

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 22/09/2016.

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***

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	=	Protéina 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
™	=	<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.

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. Messori, R. Okamoto, N. Campos, N. Pola, L. Esper, M. Sbrana, S. Fucini, V. Garcia, A.Bosco, Influence of the proportion of particulate autogenous bone graft/platelet-rich plasma on bone healing in critical-size defects: an immunohistochemical analysis in rat calvaria, *Bone* 45 (2009) 339-345, 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. Messori, 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.