruno Iyda e Bárbara Comitre

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

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

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

Autor desconhecido

À minha querida psicóloga **Claudia Belazi**

Agradeço por além de me ajudar com seu trabalho, tenha se tornado uma amiga. Comecei o tratamento há 3 anos e meio e quanta coisa consegui melhorar né? Você torce pelas minhas conquistas, se emociona com meus progressos e me ensinou a ser uma pessoa melhor. Muito obrigada por tudo!

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

Antoine de Saint-Exupéry

Pela possibilidade de realização do Curso de Mestrado

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

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

À **Valéria, Cristiane e Lilian**, da Seção Técnica Acadêmica

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

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES**, pela concessão da Bolsa de Mestrado à pós-graduanda Eduarda de Lima Graciano Belem.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP**, pela concessão da Bolsa de Mestrado (Processo Nº 2014/02094-5) a pós-graduanda Eduarda de Lima Graciano Belem.

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

Aos alunos de Pós-Graduação do Departamento de Ciências Básicas, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, pelo acolhimento.

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.

A todos os alunos de graduação pela convivência tão agradável e enriquecedora!

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

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

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

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

...*Minha sincera Gratidão*

**“O êxito da vida não se mede pelo
caminho que você conquistou, mas sim
pelas dificuldades que você superou”**

Abraham Lincoln

Resumo

Belem ELG. Aspirado de medula óssea e plasma rico em plaquetas, associados ou não à terapia com laser em baixa intensidade no reparo ósseo. 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 à terapia com laser em baixa intensidade (LLLT) 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, LLLT, PRP/LLLT e AMO/LLLT. Um DTC de 5 mm de diâmetro foi criado na calvária de cada animal. No grupo C, o defeito foi preenchido com coágulo sanguíneo somente. Nos grupos PRP e AMO, o defeito foi preenchido com PRP e AMO, respectivamente. No grupo LLLT, o defeito recebeu aplicação da LLLT (InGaAlP), foi preenchido com coágulo sanguíneo e irradiado novamente. Nos grupos PRP/LLLT e AMO/LLLT, o defeito recebeu aplicação da LLLT, foi preenchido com PRP ou AMO, respectivamente e irradiado novamente. Os animais foram submetidos à eutanásia aos 10 ou 30 dias pós-operatórios. Foram realizadas análises histomorfométrica e imunoistoquímica. A área de osso neformado (AON) 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 pós-operatórios, o grupo AMO apresentou AON significativamente maior que o grupo C. Aos 30 dias pós-operatórios, o grupo AMO apresentou AON significativamente maior que os grupos

C e LLLT, bem como números significativamente maiores de células BMP-2/4-positivas e OCN-positivas que o grupo C. Dentro dos limites deste estudo, pode-se concluir que a terapia com AMO promoveu a regeneração óssea em defeitos de tamanho crítico em calvárias de ratos, tanto aos 10 dias como aos 30 dias pós-operatórios.

Palavras-chave: Medula óssea. Plasma rico em plaquetas. Terapia a laser de baixa intensidade. Células-tronco. Regeneração óssea. Ratos.

Abstract

BELEM, ELG. Bone marrow aspirate and platelet-rich plasma combined or not with low-level laser therapy 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 low-level laser therapy (LLLT) on bone healing in surgically created critical-size defects (CSD) in rat calvaria. 96 rats were divided into 6 groups: C, PRP, BMA, LLLT, PRP/LLLT and BMA/LLLT. A 5 mm diameter CSD was created in the calvarium of each animal. In Group C, the defect was filled by blood clot only. In groups PRP and BMA, the defects were filled with PRP and BMA, respectively. In Group LLLT, the defect received laser irradiation (InGaAlP laser), was filled with blood clot and irradiated again. In groups PRP/LLLT and BMA/LLLT, the defect received laser irradiation (InGaAlP laser), was filled with PRP or BMA, respectively, and irradiated again. Animals were euthanized at either 10 or 30 days postoperative. Histomorphometric and immunohistochemical analyses were performed. Newly formed bone area (NFBA) 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 postoperative, Group BMA presented significantly greater NFBA than control. At 30 days postoperative, Group BMA presented significantly greater NFBA than control and Group LLLT, as well as significantly higher numbers of BMP-2/4-positive and OCN-positive cells than control.

Within the limits of this study, it can be concluded that the treatment with BMA promoted bone regeneration in critical-size rat calvarial defects at both 10 and 30 days postoperative.

Keywords: Bone marrow. Platelet-rich plasma. Laser therapy, low-level. Stem cells. Bone regeneration. Rats.

Lista de Figuras

- Figura 1 - Células, isoladas da medula óssea de ratos, plaqueadas para 45
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.
- Figura 2 - Células isoladas da medula óssea de ratos submetidas a diferentes 47
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.

- Figura 3 - Visões panorâmicas dos defeitos cirúrgicos aos 10 dias pós-operatórios. Fotomicrografia dos grupos Controle (A); PRP (B); AMO (C); LLLT (D); PRP/LLLT (E) e AMO/LLLT (F). H&E. Barra de escala = 500 µm. Abreviaturas: C, controle; PRP, plasma rico em plaquetas; AMO, aspirado de medula óssea; LLLT, terapia com laser em baixa intensidade. 50
- Figura 4 - Visões panorâmicas dos defeitos cirúrgicos aos 30 dias pós-operatórios. Fotomicrografia dos grupos Controle (A); PRP (B); AMO (C); LLLT (D); PRP/LLLT (E) e AMO/LLLT (F). H&E. Barra de escala = 500 µm. Abreviaturas: C, controle; PRP, plasma rico em plaquetas; AMO, aspirado de medula óssea; LLLT, terapia com laser em baixa intensidade. 51
- Figura 5 - Médias e desvios-padrão da Área de Osso Neoformado (AON), com comparações inter-grupos aos 10 dias pós-operatórios. 52
- Figura 6 - Médias e desvios-padrão da Área de Osso Neoformado (AON), com comparações inter-grupos aos 30 dias pós-operatórios. 53
- Figura 7 - Imunomarcações para PCNA, BMP-2/4 e OCN no defeito cirúrgico, aos 10 dias pós-operatórios. Fotomicrografias mostrando células PCNA-positivas (cabeça de seta preta) nos grupos Controle (A) e AMO (B). Fotomicrografias mostrando células BMP-2/4-positivas (cabeça de seta vermelha) nos grupos Controle (C) e AMO (D). Fotomicrografias mostrando células OCN-positivas (cabeça de seta azul) nos grupos Controle (E) e AMO (F). Barra de escala = 40 µm. Abreviaturas: C, controle; AMO, aspirado de medula óssea; PCNA, antígeno nuclear de proliferação celular; BMP-2/4, proteína 55

morfogenética óssea 2/4; OCN, osteocalcina; TO, tecido ósseo; TC, tecido conjuntivo; VS, vaso sanguíneo.

Figura 8 - Imunomarcações para PCNA, BMP-2/4 e OCN no defeito cirúrgico, 56
aos 30 dias pós-operatórios. Fotomicrografias mostrando células PCNA-positivas (cabeça de seta preta) nos grupos Controle (A) e AMO (B). Fotomicrografias mostrando células BMP-2/4-positivas (cabeça de seta vermelha) nos grupos Controle (C) e AMO (D). Fotomicrografias mostrando células OCN-positivas (cabeça de seta azul) nos grupos Controle (E) e AMO (F). Barra de escala = 40 µm. Abreviaturas: C, controle; AMO, aspirado de medula óssea; 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/LLLT aos 10 e 30 dias pós-operatórios. 48
- 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. 57
- 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. 57

Lista de Anexos

Anexo A -	Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEAA)	73
Anexo B -	Normas para publicação segundo o periódico <i>Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology</i>	74

Lista de Abreviaturas e Siglas

µl	=	Microlitro
µm	=	Micrometro
AMO	=	Aspirado de Medula Óssea
ANOVA	=	Análise de Variância
AON	=	Área de Osso Neoformado
AT	=	Área Total
BMP-2/4	=	Proteína Morfogenética óssea 2/4
BRONJ	=	Osteonecrose dos maxilares realacionada ao uso de bisfosfonatos
C	=	Controle
CA	=	Califórnia
CAPES	=	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CEUA	=	Comissão de Ética no Uso de Animais
cm ²	=	Centímetro quadrado
CMN	=	Células Mononucleares
CTH	=	Células-Tronco Hematopoiéticas
CTM	=	Células-Tronco Mesenquimais
DAB	=	Tetracloridrato de Diaminobenzodina
DMSO	=	Dimetila Sulfóxido
DTC	=	Defeito de Tamanho Crítico
EDTA	=	Ácido Etilendiaminotetracético
<i>et al.</i>	=	<i>et alii</i>
FAPESP	=	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FC	=	Fatores de Crescimento
Fig.	=	Figura
g	=	Grama
H&E	=	Hematoxilina e Eosina
InGaAP	=	Índio-Gálio-Alumínio-Fósforo
J	=	Joule
J/cm ²	=	Joule por Centímetro Quadrado
kg	=	Quilograma
LLLT	=	Terapia com Laser em Baixa Intensidade
LMN	=	Linfomononuclear
mg	=	Miligrama
MIF	=	Média de Intensidade de Fluorescência
ml	=	Mililitros
nm	=	Nanômetro
OCN	=	Osteocalcina

PBS	=	Tampão Fosfato Salino
PCNA	=	Antígeno Nuclear de Proliferação Celular
PDGF	=	Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas
pH	=	Potencial Hidrogeniônico
PRP	=	Plasma Rico em Plaquetas
rpm	=	Rotação por Minuto
s	=	Segundo
SF	=	Soro Fetal
TC	=	Tecido Conjuntivo
TGF- β	=	Fator de Crescimento Transformador Beta
TKW	=	Teste de Kruskall-Wallis
TO	=	Tecido Ósseo
UI	=	Unidade Internacional
UNESP	=	Universidade Estadual Paulista
USP	=	Universidade de São Paulo
VS	=	Vaso Sanguíneo
W	=	Watts

Lista de Símbolos

β	=	Beta
@	=	Arroba
n	=	Tamanho da amostra
P	=	Probabilidade do valor do teste
°C	=	Graus Celsius
%	=	Por cento
G	=	Gravidade
x	=	Vezes
<	=	Menor
>	=	Maior
=	=	Igual
*	=	Asterisco
®	=	Marca Registrada
TM	=	<i>Trade Mark</i>
+	=	Mais
-	=	Menos
§	=	Inciso

Sumário

Manuscrito para publicação	30
Página de título	31
Resumo	32
Introdução	33
Materiais e Métodos	35
Resultados	44
Discussão	58
Agradecimentos	63
Referências	63
Anexos	73

Manuscrito para publicação[★]

[★]Segundo as normas do periódico *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* – Anexo B

Aspirado de medula óssea e plasma rico em plaquetas associados ou não à terapia com laser em baixa intensidade no reparo ósseo

Eduarda de Lima Graciano Belem, DDS^a; Maria José Hitomi Nagata, DDS, PhD^a

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

Autora 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

RESUMO

Este estudo avaliou a influência do aspirado de medula óssea (AMO) e do plasma rico em plaquetas (PRP) associados ou não à terapia com laser em baixa intensidade (LLLT) 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, LLLT, PRP/LLLT e AMO/LLLT. Um DTC de 5 mm de diâmetro foi criado na calvária de cada animal. No grupo C, o defeito foi preenchido com coágulo sanguíneo somente. Nos grupos PRP e AMO, o defeito foi preenchido com PRP e AMO, respectivamente. No grupo LLLT, o defeito recebeu aplicação da LLLT (InGaAlP), foi preenchido com coágulo sanguíneo e irradiado novamente. Nos grupos PRP/LLLT e AMO/LLLT, o defeito recebeu aplicação da LLLT, foi preenchido com PRP ou AMO, respectivamente e irradiado novamente. Os animais foram submetidos à eutanásia aos 10 ou 30 dias pós-operatórios. Foram realizadas análises histomorfométrica e imunoistoquímica. A área de osso neformado (AON) 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 pós-operatórios, o grupo AMO apresentou AON significativamente maior que o grupo C. Aos 30 dias pós-operatórios, o grupo AMO apresentou AON significativamente maior que os grupos C e LLLT, bem como números significativamente maiores de células BMP-2/4-positivas e OCN-positivas que o grupo C. Dentro dos limites deste estudo, pode-se concluir que a terapia com AMO promoveu a regeneração óssea em defeitos de tamanho crítico em calvárias de ratos, tanto aos 10 dias como aos 30 dias pós-operatórios.

Palavras-chave: Medula óssea; plasma rico em plaquetas; terapia a laser de baixa intensidade, células-tronco; regeneração óssea; ratos.

1 INTRODUÇÃO

A despeito da complexidade do alvo para o reparo, as estratégias de engenharia tecidual geralmente envolvem a utilização de células, arcabouços biocompatíveis e fatores biologicamente ativos [1,2]. Nos últimos anos, tem-se observado um interesse crescente no potencial terapêutico de células derivadas da medula óssea para aplicações da engenharia tecidual. Estudos recentes têm avaliado a terapia envolvendo cultivo de células-tronco mesenquimais (CTM) derivadas da medula óssea com o objetivo de promover o reparo ósseo [3-5]. O cultivo de CTM é uma abordagem promissora, porém requer instalações especiais, consome tempo e é oneroso, o que poderia torná-lo desvantajoso na prática clínica. Com o objetivo de simplificar o uso dessas células para que seu potencial terapêutico possa ser melhor explorado, o aspirado de medula óssea (AMO) tem sido proposto como uma fonte viável de CTM [6-8]. O AMO contém uma porcentagem de células hematopoiéticas, endoteliais e CTM significativamente maior que o sangue periférico [9]. Somente poucos estudos *in vivo* avaliaram o uso do AMO no reparo ósseo como terapia única [8,10,11], ou combinado com enxertos ósseos ou biomateriais, [6-8,12,13] demonstrando resultados promissores.

Estudos *in vitro* que avaliaram o efeito da terapia com laser em baixa intensidade (LLLT) sobre as CTM demonstraram que a LLLT promoveu o aumento da proliferação destas células [14-17] e induziu sua diferenciação em osteoblastos [17]. Assim, considerando-se o grande potencial das CTM na engenharia tecidual e medicina regenerativa e o uso do AMO como rica fonte destas células, bem como os significativos efeitos bioestimulatórios da LLLT, um estudo pioneiro foi desenvolvido por nosso grupo de pesquisa, onde a associação AMO/LLLT foi avaliada no reparo de defeitos de tamanho crítico (DTC) em calvária de ratos [10]. Neste estudo, foram avaliados 4 grupos experimentais: controle, AMO, LLLT e AMO/LLLT. Foram realizadas análise histomorfométrica da área de osso neoformado (AON) e análise

imunoistoquímica para avaliação das proteínas envolvidas no processo de reparo ósseo. Concluiu-se que a combinação AMO/LLLT aumentou significativamente a formação óssea quando comparados ao controle, ou a cada tratamento isoladamente.

A regeneração óssea é um processo complexo, que *in vivo*, requer a apresentação altamente coordenada de estímulos bioquímicos para promover os vários estágios da angiogênese e osteogênese [18]. Esses processos envolvem sinais moleculares mediados principalmente por fatores de crescimento (FC) e citocinas. As plaquetas contêm diversos FC e citocinas que desempenham papel fundamental na inflamação e reparo ósseo [19-21]. Além disso, também secretam fibrina, fibronectina e vitronectina, que atuam como moléculas de adesão para migração celular mais eficiente [22]. Em 1998, Marx et al. [23] propuseram o uso do plasma rico em plaquetas (PRP) autólogo como técnica economicamente viável para obter-se alta concentrações de FC, no intuito de otimizar o processo de cicatrização de enxertos ósseos. Após os resultados favoráveis obtidos por Marx et al. [23], outros pesquisadores avaliaram os efeitos do PRP associado a enxertos de osso autógeno, demonstrando resultados positivos muito promissores em relação à formação e maturação ósseas [24-27]. Contudo, em alguns outros estudos, a adição de PRP não resultou em benefícios adicionais no reparo de enxertos de osso autógeno [28-30]. Possíveis explicações para esses resultados controversos são os empregos de diferentes protocolos de preparo e aplicação do PRP [27,31,32].

Além da utilização do PRP combinado a diferentes tipos de enxertos ósseos e biomateriais, outra modalidade terapêutica relatada foi a associação do PRP à LLLT. Martins et al. [33] avaliaram os efeitos de 3 diferentes terapias nos resultados da cicatrização de osteonecrose dos maxilares relacionada ao uso dos bisfosfonatos (BRONJ) em pacientes com câncer: 1) terapia farmacológica; 2) terapia farmacológica com cirurgia e 3) terapia farmacológica com cirurgia associadas ao PRP e à LLLT. A associação de PRP e LLLT aos tratamentos convencionais para BRONJ melhorou significativamente a cicatrização desta lesão. Portanto,

esta terapia combinada merece ser melhor investigada, uma vez que ambos podem agir sinergicamente no processo de cicatrização [33], pois estudos prévios *in vitro* demonstraram que o processo de secreção de plaquetas e a liberação de substâncias armazenadas nos grânulos específicos podem ser potencializadas pela ação do laser [34,35].

Tanto a utilização do AMO como a do PRP apresentam vantagens e desvantagens na prática clínica. A técnica do AMO envolve o trabalho de uma equipe multidisciplinar e ambiente especializado para sua obtenção, o que torna seu custo relativamente alto, enquanto que a técnica do PRP apresenta menor complexidade de realização e custo mais baixo, mas ainda há muitas controvérsias sobre sua real efetividade clínica. Além disso, a associação destes biomateriais à LLLT abre um rol de novas modalidades terapêuticas que necessitam ser melhor investigadas. Até o presente, somente informações fracionadas estão disponíveis na literatura científica sobre o AMO, o PRP e suas associações com a LLLT.

O propósito deste estudo foi avaliar a influência do aspirado de medula óssea e do plasma rico em plaquetas associados ou não à terapia com laser em baixa intensidade no reparo ósseo de defeitos de tamanho crítico criados cirurgicamente em calvárias de ratos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Modelo experimental

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP. Foram utilizados 96 ratos machos (*Rattus norvegicus*, *albinus*, Wistar), com idade entre 5 a 6 meses, pesando entre 450 e 500 g (UNESP, Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba). Eles foram aleatoriamente divididos em 6 grupos

experimentais: C (controle), PRP (plasma rico em plaquetas), AMO (aspirado de medula óssea), LLLT (terapia com laser em baixa intensidade), PRP/LLLT (plasma rico em plaquetas associado à terapia com laser em baixa intensidade) e AMO/LLLT (aspirado de medula óssea associado à terapia com laser em baixa intensidade). Esses grupos foram subdivididos em 2 subgrupos para eutanásia aos 10 e 30 dias pós-operatórios.

2.2 Protocolo de preparo do PRP

Os animais dos grupos PRP e PRP/LLLT foram anestesiados por injeção intramuscular de xilazina (6 mg/kg de peso corporal) e quetamina (70 mg/kg de peso corporal). Imediatamente antes da realização dos procedimentos cirúrgicos, 3,15 ml de sangue autólogo foi coletado de cada animal, via punção cardíaca, em uma seringa contendo 0,35 ml de 3,2 % de citrato de sódio para prevenir a coagulação. As amostras de sangue foram centrifugadas (Hermle Centrífuga Z323K, Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Alemanha) a 160 G por 20 minutos a 22 °C, para separar o plasma contendo as plaquetas das células vermelhas. O plasma foi pipetado da parte superior do tubo e centrifugado a 400 G por 15 minutos a 22 °C, para separar as plaquetas. O plasma pobre em plaquetas foi pipetado da parte superior do tubo, deixando o PRP e o “buffy coat” no fundo do mesmo.

2.3 Protocolo de coleta da medula óssea

Os ratos dos grupos AMO e AMO/LLLT foram anestesiados seguindo o mesmo protocolo descrito anteriormente. Imediatamente antes dos procedimentos cirúrgicos, a medula óssea foi coletada das cristas ilíacas direita e esquerda de cada animal. Um volume de 1 mL de medula (0,5 mL de cada crista ilíaca) foi coletado de cada animal usando uma seringa contendo 0,1 mL de citrato de sódio a 3,2% como anticoagulante. Uma alíquota do aspirado de medula óssea foi transferida para um microtubo estéril e armazenada até o momento da aplicação

clínica e o restante da amostra foi preparada para quantificação e caracterização das CTM, através de citometria de fluxo.

2.4 Preparo da amostra do AMO para a citometria de fluxo

As amostras de AMO foram colocadas em tubo Falcon (15 mL) e acrescentou-se 14 mL de Tampão de Lise. As amostras foram, então, centrifugadas a 1.200 rpm, durante dez minutos. Desprezou-se o sobrenadante e as amostras foram transferidas para microtubos tipo eppendorf contendo 1 mL de Soro Fetal (SF) mais o Dimetil Sulfoxido (DMSO), sendo imediatamente congeladas em freezer - 80 °C até o momento das análises.

2.5 Procedimento cirúrgico

Os ratos dos grupos C e LLLT foram anestesiados seguindo o mesmo protocolo descrito para os grupos PRP, AMO, PRP/LLLT e AMO/LLLT. Após preparação antisséptica, uma incisão semilunar foi realizada na região anterior da calvária, permitindo que um retalho de espessura total fosse rebatido na direção posterior. Um defeito de tamanho crítico (DTC) de 5 mm de diâmetro foi criado com uma trefina acoplada em peça de mão de baixa rotação, sob irrigação constante com solução salina estéril. Foram realizadas marcações preenchidas com amálgama para permitir a identificação do meio do defeito cirúrgico original durante o processamento laboratorial [36].

No grupo C, o defeito foi preenchido com coágulo sanguíneo. Nos grupos PRP e AMO, o defeito foi preenchido com PRP e AMO, respectivamente. No grupo LLLT, o defeito recebeu aplicação da LLLT (InGaAlP), foi preenchido com coágulo sanguíneo e irradiado novamente. Nos grupos PRP/LLLT e AMO/LLLT, o defeito recebeu aplicação da LLLT, foi preenchido com PRP ou AMO, respectivamente e irradiado novamente. Os tecidos moles foram, então, reposicionados e suturados. Cada animal recebeu uma injeção intra-muscular de morfina (1

mg/kg de peso corporal - Dimorf[®], Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, São Paulo, SP, Brasil) e 24.000 UI de Penicilina G-benzatina (Pentabiótico* Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge[®] Saúde Animal Ltda., Campinas, SP, Brasil) após a cirurgia.

2.6 Protocolo de aplicação do PRP e do AMO

No momento da aplicação clínica, os animais dos grupos PRP e PRP/LLLT receberam um volume de 50 µl de PRP e os animais dos grupos AMO e AMO/LLLT receberam um volume de 50 µl de AMO. Tanto o PRP como o AMO foram ativados com uma solução de cloreto de cálcio a 10% (Calcium Chloride 10% Solution, ScienceLab.com Inc., Houston, TX), na proporção de 0,05 ml de cloreto de cálcio para cada 1 ml de PRP ou AMO, para promover sua coagulação.

2.7 Protocolo de aplicação da LLLT

O laser utilizado neste estudo foi o de índio-gálio-alumínio-fósforo (InGaAlP) (TheraLase[®], DMC Equipamentos Ltda, São Carlos, SP, Brasil), com comprimento de onda de 660 nm e área de spot de 0,0283 cm². Imediatamente após a preparação do defeito cirúrgico, a LLLT foi aplicada em 8 pontos equidistantes em seu aspecto interno (modo contato), de tal maneira que cada parte do defeito recebeu irradiação do laser. O laser foi aplicado com potência de 0,035W por 4 s/ponto, energia de 0,14 J/ponto e densidade energética de 4,9 J/cm²/ponto. A densidade total de energia aplicada foi de 39,2 J/cm². Nos grupos LLLT, PRP/LLLT e AMO/LLLT, cada defeito cirúrgico recebeu, imediatamente após o preparo, aplicação da LLLT seguindo o protocolo anteriormente descrito. Concluída a irradiação da parte interna do defeito cirúrgico, este será preenchido com coágulo sanguíneo (grupo LLLT), PRP (grupo PRP/LLLT) ou AMO (grupo AMO/LLLT) e, em seguida, irradiado novamente utilizando o mesmo protocolo descrito acima.

2.8 Análises qualitativa e quantitativa de plaquetas

O líquido de Brecher foi usado para lisar os eritrócitos e diluir as amostras de sangue periférico e PRP. As plaquetas das amostras de sangue periférico e PRP foram, então, contadas manualmente em câmara de Neubauer. Além disso, as amostras de sangue periférico e de PRP foram coradas com “Panótico Rápido LB” (Labor Clin, Pinhais, PR, Brasil) para avaliar a morfologia das plaquetas.

2.9 Quantificação e caracterização das CTM

2.9.1 Contagem celular

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

2.9.2 Viabilidade celular

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

2.9.3 Capacidade de adesão ao plástico e diferenciação celular

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

2.9.3.1 Capacidade de adesão ao plástico

Para a capacidade de adesão ao plástico, foi plaqueado 10^5 células em placas de 24 poços, *Tissue-Treated Corning*[®], mantidos na presença de meio de cultura DMEM-F12 (*Dulbecco's Modified Minimal Essential Medium* - Invitrogen[®]) acrescido de 10% de Soro Fetal Bovino (Invitrogen[®]) aditivado com antibióticos-antimicótico. O conjunto foi colocado em estufa com 5% de CO₂, a 37° C. Foi realizado o acompanhamento por visualização microscópica e procedida a fotomicrografia da cultura. As células LMN maduras como linfócitos ou monócitos foram eliminadas da cultura.

2.9.3.2 Caracterização por diferenciação em meios indutores – tri-linhagem

As CTM obtidas foram destinadas ao teste de comprovação do potencial de diferenciação em 3 diferentes tipos celulares: adipócitos, condrócitos e osteócitos. Para tanto, foram submetidas a meios indutores específicos para cada diferenciação, sendo eles: *Stempro*[®] *adipogen.*, *Stempro*[®] *chondro.* e *Stempro*[®] *osteogen.* (Life technologiesTM). Para a diferenciação condrogênica, após 21 dias de indução, as células foram coradas com Azul de Toluidina; para a diferenciação adipogênica, após 14 dias de indução, foi procedida a coloração citoquímica *Oil red O*[®]; enquanto que, para a diferenciação osteogênica, após 14 dias de indução, utilizou-se o corante *Alizarin red*[®]. As trocas dos meios indutores de cada placa de 24 poços foi realizada 2 vezes na semana, além de registros fotográficos durante a evolução da diferenciação.

2.9.4 Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo foi realizada no Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP, utilizando equipamento FACSCalibur BDTM, com leitura realizada pelo *software* Cell Quest ProTM. Amostras de AMO dos grupos AMO e

AMO/LLLT foram submetidas à determinação fenotípica (células LMN), pelo método de citometria de fluxo com a finalidade de quantificar e caracterizar o conjunto de células utilizadas.

As células foram colocadas em suspensão em tampão próprio Isoton II BD™, e incubadas com painel de anticorpos monoclonais (anti-CDs) para a identificação fenotípica.

A avaliação foi realizada a partir de um painel imunofenotípico multicolor composto pelos marcadores positivos CD90-PERCP, CD71-FITC, CD73-FITC, CD105-PE e negativos CD11b-APC, CD31-PE, CD45-PE, CD44-FITC e CD34-FITC.

Foi estabelecido um padrão de leitura conforme o percentual da média de intensidade de fluorescência (% MIF) do marcador, após eliminar o percentual de autofluorescência encontrado nas células do controle (aquelas que não receberam anticorpos específicos), respeitando as orientações da *International Clinical Cytometry Society* (2006) e de Gratama et al. 1998.

2.10 Processamento tecidual

Os animais foram submetidos à eutanásia aos 10 ou 30 dias pós-operatórios. A área do defeito cirúrgico original e os tecidos circunjacentes foram removidos em bloco. Após uma descalcificação inicial em uma solução de Ácido Etilenodiaminotetracético (EDTA) 10%, cada espécime foi dividido longitudinalmente em dois blocos, exatamente ao longo da linha central do defeito cirúrgico original usando o longo eixo de ambas as marcações em L como referências. Foram realizados, também, cortes transversais que tangenciaram o eixo menor de cada marcação em L. Após descalcificação adicional, as peças foram processadas e incluídas em parafina. Foram realizados cortes seriados longitudinais, com 5 µm de espessura, iniciados a partir do centro do defeito cirúrgico original. Os cortes foram corados com Hematoxilina e

Eosina (H&E) para a análise histomorfométrica ou submetidos ao método da imunoperoxidase indireta para detecção das proteínas PCNA, BMP-2/4 e OCN.

Para as reações imunoistoquímicas, os cortes histológicos foram desparafinizados e hidratados em série decrescente de etanol. Para a recuperação antigênica, as lâminas foram imersas em tampão citrato (Diva decloaker[®], Biocare Medical, Concord, CA), em câmara pressurizada (Decloaking chamber[®], Biocare Medical, Concord, CA) a 95°C por 10 minutos. Ao final de cada etapa da reação imunoistoquímica, as lâminas histológicas foram lavadas em PBS (0,1M; pH 7,4). Subsequentemente, as lâminas foram imersas em peróxido de hidrogênio a 3% por 1 hora e, então, em soro de albumina bovina a 1% por 12 horas, para bloqueio da peroxidase endógena e dos sítios inespecíficos, respectivamente. Lâminas histológicas contendo amostras de cada grupo experimental foram divididas em três lotes, e cada lote foi incubado com um dos seguintes anticorpos primários: anti-PCNA do rato gerado em camundongo (1:200, VP-P980, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA), anti-BMP-2/4 do rato gerado em coelho (1:100, SC-9003, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) e anti-OCN do rato gerado em cabra (1:100, SC-18319, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Os cortes histológicos foram incubados com anticorpo secundário biotinilado por 2 horas e, subsequentemente, tratados com estreptavidina conjugada com a peroxidase de raiz forte-HRP (Universal Dako Labeled HRP Streptavidin-Biotin Kit[®], Dako Laboratories, Carpinteria, CA) por 1 hora. A revelação foi realizada utilizando como cromógeno o 3,3'-tetracloridrato de diaminobenzidina (DAB chromogen Kit[®], Dako Laboratories, Carpinteria, CA) e a contracoloração foi realizada com *Fast green* (PCNA) ou com hematoxilina de Harris (para OCN e BMP-2/4). Todas as amostras foram acompanhadas por um controle negativo (os espécimes foram submetidos aos procedimentos descritos anteriormente, suprimindo-se a utilização dos anticorpos primários).

2.11 Procedimentos de análise microscópica

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

Critérios baseados no estudo de Messora et al. [36] foram utilizados para padronizar a análise histomorfométrica das imagens digitais. Resumidamente, a área total (AT) correspondeu à área total do defeito cirúrgico original e foi considerada 100% da área a ser analisada. A área de osso neoformado (AON) foi calculada como uma porcentagem de AT.

Critérios baseados no estudo de Nagata et al. [27] foram utilizados para a análise imunoistoquímica das imagens digitais. Resumidamente, a área total (AT) correspondeu à área total do defeito cirúrgico original. Células PCNA-positivas, BMP-2/4-positivas e OCN-positivas foram quantificadas dentro dos limites de AT.

2.12 Análise estatística

A normalidade dos dados foi verificada. Para o parâmetro AON, a significância das diferenças entre os grupos de 10 dias e entre os grupos de 30 dias foi determinada por uma análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey *post hoc* quando a ANOVA sugeriu uma diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). Para os parâmetros número de células PCNA-positivas, número de células BMP-2/4-positivas e número de células OCN-positivas, a significância das diferenças entre os grupos de 10 dias e entre os grupos de 30 dias foi determinada pelo Teste de Kruskal-Wallis (TKW), seguida pelo teste de Dunn *post hoc* quando o TKW sugeriu uma diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). A análise intra-grupo foi realizada usando o teste *t*.

3 RESULTADOS

3.1 Análises qualitativa e quantitativa de plaquetas

As plaquetas exibiram morfologia normal. A média da contagem de plaquetas nas amostras de sangue periférico foi de $547,72 \pm 139,41 \times 10^3$ plaquetas/ μ l, enquanto que a média da contagem de plaquetas nas amostras de PRP foi de $3.539,82 \pm 1.378 \times 10^3$ plaquetas/ μ l. Assim, a concentração de plaquetas no PRP foi mais do que 6 vezes maior que no sangue periférico.

3.2 Quantificação e caracterização das CTM

3.2.1 Capacidade de adesão ao plástico e diferenciação celular

3.2.1.1 Capacidade de adesão ao plástico

As amostras de AMO dos grupos AMO e AMO/LLLT de 10 e 30 dias apresentaram células que aderiram ao plástico. Aos 7 dias de cultura, células com aspecto fibroblastóide aderidas ao plástico e quantidade importante de células não aderidas e auto-fluorescentes foram observadas (Fig. 1A). Aos 14 dias de cultura, foram observadas células com prolongamentos maiores, com citoplasma mais abundante e menor auto-fluorescência (Fig. 1B). Aos 21 dias, foram observadas células com citoplasma abundante, com aspecto fibrilar e presença de matriz extracelular, favorecendo o fenótipo de célula-tronco estromal (Fig. 1C).

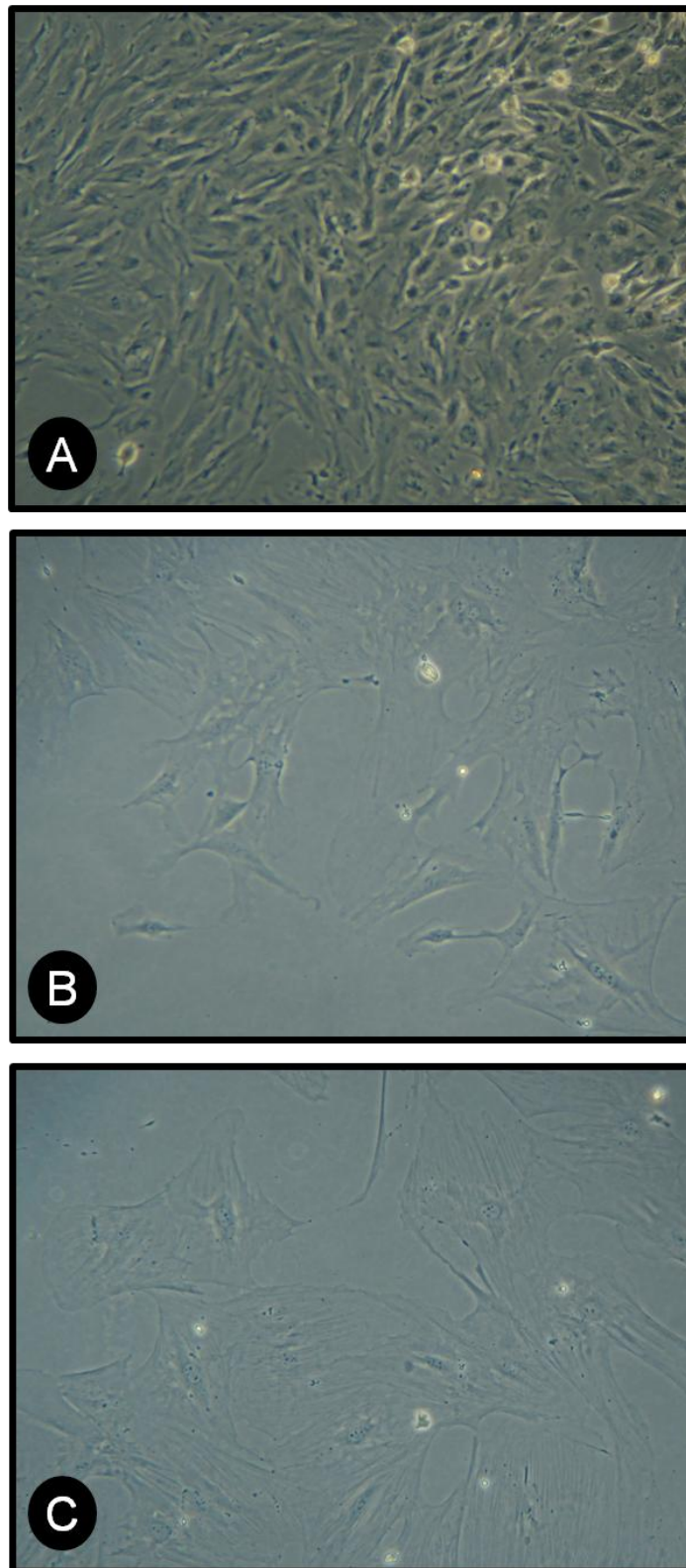


Figura 1. Células, isoladas da medula óssea de ratos, plaqueadas para verificação da capacidade de aderência ao plástico das mesmas. 7 dias de cultura: células com aspecto fibroblastóide aderidas ao plástico e células autofluorescentes não aderidas (A); 14 dias de cultura: células com prolongamentos 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.

3.2.1.2 Caracterização por diferenciação em meios indutores – tri-linhagem

As amostras de AMO dos grupos AMO e AMO/LLLT de 10 e 30 dias pós-operatórios apresentaram CTM que se diferenciaram apropriadamente nas linhagens adipogênica, condrogênica e osteogênica. Todas as culturas foram acompanhadas por um controle negativo (Fig. 2A). A adipogênese foi indicada pela intensa trama de células fibroblastóides, com presença evidente de vacúolos lipídicos (Fig. 2B). A condrogênese foi indicada pela presença de células arredondadas, com citoplasmas abundantes, núcleos bem corados e um discreto aro mais claro perinuclear formando núcleos isogênicos (Fig. 2C). A osteogênese foi indicada pelo aspecto de tapete celular confluyente, sem espaços livres, com deposição de cálcio de forma heterogênea, porém uniformemente distribuído em toda cultura (Fig. 2D).

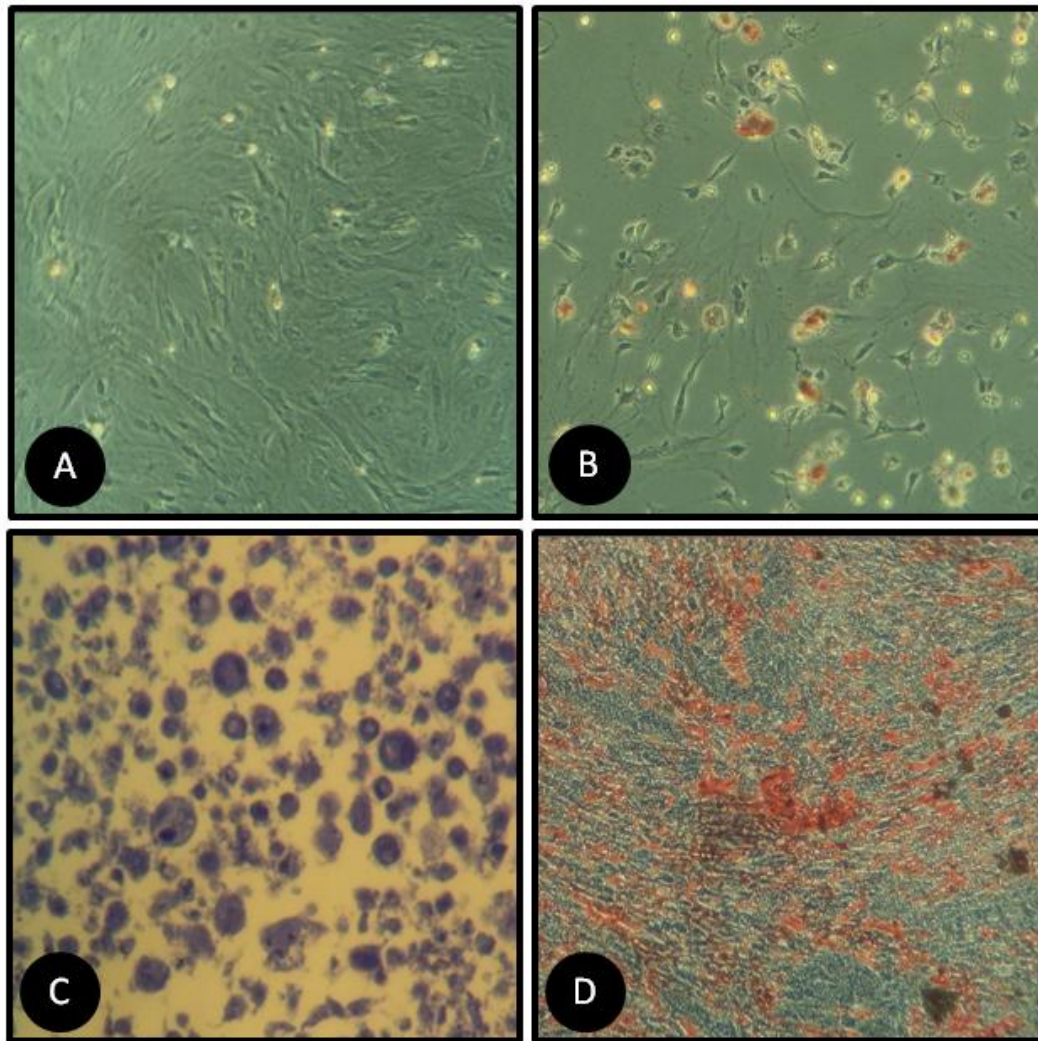


Figura 2. Células isoladas da medula óssea de ratos submetidas a diferentes meios indutores, para a verificação da capacidade de diferenciação das mesmas em tri-linhagem. Controle negativo (A). Diferenciação adipogênica: intensa trama de células fibroblastoídes, com presença evidente de vacúolos com 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.

3.2.2 Citometria de fluxo

Os resultados da citometria de fluxo das amostras de AMO dos grupos AMO e AMO/LLLT de 10 e 30 dias pós-operatórios estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1.

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

Marcador	AMO		AMO/LLLT	
	10 dias	30 dias	10 dias	30 dias
CD 71	10,28 $\pm$ 2,47	9,99 $\pm$ 2,22	8,1 $\pm$ 3,87	8,51 $\pm$ 1,75
CD 45	63,26 $\pm$ 4,05	41,44 $\pm$ 4,08	47,28 $\pm$ 11,24	46,96 $\pm$ 9,34
CD 11b	1,04 $\pm$ 0,82	4,81 $\pm$ 4,12	0,99 $\pm$ 0,63	1,26 $\pm$ 0,38
CD 44	88,32 $\pm$ 8,23	86,22 $\pm$ 3,28	80,16 $\pm$ 8,56	89,58 $\pm$ 3,93
CD 31	7,05 $\pm$ 2,83	10,01 $\pm$ 2,98	4,23 $\pm$ 1,33	3,19 $\pm$ 1,06
CD 90	12,23 $\pm$ 1,93	18,47 $\pm$ 5,49	11,12 $\pm$ 2,24	10,56 $\pm$ 1,48
CD 73	15,92 $\pm$ 3,78	19,30 $\pm$ 9,05	13,86 $\pm$ 5,2	14,14 $\pm$ 1,87
CD 105	34,85 $\pm$ 4,60	55,08 $\pm$ 7,23	39,03 $\pm$ 5,6	58,97 $\pm$ 1,15
CD 34	2,42 $\pm$ 0,61	4,38 $\pm$ 0,67	2,47 $\pm$ 0,84	2,27 $\pm$ 1,12

3.3 Análises histológica e histométrica

No Grupo C e LLLT, tanto aos 10 dias como aos 30 dias pós-operatórios, a quase totalidade dos defeitos ósseos mostrava-se preenchida por tecido conjuntivo denso. (Fig. 3A e 3D; Fig. 4A e 4D). Neste tecido, uma grande quantidade de fibras colágenas, orientadas paralelamente à superfície da ferida, abrigava poucas células inflamatórias, grande quantidade de fibroblastos e alguns vasos sanguíneos. Em ambos os períodos, uma faixa muito estreita de tecido ósseo neoformado estava confinada exclusivamente as bordas do defeito cirúrgico.

Os grupos PRP, AMO, PRP/LLLT e AMO/LLLT exibiram características histológicas muito similares no que se refere aos tecidos neoformados e ao processo de reparação tecidual. Aos 10 dias pós-operatórios um tecido conjuntivo denso ocupava a maior parte do defeito ósseo. Este tecido era composto por grande quantidade de fibras colágenas, entre as quais estavam presentes moderada quantidade de fibroblastos, alguns eritrócitos e células inflamatórias e grande quantidade de vasos sanguíneos. O tecido ósseo neoformado estava confinado às bordas do defeito ósseo (Fig. 3B, 3C, 3E e 3F). Nestes grupos, estas vertentes ósseas mostravam-se compostas por uma rede muito delicada de trabéculas de osso imaturo que circunscravam amplos espaços medulares. Aos 30 dias pós-operatórios, o tecido conjuntivo que ocupava o centro dos defeitos ósseos mostrou-se mais denso, com moderada quantidade de fibroblastos e de vasos sanguíneos, com raras células inflamatórias, sendo que alguns eritrócitos persistiam em alguns espécimes em todos os grupos experimentais. Houve um avanço da neoformação óssea tanto em direção ao centro do defeito ósseo, como promovendo o espessamento das trabéculas ósseas preexistentes (Fig. 4B, 4C, 4E, 4F). Tais padrões de neoformação óssea foram mais pronunciados no Grupo AMO.

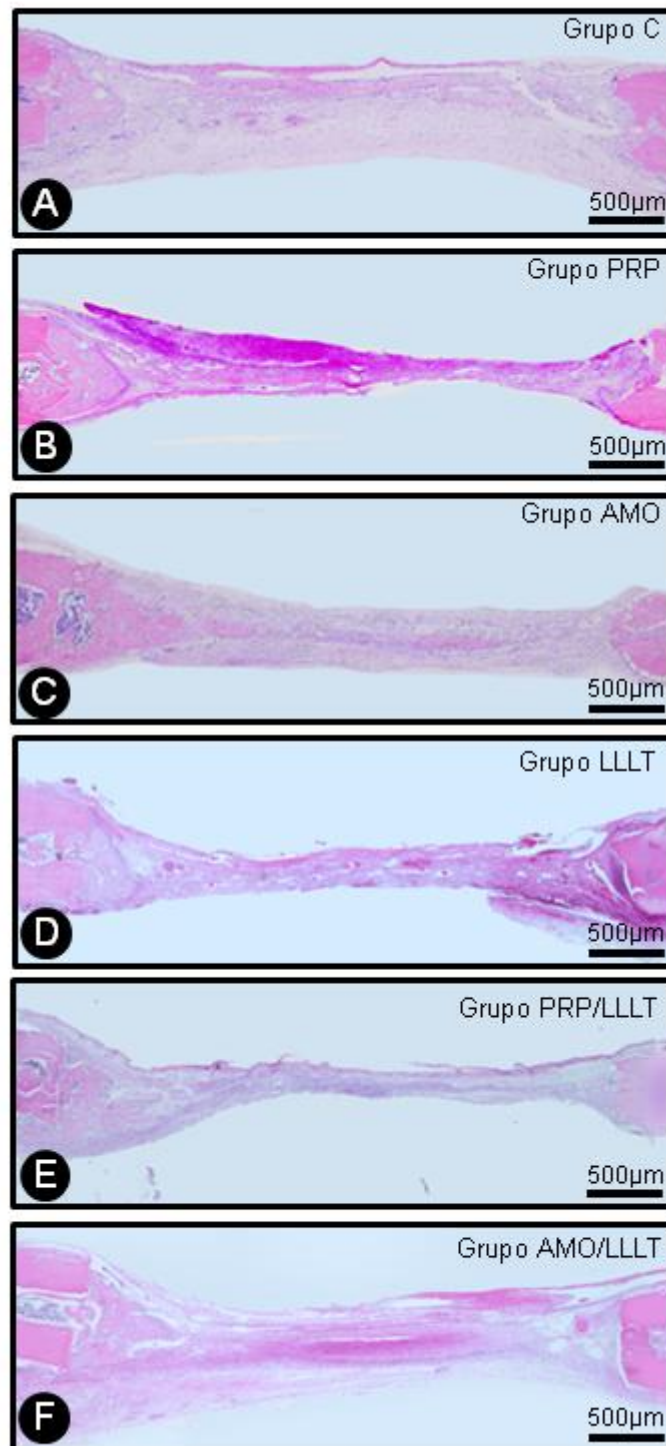


Figura 3. Visões panorâmicas dos defeitos cirúrgicos aos 10 dias pós-operatórios. Fotomicrografia dos grupos Controle (A); PRP (B); AMO (C); LLLT (D); PRP/LLLT (E) e AMO/LLLT (F). H&E. Barra de escala = 500 µm. Abreviaturas: C, controle; PRP, plasma rico em plaquetas; AMO, aspirado de medula óssea; LLLT,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

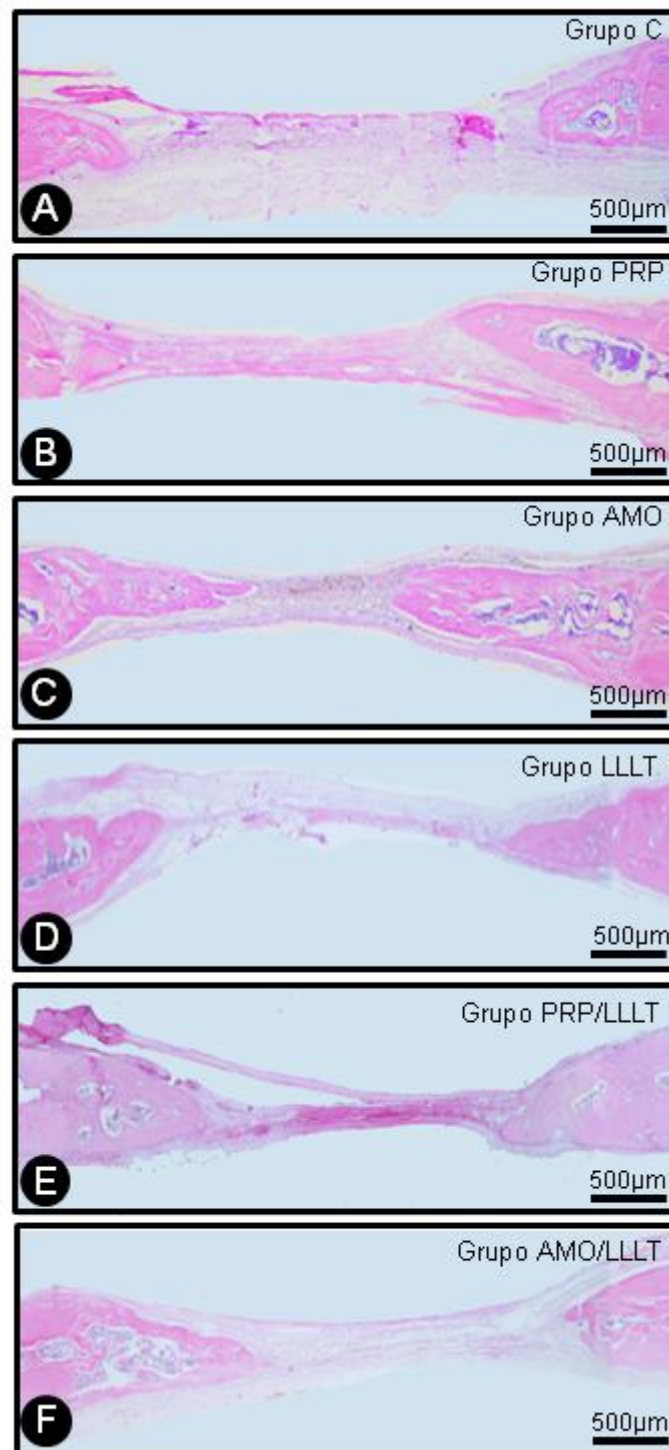
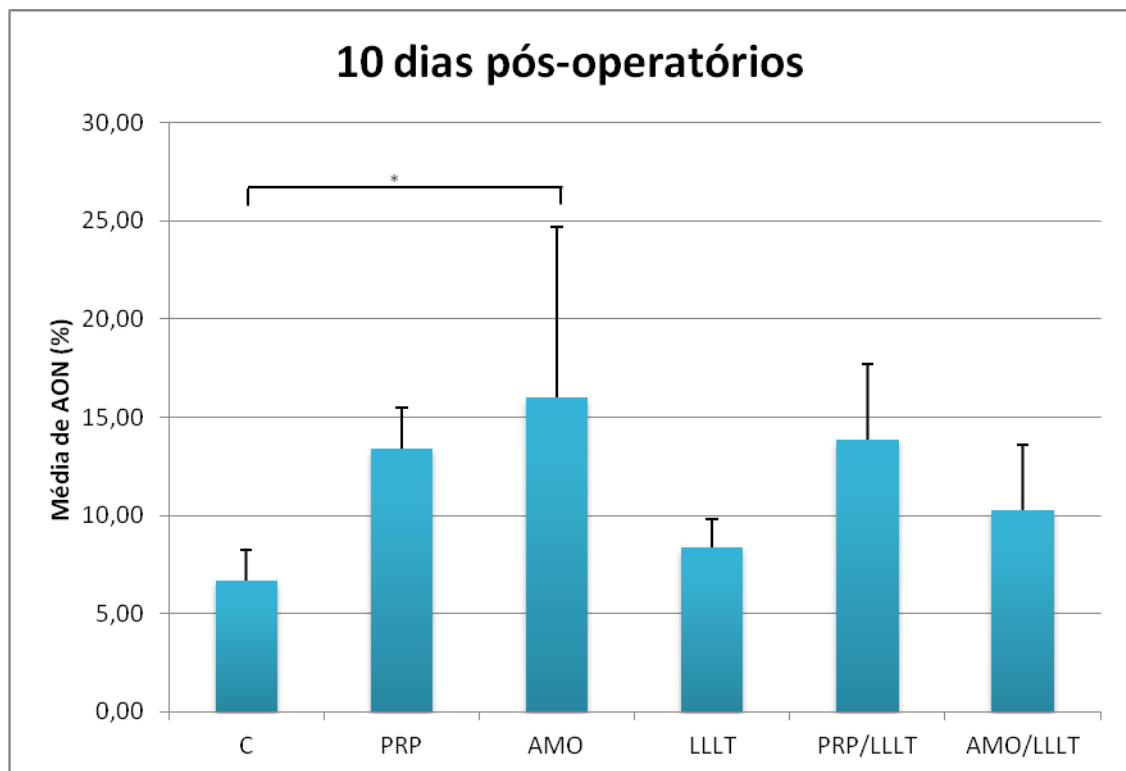


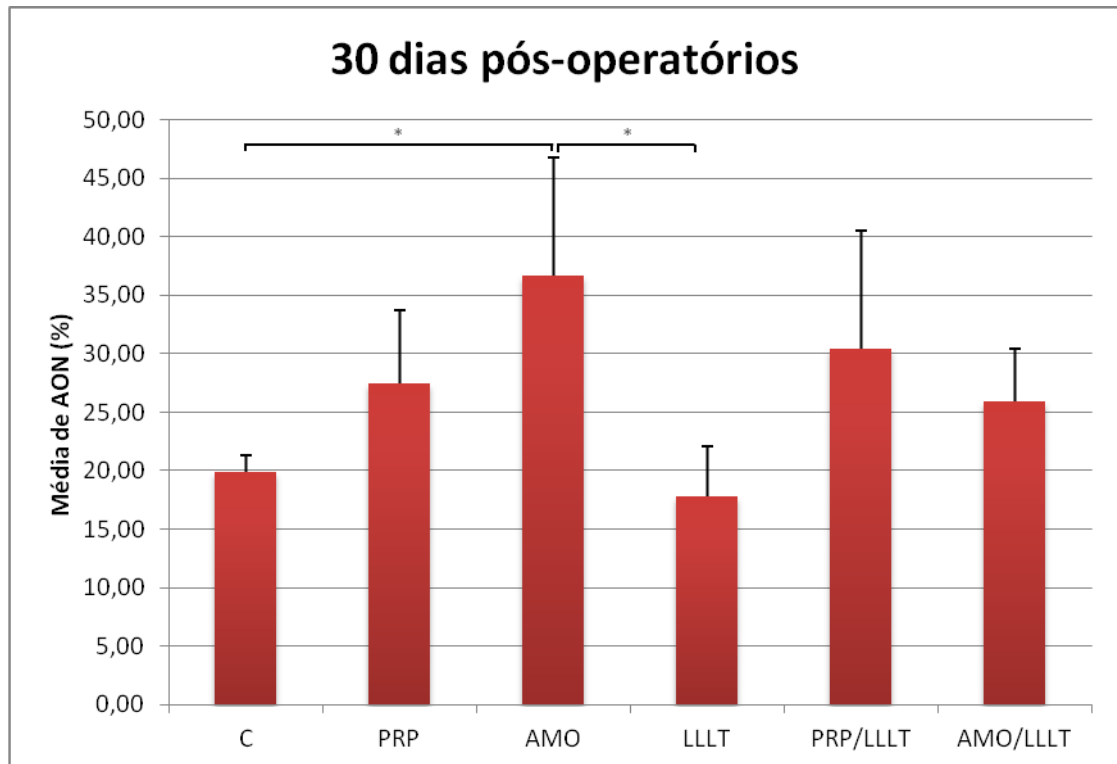
Figura 4. Visões panorâmicas dos defeitos cirúrgicos aos 30 dias pós-operatórios. Fotomicrografia dos grupos Controle (A); PRP (B); AMO (C); LLLT (D); PRP/LLL (E) e AMO/LLL (F). H&E. Barra de escala = 500 µm. Abreviaturas: C, controle; PRP, plasma rico em plaquetas; AMO, aspirado de medula óssea; LLLT, terapia com laser em baixa intensidade.

Médias e desvios-padrão de AON para os grupos C, PRP, AMO, LLLT, PRP/LLLT e AMO/LLLT dos espécimes de 10 dias e 30 dias pós-operatórios, bem como as comparações inter-grupos, estão apresentadas nas Figs. 5 e 6, respectivamente. A AON, aos 30 dias pós-operatórios, foi significativamente maior quando comparada com seu valor aos 10 dias pós-operatórios, em todos os grupos experimentais (comparações intra-grupos).



* $P < 0,05$

Figura 5. Médias e desvios-padrão da Área de Osso Neoformado (AON), com comparações inter-grupos aos 10 dias pós-operatórios.



* $P < 0,01$

Figura 6. Médias e desvios-padrão da Área de Osso Neoformado (AON), com comparações inter-grupos aos 30 dias pós-operatórios.

3.4 Análise imunoistoquímica

A técnica imunoistoquímica empregada para a detecção de PCNA, BMP-2/4 e OCN mostrou alta especificidade na detecção dessas proteínas, como evidenciado pela ausência total de imunomarcacão nos controles negativos das reações imunoistoquímicas. As células imunorreativas apresentaram uma coloração marrom escuro confinada ao núcleo, no caso de PCNA, e ao citoplasma e à matriz extracelular, no caso de BMP-2/4 e OCN.

Todos os grupos apresentaram imunomarcacões para PCNA, BMP-2/4 e OCN aos 10 dias e aos 30 dias pós-operatórios. Imunomarcacões positivas para essas proteínas nos grupos C e

AMO, aos 10 e 30 dias pós-operatórios, estão apresentadas na Fig. 7 e 8, respectivamente. A imunomarcção para PCNA estava presente em células situadas nas adjacências do tecido ósseo neoformado. Células PCNA-positivas também estavam difusamente distribuídas no tecido conjuntivo que preenchia o centro dos defeitos ósseos. As imunomarcções de BMP-2/4 e OCN foram expressas predominantemente em osteoblastos e na matriz extracelular imediatamente adjacente ao tecido ósseo neoformado.

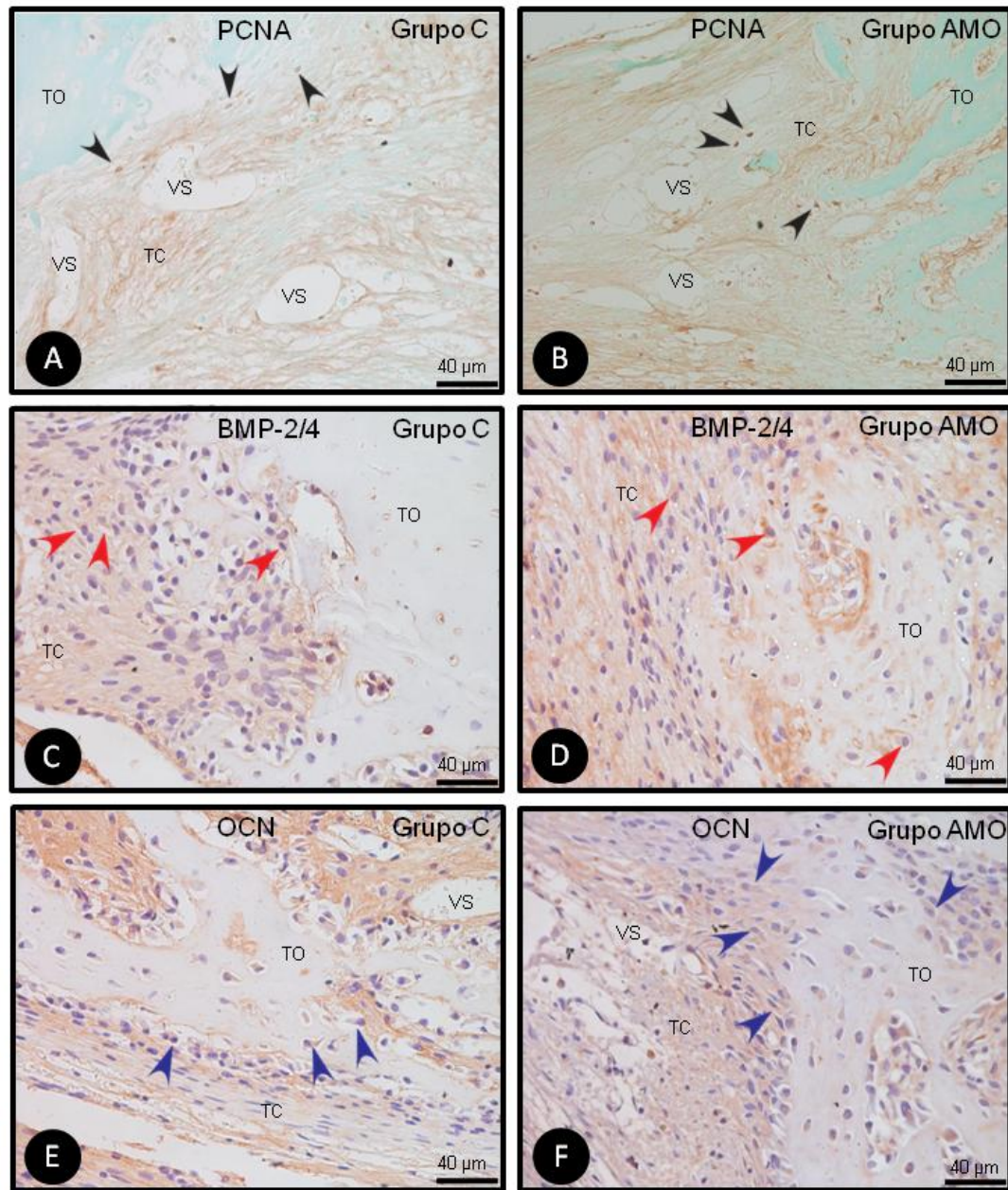


Figura 7. Imunomarcações para PCNA, BMP-2/4 e OCN no defeito cirúrgico, aos 10 dias pós-operatórios. Fotomicrografias mostrando células PCNA-positivas (cabeça de seta preta) nos grupos Controle (A) e AMO (B). Fotomicrografias mostrando células BMP-2/4-positivas (cabeça de seta vermelha) nos grupos Controle (C) e AMO (D). Fotomicrografias mostrando células OCN-positivas (cabeça de seta azul) nos grupos Controle (E) e AMO (F). Barra de escala = 40 µm. Abreviaturas: C, controle; AMO, aspirado de medula óssea; 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.

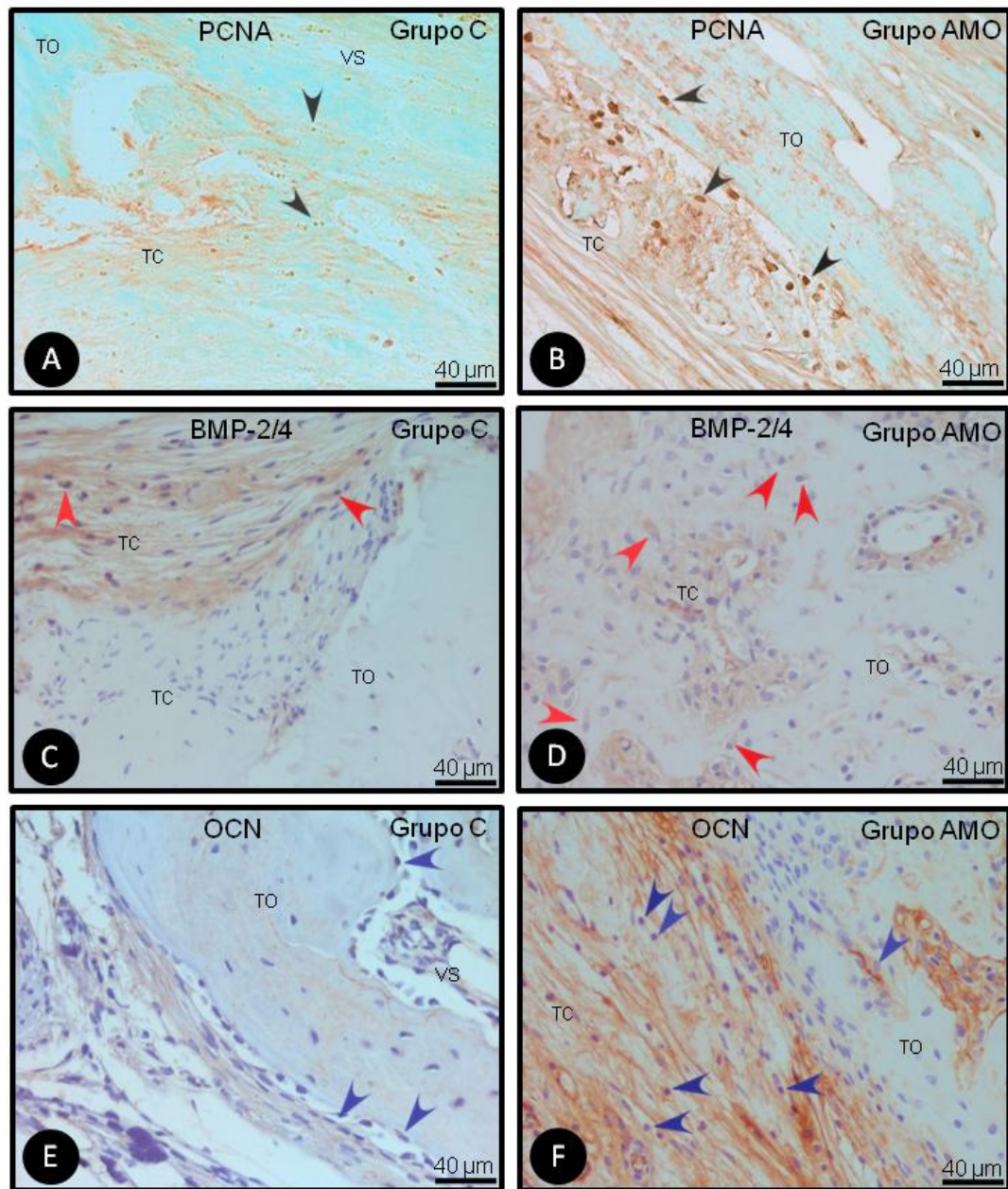


Figura 8. Imunomarcações para PCNA, BMP-2/4 e OCN no defeito cirúrgico, aos 30 dias pós-operatórios. Fotomicrografias mostrando células PCNA-positivas (cabeça de seta preta) nos grupos Controle (A) e AMO (B). Fotomicrografias mostrando células BMP-2/4-positivas (cabeça de seta vermelha) nos grupos Controle (C) e AMO (D). Fotomicrografias mostrando células OCN-positivas (cabeça de seta azul) nos grupos Controle (E) e AMO (F). Barra de escala = 40 µm. Abreviaturas: C, controle; AMO, aspirado de medula óssea; 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.

Médias e desvios-padrão de células PCNA-positivas, BMP-2/4-positivas e OCN-positivas para os grupos C, PRP, AMO, LLLT, PRP/LLLT e AMO/LLLT dos espécimes de 10 dias e 30 dias pós-operatórios, bem como as comparações inter-grupos, estão apresentadas nas Tabelas 2 e 3, respectivamente.

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	LLLT	PRP/LLLT	AMO/LLLT
PCNA	96,0 ± 4,8	135,3 ± 4,2	138,2 ± 9,1	148,0 ± 21,8	106,6 ± 54,8	153,2 ± 32,1*
BMP2/4	101,0 ± 5,3	133,0 ± 7,5*	125,6 ± 6,2	118,8 ± 5,4 [§]	115,8 ± 21,8	151,6 ± 7,3*
OCN	81,8 ± 2,8	124,0 ± 6,8	115,7 ± 5,9	94,3 ± 7,3 [§]	145,3 ± 8,5*	156,2 ± 8,2*

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

[§]Diferença significativa quando comparado ao Grupo AMO/LLLT ($P < 0,05$).

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.

Variável	C	PRP	AMO	LLLT	PRP/LLLT	AMO/LLLT
PCNA	24,7 ± 3,9	40,6 ± 11,5	75,4 ± 19,1	102,6 ± 8,5*	120,4 ± 36,7*	81,5 ± 26,2
BMP2/4	24,7 ± 3,7	40,0 ± 5,3	103,1 ± 4,9*	172,3 ± 14,6*	127,0 ± 25,7*	46,0 ± 17,0
OCN	37,1 ± 3,5	80,4 ± 9,3	113,5 ± 24,8*	149,3 ± 32,1*	127,0 ± 47,7*	92,7 ± 41,2

*Diferença significativa quando comparado ao Grupo C ($P < 0,05$).

4 DISCUSSÃO

No presente estudo, foram avaliados o AMO e o PRP, associados ou não à LLLT, para promoção do reparo ósseo.

O grupo AMO apresentou formação óssea significativamente maior que os grupos controle e LLLT, aos 30 dias pós-operatórios. Esses resultados favoráveis foram confirmados pelos resultados da análise imunoistoquímica, pois o grupo AMO apresentou, nesse tempo pós-operatório, maior diferenciação osteoblástica e maturação óssea quando comparado ao grupo controle, como demonstrado pelos números significativamente maiores de células BMP-2/4-positivas e OCN-positivas no grupo AMO. Estes resultados corroboram os resultados de estudo anterior do nosso grupo [10], onde se utilizou o mesmo modelo experimental e metodologia do presente estudo. Shirasu et al. [11] também relataram significativa formação óssea em defeitos na calvária de ratos preenchidos com enxerto de medula óssea autógena aos 30 dias pós-operatórios. Embora utilizando diferente modelo animal e metodologia, os dados do presente estudo também são corroborados pelo estudo de Krzymanski et al. [8], que mostraram regeneração óssea significativa de defeitos mandibulares em coelhos tratados apenas com AMO. Com os resultados do presente estudo, foi possível observar, ainda, que a otimização do processo de regeneração óssea obtida com o uso do AMO ocorreu em período precoce, pois este grupo já apresentou AON significativamente maior que o controle aos 10 dias pós-operatórios.

Sabe-se que o AMO contém eritrócitos, plasma, lipídeos e uma fração de células mononucleares (CMN), que são compostas por células-T, células-B, monócitos, células-tronco hematopoiéticas (CTH), células progenitoras endoteliais e CTM. Smiler et al. [9] demonstraram que o AMO contém porcentagem significativamente maior de CTM, CTH e células endoteliais que o sangue periférico. As CTM são um dos tipos celulares presentes na medula óssea que contribuem para a regeneração de tecidos mesenquimais, incluindo o osso

[37,38]. Tem sido demonstrado que as CTM apresentam alta capacidade de diferenciação osteogênica [38-40], principalmente as derivadas da medula óssea [41,42]. Na medula óssea, as CTM ocupam distintas localizações anatômicas e dividem seus nichos com muitos outros tipos celulares, incluindo osteoblastos e CTH. Esses três tipos celulares demonstram *cross-talk* e parecem regular, reciprocamente, o comportamento celular e o compromisso com a linhagem [43]. Tem sido demonstrado que as CTH são capazes de induzir a diferenciação osteogênica de CTM [44]. Assim, pode-se inferir que os resultados positivos na regeneração óssea observados no grupo AMO do presente estudo sejam devidos, principalmente, a um aumento significativo de CTM, CTH e células endoteliais no sítio da ferida cirúrgica. Neste contexto, é importante ressaltar que a osteogênese e angiogênese são consideradas processos interligados e intimamente regulados, envolvidos no crescimento, reparo e remodelação óssea [45]. Essa hipótese é corroborada pelos resultados da análise da citometria de fluxo do presente estudo, que mostraram que as amostras de AMO continham células que expressaram marcadores de superfície utilizados para identificação de CTM, CTH, células hematopoiéticas e células endoteliais, como observado em outros estudos [9,46,47]. A presença das CTM nas amostras de AMO também foi comprovada pelos testes *in vitro* de adesão ao plástico e diferenciação tri-linhagem, que mostraram não somente a presença das CTM nessas amostras, mas também que estas exibiram plenamente seu potencial de diferenciação em tri-linhagem [48].

É importante considerar, ainda, que os defeitos cirúrgicos do grupo AMO receberam células frescamente obtidas da medula óssea. Esta pode ser uma grande vantagem quando comparada às técnicas que utilizam CTM expandidas *in vitro*. Em uma revisão de literatura sobre CTM derivadas da medula óssea, Bara et al. [43] constataram que a maioria das abordagens terapêuticas com essas células conta com a fase de expansão celular *in vitro* para produzir grande quantidade dessas células antes da implantação, e que a literatura mostra claramente

que a fase de expansão *in vitro* causa alterações dramáticas no fenótipo das CTM que podem ter implicações muito significativas para o desenvolvimento de terapias efetivas, o que tem direcionado a atenção para o uso de medula óssea não processada ou de CMN frescamente isoladas. Em um nível celular, estas abordagens terapêuticas podem preservar a multipotencialidade das CTM e sua capacidade de auto-renovação. Isto pode não somente fortalecer o potencial terapêutico das mesmas, mas evitar atrasos no tratamento e altos custos financeiros associados com a fase de expansão *in vitro*. Portanto, pode-se hipotetizar que a utilização do AMO frescamente obtido no presente estudo, proporcionou CTM em estado mais primitivo no sítio cirúrgico, com características semelhantes às aquelas encontradas em seu meio nativo na medula óssea, e com possibilidade de continuar a exibir interações com as demais células da medula óssea que também constituem o AMO. É importante ressaltar, ainda, que um componente significativo do mecanismo de ação das CTM é que elas diretamente atenuam a resposta inflamatória [49], o que pode ter contribuído, também, para os resultados positivos obtidos no grupo AMO.

A densidade de energia utilizada no grupo LLLT foi $4,9 \text{ J/cm}^2$, de acordo com estudos anteriores que demonstraram que doses variando entre $1\text{-}10 \text{ J/cm}^2$ são efetivas em induzir a resposta bioestimulatória de células semelhantes a osteoblastos e aumentar a formação óssea [50,51]. Contudo, este grupo apresentou AON similar ao grupo controle, tanto aos 10 como aos 30 dias pós-operatórios. Esses resultados corroboram os achados da análise histológica de um estudo anterior [10], em que o grupo tratado com LLLT, seguindo o mesmo protocolo do Grupo LLLT do presente estudo, apresentou AON similar ao controle aos 30 dias pós-operatórios. No entanto, diferenças entre os grupos LLLT e controle foram observadas nos resultados da análise imunoistoquímica no presente estudo. O grupo LLLT apresentou números de células PCNA-positivas, BMP-2/4-positivas e OCN-positivas significativamente maiores que o controle aos 30 dias pós-operatórios, indicando que a proliferação celular, a

diferenciação osteoblástica e a maturação óssea estavam mais pronunciados no grupo LLLT quando comparado ao grupo controle. Esses achados são suportados por outros estudos que mostraram que a LLLT promove um significativo aumento na proliferação e diferenciação osteoblástica [52-54]. Contudo, a maior atividade celular observada no grupo LLLT quando comparado ao grupo controle não resultou em maior AON.

Os grupos PRP, PRP/LLLT e AMO/LLLT apresentaram quantidade de neoformação óssea similar aos do grupo AMO. Contudo, diferentemente do grupo AMO, não apresentaram diferenças estatísticas com o grupo controle. Talvez a maior variabilidade dos resultados dentro de cada um desses grupos e o tamanho da amostra tenham contribuído para que o teste estatístico aplicado não conseguisse detectar essas diferenças.

Sabe-se que a concentração aumentada de plaquetas no PRP provê um veículo para levar concentrações supra-fisiológicas de FC, tais como o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) e o fator de crescimento transformador- β (TGF- β), em um sítio de injúria, que estimulam a proliferação celular de várias células, especialmente a proliferação, diferenciação e função de osteoblastos [55-58]. De fato, no presente trabalho, o grupo PRP apresentou, aos 10 dias pós-operatórios, número de células BMP-2/4 significativamente maior que o grupo controle. Contudo, este aumento não resultou em AON significativamente maior quando comparada ao grupo controle, diferentemente do que ocorreu em estudos anteriores do nosso grupo, utilizando o mesmo modelo animal e mesma técnica de preparo do PRP [36,59]. Além das razões citadas anteriormente, é importante considerar, também, que as revisões de literatura têm indicado resultados inconsistentes do PRP no reparo ósseo [19,31,60,61].

No presente estudo, a LLLT não promoveu nenhum efeito adicional aos resultados obtidos com o PRP ou o AMO somente, pois a AON dos grupos PRP/LLLT e AMO/LLLT não diferiu significativamente daquela dos grupos PRP e AMO, respectivamente. Em estudo anterior realizado por nosso grupo, utilizando o mesmo modelo animal e metodologia, o

grupo tratado com a associação AMO/LLLT apresentou formação óssea significativamente maior que o grupo tratado somente com AMO [10]. Pode-se especular que talvez diferenças tenham ocorrido na composição do AMO coletado em ambos os estudos. É possível que, no estudo anterior, o AMO coletado e aplicado nos defeitos cirúrgicos contivesse uma menor quantidade de CMN viáveis quando comparado ao AMO coletado no presente estudo e, a LLLT pôde estimular, significativamente, a proliferação e diferenciação de todas essas células, dentre elas as CTM [62-65]. Seguindo esta linha de raciocínio, no presente estudo, a composição do AMO talvez tenha sido mais rica em CMN viáveis, das quais as CTM, CTH e células endoteliais fazem parte, e talvez essas células já estivessem exibindo seu potencial biológico máximo e, portanto, não tivessem condições de serem estimuladas adicionalmente pela LLLT. Infelizmente essas hipóteses não podem ser confirmadas, pois no estudo anterior do nosso grupo [10], não foi feita a análise de citometria de fluxo. Estudos adicionais, com amostras maiores, serão necessários para melhor esclarecer a real influência da LLLT sobre o AMO. O mesmo raciocínio poderia ser aplicado aos grupos PRP e PRP/LLLT, ou seja, talvez as células presentes nos defeitos cirúrgicos tratados com PRP somente já estivessem exibindo seu potencial biológico máximo devido aos efeitos estimulatórios dos FC presentes no PRP e, portanto, não pudessem ser estimuladas adicionalmente pela LLLT. Neste contexto, é importante ressaltar que, embora o trabalho clínico preliminar de Martins et al. [33] tenha demonstrado que a associação de PRP e LLLT melhorou a cicatrização da BRONJ em pacientes oncológicos, os autores não compararam essa terapia combinada com a terapia única com PRP ou com LLLT.

Dentro dos limites deste estudo, pode-se concluir que a terapia com AMO promoveu a regeneração óssea em defeitos de tamanho crítico em calvárias de ratos, tanto aos 10 dias como aos 30 dias pós-operatórios.

5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à “Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP” (FAPESP – São Paulo, SP, Brasil), pela concessão de Bolsa de Mestrado (Processo 2014/02094-5) à Eduarda de Lima Graciano Belem. Os autores agradecem, também, à professora Suely Regina Mogami Bomfim, da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba – UNESP, pela assistência nos procedimentos experimentais; à professora Elenice Deffune, da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, pela colaboração com as análises *in vitro* e por citometria de fluxo; e ao professor Edilson Ervolino, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, pela assessoria prestada nas análises histomorfométrica e imunoistoquímica deste estudo.

6 CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram que não possuem nenhum conflito de interesse.

7 REFERÊNCIAS

1. A. Atala, F.K. Kasper, A.G. Mikos, Engineering complex tissues, *Sci. Transl. Med.* 14 (2012) 160rv12, doi: 10.1126/scitranslmed.3004890.
2. P. Kasten, J. Vogel, F. Geiger, P. Niemeyer, R. Luginbühl, K. Szalay, The effect of platelet-rich plasma on healing in critical-size long-bone defects, *Biomaterials* 29 (2008) 3983-3992, doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.06.014.
3. A.I. Hoch, V. Mittal, D. Mitra, N. Vollmer, C.A. Zikry, J.K. Leach, Cell-secreted matrices perpetuate the bone-forming phenotype of differentiated mesenchymal stem cells, *Biomaterials* 74 (2016) 178-187, doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.10.003.

4. V.E. Santo, J. Ratanavaraporn, K. Sato, M.E. Gomes, J.F. Mano, R.L. Reis, Y. Tabata, Cell engineering by the internalization of bioinstructive micelles for enhanced bone regeneration, *Nanomedicine* 10 (2015) 1707-1721, doi: 10.2217/nnm.15.11.
5. G. Burastero, S. Scarfi, C. Ferraris, C. Fresia, N. Sessarego, F. Fruscione, F. Monetti, F. Scarfò, P. Schupbach, M. Podestà, G. Grappiolo, E. Zocchi, The association of human mesenchymal stem cells with BMP-7 improves bone regeneration of critical-size segmental bone defects in athymic rats, *Bone* 47 (2010) 117-126, doi: 10.1016/j.bone.2010.03.023.
6. S. Bansal, V. Chauhan, S. Sharma, R. Maheshwari, A. Juyal, S. Raghuvanshi, Evaluation of hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate mixed with bone marrow aspirate as a bone graft substitute for posterolateral spinal fusion, *Indian J. Orthop.* 43 (2009) 234-239, doi: 10.4103/0019-5413.49387.
7. M. Soltan, D. Smiler, H.S. Prasad, M.D. Rohrer, Bone block allograft impregnated with bone marrow aspirate, *Implant Dent.* 16 (2007) 329-339.
8. G. Krzymanski, M. Kalczak, W. Wiktor-Jedrzejczak, The use of bone-marrow-derived fibroblastoid cells and fresh bone marrow in the treatment of bone defects: an experimental study, *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 26 (1997) 55-60.
9. D. Smiler, M. Soltan, M. Albitar, Toward the identification of mesenchymal stem cells in bone marrow and peripheral blood for bone regeneration, *Implant Dent.* 17 (2008) 236-247, doi: 10.1097/ID.0b013e3181835b13.
10. M.J. Nagata, C.S. Santinoni, N.M. Pola, N.de Campos, M.R. Messori, S.R. Bomfim, E. Ervolino, S.E. Fucini, P.L. Faleiros, V.G. Garcia, A.F. Bosco, Bone marrow aspirate combined with low-level laser therapy: a new therapeutic approach to enhance bone healing, *J. Photochem. Photobiol. B.* 121 (2013) 6-14, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2013.01.013.

11. N. Shirasu, T. Ueno, Y. Hirata, A. Hirata, T. Kagawa, M. Kanou, M. Sawaki, M. Wakimoto, A. Ota, H. Imura, T. Matsumura, T. Yamada, E. Yamachika, K.Sano, Bone formation in a rat calvarial defect model after transplanting autogenous bone marrow with beta-tricalcium phosphate, *Acta Histochem.* 112 (2010) 270-277, doi: 10.1016/j.acthis.2009.01.003.
12. J.S. McDaniel, M. Pilia, V. Raut, J. Ledford, S.M. Shiels, J.C. Wenke, B. Barnes, C.R. Rathbone, Alternatives to autograft evaluated in a rabbit segmental bone defect, *Int. Orthop.* 40 (2016) 197-203, doi: 10.1007/s00264-015 2824-5.
13. G.A. Odri, R. Revert, C. Deschamps, M. Romih, Y. Maugars, D. Heymann, J. Delecrin, Effect of adding bone marrow to ceramic graft materials with different interconnectivities in lumbar arthrodesis: quantification of bone formation, *J. Orthop. Sci.* 18 (2013) 321-330, doi: 10.1007/s00776-012-0336-3.
14. M. Giannelli, F. Chellini, C. Sassoli, F. Francini, A. Pini, R. Squecco, D. Nosi, D. Bani, S. Zecchi-Orlandini, L. Formigli, Photoactivation of bone marrow mesenchymal stromal cells with diode laser: effects and mechanisms of action, *J. Cell. Physiol.* 228 (2013) 172-181, doi: 10.1002/jcp.24119.
15. J. Wang, W. Huang, Y. Wu, J. Hou, Y. Nie, H. Gu, J. Li, S. Hu, H. Zhang, MicroRNA-193 pro-proliferation effects for bone mesenchymal stem cells after low-level laser irradiation treatment through inhibitor of growth family, member 5, *Stem Cells Dev.* 21 (2012) 2508-2519, doi: 10.1089/scd.2011.0695.
16. Y.H. Wu, J. Wang, D.X. Gong, H.Y. Gu, S.S. Hu, H. Zhang, Effects of low-level laser irradiation on mesenchymal stem cell proliferation: a microarray analysis, *Lasers Med. Sci.* 27 (2012) 509-519, doi: 10.1007/s10103-011-0995-x.
17. M. Soleimani, E. Abbasnia, M. Fathi, H. Sahraei, Y. Fathi, G. Kaka, The effects of low-level laser irradiation on differentiation and proliferation of human bone marrow

- mesenchymal stem cells into neurons and osteoblasts--an in vitro study, *Lasers Med. Sci.* 27 (2012) 423-430, doi: 10.1007/s10103-011-0930-1.
18. E.A. Bayer, R. Gottardi, M.V. Fedorchak, S.R. Little, The scope and sequence of growth factor delivery for vascularized bone tissue regeneration, *J. Control. Release* 219 (2015) 129-140, doi: 10.1016/j.jconrel.2015.08.004.
 19. A. Malhotra, M.H. Pelletier, Y. Yu, W.R. Walsh, Can platelet-rich plasma (PRP) improve bone healing? A comparison between the theory and experimental outcomes, *Arch. Orthop. Trauma Surg.* 133 (2013) 153-165, doi: 10.1007/s00402-012-1641-1.
 20. A.T. Nurden, Platelets, inflammation and tissue regeneration, *Thromb. Haemost.* 105 (2011) S13-S33, doi: 10.1160/THS10-11-0720.
 21. G. Intini, The use of platelet-rich plasma in bone reconstruction therapy, *Biomaterials* 30 (2009) 4956-4966, doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.05.055.
 22. D.M. Dohan, J. Choukroun, A. Diss, S.L. Dohan, A.J. Dohan, J. Mouhyi, B. Gogly, Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part II: platelet-related biologic features, *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 101 (2006) e45-e50.
 23. R.E. Marx, E.R. Carlson, R.M. Eichstaedt, S.R. Schimmele, J.E. Strauss, K.R. Georgeff, Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts, *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 85 (1998) 638-646.
 24. K.A. Kumar, J.B. Rao, B. Pavan Kumar, A.P. Mohan, K. Patil, K. Parimala, 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 (2013) 387-394, doi: 10.1007/s12663-012-0466-3.

25. D.P. Magesh, C. Kumaravelu, G.U. Maheshwari, Efficacy of PRP in the reconstruction of mandibular segmental defects using iliac bone grafts, *J. Maxillofac. Oral Surg.* 12 (2013) 160-167, doi: 10.1007/s12663-012-0418-y.
26. F. Inchingolo, M. Tatullo, M. Marrelli, A.M. Inchingolo, A.D. Inchingolo, G. Dipalma, P. Flace, F. Girolamo, A. Tarullo, L. Laino, R. Sabatini, A. Abbinante, R. Cagiano, 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 (2012) 1222-1226.
27. M. Nagata, M. Messoria, R. Okamoto, N. Campos, N. Pola, L. Esper, M. Sbrana, S. Fucini, V. Garcia, A.Bosco, Influence of the proportion of particulate autogenous bone graft/platelet-rich plasma on bone healing in critical-size defects: an immunohistochemical analysis in rat calvaria, *Bone* 45 (2009) 339-345, doi: 10.1016/j.bone.2009.04.246.
28. G.M. Raghoobar, J. Schortinghuis, R.S. Liem, J.L. Ruben, J.E. van der Wal, A. Vissink, Does platelet-rich plasma promote remodeling of autologous bone grafts used for augmentation of the maxillary sinus floor?, *Clin. Oral Implants Res.* 16 (2005) 349-356.
29. B.H. Choi, C.J. Im, J.Y. Huh, J.J. Suh, S.H. Lee, Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in autogenous bone graft, *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 33 (2004) 56-59.
30. T.L. Aghaloo, P.K. Moy, E.G. Freymiller, Investigation of platelet-rich plasma in rabbit cranial defects: a pilot study, *J. Oral Maxillofac. Surg.* 60 (2002) 1176-1181.
31. A. Pocaterra, S. Caruso, S. Bernardi, L. Scagnoli, M.A. Continenza, R. Gatto, 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 (2016) 1027-1034, doi: 10.1016/j.ijom.2016.02.012.

32. R.E. Marx, Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP?, *Implant Dent.* 10 (2001) 225-228.
33. M.A. Martins, M.D. Martins, C.A. Lascalea, M.M. Curi, C.A. Migliorati, C.A. Tenis, M.M. Marques, Association of laser phototherapy with PRP improves healing of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in cancer patients: a preliminary study, *Oral Oncol.* 48 (2012) 79-84, doi: 10.1016/j.oraloncology.2011.08.010.
34. M. Olban, B. Wachowicz, M. Koter, M. Bryszewska, The biostimulatory effect of red laser irradiation on pig blood platelet function, *Cell Biol. Int.* 22 (1998) 245-248.
35. P. Gresner, C. Watała, L. Sikurová, The effect of green laser light irradiation on whole blood platelets, *J. Photochem. Photobiol. B.* 79 (2005) 43-50.
36. M.R. Messoria, M.J. Nagata, R.C. Mariano, R.C. Dornelles, S.R. Bomfim, S.E. Fucini, V.G. Garcia, A.F. Bosco, Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma: a histologic and histometric study in rat calvaria, *J. Periodontal Res.* 43 (2008) 217-223, doi: 10.1111/j.1600-0765.2007.01017.x.
37. O.M. Maria, R. Khosravi, E. Mezey, S.D. Tran, Cells from bone marrow that evolve into oral tissues and their clinical applications, *Oral Dis.* 13 (2007) 11-16.
38. M.F. Pittenger, A.M. Mackay, S.C. Beck, R.K. Jaiswal, R. Douglas, J.D. Mosca, M.A. Moorman, D.W. Simonetti, S. Craig, D.R. Marshak, Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284 (1999) 143-147.
39. R.A. Panepucci, J.L. Siufi, W.A. Silva Jr, R. Proto-Siquiera, L. Neder, M. Orellana, V. Rocha, D.T. Covas, M.A. Zago, Comparison of gene expression of umbilical cord vein and bone marrow-derived mesenchymal stem cells, *Stem Cells* 22 (2004) 1263-1278.
40. Y. Jiang, B.N. Jahagirdar, R.L. Reinhardt, R.E. Schwartz, C.D. Keene, X.R. Ortiz-Gonzalez, M. Reyes, T. Lenvik, T. Lund, M. Blackstad, J. Du, S. Aldrich, A. Lisberg,

- W.C. Low, D.A. Largaespada, C.M. Verfaillie, Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow, *Nature* 418 (2002) 41-49.
41. D.L. Hutton, W.L. Grayson, Stem cell-based approaches to engineering vascularized bone, *Curr. Opin. Chem. Eng.* 3 (2014) 75-82, doi:10.1016/j.coche.2013.12.002.
 42. R.K. chneider, A. Puellen, R. Kramann, K. Raupach, J. Bornemann, R. Knuechel, A. Pérez-Bouza, S. Neuss, The osteogenic differentiation of adult bone marrow and perinatal umbilical mesenchymal stem cells and matrix remodelling in three-dimensional collagen scaffolds, *Biomaterials* 31 (2010) 467-480, doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.09.059.
 43. J.J. Bara, R.G. Richards, M. Alini, M.J. Stoddart, Concise review: Bone marrow-derived mesenchymal stem cells change phenotype following in vitro culture: implications for basic research and the clinic, *Stem Cells* 32(2014)1713-1723, doi: 10.1002/stem.1649.
 44. Y. Jung, J. Song, Y. Shiozawa, J. Wang, Z. Wang, B. Williams, A. Havens, A. Schneider, C. Ge, R.T. Franceschi, L.K. McCauley, P.H. Krebsbach, R.S. Taichman, Hematopoietic stem cells regulate mesenchymal stromal cell induction into osteoblasts thereby participating in the formation of the stem cell niche, *Stem Cells* 26 (2008) 2042-2051, doi: 10.1634/stemcells.2008-0149.
 45. G. Li, Y. Cui, L. McIlmurray, W.E. Allen, H. Wang, rhBMP-2, rhVEGF(165), rhPTN and thrombin-related peptide, TP508 induce chemotaxis of human osteoblasts and microvascular endothelial cells, *J. Orthop. Res.* 23 (2005) 680-685.
 46. C.C. Niu, S.S. Lin, L.J. Yuan, L.H. Chen, T.L. Pan, C.Y. Yang, P.L. Lai, W.J. Chen, 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 (2014) 32, doi: 10.1186/1749-799X-9-32.

47. I. Copland, K. Sharma, L. Lejeune, N. Eliopoulos, D. Stewart, P. Liu, K. Lachapelle, J. Galipeau, CD34 expression on murine marrow-derived mesenchymal stromal cells: impact on neovascularization, *Exp. Hematol.* 36 (2008) 93-103.
48. M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, R. Deans, A. Keating, D.J. Prockop, E. Horwitz, Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement, *Cytotherapy* 8 (2006) 315-317.
49. S. Maxson, E.A. Lopez, D. Yoo, A. Danilkovitch-Miagkova, M.A. Leroux, Concise review: role of mesenchymal stem cells in wound repair, *Stem Cells Transl. Med.* 1 (2012) 142-149, doi: 10.5966/sctm.2011-0018.
50. A.H. Acar, U. Yolcu, S. Altindis, M. Gül, H. Alan, Bone regeneration by low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasound therapy in the rabbit calvarium, *Arch. Oral Biol.* 61 (2016): 60-65, doi: 10.1016/j.archoralbio.2015.10.011.
51. S. Incerti Parenti, L. Checchi, M. Fini, M. Tschon, Different doses of low-level laser irradiation modulate the in vitro response of osteoblast-like cells, *J. Biomed. Opt.* 19 (2014) 108002, doi: 10.1117/1.JBO.19.10.108002.
52. R. Medina-Huertas, F.J. Manzano-Moreno, E. De Luna-Bertos, J. Ramos-Torrecillas, O. García-Martínez, C. Ruiz, The effects of low-level diode laser irradiation on differentiation, antigenic profile, and phagocytic capacity of osteoblast-like cells (MG-63), *Lasers Med. Sci.* 29 (2014), 1479-1484, doi: 10.1007/s10103-014-1557-9.
53. M.M. Jawad, A. Husein, A. Azlina, M.K. Alam, R. Hassan, R. Shaari, Effect of 940 nm low-level laser therapy on osteogenesis in vitro, *J. Biomed. Opt.* 18 (2013) 128001, doi: 10.1117/1.JBO.18.12.128001.
54. N. Bloise, G. Ceccarelli, P. Minzioni, M. Vercellino, L. Benedetti, M.G. De Angelis, M. Imbriani, L. Visai, Investigation of low-level laser therapy potentiality on

- proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells in the absence/presence of osteogenic factors, *J. Biomed. Opt.* 18 (2013) 128006, doi: 10.1117/1.JBO.18.12.128006.
55. K.D. Hankenson, K. Gagne, M. Shaughnessy, Extracellular signaling molecules to promote fracture healing and bone regeneration, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 94 (2015) 3-12, doi: 10.1016/j.addr.2015.09.008.
56. W. Chen, D.J. Baylink, J. Brier-Jones, A. Neises, J.B. Kiroyan, C.H. Rundle, K.H. Lau, X.B. Zhang, PDGFB-based stem cell gene therapy increases bone strength in the mouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 112 (2015) E3893-E3900, doi:10.1073/pnas.1501759112.
57. L. Zhao, S. Jiang, B.M. Hantash, Transforming growth factor beta1 induces osteogenic differentiation of murine bone marrow stromal cells, *Tissue Eng. Part A* 16 (2010) 725-733, doi: 10.1089/ten.TEA.2009.0495.
58. F. Ng, S. Boucher, S. Koh, K.S. Sastry, L. Chase, U. Lakshmipathy, C. Choong, Z. Yang, M.C. Vemuri, M.S. Rao, V. Tanavde, 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 (2008) 295-307, doi: 10.1182/blood-2007-07-103697.
59. M.R. Messoria, M.J. Nagata, R.C. Dornelles, S.R. Bomfim, F.A. Furlaneto, L.G. de Melo, T.M. Deliberador, A.F. Bosco, V.G. Garcia, S.E. Fucini, Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma activated by two different methods. A histologic and histometric study in rat calvaria, *J. Periodontal Res.* 43 (2008) 723-729, doi: 10.1111/j.1600-0765.2008.01084.x.

60. A.S. Plachokova, D. Nikolidakis, J. Mulder, J.A. Jansen, N.H. Creugers, Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in dentistry: a systematic review, *Clin. Oral Implants Res.* 19 (2008) 539-545, doi: 10.1111/j.1600-0501.2008.01525.x.
61. C.A. Lemos, C.C. Mello, D.M. dos Santos, F.R. Verri, M.C. Goiato, E.P. Pellizzer, 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 (2016) 517-525, doi: 10.1016/j.ijom.2015.07.012.
62. M. Giannelli, F. Chellini, C. Sassoli, F. Francini, A. Pini, R. Squecco, D. Nosi, D. Bani, S. Zecchi-Orlandini, L. Formigli, Photoactivation of bone marrow mesenchymal stromal cells with diode laser: effects and mechanisms of action, *J. Cell Physiol.* 228 (2013) 172–181, doi: 10.1002/jcp.24119.
63. J. Wang, W. Huang, Y. Wu, J. Hou, Y. Nie, H. Gu, J. Li, S. Hu, H. Zhang, MicroRNA-193 pro-proliferation effects for bone mesenchymal stem cells after low-level laser irradiation treatment through inhibitor of growth family, member 5, *Stem Cells Dev.* 21 (2012) 2508–2519.
64. F.P. Eduardo, D.F. Bueno, P.M. de Freitas, M.M. Marques, M.R. Passos-Bueno, C.P. Eduardo, M. Zatz, Stem cell proliferation under low intensity laser irradiation: a preliminary study, *Lasers Surg. Med.* 40 (2008) 433-438, doi: 10.1002/lsm.20646.
65. L. Abramovitch-Gottlib, T. Gross, D. Naveh, S. Geresh, S. Rosenwaks, I. Bar, R. Vago, Low level laser irradiation stimulates osteogenic phenotype of mesenchymal stem cells seeded on a three-dimensional biomatrix, *Lasers Med. Sci.* 20 (2005) 138-146.

Anexos

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



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 à terapia com laser em baixa intensidade no reparo ósseo. Estudo histomorfométrico e imunoistoquímico**", Processo FOA nº 2014-00545, 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.

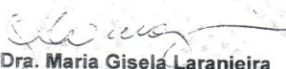
DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 21 de Março de 2016.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Bone marrow aspirate and platelet-rich plasma combined or not with low-level laser therapy on bone healing. A histomorphometric and immunohistochemical study**", Protocol FOA nº 2014-00545, 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.

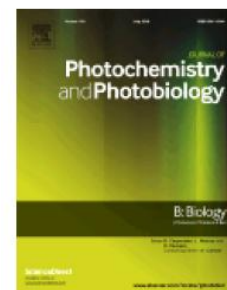
VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: February 21, 2016.

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

Anexo B – Normas para publicação segundo o periódico Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology



ISSN: 1011-1344

DESCRIPTION

The *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* provides a forum for the publication of papers relating to the various aspects of **photobiology**, as well as a means for communication in this multidisciplinary field.

The scope includes:

- **Bioluminescence**
- **Chronobiology**
- **DNA repair**
- **Environmental photobiology**
- **Nanotechnology in photobiology**
- **Photocarcinogenesis**
- **Photochemistry of biomolecules**
- **Photodynamic therapy**
- **Photomedicine**
- **Photomorphogenesis**
- **Photomovement**
- **Photoreception**
- **Photosensitization**
- **Photosynthesis**
- **Phototechnology**
- **Spectroscopy of biological systems**
- **UV and visible radiation effects and vision.**

Online article submission is available via: <http://ees.elsevier.com/jphotobiol/>.

Benefits to authors

We also provide many author benefits, such as free PDFs, a liberal copyright policy, special discounts on Elsevier publications and much more. Please click here for more information on our author services.

Please see our Guide for Authors for information on article submission. If you require any further information or help, please visit our support pages: <http://support.elsevier.com>

AUDIENCE

Biologists, Biochemists, Botanists, Biophysicists, Medical Researchers

IMPACT FACTOR

2015: 3.035 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2016

ABSTRACTING AND INDEXING

BIOSIS

Elsevier BIOBASE

Cambridge Scientific Abstracts

Chemical Abstracts

Current Contents
 MEDLINE®
 Metals Abstracts
 EMBASE
 Engineering Index
 PASCAL/CNRS
 Physics Abstracts
 Physikalische Berichte
 Polymer Contents
 Research Alert
 Science Citation Index
 Scopus
 EMBiology

EDITORIAL BOARD

Editors

R. Carpentier, Dept. de Chimie-Biologie, Université du Québec à Trois Rivières, Québec, G9A 5H7, Québec, Canada, 3351, Boulevard des Forges, C.P. 500

L. Matyus, Dept. of Biophysics and Cell Biology, Medical and Health Science Center, University of Debrecen, Nagyerdei kr. 98, H-4012, Debrecen, Hungary

D. Ramaiah, CSIR-NEIST, 785006, Jorhat, Assam, India

Biophysics, Biomolecular spectroscopy, Photodynamic Therapy, Dermatology, Photomedicine.

L. Matyus, Dept. of Biophysics and Cell Biology, Medical and Health Science Center, University of Debrecen, Nagyerdei kr. 98, H-4012, Debrecen, Hungary

D. Ramaiah, CSIR-NEIST, 785006, Jorhat, Assam, India

Photosynthesis, Environmental photobiology, Photosensitisers, Oxygen radicals, DNA repair, UV/VIS effects.

R. Carpentier, Dept. de Chimie-Biologie, Université du Québec à Trois Rivières, Québec, G9A 5H7, Québec, Canada, 3351, Boulevard des Forges, C.P. 500

D. Ramaiah, CSIR-NEIST, 785006, Jorhat, Assam, India

Founding Editor

G. Jori, Padova, Italy

Editorial Board

S.I. Allakhverdiev, Pushchino, Moscow Region, Russian Federation

D. Averbeck, Orsay Cedex, France

R.V. Bensasson, Paris, France

N. Chattopadhyay, Kolkata, India

G. Garab, Szeged, Hungary

I. Gryczynski, Fort Worth, Texas, USA

R. Hamblin, Boston, Massachusetts, USA

H .J-M. Hou, Montgomery, Alabama, USA

A Jenei, Debrecen, Hungary

A. Juzeniene, Oslo, Norway

T. Maisch, Regensburg, Germany

M. Nyitrai, Pécs, Hungary

J. Plásek, Prague, Czech Republic

B. Pogue, Hanover, New Hampshire, USA

H. Sies, Düsseldorf, Germany

K. Sonoike, Tokyo, Japan

R Subramanyam, Hyderabad, India

H.A. Tajmir-Riahi, Trois-Rivières, Quebec, Canada

M. Wainwright, Liverpool, UK

K.D. Winckler

P.-K. Wong, Hong Kong, China

J. Yu, Wuhan, China

GUIDE FOR AUTHORS

Your Paper Your Way

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

To find out more, please visit the Preparation section below.

INTRODUCTION

The *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* (JPPB) welcomes Invited review articles and original papers not previously published.

The journal provides a forum for the publication of papers relating to the various aspects of photobiology, as well as a means for communication in this multidisciplinary field. The scope includes:

- bioluminescence
- chronobiology
- DNA repair
- environmental photobiology
- nanotechnology in photobiology
- photocarcinogenesis
- photochemistry of biomolecules
- photomedicine
- photomorphogenesis
- photomovement
- photoreception
- photosensitization
- photosynthesis
- phototechnology
- spectroscopy of biological systems
- UV and visible radiation effects
- vision

This journal is cited by the following Abstracting Services: BIOSIS, Cambridge Scientific Abstracts, Chemical Abstracts, Current Contents, Elsevier BIOBASE/Current Awareness in Biological Sciences, EMBASE/Excerpta Medica, Embiology, Engineering Index, Medlar's System, Metals Abstracts, PASCAL/CNRS, Physics Abstracts, Physikalische Berichte, Polymer Contents, Research Alert™, Science Citation Index, Scopus.

Contact Details for Submission

Authors are requested to submit their article to the Editor responsible for the topic involved:

Dr. Laszlo Matyus: Biophysics, Biomolecular spectroscopy, Photodynamic Therapy, Dermatology, Photomedicine.

Dr. Robert Carpentier: Photosynthesis, Environmental photobiology, Photosensitisers, Oxygen radicals, DNA repair, UV/VIS effects.

Dr. Ramaiah: Photochemistry of biomolecules, Photodynamic therapy, Photosensitization, Molecular probes, Phototechnology, Nanotechnology in photobiology.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication.

Declaration of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work.

Submission declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' section of our ethics policy for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see more information on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Exclusive License Agreement' (more information). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license.

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. More information. *Elsevier supports responsible sharing*

Find out how you can share your research published in Elsevier journals.

Role of the funding source

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

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the Open Access Publication Fee. Details of existing agreements are available online.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open Access

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

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs.
- No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CC BY)

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

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 3300**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our green open access page for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is

formally published online in its final and fully citable form. This journal has an embargo period of 24 months.

Elsevier Publishing Campus

The Elsevier Publishing Campus (www.publishingcampus.com) is an online platform offering free lectures, interactive training and professional advice to support you in publishing your research. The College of Skills training offers modules on how to prepare, write and structure your article and explains how editors will look at your paper when it is submitted for publication. Use these resources, and more, to ensure that your submission will be the best that you can make it.

Language (usage and editing services)

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

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail. For submitting your manuscript to JPPB please go to our Elsevier Editorial System (EES) Website at: <http://ees.elsevier.com/jphotochem/> For technical support during the submission process, please visit www.elsevier.com/submissionsupport. For general questions, contact Dr. Robert Carpentier (Robert.Carpentier@uqtr.ca), Dr. Laszlo Matyus (lmatyus@med.unideb.hu), or Dr. Dominic Robinson (d.robinson@erasmusmc.nl).

Referees

Please submit, with the manuscript, the names and addresses of 5 potential referees. The referees should not be editorial board members or from the same institute or geographical region as the authors.

PREPARATION

NEW SUBMISSIONS

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

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

References

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

Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction,

Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions. If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes.

Divide the article into clearly defined sections.

Figures and tables embedded in text

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

REVISED SUBMISSIONS

Use of word processing software

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier). See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

LaTeX

You are recommended to use the Elsevier article class `elsarticle.cls` to prepare your manuscript and BibTeX to generate your bibliography. Our LaTeX site has detailed submission instructions, templates and other information.

Article structure

Subdivision - numbered sections

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

Introduction

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

Material and methods

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

Theory/calculation

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

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

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

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all

affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address.

Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**

- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

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

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view Example Graphical Abstracts on our information site.

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

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view example Highlights on our information site.

Keywords

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

Abbreviations

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

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise.

List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding. If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Nomenclature and Units

Nomenclature and units. Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). The only exception is the use of min, h, d and a as units for elapsed time, though never when combined algebraically with other units. If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. Consult the IUPAC "Glossary of Terms Used in Photochemistry" for the correct terminology (source: The Spectrum, Bowling Green, Vol.16, 1, 2003, p 16), (online: www.bgsu.edu/departments/photochem), (cited link: http://www.aspjournals.com/auth_instruct.html) UV ranges. The official UV ranges as defined by the CIE must be used:

UV-A: 400-315nm

UV-B: 315-280nm

UV-C: 280-100nm

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

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

Artwork

Image manipulation

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly.

For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.

- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files.

A detailed guide on electronic artwork is available.

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

Formats

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

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'. TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi. TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi. TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

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

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. Further information on the preparation of electronic artwork.

Figure captions

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

Text graphics

Text graphics may be embedded in the text at the appropriate position. If you are working with LaTeX and have such features embedded in the text, these can be left. See further under Electronic artwork.

Tables

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

References

Citation in text

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

Reference links

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

A DOI can be used to cite and link to electronic articles where an article is in-press and full citation details are not yet known, but the article is available online. A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <http://dx.doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Web references

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

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley and Zotero, as well as EndNote. Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and

citations as shown in this Guide. Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link: <http://open.mendeley.com/use-citation-style/journal-of-photochemistry-and-photobiology-b-biology>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plugins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference formatting

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

Reference Style

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

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

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

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] B.K. Armstrong, A. Kricker, The epidemiology of UV induced skin cancer, J. Photochem. Photobiol. B 63 (2001) 8-18.

Reference to a book:

[2] W. Strunk Jr., E.B. White, The Elements of Style, third ed., Macmillan, New York, 1979.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] G.R. Mettam, L.B. Adams, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), Introduction to the Electronic Age, E-Publishing, Inc., New York, 1994, pp. 281-304.

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary material

Supplementary material can support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Please note that such items are published online exactly as they are submitted; there is no typesetting involved (supplementary data supplied as an Excel file or as a PowerPoint slide will appear as such online). Please submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. If you wish to make any changes to supplementary data during any stage of the process, then please make sure to provide an updated file, and do not annotate any corrections on a previous version. Please also make sure to switch off the 'Track Changes' option in any Microsoft Office files as these will appear in the published supplementary file(s). For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages.

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving readers access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). More information and a full list of supported databases.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article.

AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Interactive plots

This journal enables you to show an Interactive Plot with your article by simply submitting a data file. Full instructions.

Submission checklist

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

Ensure that the following items are present:

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

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded, and contain:

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

Further considerations

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

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

- Indicate clearly whether or not color or black-and-white in print is required.

For any further information please visit our Support Center.

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

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

for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

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

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized Share Link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For no extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's Webshop. Corresponding authors who have published their article open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

Track your submitted article

Track your accepted article

You are also welcome to contact the Elsevier Support Center.

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