

NAYARA YURI HANO

**Aspirado de medula óssea associado ao enxerto de osso autógeno e
à terapia com laser em baixa intensidade no reparo ósseo.
Estudo histomorfométrico em calvária de ratos**

ARAÇATUBA - SP

2015

NAYARA YURI HANO

Aspirado de medula óssea associado ao enxerto de osso autógeno e à terapia com laser em baixa intensidade no reparo ósseo. Estudo histomorfométrico em calvária de ratos

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Odontologia.

Orientadora: Prof^ª Adjunto III Maria José Hitomi Nagata

ARAÇATUBA - SP

2015

DEDICATÓRIA

.Aos meus pais, Sérgio e Angélica.

Agradeço todo o esforço de vocês para que eu pudesse chegar aqui hoje. Sempre apoiando meus objetivos e tornando-o de vocês também. Vieram me preparando á muito tempo para que esse dia finalmente chegasse. Sei que abdicaram de muitos sonhos pessoais para me proporcionarem a oportunidade de estudar. Mãe obrigada por ter dedicado sua vida pra acompanhar meu desenvolvimento. Pai obrigada pela rigorosidade e incentivo aos estudos. Vocês são meus maiores exemplos de vida. Muito, muito obrigada!

A minha Avó, Mikie Hano.

Batian, minha amada avó. Agradeço todo o carinho da senhora, pelos finais de semana de aconchego, pelos mimos durante meus estudos em sua casa. Obrigada a senhora foi fundamental para que esse dia chegasse.

AGRADECIMENTOS

Aos Amigos

Á Família Queiroz,

Mara, Francisco, Meire, Mario, Mario Augusto e Pedro.

Por todo carinho, vocês representaram minha família durante esses anos, pelos almoços de domingo, cuidados médicos e apoio durante momentos de grande dificuldade. Muito obrigada!

As Mestrandas Eduarda Belem e Eliana Caliente,

Obrigada por todo apoio, apesar de todas as dificuldades enfrentadas vocês tiveram a paciência de me acompanhar passo a passo. Sem vocês nada disso teria acontecido.

Duda, obrigada por me apoiar durante o curso da minha iniciação científica, me ajudou além da área acadêmica, mas também foi uma amiga e companheira nos momentos de dificuldade.

Eliana, obrigada pelas piadas e brincadeiras durante o decorrer dos trabalhos, deixando-os mais divertidos.

As Amigas e irmãs,

Aline Ávila, Bianca Marques, Débora Biléco, Dinah Fressato, Jéssica de Andrade, Karyne, Marina Módolo, Marina Sena, Mariane, Mariana Ortega, Michele Maria, Michele Kuhn, Paola Carneiro, Tahiana Pigozzi, Victória Berriel. Seria impossível chegar aqui sem vocês, minhas queridas muito obrigada por esses cinco anos juntas.

Doutoranda Paula Araujo,

Paulinha, obrigada pelo apoio e amizade. Foram poucos os momentos juntas, mas cheios de conhecimentos compartilhados. Obrigada por sempre quando necessário você estava disposta a ajudar e a ensinar.

Aos Professores

Professora Dra. Maria José,

Obrigada pela maravilhosa oportunidade de realizar uma iniciação científica ao seu lado. Aprendi que tudo deve ser feito com perfeição, pois são os pequenos detalhes que fazem grande diferença. Minha admiração e respeito pela senhora só aumentam quando mais a conheço.

Agradeço por sempre estar disposta a ouvir, pelos conselhos e pelos conhecimentos científicos compartilhados.

Professora Dra. Suely R. Mogami Bomfim,

Querida professora, que oportunidade maravilhosa ter a senhora nas cirurgias do meu projeto, o seu carinho com a gente, deixando o ambiente mais leve e com um toque de mãe. Muito obrigada.

Professor Dr. Edilson Ervolino

Por toda disponibilidade durante a execução do projeto, por dividir seus conhecimentos de um histologista certificado. Apesar das inúmeras tarefas sempre que foi necessário o senhor nos ajudou com muita paciência. Obrigada, professor.

Professor Dr. Juliano Milanezi de Almeida

Obrigada por permitir que eu acompanhasse a clínica de Pós-Graduação em Periodontia, a cada clínica percebi o quanto era importante o conhecimento científico e a destreza manual para as cirurgias periodontais, sempre levarei comigo cada ensinamento e principalmente não sugar o enxerto.

Muito obrigada.

Professor Dr. Elio Shinohara,

Querido professor e amigo, o senhor com toda sua humildade me fez entender que para ser um profissional de excelência é necessário muito estudo e dedicação. Que a faculdade é um momento único da vida e que devemos aproveitar em todos os sentidos. Agradeço pela oportunidade de acompanhar alguns de seus plantões e tomar suco cor marrom. Muito obrigada!

Professora Dra. Carolina Santinoni,

Carol, obrigada por toda a ajuda durante a iniciação científica. Sempre estimulando a vontade de aprender e disposta a ensinar, às vezes rigorosa, mas sempre para que pudéssemos crescer e desenvolver o melhor trabalho. Você foi fundamental na execução do trabalho.

Obrigada.

HANO, N.Y. **Aspirado de medula óssea associado ao enxerto de osso autógeno e à terapia com laser em baixa intensidade no reparo ósseo. Estudo histomorfométrico em calvária de ratos.** 2015. 28 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2015.

RESUMO

O propósito deste estudo é avaliar, histomorfometricamente, a influência do aspirado de medula óssea (AMO) associado ao enxerto de osso autógeno (OA) e à terapia com laser em baixa intensidade (LLLT) no reparo ósseo de defeitos de tamanho crítico (DTC), criados cirurgicamente em calvárias de ratos. 30 ratos foram aleatoriamente divididos em 3 grupos: C (controle), AMO/LLLT e AMO/OA/LLLT. Um DTC de 5 mm de diâmetro foi criado na calvária de cada animal. Os animais de cada grupo receberam os seguintes tratamentos: C – o defeito foi preenchido com coágulo sanguíneo somente; AMO/LLLT - o defeito recebeu aplicação da LLLT, foi preenchido com AMO e irradiado novamente; AMO/OA/LLLT - o defeito recebeu aplicação da LLLT, foi preenchido com enxerto de OA associado com AMO e irradiado novamente. A LLLT foi realizada com laser de InGaAlP (660 nm, 0,035 W, 4 s/ponto, 0,14 J/ponto, 4,9 J/cm²/ponto). Os animais foram submetidos à eutanásia aos 30 dias pós-operatórios. A área de osso neformado (AON) foi calculada como porcentagem da área total do defeito original na análise histomorfométrica. Os dados foram analisados estatisticamente. O grupo AMO/LLLT apresentou AON significativamente maior que os grupos C e AMO/OA/LLLT. Não houve diferenças estatisticamente significativas na AON entre os grupos C e AMO/OA/LLLT. Dentro dos limites desse estudo, pode-se concluir que a associação AMO/OA/LLLT não estimulou o reparo ósseo em DTC na calvária de ratos. Já a associação AMO/LLLT resultou em formação óssea significativamente maior que os demais grupos, confirmando que esta terapia combinada é uma abordagem promissora para promoção da regeneração óssea em defeitos extensos.

Palavras-chave: Aspirado de medula óssea. Células-tronco. Lasers. Enxerto Ósseo. Regeneração Óssea.

HANO, NY. **Bone marrow aspirate combined with autogenous bone grafting and low-level laser therapy on bone healing. A histomorphometric study in rat calvaria.** 2015. 28 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2015.

ABSTRACT

The purpose of this study was to histomorphometrically analyze the influence of the bone marrow aspirate (BMA) combined with graft autogenous bone (AB) and low-level laser therapy (LLLT) on bone healing in surgically created critical-size defects (CSD) in rat calvaria. 30 rats were randomly divided into three groups: C (control), BMA/LLLT and BMA/AB/LLLT. A 5 mm diameter CSD was created in the calvarium of each animal. In Group C, the defect was filled with blood clot only. In Group BMA/LLLT, the defect received laser irradiation, was filled with BMA and irradiated again. In Group BMA/AB/LLLT, the defect received laser irradiation, was filled with AB graft combined with BMA and irradiated again. LLLT was performed with InGaAlP laser (InGaAlP laser 660 nm, 0,035 W, 4 s/ponto, 0,14 J/ponto, 4,9 J/cm²/ponto). Animals were euthanized 30 days postoperatively. Newly formed bone area (NFBA) was calculated as percentage of the total area of original defect in the histomorphometric analysis. Data were statistically analyzed. Group BMA/LLLT had significantly greater NFBA than groups C and BMA/AB/LLLT. Statistically significant differences in NFBA were not observed between groups C and BMA/AB/LLLT. Within the limits of this study, it can be concluded that the combination of BMA/AB/LLLT did not stimulate bone repair in CSD in rat calvaria. On the other hand, the combination BMA/LLLT yielded significantly greater bone formation when compared to the other groups, confirming that this combined therapy is a promising approach to promote bone regeneration in large defects.

Keywords: Bone marrow aspirate. Stem cells. Lasers. Bone graft. Bone regeneration.

LISTA DE ABREVIATURAS

AMO = Aspirado de Medula Óssea
AMO/LLLT = Aspirado de Medula Óssea associado à Terapia com Laser em Baixa Intensidade
C = Controle
CEUA = Comissão de Ética no Uso de Animais
cm = Centímetro
cm² = Centímetro Quadrado
CTM = Células-Tronco Mesenquimais
DTC = Defeito de Tamanho Crítico
EDTA = Ácido Etilenodiaminotetracético
et al. = *et alii*
FAPESP = Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FOA = Faculdade de Odontologia de Araçatuba
g = grama
InGaAlP = Índio-Gálio-Alumínio-Fósforo
Kg = Quilograma
LLLT = Terapia com Laser em Baixa Intensidade
Ltda = Limitada
mg = Miligrama
mL = Mililitro
mm = Milímetro
mm² = Milímetro quadrado
n° = Número
OCN = Osteocalcina
OPN = Osteopontina
PCNA = Antígeno Nuclear de Proliferação Celular
PVPI = Polivinilpirrolidona
Runx2 = Fator de Transcrição Relacionado à Runt-2
s = Segundo
UNESP = Universidade Estadual Paulista
VEGF = Fator de Crescimento Vascular Endotelial
W = Watts
µL = Microlitro
µm = Micrometro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – (A) Punção da crista ilíaca; (B) Tubo contendo 1 ml de medula

Figura 2 – (A) Retalho total rebatido em direção posterior; (B) DTC de 5 mm de diâmetro; (C) Preparação da canaleta 2 mm anterior ao DTC; (D) DTC e marcações de amálgama. DTC = defeito de tamanho crítico.

Figura 3 – (A) AMO coagulado; (B) aplicação do AMO do DTC. DTC = defeito de tamanho crítico.

Figura 4 - Fotomicrografias evidenciando o aspecto histológico dos tecidos que preenchem os defeitos ósseos nos grupos C (a, b), AMO-LLLT (c, d) e AMO-AO-LLLT (e, f). Abreviações e símbolos: ao, partículas remanescentes do enxerto ósseo autógeno; tc, tecido conjuntivo, to, tecido ósseo. Coloração: Hematoxilina e Eosina (H&E). Aumento original: (a) (c) (e), 25x; (b) (d) (f), 200x. Barras de escala: (a) (c) (e), 500 μm ; (b) (d) (f), 150 μm .

Figura 5 - Gráfico mostrando médias e desvios padrão de AON (em %) para cada grupo, bem como os resultados das comparações entre os grupos. 30 dias pós-operatórios. * $p < 0.001$; ** $p < 0.01$

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
3 RESULTADOS.....	17
4 DISCUSSÃO.....	19
5 CONCLUSÃO.....	21
REFERÊNCIAS	22
ANEXOS	27

1 INTRODUÇÃO

A engenharia de tecidos, um dos principais componentes da medicina regenerativa, segue os princípios do transplante de células, ciência de materiais e engenharia para o desenvolvimento de substitutos biológicos que possam restaurar e manter a função normal de tecidos.¹ Está consolidada na utilização de células, arcabouços biocompatíveis e fatores de crescimento.^{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.³ Estudos recentes têm avaliado a terapia envolvendo cultivo de células-tronco mesenquimais (CTMs) derivadas da medula óssea com o objetivo de promover o reparo ósseo.⁴⁻⁷ O cultivo de CTMs 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 CTMs.⁸⁻¹¹ O AMO contém uma porcentagem de células hematopoiéticas, endoteliais e CTMs significativamente maior que o sangue periférico.¹² Somente poucos estudos in vivo avaliaram o uso do AMO no reparo ósseo, sozinho^{8,11,13} ou associado com enxertos ósseos ou biomateriais^{9-11,14-17} demonstrando resultados promissores.

Estudos in vitro que avaliaram o efeito da terapia com laser em baixa intensidade (LLLT) sobre as CTMs demonstraram que a LLLT promoveu o aumento da proliferação destas células,¹⁸⁻²¹ e induziu sua diferenciação em osteoblastos.²¹ Assim, considerando-se o grande potencial das CTMs 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 histomorfometricamente e imunoistoquimicamente no reparo de defeitos de tamanho crítico em calvária de ratos.⁸ Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP como Bolsas de Mestrado (Processo 2010/04450-2) e Doutorado (Processo 2012/15138-5) e, parcialmente, como Auxílio Regular à Pesquisa (Processo 2010/18925-2). 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 antígeno

nuclear de proliferação celular (PCNA), fator de transcrição relacionado à Runt 2 (Runx2) e osteocalcina (OCN). O grupo AMO/LLLT teve AON e número de células PCNA-positivas e OCN-positivas, significativamente maiores que todos os grupos experimentais, bem como número de células Runx2-positivas significativamente menor que os grupos C e LLLT. Concluiu-se que a combinação AMO/LLLT aumentou significativamente a formação óssea em defeitos de tamanho crítico em calvárias de ratos quando comparados ao controle, ou a cada tratamento isoladamente.

O AMO tem sido principalmente utilizado combinado a enxertos ósseos alógenos, enxertos ósseos xenógenos ou biomateriais para promoção do reparo ósseo.^{9,10,15-17,22} Segundo o nosso conhecimento, a associação do AMO a enxertos de osso autógeno (OA) ainda não foi avaliada. Sabe-se que o enxerto de OA é considerado o material de enxertia ideal para cirurgias de reconstrução óssea devido a suas propriedades osteogênica, osteoindutiva e osteocondutiva.²³ Assim, pode-se inferir que a associação do AMO aos enxertos de OA teria o potencial de apresentar resultados sinérgicos muito vantajosos no reparo ósseo, principalmente nos casos em que são utilizados enxertos de OA cortical que, apesar de terem potencial osteogênico, osteoindutivo e osteocondutivo, apresentam número de células muito menor e revascularização, reabsorção e remodelação mais lentas que os enxertos de osso medular de crista ilíaca.²⁴ Neste contexto, seria interessante, ainda, avaliar a associação da LLLT à combinação AMO e enxertos de OA, uma vez que a LLLT tem potencial de induzir a proliferação e diferenciação de osteoblastos,²⁵⁻²⁸ aumentar a expressão de fatores osteogênicos^{29,30} e estimular a angiogênese^{31,32} durante o reparo ósseo.

O propósito deste estudo foi avaliar a influência do aspirado de medula óssea (AMO) associado ao enxerto de osso autógeno (OA) e à terapia com laser em baixa intensidade (LLLT) no reparo ósseo de defeitos de tamanho crítico, criados cirurgicamente em calvárias de ratos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Modelo experimental

O protocolo experimental foi aprovado Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP. Foram utilizados 30 ratos machos (*Rattus norvegicus*, *albinus*, Wistar), pesando entre 450 e 500 g (UNESP, Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba). Um defeito de tamanho crítico foi cirurgicamente criado na calvária de cada animal. Eles foram aleatoriamente divididos em 3 grupos experimentais: C (controle); AMO/LLLT (aspirado de medula óssea associado à terapia com laser em baixa intensidade) e AMO/OA/LLLT (aspirado de medula óssea associado ao enxerto de osso autógeno e à terapia com laser em baixa intensidade).

2.2 Protocolo de coleta o aspirado de medula óssea

Os animais dos grupos AMO/LLLT e AMO/OA/LLLT foram anestesiados por injeção intramuscular de xilazina (6 mg/kg de peso corporal) e quetamina (70 mg/kg de peso corporal). Imediatamente antes da realização dos procedimentos cirúrgicos, os animais desses grupos foram submetidos à coleta de medula das cristas ilíacas direita e esquerda. 1 ml de medula (0,5 ml da crista ilíaca direita e 0,5 ml da crista ilíaca esquerda) foi coletado de cada animal usando uma seringa descartável de 10 ml contendo 0,1 ml de citrato de sódio a 3,2% para prevenir coagulação. A medula óssea coletada foi armazenada em um microtubo estéril até o momento da aplicação clínica. (Figura 1)

2.3 Procedimentos cirúrgicos

Os animais do Grupo C (controle) foram anestesiados seguindo o mesmo protocolo descrito para os grupos AMO/LLLT e AMO/OA/LLLT. Após anti-sepsia, uma incisão semilunar foi realizada na região anterior da calvária, permitindo que um retalho de espessura total fosse rebatido na direção posterior. Um defeito de tamanho crítico (DTC) de 5 mm de diâmetro foi criado com uma trefina acoplada em peça de mão de baixa rotação, sob irrigação

constante com solução salina estéril. Uma marcação em forma de L foi realizada 2 mm anterior e uma outra 2 mm posterior à margem do defeito cirúrgico, utilizando uma broca carbide tronco-cônica e um guia cirúrgico. As marcações foram preenchidas com amálgama. O propósito destas marcações foi permitir a identificação do meio do defeito cirúrgico original durante o processamento laboratorial e, também, para serem usadas como referências para localizar precisamente as margens ósseas originais do defeito cirúrgico durante análise histométrica (MESSORA et al., 2008) (Figura 2).

No Grupo C, o defeito foi preenchido com coágulo sanguíneo somente. No Grupo AMO/LLLT, o defeito recebeu aplicação da LLLT, foi preenchido com AMO e irradiado novamente. No Grupo AMO/OA/LLLT, o defeito recebeu aplicação da LLLT, foi preenchido com enxerto de OA associado com AMO e irradiado novamente. O osso autógeno obtido da calvária durante a criação do defeito cirúrgico foi preparado em um triturador de osso (modelo pilão), resultando em um volume de 0,1 ml de OA particulado. Os tecidos moles foram, então, reposicionados e suturados. Cada animal recebeu injeções intra-musculares de morfina (1 mg/kg de peso corporal - Dirmof[®], Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., São Paulo, SP, Brasil) e 24.000 IU de Penicilina G-benzatina (Pentabiótico* Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge[®] Saúde Animal Ltda., Campinas, SP, Brasil).

2.4 Protocolo de aplicação do AMO

No momento da aplicação clínica, 50 µl de AMO foi ativado com 1,25 µl de uma solução de cloreto de cálcio a 10% (Calcium Chloride 10% Solution, ScienceLab.com Inc., Houston, TX, EUA), na proporção de 0,05 ml de cloreto de cálcio para cada 1 ml de AMO. (Figura 3)

2.5 Protocolo de aplicação da LLLT

O laser utilizado neste estudo foi o de índio-gálio-alumínio-fósforo (InGaAlP) (TheraLase[®], DMC Equipamentos Ltda, São Carlos, SP, Brasil), com comprimento de onda de 660 nm e área do spot de 0,0283 cm². Imediatamente após o preparo do defeito cirúrgico, a LLLT foi aplicada em 8 pontos equidistantes na porção interna (modo contato) do defeito cirúrgico, de tal forma que toda extensão do mesmo recebeu a irradiação com laser. O laser

foi aplicado com uma potência de 0,035 W por 4 s/ponto, energia de 0,14 J/ponto e densidade energética de 4,9 J/cm²/ponto. A densidade de energia total aplicada foi de 39,2 J/cm². O defeito foi preenchido com AMO (Grupo AMO/LLLT) ou enxerto de OA associado ao AMO (Grupo AMO/OA/LLLT) e irradiado novamente.

2.6 Processamento tecidual

Todos os animais foram submetidos à eutanásia aos 30 dias pós-operatórios. A área do defeito cirúrgico original e os tecidos circunjacentes foram removidos em bloco. Após descalcificação inicial em solução de Ácido Etilenodiaminotetracético (EDTA) a 10%, cada espécime foi dividido longitudinalmente em dois blocos, usando o longo eixo de ambas as marcações em L como referências. Cortes transversais foram, então, feitos usando o eixo menor de cada marcação em L, permitindo a identificação precisa das margens do defeito cirúrgico original durante a análise histomorfométrica. Após descalcificação adicional, as peças foram processadas e incluídas em parafina. Foram realizados cortes seriados longitudinais, com 5 µm de espessura e corados pelas técnicas de Hematoxilina e Eosina para a análise histomorfométrica.

2.7 Procedimento de análise de imagem

Dois cortes histológicos, representando o centro do defeito cirúrgico original, foram selecionados para a análise histomorfométrica. Esta análise foi realizada por examinador calibrado e cego ao tratamento realizado (“Imagelab 2000” software, Diracon Bio Informática Ltda., Vargem Grande do Sul, SP, Brasil).

CrITÉrios baseados no estudo de Messora et al. (2008) foram usados para padronizar a análise histomorfométrica das imagens digitais. Resumidamente, a Área Total (AT) correspondeu à área total do defeito cirúrgico original e foi considerada 100% da área a ser analisada. A área de osso neoformado (AON) foi calculada como uma porcentagem da AT na análise histomorfométrica.

2.8 Análise Estatística

A normalidade e homocedasticidade dos dados foram verificadas. A significância das diferenças entre os grupos foi determinada por uma análise de variância (ANOVA), seguida por um teste de Tukey *post-hoc* quando a ANOVA sugeriu uma diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS

3.1 Análise histológica qualitativa

Nos espécimes do Grupo C, observou-se uma estreita faixa de tecido ósseo neoformado confinada exclusivamente às bordas da ferida cirúrgica. Os defeitos ósseos deste grupo mostravam-se preenchidos em sua quase totalidade por tecido conjuntivo denso. Neste tecido, uma grande quantidade de fibras colágenas, orientadas paralelamente à superfície da ferida, abrigava raras células inflamatórias, grande quantidade de fibroblastos e alguns vasos sanguíneos (Figura 4a e 4b).

Nos espécimes do grupo AMO/LLLT, a neoformação óssea progrediu das bordas da ferida em direção ao seu centro. O tecido ósseo neoformado propiciou o fechamento da quase totalidade ou de mais de 2/3 do defeito ósseo. O remanescente do defeito ósseo mostrava-se ocupado por tecido conjuntivo denso. Este tecido mostrava-se composto por grande quantidade de fibras colágenas, entre as quais se observava moderada quantidade de fibroblastos e vasos sanguíneos (Figura 4c e 4d).

Os espécimes do grupo AMO/OA/LLLT exibiram os dois padrões de neoformação óssea, ambos igualmente contribuindo muito pouco para o fechamento do defeito ósseo. Uma neoformação óssea progrediu das bordas da ferida em direção ao seu centro, todavia, em todos os espécimes, isso era representado por uma faixa extremamente estreita de tecido ósseo, inclusive mais estreita que aquela apresentada pelos espécimes do grupo C. No centro do defeito, observou-se muitas partículas ósseas remanescentes do enxerto ósseo envolvidas por tecido conjuntivo. Na superfície de alguns destes remanescentes do enxerto ósseo, constatou-se o outro padrão de neoformação óssea, representado pela aposição de uma fina camada de tecido ósseo imaturo. Todavia, a maioria dos remanescentes do enxerto não exibiu aposição de tecido ósseo. Alguns focos de reabsorção óssea ativa foram observados sobre as partículas de osso autógeno provenientes do enxerto. O tecido conjuntivo que ocupava as superfícies do defeito ósseo e circunscrevia as partículas ósseas remanescentes do enxerto ósseo apresentava-se moderadamente denso, rico em vasos sanguíneos e provido de moderada quantidade de fibroblastos e discreto infiltrado inflamatório. (Figura 4e e 4f).

3.2 Análises histométrica e estatística

O grupo AMO/LLLT apresentou AON significativamente maior que os grupos C e AMO/OA/LLLT. Não houve diferenças estatisticamente significativas na AON entre os grupos C e AMO/OA/LLLT (Figura 5).

4 DISCUSSÃO

No presente estudo, o Grupo AMO/LLLT apresentou formação óssea significativamente maior que o Grupo Controle, corroborando os achados observados em estudo anterior do nosso grupo de pesquisa.⁸ É bem conhecido que as células-tronco mesenquimais (CTM) são um dos tipos celulares presentes na medula óssea que contribuem para a regeneração de tecidos mesenquimais, incluindo osso^{33,34}. Estudos recentes têm demonstrado que as CTM de medula óssea têm um maior potencial osteogênico que aquelas de outras origens anatômicas.^{10,35} Apesar de que uma contagem específica de CTM não foi realizada no presente estudo, é provável que tenha havido um aumento significativo de CTM nos sítios cirúrgicos do Grupo AMO/LLLT. Esta hipótese é suportada pelos achados de Smiler et al. (2008) que analisaram amostras de AMO e sangue periférico de pacientes com idades entre 23 e 73 anos, através de citometria de fluxo de 6 colunas, usando marcadores celulares para células-tronco relacionadas ao reparo e crescimento ósseo, e concluíram que o AMO contém uma porcentagem de células hematopoiéticas, endoteliais e CTMs significativamente maior que o sangue periférico. Tem sido demonstrado que o laser em baixa potência pode acelerar a proliferação de CTM³⁶⁻³⁸. Além disso, a LLLT tem efeitos bioestimulatórios na conversão das CTM em células formadoras de osso e na indução de ossificação *ex vivo*³⁹. Portanto, a combinação de LLLT com AMO poderia ser uma abordagem promissora, como indicado em estudo pioneiro realizado por nosso grupo de pesquisa⁸ e confirmado pelos resultados do presente estudo, onde o Grupo AMO/LLLT apresentou formação óssea significativamente maior que os demais grupos. Além disso, sinais de um estágio avançado da formação óssea, tais como trabéculas ósseas espessas ricas em osteócitos e pequenos espaços medulares preenchidos com medula óssea, com restituição do periósteo, foram observados neste grupo. Pode ser sugerido que, no Grupo AMO/LLLT, houve um aumento das CTM no sítio cirúrgico devido à presença de AMO.¹² A LLLT deve ter não somente estimulado a proliferação de CTM,^{36-38,40} mas também estimulado a diferenciação destas células no linhagem osteoblástica,^{39,41} resultando em regeneração óssea melhor e mais rápida. É possível que, além das CTM, a LLLT tenha tido uma influência positiva sobre outras células do AMO, tais como as células-tronco hematopoiéticas e progenitoras endoteliais, melhorando suas capacidades de induzir vasculogênese, recrutar outras células para o sítio da injúria, e secretar fatores de crescimento e citocinas que tenham um efeito parácrino nas células circunjacentes,^{42,43} melhorando, assim, a regeneração óssea.⁴⁴ Considerando-se os resultados muito promissores obtidos com a terapia combinada AMO/LLLT na promoção da regeneração óssea em estudo

anterior do grupo⁸ e, também, o fato de que o AMO tem sido utilizado, com sucesso, combinado a enxertos ósseos alógenos e xenógenos ou biomateriais para promoção do reparo ósseo,^{9,11,15,22} aventou-se a hipótese, proposta para ser avaliada neste estudo, de que a combinação de AMO/LLLT ao enxerto de OA poderia apresentar resultados sinérgicos muito vantajosos no reparo ósseo. Contudo, esta hipótese não foi confirmada pelos resultados observados nos animais do Grupo AMO/OA/LLLT, que apresentaram formação óssea similar ao Grupo Controle e significativamente menor que o Grupo AMO/LLLT. Sabe-se que o enxerto de OA é considerado o material de enxertia ideal para cirurgias de reconstrução óssea devido a suas propriedades osteogênica, osteoindutiva e osteocondutiva.^{23,45} Estes enxertos podem incluir osso cortical, esponjoso ou córtico-esponjoso.²³ O osso coletado da calvária durante o preparo do defeito cirúrgico era predominantemente formado por osso cortical. Devido ao fato de que a sobrevivência dos osteócitos depende da presença de um suprimento vascular dentro de uma distância de 0,1 mm,²³ os enxertos de osso cortical deficientes em concentrados celulares e vasculares sobre as superfícies endosteais e periosteais podem não ser capazes de sustentar a viabilidade celular.²³ De fato, tem sido amplamente constatado em vários estudos que enxertos de osso cortical têm neovascularização muito lenta e as células no seu interior podem não sobreviver; portanto, a formação óssea ocorre principalmente pelo crescimento do osso adjacente.⁴⁶ Além disso, tem sido demonstrado que o trauma cirúrgico a um enxerto compromete a viabilidade celular e causa um atraso na revascularização e remodelação do enxerto traumatizado comparado com um enxerto cuidadosamente manipulado.⁴⁷ Neste contexto, deve-se considerar que o enxerto de OA utilizado neste estudo foi na forma particulada, tendo sido preparado em um triturador de osso. Portanto, o significativo trauma cirúrgico infligido a este enxerto deve ter dificultado a sobrevivência celular e revitalização do enxerto *in situ*.²³ Se a viabilidade celular foi comprometida nos fragmentos de OA enxertados no defeito cirúrgico, não havia quantidade significativa de células que pudessem ter sido estimuladas pela LLLT ou pelas CTM do AMO. Maxson et al. 2012 afirmaram que, além da diferenciação, a sinalização parácrina também tem sido implicada como outro mecanismo pelo qual as CTM melhoram o reparo tecidual. De fato, a análise histológica qualitativa mostrou que os animais do Grupo AMO/OA/LLLT apresentavam vários fragmentos do enxerto de OA no sítio do defeito cirúrgico, mesmo aos 30 dias pós-operatórios, confirmando o retardo nos processos de reabsorção e remodelação deste enxerto. Estes fragmentos, compostos por tecido parcialmente necrótico,²³ permaneceram ocupando espaços no sítio do defeito cirúrgico, limitando assim, a neoformação óssea.

5 CONCLUSÃO

Dentro dos limites desse estudo, pode-se concluir que a associação AMO/OA/LLLT não estimulou o reparo ósseo em DTC na calvária de ratos. Já a associação AMO/LLLT resultou em formação óssea significativamente maior que os demais grupos, confirmando que esta terapia combinada é uma abordagem promissora para promoção da regeneração óssea em defeitos extensos.

REFERÊNCIAS

1. ATALA A et al. Engineering complex tissues. *Sci Transl Med*. 2012;4(160):160rv12
2. KASTEN P et al. The effect of platelet-rich plasma on healing in critical-size long-bone defects. *Biomaterials*. 2008;29:3983-3992.
3. KAIGLER D et al. Angiogenic and osteogenic potential of bone repair cells for craniofacial regeneration. *Tissue Eng Part A*. 2010;16:2809-2820.
4. BURASTERO G et al. The association of human mesenchymal stem cells with BMP-7 improves bone regeneration of critical-size segmental bone defects in athymic rats. *Bone*. 2010;47:117-126
5. SCHNEIDER RK et al. The osteogenic differentiation of adult bone marrow and perinatal umbilical mesenchymal stem cells and matrix remodelling in three-dimensional collagen scaffolds. *Biomaterials*. 2010;31:467-480.
6. ZONG C et al. Reconstruction of rat calvarial defects with human mesenchymal stem cells and osteoblast-like cells in poly-lactic-co-glycolic acid scaffolds. *Eur Cell Mater*. 2010;20:109-120.
7. SANTO VE et al. Cell engineering by the internalization of bioinstructive micelles for enhanced bone regeneration. *Nanomedicine*. 2015;10:1707-1721.
8. NAGATA MJH et al. Bone marrow aspirate combined with low-level laser therapy: a new therapeutic approach to enhance bone healing. *J Photochem Photobiol B*. 2013;121:6-14.
9. BANSAL S et al. Evaluation of hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate mixed with bone marrow aspirate as a bone graft substitute for posterolateral spinal fusion. *Indian J Orthop*. 2009;43:234-239.
10. SOLTAN M et al. Bone block allograft impregnated with bone marrow aspirate. *Implant Dent* 2007;16:329-339.

11. KRZYMANSKI G et al. 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.* 1997;26:55-60.
12. SMILER D et al. Toward the identification of mesenchymal stem cells in bone marrow and peripheral blood for bone regeneration. *Implant Dent.* 2008;17:236-247.
13. SHIRASU N et al. Bone formation in a rat calvarial defect model after transplanting autogenous bone marrow with beta-tricalcium phosphate. *Acta Histochem.* 2010;112(3):270-7.
14. ODRI GA et al. Effect of adding bone marrow to ceramic graft materials with different interconnectivities in lumbar arthrodesis : quantification of bone formation. *J Orthop Sci.* 2013;18(2):321-30.
15. SOLTAN M et al. Bone grafting by means of a tunnel dissection: predictable results using stem cells and matrix. *Implant Dent.* 2010;19:280-287.
16. KOGA A et al. Effects of fibronectin on osteoinductive capability of fresh iliac bone marrow aspirate in posterolateral spinal fusion in rabbits. *Spine* 2008;33:1318-1323.
17. SMILER D et al. A histomorphogenic analysis of bone grafts augmented with adult stem cells. *Implant Dent* 2007;16:42-53
18. GIANELLI M et al. Effects of mesenchymal stromal cells with diode laser: Effects and mechanisms of action. *J Cell Physiol* 2013;228:172–181.
19. WANG J et al. MicroRNA-193 pro-proliferation effects for bone mesenchymal stem cells after low-level irradiation treatment through inhibitor of growth family, member 5. *Stem Cells Dev.* 2012;21:2508-2519.
20. WU Y. et al. Effects of low-level laser irradiation on mesenchymal stem cell proliferation: microarray analysis. *Laser Med Sci.* 2012;27:509-519.
21. SOLEIMANI M. The effects of low-level laser irradiation on differentiation and proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells and neurons and osteoblasts: an in vitro study. *Laser Med Sci.* 2012;27:423-430

22. MANRIQUE E et al. In vivo tricalcium phosphate, bone morphogenetic protein and autologous bone marrow biochemical enhancement in vertebral fractures in a porcine model. *Int Orthop*. 2014;38:1993-1999.
23. HALLMAN M et al. Bone substitutes and growth factors as an alternative/complement to autogenous bone for grafting in implant dentistry. *Periodontol 2000*. 2008;47:172-92.
24. KHAN SN et al. The biology of bone grafting. *J Am Acad Orthop Surg*. 2005;13(1):77-86.
25. FUJIHARA NA et al. Irradiation at 780 nm increases proliferation rate of osteoblasts independently of dexamethasone presence. *Lasers Surg Med*. 2006;38(4):332-6.
26. KHADRA M et al. Effect of laser therapy on attachment, proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells cultured on titanium implant material. *Biomaterials*. 2005;26:3503-3509.
27. BLOISE N et al. 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 Optics*. 2013;18:128006.
28. JAWAD MM et al. Effect of 940 nm low-level laser therapy on osteogenesis in vitro. *J Biomed Optics*. 2013;18:128001.
29. FERNANDES KR et al. Effects of low-level laser therapy on the expression of osteogenic genes related in the initial stages of bone defects in rats. *J Biomed Opt*. 2013;18(3):038002.
30. TIM CR et al. Low-level laser therapy enhances the expression of osteogenic factors during bone repair in rats. *Lasers Med Sci*. 2013 Mar 21. [Epub ahead of print] DOI 10.1007/s10103-013-1302-9
31. GARAVELLO IF et al. The effects of low laser irradiation on angiogenesis in injured rat tibiae. *Histol Histopathol*. 2004;19:43-48.

32. GARAVELLO-FREITAS I et al. Low-power laser irradiation improves histomorphometrical parameters and bone matrix organization during tibia wound healing in rats. *J Photochem Photobiol B*. 2003;70:81-89.
33. PITTENGER MF et al. Jaisw Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells, *Science* 284 (1999) 143–147.
34. MARIA OM at al. Cells from bone marrow that evolve into oral tissues and their clinical applications, *Oral Dis*. 13 (2007) 11–16.
35. ZHANG ZY et al. Superior osteogenic capacity for bone tissue engineering of fetal compared with perinatal and adult mesenchymal stem cells, *Stem Cells* 27 (2009) 126–137.
36. EDUARDO FP et al. Stem cell proliferation under low intensity laser irradiation: a preliminary study, *Lasers Surg. Med.* 40 (2008) 433–438.
37. WANG J et al. 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.
38. GIANNELLI M et al. Photoactivation of bone marrow mesenchymal stromal cells with diode laser: effects and mechanisms of action, *J. Cell Physiol.* 228 (2013) 172–181.
39. ABRAMOVITCH-GOTTLIB L et al. Low level laser irradiation stimulates osteogenic phenotype of mesenchymal stem cells seeded on a three-dimensional biomatrix. *Lasers Med Sci.* 2005;20(3-4):138-46.
40. MESSORA MR et al. Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma: a histologic and histometric study in rat calvaria. *J Periodontal Res.* 2008;43:217-223.
41. PINHEIRO ALB A.L.B Photoengineering of bone repair processes, *Photomed. Laser Surg.* 24 (2006) 169–178.
42. KIM K.L. Kim et al. Enhanced dermal wound neovascularization by targeted delivery of endothelial progenitor cells using an RGD-g-PLLA scaffold, *Biomaterials* 30 (2009) 3742–3748.

43. SUH W et al. Transplantation of endothelial progenitor cells accelerates dermal wound healing with increased recruitment of monocytes/macrophages and neovascularization, *Stem Cells* 23 (2005) 1571–1578.
44. MATSUMOTO T et al. Therapeutic potential of vasculogenesis and osteogenesis promoted by peripheral blood CD34-positive cells for functional bone healing, *Am. J. Pathol.* 169 (2006) 1440–1457.
45. DELGADO-RUIZ RA et al. Bone grafting materials in critical defects in rabbit calvarie. A systematic review and quality evaluation using ARRIVE guidelines. *Clin Oral Implants Res.* 2015 May 20. doi: 10.1111/clr.12614.
46. GLOWACKI J A review of osteoinductive testing methods and sterilization processes for demineralized bone. *Cell Tissue Bank.* 2005;6(1):3-12.
47. ALBREKTSSON T. Repair of bone grafts. A vital microscopic and histological investigation in the rabbit. *Scand J Plast Reconstr Surg* 1980; 14: 1–12.
48. MAXSON S et al. Concise review: role of mesenchymal stem cells in wound repair, *Stem Cells Transl.* 1 (2012) 142–149

ANEXOS A - FIGURAS

Figura 1

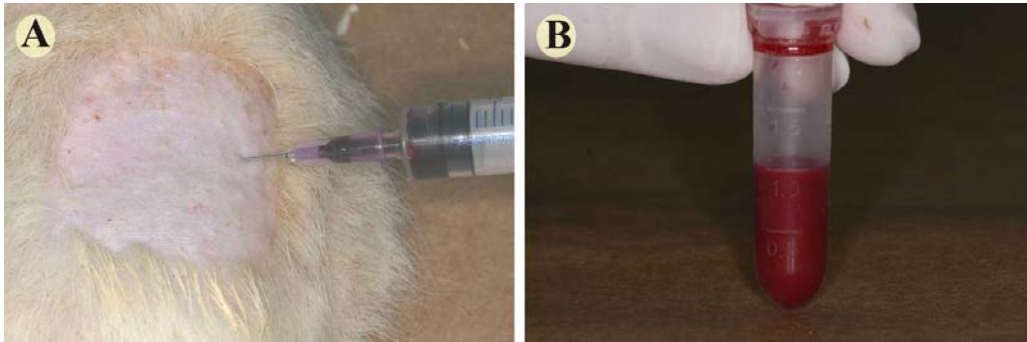


Figura 1. (A) Punção da crista ilíaca; (B) Tubo contendo 1 ml de medula.

Figura 2

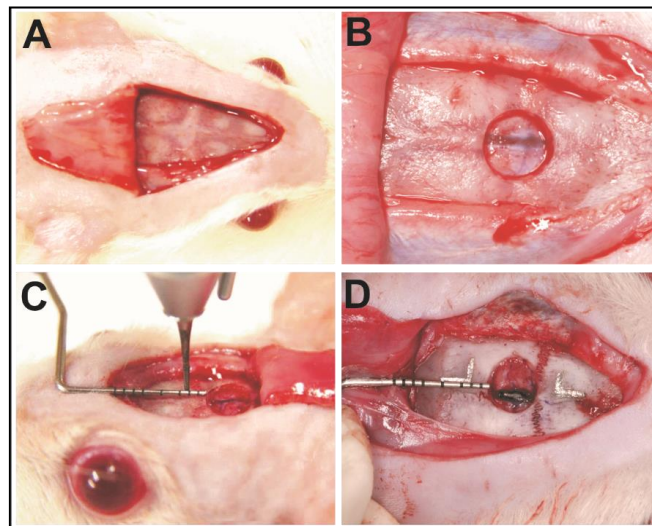


Figura 2. (A) Retalho total rebatido em direção posterior; (B) DTC de 5 mm de diâmetro; (C) Preparação da canaleta 2 mm anterior ao DTC; (D) DTC e marcações de amálgama. DTC = defeito de tamanho crítico.

Figura 3

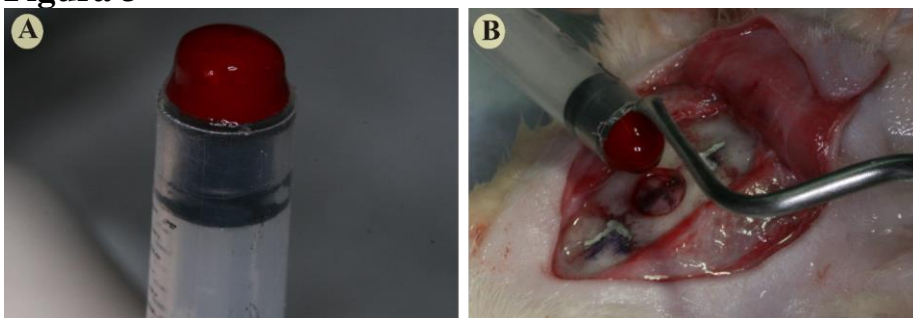


Figura 3. (A) AMO coagulado; (B) aplicação do AMO do DTC. DTC = defeito de tamanho crítico.

Figura 4

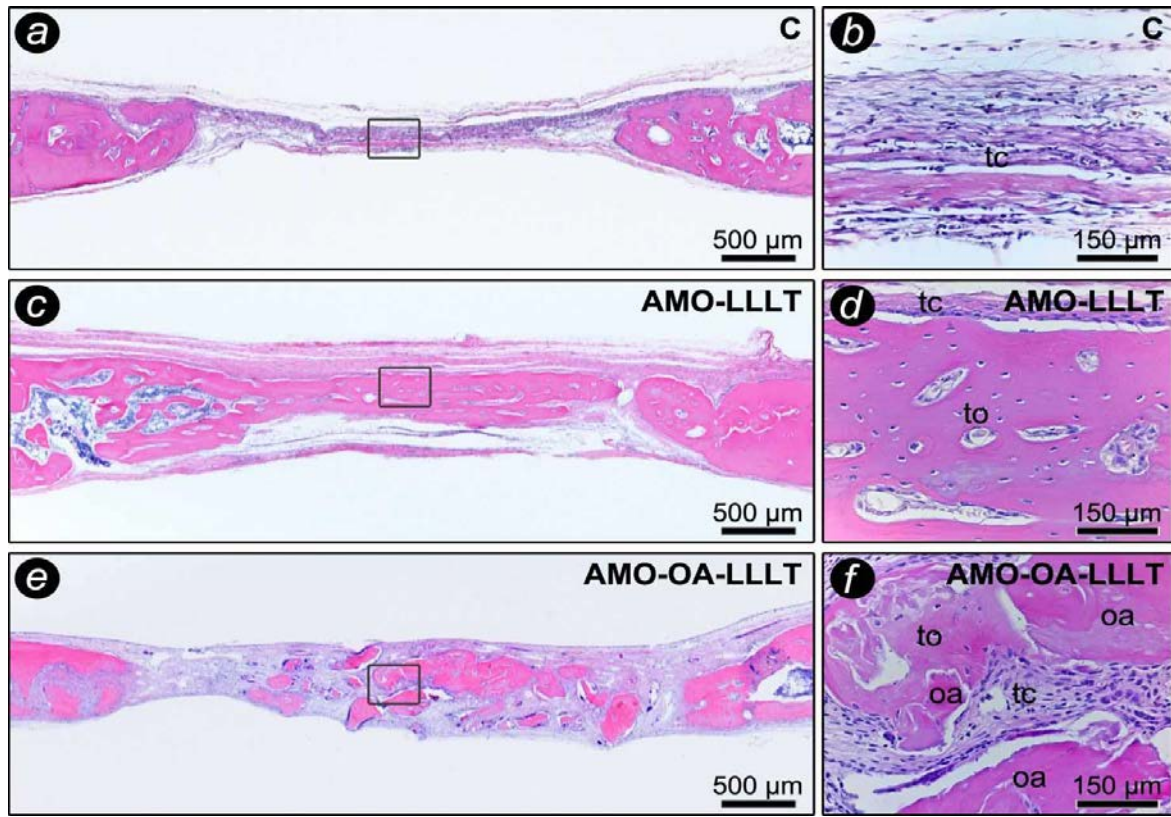


Figura 4. Fotomicrografias evidenciando o aspecto histológico dos tecidos que preenchem os defeitos ósseos nos grupos C (**a**, **b**), AMO-LLLT (**c**, **d**) e AMO-OA-LLLT (**e**, **f**). Abreviações e símbolos: ao, partículas remanescentes do enxerto ósseo autólogo; tc, tecido conjuntivo, to, tecido ósseo. Coloração: Hematoxilina e Eosina (H&E). Aumento original: (**a**) (**c**) (**e**), 25x; (**b**) (**d**) (**f**), 200x. Barras de escala: (**a**) (**c**) (**e**), 500 µm; (**b**) (**d**) (**f**), 150 µm

Figura 5

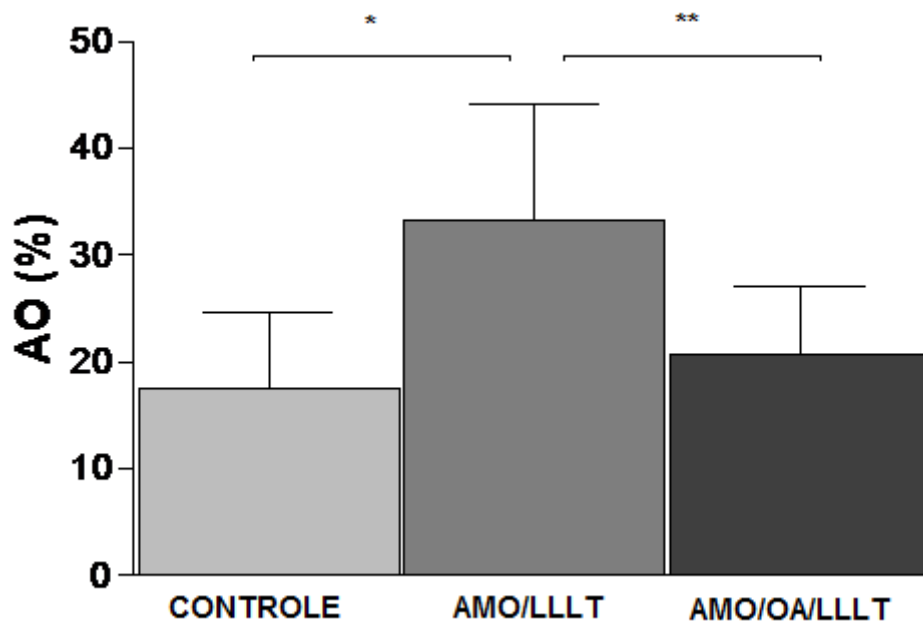


Figura 5. Gráfico mostrando médias e desvios padrão de AON (em %) para cada grupo, bem como os resultados das comparações entre os grupos. 30 dias pós-operatórios. * $p < 0.001$; ** $p < 0.01$