

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 26/08/2018.

*Eliana Aparecida Caliente*

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

ARAÇATUBA - SP  
2016

*Eliana Aparecida Caliente*

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

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Adj. Maria José H. Nagata

Coorientador: Prof. Ass. Dr. Edilson Ervolino

ARAÇATUBA - SP

2016

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

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

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

Orientadora: Profa. Maria José Hitomi Nagata

Coorientador: Prof. Edilson Ervolino

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

Black D6  
CDD 617.601

## A Deus

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

*“Eu sou aquilo que Deus pensa de mim.”*

*Santa Teresinha do Menino Jesus*

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

*Mãe,*

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

*Pai,*

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

*“Quando os meus olhos não podiam ver*

*Tua mão segura me ajudou a andar*

*Quando eu não tinha mais amor no peito*

*Teu amor me ajudou a amar”*

*Padre Fábio de Melo*

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

*Juliana,*

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

Amo você, minha melhor amiga!

*Henrique,*

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

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

*Antoine de Saint - Exupéry*

## *Agradecimentos*

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

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

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

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

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

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

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

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

À amiga **Eduarda**,

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

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

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

## **AO** amigo **Marcelo Putte e sua família**

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

## **AO** amigo **Everton Tavano e sua família**

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

## **AO** amigo **Lucas Esgalha e sua família**

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

## **À** amiga **Aline Magalhães e sua família**

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

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

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

*A* amiga **Ana Cláudia Manzatti**

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

*A minha sincera gratidão*

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

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

*A* Professora **Dra. Leticia Theodoro**

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

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

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

**Ao Professor Dr. Juliano Milanezi**

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

**À Professora Dra. Carolina Santinoni**

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

**À Professora Dra. Natália Campos**

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

**Ao Professor Dr. Michel Messoria**

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

**À querida Professora Dra. Rita de Cássia Dorneles**

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

*Ao* querido Professor **Dr. Wilson Poi**

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

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

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

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

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

*Ao* Dr. **Stephen Fucini**

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

**Ao Sr. Odair**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

*Arthur Schopenhauer*

## RESUMO

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

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

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

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

## ABSTRACT

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

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

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

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

## *Lista de Figuras*

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

de medula óssea; OA, osso autógeno.

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

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

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

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

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

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

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

## *Lista de Tabelas*

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

## *Lista de Anexos*

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

## *Lista de Abreviaturas*

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

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

## *Sumário*

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

# *Manuscrito para publicação*<sup>\*</sup>

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

Eliana Aparecida Caliente, DDS\* ; Maria J. H. Nagata, DDS, PhD<sup>\*,1</sup>

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

### **<sup>1</sup>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](mailto:mjnagata@foa.unesp.br)

**Running title:** Terapias otimizadoras do reparo ósseo

## Resumo

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

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

## 1 INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

## REFERÊNCIAS

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

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

- useful aid in healing and regeneration of bone tissue. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 16:1222-6.
18. Nagata M, Messori M, Okamoto R et al. 2009. Influence of the proportion of particulate autogenous bone graft/platelet-rich plasma on bone healing in critical-size defects: an immunohistochemical analysis in rat calvaria. *Bone* 45:339-45.
19. Raghoobar GM, Schortinghuis J, Liem RS et al. 2005. Does platelet-rich plasma promote remodeling of autologous bone grafts used for augmentation of the maxillary sinus floor? *Clin Oral Implants Res* 16:349-56.
20. Choi BH, Im CJ, Huh JY et al. 2004. Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in autogenous bone graft. *Int J Oral Maxillofac Surg* 33:56-9.
21. Aghaloo TL, Moy PK, Freymiller EG. 2002. Investigation of platelet-rich plasma in rabbit cranial defects: A pilot study. *J Oral Maxillofac Surg* 60:1176-81.
22. Nagata MJ, Messori M, Pola N et al. 2010. Influence of the ratio of particulate autogenous bone graft/platelet-rich plasma on bone healing in critical-size defects: a histologic and histometric study in rat calvaria. *J Orthop Res* 28:468-73.
23. Messori MR, Nagata MJ, Mariano RC et al. 2008. Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma: a histologic and histometric study in rat calvaria. *J Periodontol Res* 43:217-23.
24. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I et al. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8:315-7.
25. Gratama JW, D'hautcourt JL, Mandy F et al. 1998. Flow cytometric quantitation of immunofluorescence intensity: problems and perspectives. European Working Group on Clinical Cell Analysis. *Cytometry* 33:166-78.

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

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

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