

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

MESTRADO EM PRÓTESE DENTÁRIA

THAISA BARIZAN BORDIN

**ANÁLISE COMPARATIVA *IN VITRO* DA CITOTOXICIDADE DOS ÁCIDOS  
HIALURÔNICOS DE ALTO E BAIXO PESO MOLECULAR EM ENXERTIA ÓSSEA**

Porto Alegre

2014

THAISA BARIZAN BORDIN

**ANÁLISE COMPARATIVA *IN VITRO* DA CITOTOXICIDADE DOS ÁCIDOS  
HIALURÔNICOS DE ALTO E BAIXO PESO MOLECULAR EM ENXERTIA ÓSSEA**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Odontologia, na área de Prótese Dentária, pelo Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia, da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Linha de Pesquisa: Técnicas e Aparelhos em Odontologia.

**Orientador: Prof. Dr. Eduardo Rolim Teixeira**

Porto Alegre

2014

B729a Bordin, Thaisa Barizan  
Análise comparativa *in vitro* da citotoxicidade dos ácidos hialurônicos de alto e baixo peso molecular em exérgia óssea. / Thaisa Barizan Bordin. – Porto Alegre, 2014.  
46 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.  
Orientação: Prof. Dr. Eduardo Rolim Teixeira

1. Odontologia. 2. Ácido Hialurônico. 3. Transplante Ósseo. 4. Engenharia tecidual. I. Teixeira, Eduardo Rolim. II. Título.

CDD 617.69

Ficha Catalográfica elaborada por  
Sabrina Vicari  
CRB 10/1593

THAISA BARIZAN BORDIN

**ANÁLISE COMPARATIVA *IN VITRO* DA CITOTOXICIDADE DOS ÁCIDOS  
HIALURÔNICOS DE ALTO E BAIXO PESO MOLECULAR EM ENXERTIA ÓSSEA**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Odontologia, na área de Prótese Dentária, pelo Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia, da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Linha de Pesquisa: Técnicas e Aparelhos em Odontologia.

Aprovada em \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA:**

Prof. Dr. Eduardo Rolim Teixeira

---

Prof. Dr. Rogério Belle de Oliveira

---

Prof. Dr. Marcel Fasolo de Paris

---

À minha profissão de odontóloga e à comunidade  
científica dedico esta pesquisa.

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por ter me dado forças e iluminado meu caminho para que pudesse concluir mais uma etapa da minha vida.

A minha **família**, a qual me apoia em todos os momentos, por todo amor e incentivo.

Agradeço aquele que me acolheu de braços abertos, me conduzindo pelos caminhos da pesquisa com paciência e maestria: meu orientador, **Prof. Dr. Eduardo Rolim Teixeira**. Obrigada por sugerir um assunto pouco pesquisado na área de prótese dentária e abrir meus horizontes, assim como por sua atenção e dedicação na orientação de cada passo deste trabalho. Quero expressar o meu reconhecimento e minha admiração.

Ao meu colega, **Dr. Carlos Augusto Accorsi Ribeiro**, pela amizade, companheirismo e total dedicação para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

Ao meu colega, **Dr. Daniel Gonçalves Boeckel**, por todo apoio e suporte dado para a realização desta pesquisa.

Ao CNPq por disponibilizar a oportunidade de realizar esta pesquisa e curso.

A toda equipe do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Instituto de Pesquisas Biomédicas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Principalmente à coordenadora deste departamento **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Denise Cantarelli Machado** e ao biólogo **Fágner Henrique Heldt**, sem o qual esta dissertação não teria sido possível.

Ao **Prof. Sérgio Kato** pelo auxílio com a análise estatística.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da PUCRS, na pessoa de sua coordenadora, **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Maria Spohr**.

A todos os **professores** do Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da PUCRS. Assim como a todos os **funcionários**.

Meu muito obrigada!

## RESUMO

Nas últimas décadas, técnicas envolvendo engenharia tecidual têm sido reportadas na literatura como opção alternativa aos enxertos autógenos convencionais para correção de defeitos ósseos e posterior instalação de implantes dentários. Estas buscam basicamente um material que apresente as mesmas propriedades biológicas do osso autógeno sem seus fatores limitantes. Tal tecnologia necessita, entre outros componentes, de um *scaffold* para as células, onde o ácido hialurônico, um glicosaminoglicano natural, parece ter características adequadas para exercer este papel. Ele exerce funções biológicas diferentes dependendo do seu peso molecular, que pode ser classificado em alto (> 1000 kDa), baixo (de 50 a 1000 kDa) ou baixíssimo (< 50 kDa). Além disso, no organismo humano há a presença da hialuronidase, enzima que degrada o ácido hialurônico em fragmentos menores, elementos estes que possivelmente podem influenciar a resposta celular. Desta forma, este estudo buscou avaliar, *in vitro*, a influência da enzima hialuronidase (HIAL) sobre o ácido hialurônico de alto (AH-APM) e baixo peso molecular (AH-BPM), bem como seu possível potencial citotóxico sobre células da linhagem NIH-3T3. Para tal, foi realizado o teste de MTT analisando a viabilidade celular dos seguintes grupos: (G1) Células + AH-APM; (G2) Células + AH-BPM; (G3) Células + AH-APM + HIAL; (G4) Células + AH-BPM + HIAL; (G5) Células + AH-APM + Hidroxiapatita; (G6) Células + AH-BPM + Hidroxiapatita; (G7) Células + AH-APM + HIAL + Hidroxiapatita; (G8) Células + AH-BPM + HIAL + Hidroxiapatita; (G9) Células (controle positivo); (G10) Células + hipoclorito (controle negativo). A viabilidade celular média de cada grupo foi: (G1) 76,0%, (G2) 63,3%, (G3) 67,4%, (G4) 76,5%, (G5) 57,6%, (G6) 60,8%, (G7) 64,4%, (G8) 74,3%, (G9) 100% e (G10) 12,4%. Os resultados indicaram que todos os grupos apresentaram viabilidade celular significativamente superior ao controle negativo. E apesar de não haver diferença significativa entre os grupos experimentais, somente os grupos G1, G4 e G8 não diferiram do controle positivo. O AH-APM apresentou melhor viabilidade na ausência da enzima hialuronidase, enquanto que o AH-BPM proporciona uma melhor viabilidade celular na presença desta enzima.

Palavras-chave: Citotoxicidade. Ácido Hialurônico. Hialuronidase. Engenharia de Tecidos. Enxertos Ósseos.

## ABSTRACT

In recent decades, tissue engineering techniques have been reported in the literature as an alternative to conventional autogenous grafts for bone defects and subsequent installation of dental implants, combining a material with the same biological properties of autogenous bone without its limiting factors. This technology requires a carrier for the cells, where hyaluronic acid, a natural glycosaminoglycan, appears to have suitable characteristics to carry out this role. It exerts various biological functions depending on its molecular weight, which can be classified as high (> 1000 kDa), low (from 50 to 1000 kDa) or very low (<50 kDa). Furthermore, there is the hyaluronidase, an enzyme that degrades hyaluronic acid into smaller fragments, influencing the cellular response. Thus, this study aimed to evaluate in vitro the influence of the enzyme hyaluronidase (HYAL) on the high hyaluronic acid (HA-HMW) and low molecular weight (HA-LMW) and their potential cytotoxicity on NIH - 3T3 cells. The MTT assay was performed analyzing cell viability of the following groups: (G1) Cells + HA-HMW; (G2) Cells + HA- LMW; (G3) Cells + HA-HMW + HYAL; (G4) Cells + HA-LMW + HYAL; (G5) Cells + HA-HMW + hydroxyapatite; (G6) Cells + HA-LMW + hydroxyapatite; (G7) Cells + HA-HMW + HYAL + hydroxyapatite; (G8) Cells + HA-LMW + HYAL + hydroxyapatite; (G9) Cells (positive control); (G10) Cells + hypochlorite (negative control). The cell viability for each group were as follows: (G1) 76,0%, (G2) 63,3%, (G3) 67,4%, (G4) 76,5%, (G5) 57,6%, (G6) 60,8%, (G7) 64,4%, (G8) 74,3%, (G9) 100% e (G10) 12,4%. It was found that all groups had significantly higher cell viability compared to the negative control. And although there was no significant difference between experimental groups, only the G1, G4 and G8 groups did not differ significantly from the positive control. Therefore, HA-HMW had better viability in the absence of enzyme hyaluronidase, although HA-LMW provided greater cell viability in the presence of the enzyme. Results indicated that the low-weight hyaluronic acid might be applicable for tissue engineering grafting techniques.

Key-words: Cytotoxicity. Hyaluronic Acid. Hyaluronidase. Tissue Engineering. Bone Grafting.



## LISTA DE TABELAS E ILUSTRAÇÕES

**Tabela 1 – Tratamentos e o respectivo volume de cada componente por poço.....17**

**Figura 1: Viabilidade celular de cada grupo, expressa em porcentagem.....21**

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AH	Ácido hialurônico
AH-APM	Ácido hialurônico de alto peso molecular
AH-BPM	Ácido hialurônico de baixo peso molecular
HIAL	Hialuronidase
HP	Hidroxiapatita
kDa	Quilo daltons
MDa	Milhões de daltons
DMEM	Meio de Eagle modificado por <i>Dulbecco</i>
SFB	Soro fetal bovino
DPBS	Fosfato de <i>Dulbecco</i> tamponado salino
MTT 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2il-tetrazólico	<i>Metil tetrazolium</i>
UTR	Unidade redutora de turbidez
$\beta$ -TCP	Beta tricálcio fosfato
Ph	Potencial hidrogeniônico
nm	Nanômetro
mg	Miligramas
ml	Mililitro
$\mu$ l	Microlitros
ANOVA	Análise de variância múltipla
DMSO	Dimetil sulfóxido

Artigo escrito nas normas da revista Oral Surgery Oral Medicine  
Oral Pathology Oral Radiology (<http://www.oooojournal.net>).

## SUMÁRIO

<b>Página de título.....</b>	<b>11</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>13</b>
<b>Introdução.....</b>	<b>13</b>
<b>Materiais e Métodos.....</b>	<b>15</b>
<b>Resultados.....</b>	<b>20</b>
<b>Discussão.....</b>	<b>22</b>
<b>Conclusões.....</b>	<b>28</b>
<b>Declaração de Relevância Clínica.....</b>	<b>28</b>
<b>Referências Bibliográficas.....</b>	<b>29</b>
<b>Anexo A - Alterações no Projeto de Pesquisa No. 0048/11.....</b>	<b>34</b>
<b>Anexo B - Resposta Solicitação de Alteração em Projeto de Pesquisa..</b>	<b>35</b>
<b>Anexo C – Normas da revista Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology.....</b>	<b>36</b>

**Análise comparativa *in vitro* da citotoxicidade dos ácidos hialurônicos de alto e baixo peso molecular como *scaffolds* sobre células da linhagem NIH-3T3 através do teste de MTT**

Thaís Barizan Bordin – Mestranda em Prótese Dentária, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brasil;

Carlos Augusto Accorsi Ribeiro – Mestrando em Prótese Dentária, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brasil;

Daniel Gonçalves Boeckel – Doutorando em Prótese Dentária, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brasil;

Márcio Lima Grossi – Professor Associado, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brasil.

Rosemary Sadami Arai Shinkai – Professora Titular, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brasil;

Eduardo Rolim Teixeira – Professor Titular, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brasil.

**Endereço para correspondência:** Eduardo Rolim Teixeira – Avenida Ipiranga, 6681 Prédio 06, Partenon, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. CEP: 90619-900. Fone: +55 (51) 3320-3562. E-mail: [erteixeira@yahoo.com.br](mailto:erteixeira@yahoo.com.br).

**Declaração**

Este estudo foi parcialmente apoiado pelo Ministério da Educação e Cultura do Brasil (MEC/CAPES).

## **Análise comparativa *in vitro* da citotoxicidade dos ácidos hialurônicos de alto e baixo peso molecular como *scaffolds* sobre células da linhagem NIH-3T3 através do teste de MTT**

**Objetivos:** Avaliar, *in vitro*, o possível potencial citotóxico do ácido hialurônico de alto (AH-APM) e baixo peso molecular (AH-BPM) sobre células da linhagem NIH-3T3 na presença enzima hialuronidase (HIAL).

**Desenho do estudo:** Foi realizado o teste de MTT analisando a viabilidade celular dos seguintes grupos: (G1) Células + AH-APM; (G2) Células + AH-BPM; (G3) Células + AH-APM + HIAL; (G4) Células + AH-BPM + HIAL; (G5) Células + AH-APM + Hidroxiapatita; (G6) Células + AH-BPM + Hidroxiapatita; (G7) Células + AH-APM + HIAL + Hidroxiapatita; (G8) Células + AH-BPM + HIAL + Hidroxiapatita; (G9) Células (controle positivo); (G10) Células + hipoclorito (controle negativo).

**Resultados:** A viabilidade celular média de cada grupo foi: (G1) 76,0%, (G2) 63,3%, (G3) 67,4%, (G4) 76,5%, (G5) 57,6%, (G6) 60,8%, (G7) 64,4%, (G8) 74,3%, (G9) 100% e (G10) 12,4%. O AH-APM apresenta maior viabilidade na ausência da enzima hialuronidase, em contraste com o AH-BPM que proporcionou uma melhor viabilidade celular na presença da enzima.

**Conclusões:** Os resultados indicam a possível utilização do AH-BPM como *scaffold* para células em engenharia tecidual óssea.

## **INTRODUÇÃO**

A necessidade de correção de defeitos ósseos para colocação de implantes dentários e posterior reabilitação tornou-se rotineira na prática da implantodontia<sup>1</sup>, sendo o osso autógeno o material de enxerto ósseo considerado padrão ouro por diversos autores<sup>1, 2, 3</sup> pelo fato de agregar propriedades como osteogênese, osteoindução e osteocondução<sup>2</sup>. Porém, fatores como a disponibilidade óssea limitada e a morbidade do sítio doador têm sido indicados como aspectos adversos para sua utilização clínica<sup>4</sup>.

Nas últimas décadas, técnicas envolvendo engenharia tecidual têm sido reportadas na literatura como opção alternativa aos enxertos autógenos convencionais. Estas buscam basicamente um material que apresente as mesmas propriedades biológicas do osso autógeno sem seus fatores limitantes<sup>4, 5, 6</sup>.

A abordagem indicada em engenharia tecidual é a utilização de suportes tridimensionais (*scaffolds*), que servem como bases temporárias para o crescimento celular e o desenvolvimento do tecido novo<sup>7</sup>.

O ácido hialurônico (AH) é um polímero natural, principal componente da matriz extracelular, que tem sido utilizado como *scaffold* na engenharia tecidual devido a suas propriedades físico-químicas e biocompatibilidade. Ele é constituído de uma cadeia linear de unidades repetidas de (β,1-4)-ácido-D-glucurônico-(β,1-3)-N-acetil-D-glicosamina<sup>8</sup>. Exerce funções biológicas diferentes dependendo do seu peso molecular<sup>9</sup>, que pode ser considerado alto (> 1000 kDa), baixo (de 50 a 1000 kDa) ou baixíssimo (< 50 kDa)<sup>10</sup>.

O ácido hialurônico de alto peso molecular tem sido caracterizado como anti-angiogênico e não imunogênico, enquanto o ácido de baixo peso tem sido considerado inflamatório, imuno-estimulador e angiogênico. Além disso, efeitos opostos também são relatados quanto à proliferação celular<sup>9</sup>. Contudo, estudos anteriores nesta linha de pesquisa demonstraram o potencial de uso clínico do ácido hialurônico de alto peso molecular, onde culturas celulares *in vitro* resultaram em uma viabilidade celular de 74% avaliados em testes de citotoxicidade<sup>11</sup>.

Assim, a aplicação de um ácido hialurônico com apropriado peso molecular e ótima concentração local podem contribuir significativamente para a organização de um substrato capaz de permitir a diferenciação e proliferação de células



osteoblásticas nele inseridas, visando a formação de um composto de aplicação local para posterior formação óssea<sup>12</sup>.

Contudo, em tecidos orgânicos e também no plasma sanguíneo, é sabida a presença da enzima hialuronidase, responsável entre outras coisas pela degradação da molécula de ácido hialurônico<sup>13</sup>. Embora seis diferentes hialuronidases estejam potencialmente envolvidas na degradação de AH, Hial-1 e Hial-2 são consideradas como sendo as principais hialuronidases funcionais de células somáticas de mamíferos. Hial-2 degrada o AH de alto peso molecular em fragmentos de aproximadamente até 20 kDa, em seguida, Hial-1 degrada esse ácido de menor peso molecular em tetrassacarídeos<sup>13</sup>.

Desta forma, além do peso molecular do ácido hialurônico, a resposta celular também é influenciada pela estrutura de fragmentos formados pela degradação do polímero pela ação da enzima hialuronidase<sup>14</sup>.

Tendo em vista o potencial do ácido hialurônico para ser utilizado como *scaffold* em engenharia tecidual, e que um adequado peso molecular frente à enzima hialuronidase e uma concentração ótima podem viabilizar a diferenciação de osteoblastos e induzir desta forma a formação óssea, este estudo buscou avaliar, *in vitro*, a influência do ácido hialurônico de alto e baixo peso molecular e seu possível potencial citotóxico sobre células da linhagem NIH-3T3 (células fibroblásticas de camundongo) na presença da enzima hialuronidase.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Pesquisas Éticas da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

Foi realizada a análise da citotoxicidade dos ácidos hialurônicos de alto e baixo peso molecular, associados à hidroxiapatita e na presença da enzima hialuronidase, em culturas *in vitro*, de acordo com a ISO 10993-12.

### **Cultura celular e preparação da amostra**

Ampolas contendo células da linhagem NIH-3T3 foram removidas do nitrogênio líquido e descongeladas em um banho de água a 37°C. A suspensão celular foi transferida para um frasco de cultura contendo Meio de Eagle modificado por *Dulbecco* (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de penicilina/estreptomicina. Ao atingirem confluência de 70% as células foram lavadas com DPBS (Fosfato de *Dulbecco* tamponado salino), tripsinizadas e ressuspensas em 1,0 mL de DMEM. Foram coradas com azul de trypan e contadas em câmara de Neubauer. A seguir, uma concentração de  $0,5 \times 10^5$  células com 200  $\mu$ l de meio DMEM foram introduzidas em cada poço de um total de quatro placas de 96 poços (TPP, St. Louis, MO, EUA) (uma para cada tempo estudado), mantendo-as em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. Após 24 horas, o meio foi retirado dos poços, estes foram lavados com DPBS e então, de acordo com os resultados de estudo piloto, os tratamentos a serem analisados foram acrescentados nos respectivos poços e tempos. As placas retornaram para a estufa umidificada a 37°C na presença de 5% de CO<sub>2</sub>, onde permaneceram até a realização do teste de viabilidade celular.

Como demonstrado na tabela 1, dois grupos controles (um positivo e um negativo) e oito grupos experimentais foram feitos em quadruplicata para análise da viabilidade celular através do teste colorimétrico de MTT 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2il-tetrazólico (Across Organics, New Jersey, EUA).

Tabela 1 – Tratamentos e o respectivo volume de cada componente por poço.

Grupo	Células	DMEM	AH-APM	AH-BPM	HIAL	HP	Hipoclorito
G1	0,5x10 <sup>5</sup>	184µl	16µl	-----	-----	-----	-----
G2	0,5x10 <sup>5</sup>	196µL	-----	4µl	-----	-----	-----
G3	0,5x10 <sup>5</sup>	183µl	16µl	-----	0,13µl	-----	-----
G4	0,5x10 <sup>5</sup>	195µl	-----	4µl	0,13µl	-----	-----
G5	0,5x10 <sup>5</sup>	184µl	16µl	-----	-----	4mg	-----
G6	0,5x10 <sup>5</sup>	196µl	-----	4µl	-----	4mg	-----
G7	0,5x10 <sup>5</sup>	183µl	16µl	-----	0,13µl	4mg	-----
G8	0,5x10 <sup>5</sup>	195µl	-----	4µl	0,13µl	4mg	-----
G9	0,5x10 <sup>5</sup>	200µl	-----	-----	-----	-----	-----
G10	0,5x10 <sup>5</sup>	-----	-----	-----	-----	-----	200µl

DMEM, Meio de Eagle Modificado por Dulbecco; AH-APM, ácido hialurônico de alto peso molecular; AH-BPM, ácido hialurônico de baixo peso molecular; HIAL, hialuronidase; HP, hidroxiapatita.

Os grupos foram então formados como a seguinte constituição:

G1 = Células NIH-3T3 + AH alto peso molecular

G2 = Células NIH-3T3 + AH baixo peso molecular

G3 = Células NIH-3T3 + AH alto peso molecular + hialuronidase

G4 = Células NIH-3T3 + AH baixo peso molecular + hialuronidase

G5 = Células NIH-3T3 + AH alto peso molecular + hidroxiapatita

G6 = Células NIH-3T3 + AH baixo peso molecular + hidroxiapatita

G7 = Células NIH-3T3 + AH alto peso molecular + hialuronidase + hidroxiapatita

G8 = Células NIH-3T3 + AH baixo peso molecular + hialuronidase + hidroxiapatita

G9 = Células NIH-3T3 + DMEM (controle positivo)

G10 = Células NIH-3T3 + hipoclorito 1% (controle negativo)

### Aplicação do AH de alto peso molecular

Foi inserido 16 µl de gel de ácido hialurônico de alto peso molecular (1000 kDa) (Teosyal 30G Touch Up<sup>®</sup>, Teoxane, Geneva, Suíça), em que cada 1ml do produto contém 25mg de ácido hialurônico em Ph de 7,3, em cada poço dos grupos G1, G3, G5 e G7. Utilizando 16 µl do produto, obtivemos uma concentração final de

0,4 mg/mL de AH aplicado em cada poço. A concentração de ácido hialurônico a ser utilizado foi determinada baseada nos resultados do teste de curva de concentração realizado em um estudo piloto (resultados não demonstrados).

#### **Aplicação do AH de baixo peso molecular**

Foi inserido 4 µl de gel de ácido hialurônico de baixo peso molecular (500 a 730 kDa) (Hyaloss<sup>®</sup>, Anika Therapeutics, Reggio Emilia, Itália), em que cada 1 ml do produto contém 25 mg do ácido hialurônico em Ph de 7,3 em cada poço dos grupos G2, G4, G6 e G8. Ao utilizarmos 4 µl de Hyaloss, obtivemos uma concentração final de 0,1 mg/ml de AH aplicado em cada poço. A concentração de ácido hialurônico a ser utilizado foi determinada baseada nos resultados do teste de curva de concentração realizado em um estudo piloto (resultados não demonstrados).

#### **Aplicação da Hialuronidase**

Um total de 0,13 µl de hialuronidase (Hyalozima<sup>®</sup>, Apsen Farmacêutica S/A, São Paulo – SP, Brasil), extraída de testículos bovinos, onde a solução é constituída por 400 UTR de hialuronidase injetável em 1 ml de excipientes q.s.p, foi utilizada em cada poço dos grupos G3, G4, G7 e G8. Após a diluição de 1,0 µl do produto em 1499 µl de DMEM a 10%, a concentração final obtida foi de 0,2U/ml. A concentração de hialuronidase utilizada foi determinada baseada nos resultados de um teste de curva de concentração realizado em um estudo piloto (resultados não demonstrados).

#### **Aplicação da Hidroxiapatita**

Partículas de hidroxiapatita reabsorvível (Straumann<sup>®</sup> BoneCeramic<sup>™</sup>, BIORA AB, Institut Staumann AG, Malmo, Suécia), substituto ósseo totalmente sintético, composto de uma mistura de 60% de hidroxiapatita e 40% de β-tricálcio fosfato (β-

TCP) e porosidade de 90%, com poros interconectados de diâmetro de 100-500µm, foi previamente pesado e colocado nos poços dos grupos G5, G6, G7 e G8, em um total de 4 mg por poço. Segundo o fabricante esse biomaterial possui uma reabsorção gradativa, é biocompatível, osteocondutor e permite uma estrutura de suporte para adesão do tecido ósseo durante o processo de osteogênese.

### **Aplicação do hipoclorito de sódio**

Foi utilizado 200 µl de hipoclorito de sódio 1% (produto manipulado, Farmácias Panvel, Porto Alegre, RS, Brasil. Lote: 1911137) sobre as células NIH-3T3 na concentração de  $0,5 \times 10^5$  no grupo 10 (controle negativo) devido à sua característica de inviabilização do crescimento celular.

### **Ensaio da viabilidade celular (MTT)**

O teste de MTT foi realizado para análise da viabilidade celular, o qual tem como princípio a determinação da habilidade de células vivas em reduzir o sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2il-tetrazólico (Across Organics, New Jersey, EUA), em cristais insolúveis de *Formazan* de coloração violeta. Após o estabelecimento de cada grupo celular, o teste de MTT foi realizado nos períodos de 24, 48, 72 e 96 horas. Para tal, os sobrenadantes das culturas celulares contendo ou não os agentes testados foram removidos e as células foram cultivadas com 10% de MTT (5mg/ml) em solução salina tamponada com fosfato e incubadas durante 2 horas a 37°C, ao abrigo da luz, até a observação da presença dos cristais violetas de *Formazan*. Para a solubilização dos cristais de *Formazan*, 100µl de Dimetil Sulfóxido (DMSO) foram adicionados a cada poço da placa de cultura. Logo após, foi realizada a leitura espectrofotométrica da absorbância, em comprimento de onda de 570nm (Microplate Reader, Molecular Devices, SpectraMax® M 5, Califórnia, EUA) suportado pelo programa Softmax Pro 5.2® (Molecular Devices, Califórnia, EUA).

## **Análise estatística**

Todos os resultados foram expressos através da média de viabilidade celular do respectivo grupo  $\pm$  desvio padrão. Uma análise comparativa das médias foi realizada utilizando o teste T de Student e Análise de Variância Múltipla (ANOVA). Como complementação, foi realizado o Teste de Comparações Múltiplas de Tuckey ( $P < 0,05$ ).

## **RESULTADOS**

Os valores de densidade óptica observados no teste de MTT indicam a porcentagem de viabilidade celular por grupo, posteriormente comparada ao grupo controle (G9), o qual foi considerado 100% viável.

De acordo com estes resultados, todos os grupos experimentais apresentaram médias de viabilidade celular inferiores ao grupo controle positivo e superiores ao controle negativo, não havendo diferença significativa entre os grupos experimentais, porém todos com diferenças estatisticamente significantes em relação ao controle negativo (G10) ( $p < 0,05$ ).

A viabilidade celular média de cada grupo foi: (G1) 76,0%; (G2) 63,3%; (G3) 67,4%; (G4) 76,5%; (G5) 57,6%; (G6) 60,8%; (G7) 64,4%; (G8) 74,3%; (G9) 100% e (G10) 12,4%.

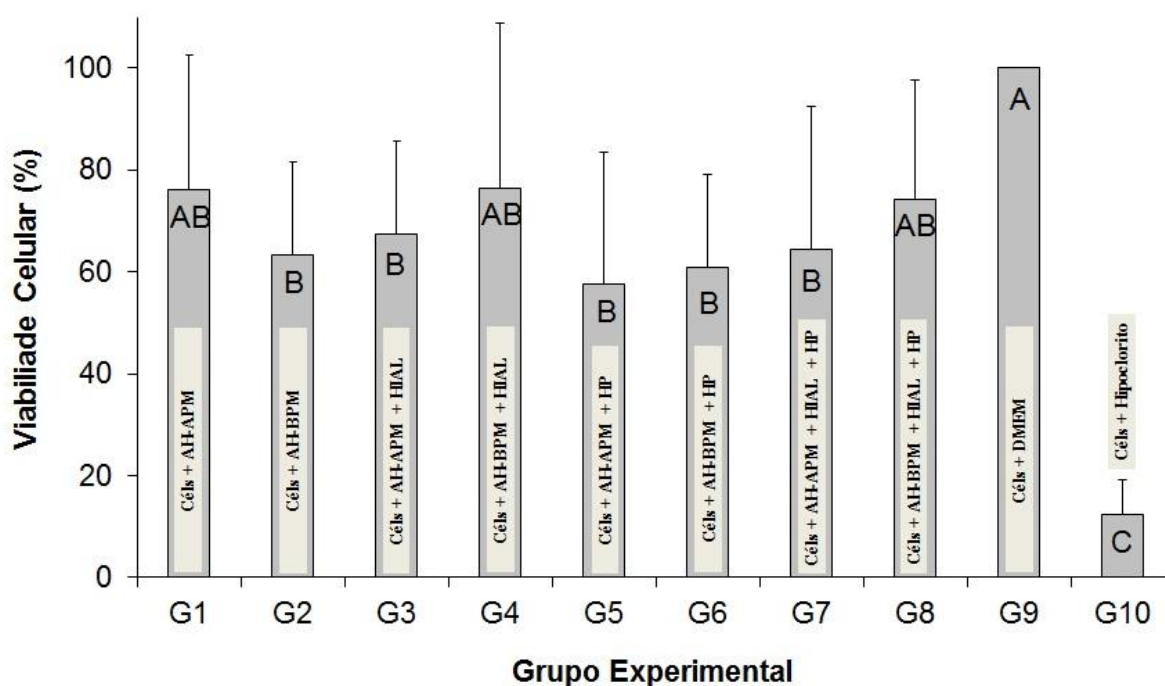
Os grupos G1 (células + AH alto peso molecular) com 76% de viabilidade, G4 (células + AH baixo peso molecular + hialuronidase) com 77% de viabilidade e G8 (células + AH baixo peso molecular + hialuronidase + hidroxiapatita) com 75% de viabilidade apresentaram as maiores médias de viabilidade celular e não apresentaram diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) em relação ao grupo

ao controle positivo. Já os grupos G2, G3, G5, G6 e G7 diferiram significativamente do controle positivo ( $p < 0,05$ ).

O grupo G5 (células + AH alto peso molecular + hidroxiapatita) com 58% de viabilidade e o grupo G6 (células + AH baixo peso molecular + hidroxiapatita) com 61% de viabilidade foram os grupos que exibiram as menores viabilidades celulares entre os grupos experimentais (Fig.1).

De acordo com os resultados do teste de Tuckey, houve diferença significativa quanto à presença da hialuronidase entre os ácidos hialurônicos de alto e baixo peso molecular, independente do tempo e da presença da hidroxiapatita, onde o AH de alto peso molecular, na presença da enzima, apresentou viabilidade celular significativamente menor em relação ao AH de baixo peso molecular ( $p < 0,05$ ).

Figura 1 – Viabilidade celular de cada grupo, expressa em porcentagem.



Diferentes letras indicam diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos. Sendo que: Cél, células; AH-APM, ácido hialurônico de alto peso molecular; AH-BPM, ácido hialurônico de baixo peso molecular; HIAL, hialuronidase; HP, hidroxiapatita; DMEM, meio de Eagle modificado por Dulbecco.

## DISCUSSÃO

Visando a aplicação do composto *in vivo* para realização de enxertia óssea, a presente pesquisa *in vitro* buscou avaliar a possível influência da hialuronidase na viabilidade celular de *scaffolds* formados por ácido hialurônico de alto e baixo peso molecular. Acredita-se que esta enzima possa degradar o AH em fragmentos menores, sendo esta presente no organismo humano em uma concentração de 32 mU/mg de proteína em nível tecidual<sup>15</sup>. Estes fragmentos formados pela degradação do AH tem um potencial considerável para influenciar a resposta celular tecidual quanto à sua proliferação e síntese proteica<sup>14</sup>.

De acordo com os resultados encontrados nesta pesquisa, células da linhagem NIH-3T3 cultivadas em ácido hialurônico de alto e baixo peso molecular com diferentes composições mostraram diferente viabilidade celular na presença da enzima hialuronidase. Observou-se que, independente do tempo ou da presença da hidroxiapatita, a hialuronidase combinada ao ácido de baixo peso molecular proporcionou uma viabilidade celular significativamente maior do que com o ácido de alto peso molecular. Ainda, quando se acrescentou a enzima ao AH de alto peso, ocorreu uma resposta significativamente inferior comparada ao controle positivo. Portanto, uma possível hipótese a ser discutida aqui refere-se à presença da enzima, que quando combinada ao ácido hialurônico de alto peso molecular, influi negativamente na viabilidade celular do composto. Porém, quando presente com o ácido hialurônico de baixo peso molecular, esta mostra-se positiva, uma vez que não



houve diferença significativa entre o controle positivo e o AH de baixo peso na presença da enzima.

Apesar de não ter diferença significativa entre as médias dos grupos-teste, houve diferença significativa entre os grupos e os controles. Todos apresentaram diferença significativa superior ao controle negativo ( $p < 0,05$ ), o que demonstra que nenhum grupo inviabilizou a proliferação celular. Contudo, certos grupos apresentaram ainda diferença significativa inferior ao controle positivo. Somente três grupos demonstraram apresentar uma resposta celular não diferente do controle positivo, sendo estes os grupos com AH de alto peso molecular na ausência da hialuronidase e os dois grupos de AH de baixo peso molecular na presença da enzima. Quando acrescentou-se a enzima no AH de alto peso, houve uma resposta significativamente inferior ao controle positivo ( $p < 0,05$ ).

Existe uma controvérsia na literatura em relação aos efeitos teciduais gerados pelos ácidos hialurônicos de diferentes pesos moleculares. Muitos estudos mostraram que ácidos hialurônicos de alto peso molecular exibiram efeitos teciduais anti-angiogênicos e inflamatórios em diversos ensaios *in vivo*, além da inibição da migração, proliferação e divisão celular<sup>16, 17</sup>. Em contraste, ácidos hialurônico de baixo peso molecular estimularam a proliferação e motilidade celular, exibindo efeitos pró-inflamatórios e pró-angiogênicos em uma variedade de sistemas experimentais<sup>18, 19</sup>. Contudo, outros estudos relacionados à engenharia tecidual óssea têm demonstrado um elevado efeito proliferativo em ambos pesos moleculares. Huang et al.<sup>20</sup> testaram *in vitro* a proliferação de células mesenquimais derivadas da calvária de ratos utilizando ácidos hialurônicos com diferentes concentrações (0,5mg/ml, 1mg/ml, 2mg/ml) e pesos moleculares (60 kDa, 900 kDa e 2300 kDa). Os resultados mostraram que, tanto os ácidos de baixo quanto o de alto

peso molecular estimularam significativamente o crescimento celular em relação ao controle. Somente a menor concentração do alto peso molecular não apresentou significativa proliferação. Os autores relataram mais de 100% de viabilidade na maioria dos grupos experimentais, uma proliferação maior do que a encontrada nesta pesquisa. Contudo, não avaliaram a influência da enzima hialuronidase na degradação da molécula do ácido e seus possíveis efeitos na proliferação celular.

Em um estudo semelhante, Park et al.<sup>21</sup> avaliaram *in vitro* a proliferação de fibroblastos dérmicos humanos em *scaffolds* de ácido hialurônico de alto peso molecular (2000 kDa; 0,5mg/ml) na presença da enzima hialuronidase na concentração de 1000U/ml. Nos resultados após 72 horas, verificaram uma viabilidade celular de apenas 35%, o que vai de encontro com os resultados da presente investigação, uma vez que o ácido de alto peso molecular na presença da enzima hialuronidase apresentou uma viabilidade média significativamente inferior ao controle positivo.

Quanto à proliferação em *scaffolds* de ácido hialurônico de baixo peso molecular, Kim et al.<sup>15</sup>, ao avaliarem o AH de baixo peso (170 kDa; 0,9mg/ml) na presença da hialuronidase (100U/ml) sobre células mesenquimais da medula óssea de humanos, e após 48 horas obtiveram uma viabilidade celular de 72%, resultado muito semelhante ao encontrado nesta pesquisa. Em outro estudo, analisaram a viabilidade de células mesenquimais da medula óssea de humanos em *scaffolds* de AH de baixíssimo peso molecular (10 kDa; 0,9mg/ml) e baixo peso (50 kDa; 0,9mg/ml) na presença de hialuronidase (100U/ml). As células no ácido de baixo peso mostraram uma taxa de proliferação de 90% ou mais, indicando que o AH de baixo peso molecular proporciona um ambiente favorável para este tipo celular<sup>22</sup>.

Ainda em estudo semelhante, Martínez-Sanz et al.<sup>23</sup>, também realizaram o teste de MTT indireto para verificar a proliferação celular *in vitro* (fibroblastos dérmicos humanos) em AH de baixo peso molecular (130 kDa; 16mg/ml) na presença de 10U/ml de hialuronidase. Realizaram leitura após 24 e 72 horas, onde mais de 95% das células foram viáveis, o que indica que o *scaffold* e os produtos da sua degradação parcial não apresentam citotoxicidade significativa.

As possíveis divergências nos relatos da literatura quanto aos efeitos celulares proporcionados pelos ácidos de alto e baixo peso molecular, assim como pelos seus fragmentos, pode ser explicada por várias linhas de evidências. Os efeitos do peso molecular do AH na proliferação celular parecem ser diferentes entre células específicas e dependentes da concentração média de AH empregada<sup>9</sup>. Diferenças na viabilidade celular em pesquisas *in vitro* utilizando o ácido hialurônico como *scaffold* também poderiam ser explicadas pela presença ou não da enzima hialuronidase, assim como a concentração da enzima utilizada em cada teste. Para não inviabilizar a diferenciação celular, foi realizado neste estudo um teste de curva de dose, onde verificou-se que a concentração ideal de hialuronidase a ser utilizada sobre células da linhagem NIH-3T3 é de 0,2U/ml, uma concentração maior do que a encontrada na condição fisiológica, uma vez que Muckenschnabela et al.<sup>24</sup> estimaram a concentração de hialuronidase presente no plasma sanguíneo como tendo a média de 0,00142U/ml.

O grupo com maior viabilidade celular neste estudo obteve uma média inferior a 80%. Resultado bastante semelhante com o encontrado por Kim et al.<sup>15</sup>, onde a viabilidade celular foi de 72%. Contudo, quando a proteína BMP-2 (proteína morfogenética óssea) foi adicionada na pesquisa destes autores, a viabilidade aumentou para 81%. Eles acreditam que a sobrevivência celular no AH é afetada

pela interação das células com o meio circundante. Com o objetivo de aumentar volumetricamente o composto celular obtido, associado aos ácidos hialurônicos, foi introduzida nesta pesquisa a hidroxiapatita, um material sintético, biocompatível, não carcinogênico e não alergênico. Alguns autores acreditam que a indução da neoformação óssea parece ser dependente também da presença de cristais de hidroxiapatita na superfície do veículo celular, pois ela contribui para torná-lo mais bioativo e osteocondutor<sup>25</sup>. Porém, *in vitro*, de acordo com os resultados encontrados, ela não apresentou influência positiva ou negativa na viabilidade celular.

Outros autores relatam que a viabilidade celular em *scaffolds* de ácido hialurônico utilizados em suas pesquisas possa ter apresentado resultados inferiores ao controle devido às propriedades anti-adesivas típicas do AH<sup>21</sup>. Acredita-se que esse efeito anti-adesivo depende do peso molecular assim como da concentração da preparação para o teste<sup>26</sup>. Entretanto, pesquisas *in vivo* têm demonstrado maior proliferação celular, provavelmente devido à ligação do ácido com receptores da membrana celular, tais como CD44, RHAMM e ICAM-1. Essa interação na membrana, segundo alguns autores, pode iniciar algumas vias de sinalização intra e intercelular, regulando a proliferação, a migração e a diferenciação das células<sup>14</sup>.

Outra questão relevante é a forma do AH utilizado como *scaffold*, se é AH livre, modificado ou reticulado. Estudos demonstram que os ácidos modificados e reticulados permanecem por mais tempo no tecido por serem mais resistentes à degradação e proporcionam maior viabilidade celular<sup>27</sup>. O ácido hialurônico de alto peso molecular utilizado nesta pesquisa é um ácido com finalidade dermatológica, reticulado através da ligação do ácido hialurônico com éter diglicídico de 1,4-butanodiol para resistir à degradação e permanecer mais tempo na pele<sup>28</sup>. O de

baixo peso molecular, que tem normalmente a finalidade de auxiliar a enxertia óssea, é um éster de ácido hialurônico com álcool benzílico (modificado), sendo degradado por volta de 10 a 14 dias<sup>29</sup>.

A análise com metodologia proposta pelas normas da ISO 10993-12 permite o estabelecimento de uma escala ordenada e racional para a biocompatibilidade dos materiais em função de sua toxicidade. Esta ISO recomenda o uso de células da linhagem NIH-3T3 para a realização dos testes de citotoxicidade<sup>30</sup>, no presente caso o MTT, que tem como princípio a redução de um substrato amarelo, o sal de tetrazolium MTT, por enzimas mitocondriais resultando em um produto de coloração violeta chamado formazana que pode ser quantificado por espectrofotometria<sup>31</sup>. O presente teste é um dos métodos de ensaio para estimar o número de células viáveis em placas de multi-poços mais utilizados na literatura, caracterizando-se por ser um teste preciso, conveniente, rápido e econômico<sup>32</sup>.

Através dele, observou-se que os fragmentos formados pela degradação do ácido hialurônico de alto peso molecular não favoreceram a viabilidade celular, entretanto, os fragmentos formados pela degradação do ácido de baixo peso apresentaram efeito contrário. Contudo, esta pesquisa não teve como objetivo avaliar os possíveis graus de biodegradação dos compostos de AH. Analisou sim, *in vitro*, a viabilidade celular destes possíveis fragmentos sobre células da linhagem NIH-3T3 até o período de 96 horas. Estudos futuros serão necessários para analisar o tempo ideal e os possíveis sub-produtos da degradação do ácido hialurônico como *scaffold* para células osteoblásticas pela ação enzimática tecidual, visando a indicação das características ideais do material em questão para realização de técnicas de engenharia tecidual para reconstrução óssea.

## CONCLUSÕES

Pesquisando a possível influência da enzima hialuronidase na viabilidade celular de *scaffolds* de ácido hialurônico para posterior enxertia óssea, verificou-se que o ácido hialurônico de alto peso molecular apresenta maior viabilidade na ausência da enzima hialuronidase, já o ácido de baixo peso molecular proporciona uma melhor viabilidade celular na presença da enzima. Resultados do presente estudo sugerem o uso do ácido hialurônico de baixo peso molecular, dada a presença natural da enzima hialuronidase nos tecidos vivos.

Pesquisas futuras são necessárias para analisar o tempo, assim como os subprodutos formados pela biodegradação do ácido hialurônico como *scaffold* para osteoblastos em engenharia tecidual.

### Relevância Clínica

Os resultados da presente investigação sugerem que, *in vivo*, devido à presença da enzima hialuronidase no organismo humano, o ácido hialurônico de baixo peso molecular apresenta-se como *scaffold* mais apropriado para ser aplicado em técnicas envolvendo engenharia tecidual óssea.

## REFERÊNCIAS

1. Farré-Guasch E, Prins HJ, Overman JR, Ten Bruggenkate CM, Schulten EA, Helder MN, et al. Human maxillary sinus floor elevation as a model for bone regeneration enabling the application of one-step surgical procedures. *Tissue Eng Part B Rev.* 2013 Feb;19(1):69-82.
2. Gonshor A, McAllister BS, Wallace SS, Prasad H. Histologic and histomorphometric evaluation of an allograft stem cell-based matrix sinus augmentation Procedure. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2011; 26:123–131.
3. Rogers GF, Greene AK. Autogenous bone graft: basic science and clinical implications. *J Craniofac Surg.* 2012 Jan; 23(1):323-7. doi: 10.1097/SCS.0b013e318241dcb.
4. Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Bone tissue engineering: recent advances and challenges. *Crit Rev Biomed Eng.* 2012; 40(5):363-408.
5. Sun XJ, Xia LG, Chou LL, Zhong W, Zhang XL, Wang SY, et al. Maxillary sinus floor elevation using a tissue engineered bone complex with BMP-2 gene modified bMSCs and a novel porous ceramic scaffold in rabbits. *Arch Oral Biol.* 2010; 55:195–202.
6. Wen B, Karl M, Pendrys D, Shafer D, Freilich M, Kuhn L. An evaluation of BMP-2 delivery from scaffolds with miniaturized dental implants in a novel rat mandible model. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2011; 97: 315-26.
7. Nicodemus GD, Bryant SJ. Cell encapsulation in biodegradable hydrogels for tissue engineering applications. *Tissue Eng Part B Rev.* 2008 June; 14(2): 149–165. doi: 10.1089/ten.teb.2007.0332
8. Krasieński R, Tchorzewski H. Hyaluronan-mediated regulation of inflammation. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 2007 Nov 19;61:683-9.

9. Mizrahy S, Raz SR, Hasgaard M, Liu H, Soffer-Tsur N, Cohen K, Dvash R, Landsman-Milo D, Bremer MG, Moghimi SM, Peer D. Hyaluronan-coated nanoparticles: the influence of the molecular weight on CD44-hyaluronan interactions and on the immune response. *J Control Release*. 2011 Dec 10;156(2):231-8. doi: 10.1016/j.jconrel.2011.06.031. Epub 2011 Jul 2.
10. Csoka AB, Frost GI, Stern R. The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes. *Matrix Biology*. 2001; 20(8):499–508.
11. Boeckel DG, Shinkai RSA, Grossi ML, Teixeira ER. In vitro evaluation of cytotoxicity of hyaluronic acid as na extracelular matrix on OFCOL II cells by the MTT assay. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2012 Nov 9. pii: S2212-4403(12)01016-4. doi: 10.1016/j.oooo.2012.07.486. [Epub ahead of print].
12. Pilloni A, Bernard GW. The effect of hyaluronan on mouse intramembranous osteogenesis in vitro. *Cell Tissue Res*. 1998; 294:323-33.
13. El-Safory NS, Fazary AE, Lee CK, Hyaluronidases, a group of glycosidases: Current and future perspectives. *Carbohydrate Polymers*, 2010; 81(2):165-181.
14. Collins MN, Birkinshaw C. Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering – A review. *Carbohydr Polym*. 2013 Feb 15;92(2):1262-79. doi: 10.1016/j.carbpol.2012.10.028. Epub 2012 Oct 17.
15. Kim J, Kim IS, Cho TH, Lee KB, Hwang SJ, Tae G, et al. Bone regeneration using hyaluronic acid-based hydrogel with bone morphogenic protein-2 and human mesenchymal stem cells. *Biomater* 2007; 28:1830-1837.



16. Yang C, Cao M, Liu H, He Y, Xu J, Du Y, et al. The High and Low Molecular Weight Forms of Hyaluronan Have Distinct Effects on CD44 Clustering. *J Biol Chem*. 2012 December 14; 287(51): 43094–43107.
17. Fuchs K, Hippe A, Schmaus A, Homey B, Sleeman JP, Orian-Rousseau V. Opposing effects of high and low molecular weight hyaluronan on CXCL12-induced CXCR4 signaling depend on CD44. *Cell DeathDis*. 2013; 4:e819.
18. Gao F., Yang C. X., Mo W., Liu Y. W., He Y. Q. Hyaluronan oligosaccharides are potential stimulators to angiogenesis via RHAMM mediated signal pathway in wound healing. *Clin Invest Med*. 2008; 31(3):E106–16.
19. Wang Y. Z., Cao M. L., Liu Y. W., He Y. Q., Yang C. X., Gao F. CD44 mediates oligosaccharides of hyaluronan-induced proliferation, tube formation and signal transduction in endothelial cells. *Exp Biol Med*. 2011 Jan; 236(1):84–90.
20. Huang L, Cheng YY, Koo PL, Lee KM, Qin L, Cheng JC, Kumta SM. The effect of hyaluronan on osteoblast proliferation and differentiation in rat calvarial-derived cell cultures. *J Biomed Mater Res A*. 2003 Sep 15;66(4):880-4.
21. Park YD, Tirelli N, Hubbell JA. Photopolymerized Hyaluronic Acid-Based Hydrogels and InterPenetrating Networks. *Biomaterials*. 2003 Mar; 24(6):893-900.
22. Kim J, Park Y, Tae G, Lee KB, Hwang CM, Hwang SJ, Kim IS, Noh I, Sun K. Characterization of low-molecular-weight hyaluronic acid-based hydrogel and differential stem cell responses in the hydrogel microenvironments. *J Biomed Mater Res A*. 2009 Mar 15;88(4):967-75. doi: 10.1002/jbm.a.31947.

23. Martínez-Sanz E, Ossipov DA, Hilborn J, Larsson S, Jonsson KB, Varghese OP. Bone reservoir: Injectable hyaluronic acid hydrogel for minimal invasive bone augmentation. *J Control Release*. 2011 Jun 10;152(2):232-40. doi: 10.1016/j.jconrel.2011.02.003. Epub 2011 Feb 22.
24. Muckenschnabela I, Bernhardt G, Spruss T, Dietl B, Buschauer A. Quantitation of hyaluronidases by the Morgan-Elson reaction: comparison of the enzyme activities in the plasma of tumor patients and healthy volunteers. *Cancer Letter* 1998; 131:13-20.
25. Manferdini C, Guarino V, Zini N, Raucci MG, Ferrari A, Grassi F, et al. Mineralization behavior with mesenchymal stromal cells in a biomimetic hyaluronic acid-based scaffold. *Biomaterials*. 2010 May;31(14):3986-96. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.01.148. Epub 2010 Feb 20.
26. De Iaco PA, Stefanetti M, Pressato D, Piana S, Donà M, Pavesio A, Bovicelli L. A novel hyaluronan-based gel in laparoscopic adhesion prevention: preclinical evaluation in an animal model. *Fertil Steril*, 1998;69:318–323.
27. Xu X, Jha AK, Harrington DA, Farach-Carson MC, Jia X. Hyaluronic acid-based hydrogels: from a natural polysaccharide to complex networks. *Soft Matter*. 2012;8(12):3280-3294.
28. Brandt FS, Cazzaniga A. Hyaluronic acid gel fillers in the management of facial aging. *Clin Interv Aging*, 2008 March; 3(1):153-159.
29. Bansal J, Kedige SD, Anand S. Hyaluronic acid: A promising mediator for periodontal regeneration. *Indian J Dent Res* 2010; 21:575-8.
30. International Organization for Standardization. ISO 10993-12. Biological evaluation of medical devices – part 12: Sample preparation and reference materials, 2007.

31. Ragab EA, Mohammed ASI, Abbass HS, Kotb SI. A new flavan-3-ol dimer from *Ficus spragueana* leaves and its cytotoxic activity. *Phcog Mag* 2013;9:144-8.
32. Sylvester PW. Optimization of the tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay for cellular growth and viability. *Methods Mol Biol.* 2011; 716:157-68.

## ANEXOS

### ANEXO A - Alterações no Projeto de Pesquisa No. 0048/11

Porto Alegre, 28 de Setembro de 2012

Profa. Ana Maria Spohr  
Comissão Científica e de Ética – CCE  
Faculdade de Odontologia  
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – PUCRS

Ref.: Alterações no Projeto de Pesquisa No. 0048/11

Prezada Coordenadora:

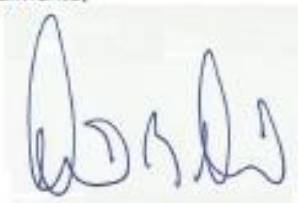
Por meio desta, venho solicitar o registro das seguintes alterações no projeto de pesquisa aprovado segundo protocolo 0048/11, intitulado "O Ácido Hialurônico como Veículo de Células Osteoprogenitoras para Enxertia Óssea":

- Substituição do pesquisador associado Sabrina Rebollo Zani pelos pesquisadores associados Carlos Augusto Accorsi Ribeiro e Thaisa Barizan Bordin.

- Acréscimo de outro grupo experimental aos já existentes contendo ácido hialurônico de baixo peso molecular (Hyaloss™, Fidia Farmaceutici S.p.A., Itália).

Saliento que a inclusão deste grupo experimental não acarretará na alteração e/ou acréscimo do número de animais previstos para uso no descrito experimento.

Cordialmente,



Prof. Eduardo Rolim Teixeira  
Pesquisador Responsável  
Depto. de Prótese Dentária – FO/PUCRS

**ANEXO B – Resposta Solicitação de Alteração em Projeto de Pesquisa**

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
Comissão de Ética no Uso de Animais

Ofício 141/12 CEUA/PRPPG

Porto Alegre, 22 de novembro de 2012.

Prezado Professor,

Em resposta a sua solicitação de alteração no projeto sob nº 11/00253 da CEUA, intitulado "Avaliação do potencial citotóxico do ácido hialurônico sobre células osteoprogenitoras diferenciadas a partir de células-tronco mesenquimais", informamos que o mesmo foi alterado. Portanto a continuidade de sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Atenciosamente,

  
Prof. Dra. Anamaria Gonçalves Feijó  
Coordenadora da CEUA – PUCRS

Ilmo. Sr.  
Prof. Dr. Eduardo Rolim Teixeira  
FO  
Nesta Universidade

PUCRS

Campus Central  
Av. Ipiranga, 6690 – Fêdrio 60, sala 314  
CEP: 90610-000  
Fone/Fax: (51) 3320-3345  
E-mail: ceua@pucrs.br

## **ANEXO C - Normas da revista Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology**

### **Author Instructions**

**Authors: Please note that, due to changes in readership, the Endodontology section of OOOO is being retired. New submissions for the Endodontology section are no longer accepted. Manuscripts currently accepted or in process will be processed as usual. Thank you for your previous support of the Endodontology section.**

### **Correspondence**

- General inquiries and communications regarding editorial management should be addressed to Alice M. Landwehr, Managing Editor: tripleOjournal@gmail.com.
- General correspondence to the Editor-in-Chief, Mark W. Lingen, DDS, PhD: Mark.Lingen@uchospitals.edu.
- Publisher-specific inquiries should be addressed to: Jane Ryley, Elsevier Inc., 3251 Riverport Lane, Maryland Heights, MO 63043; e-mail: J.Ryley@Elsevier.com
- Issue Manager, Jill Shepherd. Telephone: (352) 483-8113; fax: (352) 483-3417; e-mail: shepherdja@aol.com

### **Section Scope Statements**

The *Oral and Maxillofacial Surgery Section* aims to publish an extensive range of original articles that advances patient care through enhanced understanding of diagnosis, surgical and adjunctive treatment of diseases, and injuries and defects involving both the functional and esthetic aspects of the hard and soft tissues of the oral and maxillofacial regions. The section also seeks research regarding both the basic science of and management of persons with oral and maxillofacial conditions. Articles presenting ethical, original, well-documented, and reproducible research are given preference.

The *Oral Medicine Section* aims to publish a broad range of original articles that help clinicians understand more thoroughly the pathobiology, etiology, diagnosis, prevention, and management of oral conditions related to underlying medical conditions, including diseases of the head, neck, and oral mucosal structures, orofacial pain conditions, salivary gland disorders, and taste disorders. The section also seeks research regarding the dental management of persons with medical problems and/or complicated medical conditions. The published findings must contribute substantively to the body of oral medicine literature and should lead to improved clinical decision-making and enhanced care of medically-related disorders or conditions affecting the oral and maxillofacial region. Articles presenting original, well-documented, and reproducible research are preferred.

The *Oral and Maxillofacial Pathology Section* encourages the submission of original articles of high scientific quality that investigate the pathogenesis, diagnosis, and management of diseases affecting the oral and maxillofacial region. Submitted manuscripts may summarize findings from clinical, translational, or basic research in the broad field of oral and maxillofacial pathology but must contribute substantively to

the body of knowledge in this field and should be of obvious clinical and/or diagnostic significance to the practicing oral and maxillofacial pathologist. Areas of focus may include the investigation of disease pathogenesis, the diagnosis of disease using microscopic, clinical, radiographic, biochemical, molecular, or other methods as well as the natural history and management of patients with various conditions of the head, neck, and oral mucosal structures. Articles presenting novel and reproducible research that introduce new knowledge and observations are especially encouraged. This section also welcomes the submission of topical review papers on relevant subjects.

The *Oral and Maxillofacial Radiology Section* publishes original peer-reviewed contributions to the advancement of diagnostic clinical oral and maxillofacial radiology and related imaging sciences. The section considers original clinical and experimental research papers, technological developments, extensive systematic reviews of the literature, comprehensive pictorial reviews, special reports, and invited papers on subjects that will appeal to clinicians involved in the diagnostic imaging of hard and soft tissue maxillofacial pathology, selection criteria, computer-assisted diagnosis, craniofacial analysis, image-guided surgical navigation, image processing, dosimetry, radiation physics, biology, and safety.

The section also seeks extensive case series representing various expressions of particular conditions, descriptions of innovative imaging technique applications to these series, and description of novel imaging features to assist imaging specialists develop clinical protocols and interpretive knowledge based on multiple observations. Only papers contributing substantively to the body of knowledge in oral and maxillofacial imaging and performed with scientific rigor will be considered. These papers should assist clinicians in developing evidence-based practice and provide improved clinical decision-making regarding the performance of specific techniques and interpretation of resulting images affecting the oral and maxillofacial region. Diagnostic accuracy studies should conform to the principles of the STARD document (⇒ <http://www.stard-statement.org/>).

### **Article Types**

1. Full Length Manuscripts (FLM). Reports of original research (preclinical, clinical, or translational) that are well-documented, novel, and significant. FLM will be organized into six parts: (1) Abstract; (2) Introduction; (3) Materials and methods; (4) Results; (5) Discussion; (6) References.

2. Review manuscripts (RM). Manuscripts that review the current status of a given topic, diagnosis, or treatment. These manuscripts should not be an exhaustive review of the literature but rather should be a review of contemporary thought with respect to the topic.

3. Clinicopathologic Conference (CPC). Manuscripts that present interesting, challenging, or unusual cases. The presentation should simulate clinical work-up, including the formulation of a detailed and well thought out differential diagnosis. The complete diagnostic evaluation, management, and follow-up must be included. CPC articles must be organized into six parts: (1) Title: Provide a descriptive clinical title that does not reveal the final diagnosis. (2) Clinical presentation: Describe the clinical and imaging characteristics of the lesion. Use clinical photographs and radiographs as appropriate. (3) Differential diagnosis: List and discuss lesions to be considered

as reasonable diagnostic possibilities. The authors are reminded that the most important part of the CPC manuscript is the clinical differential diagnosis, where the authors guide the readership through their own diagnostic thought process. This will require the formulation of a list of the most probable diagnostic possibilities (ideally at least 5-6 entities) based on the clinical presentation, medical history, and/or radiographic studies. (4) Diagnosis: Histopathologic findings illustrated with appropriate photomicrographs. (5) Management: Describe the treatment of the patient and response to treatment. (6) Discussion: Concentrate on the most interesting aspect(s) of the case. No abstract is needed for CPC manuscripts.

4. Medical Management and Pharmacology Update (MMPU). This section is intended to provide concise, current reviews of medical problems and how they relate to dentistry. Manuscripts should include a good review of the clinical aspects of the disease, stressing the impact of the disease on the dental management and dental treatment of the patient. Emphasis should be placed on new developments, new research, or new approaches to therapy or management. Manuscripts should not be an exhaustive review of the literature but rather a review of contemporary thought with respect to the topic. Likewise, the bibliography need not be all inclusive but rather should include only seminal, contemporary references deemed by the author to be most pertinent. The desired format for manuscripts submitted for the MMPU section includes: (1) abstract; (2) topic introduction/overview; (3) epidemiology/demographics; (4) etiology and pathogenesis; (5) clinical presentation/physical findings; (6) diagnosis (laboratory tests, diagnostic imaging, etc.); (7) medical management and treatment; (8) complications; (9) prognosis; oral manifestations/dental implications and significance; and (10) dental management (of patients with the disease). Manuscripts should not exceed 12 pages in 12-point, double-spaced Times New Roman (tables and figures count toward the 12-page limit).

5. Pharmacology Update is a component of the MMPU section that offers the reader the opportunity to obtain concise information regarding drugs used in the practice of medicine, clinical dentistry, and dental specialties. Manuscripts should present clearly and concisely the background information regarding the disease or condition that is managed, the indications, rationale for and approved uses of the specific drugs or class of drugs, the advantages and benefits of the drug or drug class over previous drugs, mechanism of action, criteria for selection, usual dosage, pharmacokinetics, adverse effects, drug interactions, and oral health and dental management considerations. Emphasis should be placed on new developments, effectiveness in clinical trials, therapeutic outcomes, and safety. Manuscripts should reflect contemporary thought with respect to the topic. Use of figures to illustrate the mechanism of action and tables to present therapeutic outcomes, drug interactions, and adverse effects are encouraged. Manuscripts should utilize the MMPU categories for formatting the paper. Text should not exceed 3,000 words. Font should be 12-point, double-spaced Times New Roman. A maximum of 50 references is recommended.

6. Case Reports. These types of publications often add little to the scientific knowledge base. However, excellent case reports may be published as online only papers if they meet certain criteria, such as: (1) rare or unusual lesions/conditions that need documentation, (2) well-documented cases showing unusual or "atypical"



clinical or microscopic features or behavior, or (3) cases showing good long-term follow-up information, particularly in areas in which good statistics on results of treatment are needed.

### Submission

All submissions to *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, and Oral Radiology* should be made electronically via the Elsevier Editorial System (EES) submission system: <http://ees.elsevier.com/tripleo>. EES guides authors through the process of creating and uploading manuscripts. Original source files are required for the submission process. Correct preparation of the manuscript by the author will expedite the reviewing and publication procedures.

After submission files are uploaded, the system automatically generates an electronic copy in PDF format, which is used for reviewing. All correspondence, including the Editor's decision, will be communicated by e-mail; the corresponding author should verify that the e-mail address is entered correctly in the system. If the manuscript is accepted, the Editors reserve the right to determine whether it will be published in the print edition or solely in the Internet edition of the Journal. Articles accepted for publication are subject to editorial revision.

The manuscript, including all tables, should be formatted in word processing software (eg, .doc) and double-spaced. The use of appropriate headings throughout the body of the text (eg, Methods, Results, and Discussion sections) is required. Legends for figures should appear after the references list. If an illustration has been taken from copyrighted material, the legend must give full credit to the original source, and permission from the copyright holder must be provided (see *Permissions* below). Illustrations must also be submitted electronically as separate files (not embedded in the manuscript file); see file specifications below in *Illustrations*. Each table should be submitted as a separate file in word processing software (eg, .doc) format.

International authors who are not completely fluent in the English language should seek help in the preparation of their manuscripts. Such assistance will enhance the review, improve the chance of acceptance, and greatly reduce the time until publication if the article is accepted. You might consider using a professional English editorial service such as America Journal Experts (<http://www.journalexpert.com>), TextCheck (<http://www.textcheck.com>), Medical English Service (<http://www.med-english.com>), or the Elsevier Editing Services (<http://webshop.elsevier.com/languageediting>).

**Disclosures** Disclose all funding sources that supported the work as well as all institutional or corporate affiliations of the authors in the cover letter. On the title page, include a publishable statement disclosing any commercial associations, current and within the past five years, that might pose a potential, perceived, or real conflict of interest. These include grants, patent licensing arrangements, consultancies, stock or other equity ownership, advisory board memberships, or payments for conducting or publicizing the study. If there are no disclosures, provide a statement to that effect.

If there is any overlap between the submission and any other material, published or submitted, detail the nature of and reason for the overlap for the editors' assessment.

Although poster presentations and abstracts are not considered duplicate publication, they should be stated on the title page. Further information about Elsevier's standards for publication ethics is available at [http://www.elsevier.com/wps/find/intro.cws\\_home/ethical\\_guidelines](http://www.elsevier.com/wps/find/intro.cws_home/ethical_guidelines)

**Title Page.** The title page of the manuscript should include the title of the article, the full name of the author(s), academic degrees, positions, and institutional affiliations. The corresponding author's address, business and home telephone numbers, fax number, and e-mail address should be given. Disclosures must appear on the title page (see *Disclosures* above).

**Authorship.** All authors must have seen and approved the submission of the manuscript and be willing to take responsibility for the entire manuscript. All persons listed as authors must meet the criteria for authorship according to the "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication" available at [www.icmje.org](http://www.icmje.org). All persons who are identified as authors must have made substantial contribution to the manuscript through significantly contributing to the conception, design, analysis or interpretation of data; drafting or significantly revising the manuscript; and providing final approval of the manuscript. All three of these conditions must be met by each author. Persons who contribute to the effort in supporting roles should not be included as authors; they should be acknowledged at the end of the paper (see *Acknowledgments* below).

**Abstract.** A structured abstract, limited to 150 words, must be used for data-based research articles. The structured abstract is to contain the following major headings: Objective(s); Study Design; Results; and Conclusion(s). The Objective(s) reflects the purpose of the study, that is, the hypothesis that is being tested. The Study Design should include the setting for the study, the subjects (number and type), the treatment or intervention, and the type of statistical analysis. The Results include the outcome of the study and statistical significance if appropriate. The Conclusion(s) states the significance of the results. For nondata-based submissions, the abstract should be an unstructured summary of less than 150 words. No abstract is needed for submissions to the CPC section.

**Statement of Clinical Relevance.** For FLM, RA, and MMPU manuscripts, please provide a brief statement of no more than 40 words that succinctly summarizes the clinical relevance of the findings described in your manuscript.

**Methods.** As relevant, the Methods section should describe in adequate detail the experimental subjects, their important characteristics, and the methods, apparatus, and procedures used so that other researchers can reproduce the experiment. When the paper reports experiments on human subjects, the methods section must indicate that the protocol was reviewed by the appropriate institutional review board (IRB), is in compliance with the Helsinki Declaration, and that each subject in the project signed a detailed informed consent form.

**Animals.** Please indicate that protocols were reviewed by the appropriate institutional committee with respect to the humane care and treatment of animals used in the study.

**Acknowledgments.** The names of persons who have contributed substantially to a manuscript but who do not fulfill the criteria for authorship, along with their conflicts of interest, funding sources, and industry relations, if relevant, are to be listed in the Acknowledgment section. This section should include individuals who provided any writing, editorial, statistical assistance, etc.

**References.** References should be complete and reflect the current state of knowledge on the topic.. Personal communications and unpublished data are not to be cited as references but rather are to be cited in parentheses at the appropriate place in the text. Make sure all references have been verified and are cited consecutively in the text (not including tables) by superscript numbers. Reference list format must conform to that set forth in "Uniform Requirement for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" available at [www.icmje.org](http://www.icmje.org). References to articles in press must include authors' surnames and initials, title of article, and name of journal. The reference list should be typed double-spaced on a separate page of the manuscript file and numbered in order as the reference citations appear in the text. For journal citations, include surnames and initials of authors, complete title of article, name of journal (abbreviated according to the Cumulated Index Medicus), year of publication, volume, number, and inclusive page numbers. For book citations, surnames and initials of authors, chapter title (if applicable), editors' surnames and initials, book title, volume number (if applicable), edition number (if applicable), city and full name of publisher, year of publication, and inclusive page numbers of citation.

EXAMPLES (if six or fewer authors, list all; if seven or more list first six and add et al):

Format for periodical references: Pullon PA, McGivney J. Computer utilization in an oral biopsy service. *Int J Oral Surg* 1977;6:251-5.

Format for book references: Seakins J, Saunders R, editors. *Treatment of inborn errors of metabolism*. London: Churchill Livingstone: 1973; p. 51-6.

Format for chapter references: Hudson FB, Hawcroft J. Duration of treatment in phenylketonuria. In: Seakins J, Saunders R, editors. *Treatment of inborn errors of metabolism*. London: Churchill Livingstone: 1973; p. 51-6.

Journal article on the Internet: Abood S. Quality improvement initiative in nursing homes: the ANA acts in an advisory role. *Am J Nurs* 2002 Jun ;102(6). Available at: <http://www.nursingworld.org/AJN/2002/june/Wawatch.htm> (accessed June 24, 2011)

**Illustrations.** Illustrations should be numbered in the order of appearance in the text and accompanied by suitable legends.

A reasonable number of halftone illustrations or line drawings will be reproduced at no cost to the author. At the editors' discretion, color illustrations may be published in grayscale with the color image available in the online edition of the Journal; elaborate tables and extra illustrations, if accepted, may also appear as supplementary material in the online edition only. Typewritten or freehand lettering on illustrations is not

acceptable. All lettering must be done professionally, and letters should be in proportion to the drawings or photographs on which they appear.

Figures must be submitted in electronic figure file format. For best reproduction, images should be submitted in .tif format. Figures in .jpg format may be acceptable if they meet minimum resolution guidelines. Images embedded in programs such as PowerPoint or Word will not be accepted. Photographic images must be submitted at 300 ppi (pixels per inch) with the following dimensions: Full page 5" wide (1,500 pixels wide) or half page 3" wide (900 pixels wide). Screen capture resolutions (typically 72 ppi) will not provide adequate reproduction quality. Line-art images (charts, graphs) must be submitted at 1200 ppi with the following dimensions: Full page 5" wide (6000 pixels wide) or half page 3" wide (3600 pixels wide).

Avoid background gridlines and other formatting that do not convey information (eg, superfluous use of 3-dimensional formatting, background shadings). All images should be cropped to show only the area of interest and the anatomy necessary to establish a regional frame of reference. Although multipart figures are not preferred, if they are used, label multipart figures with capital letters (eg, A, B, C, etc); do not exceed nine parts to one figure. If images are to be combined in one figure, they should be the same height and magnification to facilitate reproduction.

For advice on image enhancement and annotation refer to Corl FM, et al. A five-step approach to digital image manipulation for the radiologist. *RadioGraphics* 2002;22:981-992.

For further information, please see [www.elsevier.com/artwork](http://www.elsevier.com/artwork).

See also *Permissions* below.

**Legends to illustrations.** Each illustration must be accompanied by a legend. These should be typed double-spaced on a separate page. If an illustration has been taken from published or copyrighted material, the legend must give full credit to the original source and accompanied by signed, written permission from the copyright holder (see *Permissions* below).

**Tables.** Each table should be submitted as a separate file. Tables should be self-explanatory and should supplement, not duplicate, the text. All table reference citations should be repeats of numbers assigned within the text, not initial citations. A concise title should be supplied for each table. All columns should carry concise headings describing the data therein. Type all footnotes immediately below the table and define abbreviations. If a table or any data therein have been previously published, a footnote to the table must give full credit to the original source and accompanied by signed, written permission from the copyright holder (see *Permissions* below).

**Supplementary Material.** To save print pages and/or shorten an article to a readable length while allowing for detailed information to be available to interested readers, authors are encouraged to provide information that is essential for the discussion of the results of the submission in the submission itself and utilize supporting information to describe experimental details and nonessential but useful information as Supplementary Material. If the manuscript is accepted for print

publication, a reference to the online material will appear in the print version.

Upload material, figures, and tables for online publication under the submission item "Supplementary Material" through the EES system. Be sure to change the description of the Supplementary Material to reflect the content; for example, Supplementary Detailed Methodology, Supplementary Figure Sx, Supplementary Table Sx.

Please order material such as Figures and Supplemental Figures separately in order of the callouts/first mentions in the text. For example: Figure 1, Figure 2; Supplemental Figure S1, Supplemental Figure S2, etc.

In the text be sure that you add behind the reference to the supplemental material "(Supplemental Table Sx; *available at [URL/link\*]*)." \* To be provided by the production department.

**Video and Computer Graphics.** Authors are encouraged to submit videos and computer-generated graphics (eg, a slide presentation with or without animation and sound, a short video clip of a procedure). An author who wishes to supply such material should notify the editors in the cover letter and note this intention in the Author Comments area of the online submission. Although the publisher will not edit any video or computer graphic, editors and reviewers may suggest changes. All patient-identifying information must be removed or masked. If any of this material is copyrighted, full credit to the original source must be given in the legend and accompanied by signed, written permission from the copyright holder (see *Permissions* below).

The maximum length of a video or computer graphic is 8 minutes. Longer submissions may be divided into smaller clips, each of which should be identified at the beginning of the section (eg, Video Clip 1, Graphic 1). A concise legend for each video clip or computer graphic presentation must be included with the manuscript. Videos are to be submitted in MPEG-1 or MPEG-2 (.mpg) or QuickTime (.mov) format. More detailed instructions can be found at <http://www.elsevier.com/artwork>. Videos and computer graphics accompanying a manuscript declined for publication will not be accepted separately. If the manuscript is accepted for publication, the presentation will be archived at <http://www.oooojournal.net/>.

**Permissions.** Direct quotations, tables, or illustrations that have appeared in copyrighted material must be accompanied by written permission for their use from the copyright owner along with complete information with respect to source. Photographs of identifiable persons must be accompanied by signed releases from the patient or legal guardian showing informed consent and permission to publish recognizable photographs. We cannot review a manuscript with a recognizable photograph until the consent form is signed and uploaded. If it is impossible to obtain a consent form, the image must be sufficiently cropped or otherwise changed so the patient cannot be recognized. However, placing bars over the eyes is no longer acceptable to eliminate the need for a signed consent form. Articles appear in both the print and online versions of the journal, and wording of permissions should specify permission in all forms and media. Failure to obtain electronic permission rights may result in the images not appearing in the print or online versions.

**Letters to the Editor.** Letters to the Editor should be a succinct comment pertaining to a paper(s) published in the Journal within the past year or to related topics. Provide a unique title for the Letter on the title page with complete contact information for the author(s). Double-space the text of the Letter. References, including reference to the pertinent article(s) in the Journal, should conform to style for manuscripts (see *References*). If accepted, the author(s) of the pertinent article(s) may be contacted to prepare a response to the comment.

**Announcements.** Announcements must be received by the Editorial Office at least 10 weeks before the desired month of publication. Items published at no charge include those received from a sponsoring society of the Journal; courses and conferences sponsored by state, regional, or national dental organizations; and programs for the dental profession sponsored by government agencies. All other announcements selected for publication by the Editor carry a charge of \$60 US, and the fee must accompany the request to publish.

**Reprints.** Because of the extremely high cost of preparing color articles, author reprints for articles containing color illustrations have to be prepared as overprints (overrun pages). Order forms will be sent to the corresponding author of articles containing color illustrations so that overprints of those articles can be ordered at the time of publication. No complimentary overprints or reprints will be provided.

### Checklist for authors

- Letter of submission, to include disclosure of any previous publications or submissions with any overlapping information
- Statement of clinical relevance (uploaded separately)
- Title page
- Title of article
- Full names(s), academic degree(s), affiliation(s) and titles of author(s)
- Author to whom correspondence, proof, and reprint requests are to be sent, including address and business and home telephone numbers, fax number, and e-mail address
- Any conflict of interest statement(s), disclosure(s), and/or financial support information, including donations
- Word count for the abstract (if relevant to article type), a complete manuscript word count (to include body text and figure legends), number of references, and number of figures/tables
- Structured abstract (double-spaced as part of manuscript file), as relevant to article type
- Article proper (double-spaced)
- Statement of IRB review and compliance with Helsinki Declaration (stated in Methods section of manuscript, as relevant)
- References (double-spaced on a separate page of the manuscript file)
- Figure legends (double-spaced, on a separate page of the manuscript file)
- Tables (double-spaced, uploaded separately as word processing [eg, .doc] files)

- Illustrations, properly formatted (uploaded as separate files)
- Video/computer graphics, properly formatted (uploaded as separate files)
- Signed permission to reproduce any previously published material, in all forms and media (scanned in as a file and uploaded as Permission)
- Signed permission to publish photographs of identifiable persons from the individual or legal guardian specifying permission in all forms and media (scanned in as a file and uploaded as Permission)