ANA LUISA RIUL SÓRIO

Avaliação histológica e microtomográfica do efeito de células osteoblásticas originárias da medula óssea em defeitos ósseos na calvária de ratos submetidos a um modelo experimental de osteorradionecrose

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof.^a Dr^a Karina Fittipaldi Bombonato Prado.

Ribeirão Preto

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação
Serviço de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
Universidade de São Paulo

Sório, Ana Luisa Riul Sório

Avaliação histológica e microtomográfica do efeito de células osteoblásticas originárias da medula óssea em defeitos ósseos na calvária de ratos submetidos a um modelo experimental de osteorradionecrose.

89 p. : il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biologia Oral.

Orientador: Bombonato- Prado, Karina Fittipaldi

1- Osterradionecrose 2- células osteoblásticas 3- ratos 4-avaliação histológica 5- micro-ct

Nome: Sório, Ana Luisa Riul

Título: Avaliação histológica e microtomográfica do efeito de células osteoblásticas originárias da medula óssea em defeitos ósseos na calvária de ratos submetidos a um modelo experimental de osteorradioneecrose.

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Biologia Oral em Ciências.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora:

Prof. Dr(a): _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr(a): _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr(a): _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr(a): _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Este trabalho foi desenvolvido no setor de radioterapia do Hospital Escola da UFTM, nos Laboratórios de Cultura de Células do Departamento de Morfologia, Fisiologia e Patologia Básica e LAB 3D BIO do Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo Facial e Periodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo.

Dedicatória

Dedico este trabalho a minha mãe Luiza.

Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e pelas oportunidades com que me presenteia para meu crescimento humano e espiritual.

Agradeço a minha mãe Luiza que de forma incansável batalhou pela minha formação e educação.

Agradeço aos meus familiares que são meus torcedores, meus conselheiros, meus exemplos, minha segurança.

Agradeço as minhas amigas Barbara, Juliana, Florença, Eduarda, Thaís, Michele, Mary, Roseane pela amizade que ultrapassa qualquer distância e que comigo dividem objetivos, expectativas e vitórias.

Agradeço aos meus amigos Fernando e Daniela por serem simplesmente amigos de todos os momentos.

Agradeço a minha orientadora Prof.^a Dr^a Karina Fittipaldi Bombonato Prado por toda acessibilidade, compreensão apoio, incentivo e otimismo desde o começo desta minha jornada na pós-graduação.

Agradeço ao Roger Rodrigo Fernandes por ter toda paciência de me ensinar. Ao longo destes dois anos de nosso convívio seu status de técnico de cultura de células obteve um “upgrade” para amigo.

Agradeço a Fabíola Singaretti de Oliveira e Adriana Luisa Gonçalves de Almeida na participação do processo de ensino-aprendizagem e companhia fora do ambiente laboratorial.

Agradeço aos técnicos Luis Gustavo de Sousa e Dimitrius Leonardo Pltol por toda paciência em repassar as informações necessárias e auxílio para o bom andamento da pesquisa.

Agradeço aos Professores e funcionários que de uma forma direta ou indiretamente participaram desta minha etapa.

Agradeço aos amigos e colegas de laboratório: Emanuela Prado Ferraz, Rodrigo Paolo Flores Abuna, Alann Thaffarell Portilho de Souza, Helena Bacha Lopes, Gileade Pereira Freitas e Paula K. Varga, pelo ótimo convívio diário e disponibilidade.

Agradeço aos alunos de iniciação científica, em especial Denise Weffort e Gustavo de Oliveira, pela disponibilidade nos momentos que necessitei de ajuda.

Agradeço à Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba – MG e ao Físico Médico responsável pelo setor de radioterapia do hospital escola da instituição, Adriano Bianchini, por permitir a utilização do Acelerador Linear Clinac 600C para realizar o protocolo de osteorradioneecrose.

Agradeço ao Professor Doutor Geraldo Melo, da Universidade Federal de Uberlândia, por ceder o gel carreador utilizado para inserção as células osteoblásticas nos defeitos das calvárias.

Agradeço à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo financiamento durante o período do meu curso de Mestrado.

Agradeço ao Programa de Biologia Oral do Departamento de Morfologia, Fisiologia e Patologia Básica pelo acolhimento e por possibilitar a minha formação como Mestre em Ciências.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Martin Luther King

Resumo

RESUMO

A osteorradionecrose é uma séria e debilitante consequência da radioterapia da cabeça e pescoço, definida como uma área óssea que não sofre reparação após a irradiação. O objetivo deste trabalho foi analisar o efeito *in vivo* da presença de células mesenquimais da medula óssea carregadas em gel em defeitos provocados na calvária de ratos submetidos a um modelo experimental de osteorradionecrose. Foi realizada a obtenção de células osteoblásticas da medula óssea de ratos cultivadas *in vitro* e devidamente caracterizadas quanto ao seu fenótipo por meio de ensaios bioquímicos como proliferação celular, atividade de fosfatase alcalina e sua detecção *in situ*, além da detecção e quantificação de nódulos mineralizados. Posteriormente, ratos wistar foram submetidos ao protocolo de osteorradionecrose (irradiação com 20 Gy em dose única) e pareados com controles para em seguida serem realizados defeitos nas calvárias para inserção de células osteoblásticas da medula óssea previamente cultivadas *in vitro* juntamente com gel carreador e realizada a sutura. Os animais foram divididos em 4 grupos: controle (C), controle + células osteoblásticas (Cc); osteorradionecrose (IR) osteorradionecrose + células osteoblásticas (IRc). Ao final de 4 semanas os animais foram sacrificados e realizados os seguintes ensaios: (1) análise histológica com base em cortes histológicos descalcificados (2) análise tomográfica por meio de micro-CT dos defeitos previamente criados. Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade e posteriormente à análise estatística para $p < 0,05$. As células mesenquimais derivadas da medula óssea apresentaram fenótipo característico de células osteoblásticas após serem cultivadas em meio osteogênico, com aumento da proliferação, atividade de fosfatase alcalina e formação de nódulos mineralizados quando comparado com as células cultivadas em meio basal. A análise qualitativa dos cortes histológicos corados em hematoxilina-eosina e tricrômico de Masson demonstrou maior neoformação óssea no grupo IRc quando comparado ao grupo IR e similar ao grupos controles. A análise tomográfica revelou um aumento na espessura trabecular, densidade de conectividade, número trabecular e superfície óssea no grupo IRc em relação ao grupo IR. Os resultados sugerem que a inserção de células mesenquimais diferenciadas em osteoblastos favorece a neoformação de defeitos ósseos na presença de osteorradionecrose.

Palavras-Chave: Osteorradionecrose, células osteoblásticas, ratos, análise histológica, micro-ct

Abstract

ABSTRACT

Osteoradionecrosis is a serious and debilitating consequence of head and neck radiotherapy, defined as a bone area that does not repair after irradiation. The purpose of this investigation was to analyze *in vivo* the presence of mesenchymal cells from bone marrow in calvariae defects of rats submitted to osteoradionecrosis. Cells were collected from rat femur bone marrow to perform characterization of osteoblastic phenotype by means of biochemical assays such as cell proliferation, alkaline phosphatase activity and its *in situ* detection and mineralization. Afterwards, male wistar rats were submitted to osteoradionecrosis protocol (20 Gy in a single dose) and paired with control animals. After 30 days, there were performed calvariae defects and placement of osteoblastic cells previously cultured with a gel vehicle inside the defects, which were sutured properly. The animals were divided in 4 groups: control (C), control + osteoblastic cells (C_c), osteoradionecrosis (IR) osteoradionecrosis + osteoblastic cells (IR_c). After 30 days, the animals were euthanized to perform the following analysis: (1) Histological evaluation by means of decalcified slide sections stained with hematoxylin-eosin and Masson trichrome; (2) Tomographic evaluation by means of adequate parameters. Data obtained were submitted to normality test and statistical analysis for $p < 0,05$. The mesenchymal cells from bone marrow presented osteoblastic phenotype after being cultured in osteogenic medium, with higher ALP detection and activity, as well as an increase of mineralized nodules when compared to cells cultured in basal medium. Histological analysis showed that irradiation impaired bone neoformation and affected bone marrow composition, as well as the presence of osteoblasts and osteocytes. On the other hand, cell therapy in group IR_c improved bone neoformation when compared to group IR, showing similarity to control groups. Tomographic analysis revealed an increase in trabecular thickness, density of connectivity, trabecular number and bone surface when compared to group IR. The results suggest that the placement of mesenchymal cells differentiated in osteoblasts may improve bone neoformation of defects created after the onset of osteoradionecrosis.

Key words: osteoradionecroses, osteoblastic cells, rats, histological analysis, micro-ct

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Aparelho utilizado foi o Acelerador Linear Clinac 600C, energia de 6 MV, feixe de fótons (Varian, EUA).....	42
Figura 2.	Posicionamento dos animais na base do aparelho de acelerador linear de fótons.....	43
Figura 3.	Determinação do campo de irradiação.....	43
Figura 4.	Tricotomia e antissepsia na região dorsal da cabeça do animal.	45
Figura 5.	Protocolo para confecção do defeito unilateral de 5 mm de diâmetro no hemisfério esquerdo da calvária dos ratos submetidos à osteorradioneecrose.....	45
Figura 6.	Defeito cirúrgico realizado pronto para receber as células osteoblásticas em veículo gel dentro dos defeitos.....	46
Figura 7.	Inserção das células osteoblásticas no defeito com o auxílio de pipetador e ponteira, seguido da sutura da ferida cirúrgica...	46
Figura 8.	Proliferação das células da medula óssea divididas em grupos cultivados em meio basal (MEM) e meio osteogênico (MTS), após 7 (A), 10 (B) e 14 (C) dias de cultura. Teste estatístico para $p < 0.05$	51
Figura 9.	Atividade da fosfatase alcalina das células da medula óssea divididas em grupos cultivados em meio basal (MEM) e meio osteogênico (MTS), após 7 (A), 10 (B) e 14 (C) dias de cultura. Teste estatístico para $p < 0.05$	52
Figura 10.	Detecção <i>in situ</i> da fosfatase alcalina das células da medula óssea divididas em grupo cultivado em meio basal (MEM) e meio osteogênico (MTS), após 7, 10 e 14 dias de cultura.....	53
Figura 11.	Quantificação dos nódulos mineralizados nas culturas de células da medula óssea divididas em grupo cultivado em meio basal (MEM) e meio osteogênico (MTS), após 7, 10 e 14 dias de cultura. Teste estatístico para $p < 0.05$	54
Figura 12.	Análise histológica do tecido ósseo da calvária após a realização do protocolo de irradiação, mostrando alterações	

	típicas de osteorradionecrose como diminuição do espaço medular e lacunas osteocíticas vazias.....	55
Figura 13.	Imagens A e B correspondem à reconstrução microtomográfica do defeito ósseo na calvária do grupo controle (A) e irradiado (B).....	55
Figura 14.	Parâmetros da análise microtomográfica demonstrando menor superfície óssea e menor número de trabéculas no grupo de animais submetidos ao protocolo de osteorradionecrose. Teste T para $p < 0.05$	56
Figura 15.	Análise histológica do defeito na calvária de ratos.....	58
Figura 16.	A. Ausência de neoformação óssea no defeito da calvária de ratos irradiados. Neoformação óssea no defeito da calvária de ratos irradiados com inserção de células osteoblásticas carregadas em gel. Coloração com Tricrômico de Masson, aumento de 40x, microscópio Leica.....	59
Figura 17.	Análise histológica do defeito na calvária de ratos. Neoformação óssea no defeito da calvária de ratos controles. Neoformação óssea no defeito da calvária de ratos controles com inserção de células osteoblásticas. Defeito da calvária de ratos irradiados, Coloração com Hematoxilina-eosina, aumento de 10x, microscópio Leica.....	60
Figura 18.	Análise histológica da região medular da calvária de ratos. A. Medula da calvária ratos controles; B. Medula da calvária de ratos controles com inserção de células osteoblásticas; C. Medula da calvária de ratos irradiados. Medula da calvária de ratos irradiados após a inserção de células osteoblásticas, Coloração com Hematoxilina-eosina, aumento de 10x, microscópio Leica.....	61
Figura 19.	A. Reconstrução tridimensional das imagens microtomográficas obtidas a partir dos defeitos da calvária de ratos controles (A), controles mais inserção de células osteoblásticas (B), irradiados (C) e irradiados mais inserção de células osteoblásticas (D).....	63

Figura 20.	Análise microtomográfica do volume ósseo, superfície óssea, separação trabecular e espessura trabecular no defeito ósseo da calvária de ratos controles (C), controle mais células osteoblásticas (Cc), irradiados (IR) e irradiados mais células osteoblásticas (IRc). Teste estatístico one-way ANOVA com comparações múltiplas para $p < 0,05$	64
Figura 21.	Análise microtomográfica do número trabecular, densidade de conectividade e porosidade total no defeito ósseo da calvária de ratos controles (C), controle mais células osteoblásticas (Cc), irradiados (IR) e irradiados mais células osteoblásticas (IRc). Teste estatístico one-way ANOVA com comparações múltiplas para $p < 0,05$	65

Lista de Abreviaturas e Siglas

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ORN	Osteorradionecrose
GY	Gray (medida utilizada para irradiação)
CTMs	Célula-tronco mesenquimal
OBs	Osteoblastos
BMP-2	Proteína óssea morfogenética - 2
MEM	Meio essencial Mínimo
ALP	Fosfatase alcalina

Lista de Anexos

LISTA DE ANEXOS

Anexo A – Termo de Convênio com Hospital Escola de UFTM.....	87
Anexo B – Certificado de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....	88
Anexo C – Planilha de Bioequivalência de dose.....	89

Sumário

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	25
2. OBJETIVO.....	31
2.1. OBJETIVO GERAL.....	33
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1. Animais utilizados e Considerações éticas.....	37
3.2. Caracterização fenotípica das células osteoblásticas.....	37
3.2.1. Obtenção das células mesenquimais.....	37
3.2.2. Avaliação das respostas celulares.....	38
3.2.2.1. <i>Proliferação celular</i>	38
3.2.2.2. <i>Conteúdo de proteína total e atividade de fosfatase alcalina</i>	39
3.2.2.3. <i>Análise de fosfatase alcalina in situ por meio de Fast Red</i>	40
3.2.2.4. <i>Deteção e quantificação de matriz mineralizada</i>	40
3.3. Ensaios <i>in vivo</i>	41
3.3.1. Irradiação por Acelerador linear de Fótons.....	41
3.3.2. Procedimento cirúrgico para confecção do defeito ósseo.....	44
3.3.3. Cultivo e Inserção das células mesenquimais osteoblásticas.....	46
3.3.4. Coleta de material.....	47
3.3.5. Análise histológica.....	47
3.3.6. Análise microtomográfica (micro-CT).....	47
3.3.7. Análise dos resultados.....	48
4. RESULTADOS.....	49
4.1. Ensaios <i>in vitro</i>	51
4.1.1. Caracterização do fenótipo osteoblástico.....	51
4.1.2. Proliferação celular.....	51
4.1.3. Atividade da Fosfatase Alcalina (ALP).....	52
4.1.4. Deteção <i>in situ</i> da ALP.....	52

4.1.5. Detecção e quantificação de matriz mineralizada.....	53
4.2. Ensaio <i>in vivo</i>.....	54
4.2.1. Caracterização da Osteorradionecrose.....	54
4.2.2. Inserção das células osteoblásticas no defeito crítico da calvária.....	56
4.2.2.1. <i>Análise histológica</i>	56
4.2.2.2. <i>Análise microtomográfica (micro-CT)</i>	61
5. DISCUSSÃO.....	67
6. CONCLUSÃO.....	75
7. REFERÊNCIAS.....	79
8. ANEXOS.....	85

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Os efeitos benéficos da radioterapia no tratamento de lesões tumorais já são amplamente pesquisados. Atualmente o desafio da medicina é a evolução na modalidade de tratamento em associação com a qualidade de vida do paciente, ou seja, obter o máximo de resultados com mínimos efeitos colaterais. Os efeitos colaterais da radioterapia na região de cabeça e pescoço, com ênfase em cavidade oral, podem ser divididos em agudos (mucosites, candidíase, disgeusia, cáries, xerostomia) e tardios, que ocorrem após o término do tratamento, como a osteorradionecrose (Chrcanovic et al,2010).

O termo osteorradionecrose (ORN) designa uma condição em que o osso irradiado torna-se sem vitalidade e exposto através da pele ou mucosa suprajacente, sem cicatrização adequada por no mínimo três meses, porém sem sinais de tumor primário, recidiva ou doença metastática (Marx, 1983; Rahman et al 2013; Curi et al, 2016). O primeiro a observar as alterações ósseas após irradiação foi Regaude, em 1922; porém somente em 1926, Ewing descreveu as alterações do tecido ósseo associado com a radiação, denominando de “osteíte de radiação”.

Existem várias teorias sobre a fisiopatologia da ORN. Meyer (1970) propôs a teoria da radiação, trauma e infecção que sugeria que a injúria proporcionava a abertura para a invasão da flora microbiológica oral no osso irradiado subjacente. Em 1983, Marx examinou o conceito tradicional descrito por Meyer, observando a presença de bactérias apenas na superfície do osso e não na área necrótica, indicando que os microrganismos desempenham um papel muito menor na fisiopatologia da ORN. Marx defendeu a concepção da “endarterite por radioterapia” como a causa da ORN; sua proposta é que a endarterite levaria à hipóxia, hipocelularidade, hipovascularização, que por sua vez conduz para o desarranjo tecidual e cicatrização inadequada do tecido ósseo (Deshpande et al., 2014; Curi et al., 2016). Avanços recentes nos estudos celulares e microbiológicos permitiram o desenvolvimento de uma nova teoria na patogênese, proposta por Delanian e Lefaix (2004), que se baseou no processo de fibrose atrófica induzida por radiação, constituído por três fases: fase pré-fibrótica, fase de organização e fase de cicatrização fibroatrófica tardia. (Chrcanovic et al., 2010; O'Dell e Sinha, 2011; Deshpande et al., 2014).

Diversos fatores contribuem para o risco de desenvolvimento da ORN na região de cabeça e pescoço, tais como: sítio do tumor primário e seu estadiamento, proximidade do tumor com o osso, proximidade da osso com o campo de radiação, estado da saúde dentária e periodontal, qualidade da higiene oral, estado nutricional, radioterapia concomitante à quimioterapia, trauma agudo de procedimento cirúrgico, uso inapropriado de próteses resultando em trauma crônico no tecido ósseo e a dose de radiação utilizada (Jacobson et al., 2010). O risco de ORN é notado em doses de radiação superior a 60 Gy (Lee et al., 2009; Jacobson et al., 2010), porém em um estudo retrospectivo, autores demonstraram que doses iguais ou menores a 50 Gy favoreceram o desenvolvimento da ORN, além de aumento proporcional da lesão com o aumento das doses de radiação (Curi e Luciano, 1997).

Os principais sintomas clínicos da ORN incluem dor, edema, disfagia, má oclusão, fístula orocutânea, trismo e desfiguração facial. Em casos mais severos esta condição pode levar o indivíduo a óbito (Silvestre-Rangil e Javier-Silvestre, 2011; Deshpande et al., 2014).

Os achados histológicos da ORN foram observados por Marx (1983) e incluem fibrose da mucosa, hialinização e trombose com diminuição da vascularização do tecido conjuntivo, além da perda de osteócitos e osteoblastos. O resultado é um tecido hipovascular, hipocelular e hipóxico, com lise do colágeno e morte celular que excede a replicação celular, em comparação com tecido não irradiado (Lambade et al., 2013). A teoria da fibroatrofia induzida por radiação sugere que o evento chave da progressão da ORN seja a ativação e desregulação da atividade fibroblástica dentro de uma área previamente irradiada. A hipótese se concentra no desequilíbrio entre síntese e degradação dos tecidos em três fases distintas: 1) **Fase pré-fibrótica**: injúria das células endoteliais como consequência direta da radiação e indiretamente pela produção de radicais livres, que resultam na liberação de citocinas desencadeando uma resposta inflamatória aguda e liberação adicional de espécies reativas de oxigênio (ROS). 2) **Fase constitutiva organizada**: é caracterizada por um tecido fibro-atrófico induzido pela radiação, formado por fibroblastos com uma produção e excreção anormais de produtos em uma matriz extracelular desorganizada. 3) **Fase de cicatrização fibroatrófica tardia**: tentativa de remodelação do tecido com a formação de uma estrutura frágil e com alto risco de inflamação em caso de lesão no local. O resultado final é um osso hipocelular e a formação reduzida da matriz óssea

compensada por fibrose (Delanian e Lefaix, 2004; O'Dell e Sinha, 2011; Curi et al., 2016).

O tratamento da ORN pode ser conservador, com a utilização de antibioticoterapia tópica ou local, irrigações locais com clorexidina, oxigenoterapia hiperbárica e mais recentemente a utilização de terapia com PENTOCLO (pentoxifilina, tocoferol e clodronato). Em casos avançados o tratamento é apontado como um desafio clínico, pois a conduta terapêutica são ressecções cirúrgicas extensas. (Aldunate et al. 2010; Xu et al., 2012; Janus et al. 2017). Porém, alguns pacientes permanecem resistentes a todos os tipos de manejo e, portanto, as opções disponíveis são reduzidas para combater a morbidade desta doença (Dhanda et al. 2016; Janus et al. 2017).

As células-tronco mesenquimais (CTMs) são objeto de investigação há alguns anos no campo da regeneração óssea para utilização em casos de deformidades congênitas, traumas, doenças degenerativas e ressecção tumoral. As CTMs foram inicialmente encontradas na medula óssea, mas podem também ser encontradas em diferentes sítios, como: baço, cordão umbilical, fígado, músculo, osso, placenta, polpa dental, pulmões, sangue, tecido adiposo, tendões e sinóvia (Beloti et al. 2012; Wang et al., 2013). Entre as células isoladas mais utilizadas estão as da medula óssea, pela quantidade, facilidade de obtenção e potencial de diferenciação em vários tipos celulares, como osteoblastos (In't Anker et al., 2003, Santos et al., 2015).

De acordo com Sensebe et al. (2011), as CTMs possuem propriedades anti-fibróticas, anti-apoptóticas, pró-angiogênicas e imunomodulatórias devido às suas possibilidades de diferenciação multipotente, secreção de citocinas e fatores de crescimento, permitindo assim, um caráter terapêutico. A terapia com CTMs originárias da medula óssea diferenciada ou não em osteoblastos (OBs) no tratamento de ausência de união crônica de fraturas, osteoartrite, osteonecrose, defeitos de cartilagem e doenças ósseas metabólicas tem sido descrita com resultados promissores (Chen et al, 2012; da Silva – 2015). Xu et al. (2012) geraram um modelo de ORN mandibular em suínos, utilizando a combinação de dose única de radiação de 25 Gy e extração dentária. Eles realizaram o tratamento utilizando células mesenquimais da medula óssea, as quais regeneraram tecidos ósseo e vascular.

Manimaran et al. (2014) sugeriram que a abordagem terapêutica para ORN com células após falha de métodos convencionais pode ser bem sucedida, mostrando que a inserção de células-tronco da polpa dental mais fosfato tricálcio e células da

medula óssea na mandíbula humana pode auxiliar a neoformação óssea visualizada por radiografias panorâmicas.

Jin et al. (2015) investigaram o efeito das CTMs e da proteína morfogenética óssea-2 (BMP-2) sobre o processo de cicatrização óssea da osteorradionecrose na mandíbula de ratos. Estes autores aplicaram uma dose de 30 Gy e agressão mandibular por meio da exodontia de todos os molares após uma semana da irradiação, concluindo que a cicatrização óssea pós-trauma e pós-irradiação nos ratos foi elevada imediatamente pela aplicação de BMP-2, enquanto que a associação de CTMs e BMP-2 foi mais eficaz após a ocorrência de osteorradionecrose. Em 2017, Janus et al. realizaram um estudo prospectivo em animais para avaliação na reabilitação do osso danificado pela ORN após irradiação de 20Gy e extração do molar. Os animais receberam injeção local de células-tronco derivadas de tecido adiposo e ao comparar este grupo com os que receberam solução salina e plasma rico em plaquetas e colágeno, verificou-se que no primeiro grupo houve um aumento na neoformação óssea.

A realização desta investigação se justificou pelo fato de haverem poucos estudos utilizando parâmetros histológicos e microtomográficos para avaliação do uso de células mesenquimais osteoblásticas no processo de reparo ósseo nos casos de osteorradionecrose. Além disso, resultados positivos poderiam colaborar para a saúde da sociedade de forma dinâmica, acrescentando mais uma forma terapêutica nesta complicação do pós-tratamento oncológico. Assim, a hipótese deste trabalho foi a de que a inserção de células mesenquimais da medula óssea diferenciadas em osteoblastos no defeito ósseo da calvária de ratos poderia favorecer a neoformação óssea após a submissão dos animais a um modelo experimental de osteorradionecrose no local do defeito.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo desta investigação foi avaliar a influência de células mesenquimais da medula óssea diferenciadas em osteoblastos no processo de neoformação óssea no defeito de calvárias de ratos submetidos à irradiação de fótons de um acelerador linear.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtenção de células com fenótipo osteoblástico para inserção nos defeitos de calvárias de ratos submetidos ao protocolo de osteorradição;
- Comprovar os efeitos deletérios da irradiação na neoformação óssea;
- Avaliar a eficácia da terapia celular por meio de análise histológica;
- Avaliar a eficácia da terapia celular por meio de análise microtomográfica segundo os seguintes parâmetros: volume de tecido ósseo (mm^3), superfície óssea (mm^2), número de trabéculas ($1/\text{mm}$), espessura das trabéculas (mm), densidade de conectividade ($1/\text{mm}^3$), separação trabecular (mm) e porosidade total (%).

Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais utilizados e Considerações éticas

Foi realizado o cálculo amostral com o Software G*Power 3.1 (Faul et al., 2007), assumindo como significativa diferença maior que 1.5 do desvio padrão e considerando os erros Tipo I (α) e Tipo II (β) de 5% e 20%, respectivamente. Assim, foram necessários 40 ratos machos da espécie Wistar, com peso corporal de 250 a 300 g, provenientes do Biotério Central do Campus da USP Ribeirão Preto, mantidos três animais por caixa de polietileno, com temperatura ambiente controlada entre 23°C a 24°C e iluminação regulada por timer para manter a iluminação diária no período de 10 horas no Biotério da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP. Os ratos receberam ração e água *ad libitum* e a limpeza das caixas e troca da maravalha foi realizada três vezes por semana. O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA- 2015.1.765.58.5) da FORP-USP.

3.2. Caracterização fenotípica das células osteoblásticas

Para avaliar o fenótipo das células mesenquimais da medula óssea femoral após diferenciação osteoblástica por meio químico, foi realizada a cultura celular em meios basal e osteogênico, e os ensaios bioquímicos foram realizados como descrito a seguir.

3.2.1. Obtenção das células mesenquimais

As células mesenquimais foram isoladas da medula óssea femoral e transportadas até o laboratório em meio de transporte (α -MEM, suplementado com 500 μ g/mL de gentamicina e 3 μ g/mL de fungisona). No fluxo laminar, os fêmures foram submetidos à antissepsia (clorexidina a 2,5% e álcool a 70% por 1 minuto cada). Posteriormente, foram removidos os tecidos moles restantes dos fêmures por meio de lâmina de bisturi intercalada com a permanência dos mesmos em meio de transporte/lavagem por 15 minutos (três vezes). As epífises foram cortadas e a medula

óssea extraída por meio de irrigação das diáfises com meio de cultura. As células foram mantidas em frascos de 75 cm² (Corning) em meio de cultura basal. Com a subconfluência, as células foram liberadas enzimaticamente dos frascos de cultura pela adição de solução de EDTA 1 mM (Gibco), 1,3 mg/mL de collagenase tipo II (Gibco) e tripsina a 0,25% (Gibco) e colocadas em presença de quantidade suficiente de meio de cultura para interromper a ação enzimática. Posterior à centrifugação a 2000 rpm por 5 min para obtenção do precipitado celular, as células foram homogeneizadas em meio de cultura α -MEM (Gibco), sendo que uma alíquota de 100 μ L desta solução foi adicionada a um volume igual de corante azul de tripan 0,1% (Acros Organics) para contagem celular por meio de um contador de células automático (Countess Automated Cell Countertm, Invitrogen, USA). A primeira passagem celular foi empregada para realização dos experimentos. As células foram cultivadas na concentração de 2×10^4 células por poço, em placas de cultura celular de 24 poços (n=5). As culturas foram incubadas a 37°C, em atmosfera umidificada contendo 5% de dióxido de carbono e 95% de ar atmosférico. Durante o tempo de cultivo, as células foram acompanhadas por meio de observação em microscópio de luz invertido (Axiovert 25 Zeiss) sendo os meios de cultura trocados a cada 3 ou 4 dias. Os grupos experimentais foram divididos em: células mesenquimais cultivadas em meio total suplementado (α -MEM (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), dexametasona 10^{-7} (Sigma), 5 μ g/ml ácido ascórbico (Gibco), 0,3 μ g/mL de fungizona (Gibco), 50 μ g/mL de gentamicina (Gibco) e 2,16 g/ ml de β -glicerofosfato) chamado de MTS 10% e células mesenquimais em meio basal não suplementado, chamado de MEM.

3.2.2. Avaliação das respostas celulares

As células foram caracterizadas quanto ao seu fenótipo osteoblástico por meio dos seguintes parâmetros bioquímicos:

3.2.2.1. Proliferação celular

Aos 7, 10 e 14 dias de cultura, a proliferação celular foi avaliada pelo ensaio colorimétrico MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]} (Sigma).

Após remoção do meio de cultura, as células foram incubadas com solução de MTS + MTT a 10% por 4 horas a 37°C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. Passado esse período, o meio de cultura foi removido dos poços e, em seguida, adicionado 1mL de solução de isopropanol ácido (Merck, Darmstadt, Alemanha) em cada poço sob agitação por 5 minutos, para a solubilização completa do precipitado formado. Alíquotas de 150µL foram transferidas para uma placa de 96 poços para leitura em espectrofotômetro (µQuant, Bio-tek Instruments Inc., Winooski, VT, EUA) em comprimento de onda de 570nm.

3.2.2.2. Conteúdo de proteína total e atividade de fosfatase alcalina

Após 7, 10 e 14 dias de cultura celular, o meio de cultura foi removido das placas e os poços foram lavados três vezes com PBS (Gibco) aquecido a 37°C para remoção das células não aderidas e do meio de cultura sobressalente. Em seguida, os poços foram preenchidos com 1mL de solução de lauril sulfato de sódio 0,1% (Sigma) e deixados à temperatura ambiente (TA) por 30 minutos antes de iniciar os ensaios:

a) Proteína total: a dosagem de proteína foi realizada seguindo o método de Lowry (Lowry et al., 1951). Para isso, 500µL da amostra contida em cada poço da placa de cultura foram transferidos ao respectivo tubo de ensaio, ao qual foi adicionado 500µL do reagente de Lowry (Sigma). Os tubos foram agitados vigorosamente e deixados em TA por 20 minutos. Após este período, 250µL da solução de *Folin & Ciocalteu's phenol reagent* (Sigma) foram adicionados aos tubos, que após agitação, ficaram em TA por 30 minutos para desenvolvimento da coloração azul. Passado o tempo, a absorbância de cada tubo foi determinada em um espectrofotômetro (Bio-Tek), em comprimento de onda de 680nm. O conteúdo de proteína total de cada poço foi calculado com base na construção de uma curva padrão a partir de albumina bovina (Sigma). Os resultados foram utilizados para normalização da atividade de fosfatase alcalina.

b) Atividade de ALP: foi determinada através da liberação de timolftaleína pela hidrólise do substrato timolftaleína monofosfato, utilizando o kit comercial (Labtest Diagnostica SA, Lagoa Santa, MG, Brasil) e seguindo as instruções do fabricante. Utilizou-se tubos de ensaio para os grupos testes, padrão e branco. Em todos os tubos foram adicionados 50µL de substrato e 500µL de solução tampão; somente no tubo padrão foram acrescentados 50µL da solução padrão. Posteriormente, todos os tubos

foram colocados em banho-maria a 37°C, para a realização do experimento. Foram acrescentados 50µL das amostras aos respectivos tubos testes em uma etapa realizada em intervalo máximo de 10 minutos. Decorrido o tempo, 2mL do reagente de cor foram adicionados a todos os tubos de ensaio e, em seguida, determinou-se a absorbância em espectrofotômetro (Bio-Tek), no comprimento de onda de 590nm. Os dados da atividade de ALP foram normalizados pelo conteúdo de proteína total.

3.2.2.3. *Análise de fosfatase alcalina in situ por meio de Fast Red*

A análise da enzima fosfatase alcalina *in situ* foi realizada aos 7, 10 e 14 dias. Após a remoção do meio de cultura, os poços foram lavados duas vezes com PBS aquecido a 37°C. Trezentos e vinte miligramas do reagente Triz (Sigma) foram dissolvidos em 20mL de água deionizada e, adicionado, 7mg do reagente *Fast Red* (Sigma). Foram desprezados 2mL desta solução e acrescentados 8mg de *Naphthol* (Sigma) diluídos em 2mL de dimetil formamida (Merck) formando a solução de trabalho. Um mililitro dessa solução foi adicionado em cada poço. A placa foi levada à incubadora em uma atmosfera umidificada a 37°C com 5% de CO₂ por 30 minutos. Decorrido esse tempo, a solução foi retirada dos poços e a placa seca à TA para posterior documentação fotográfica.

3.2.2.4. *Deteção e quantificação de matriz mineralizada*

A detecção de matriz mineralizada foi avaliada ao final dos 21 dias de experimento. Após remoção do meio de cultura, os poços foram lavados três vezes com PBS (Gibco) aquecido a 37°C, adicionados 2mL de formalina 10% para fixação e mantidos a 4°C por 24 horas. A formalina foi removida e os poços desidratados à TA em séries crescentes de álcoois (30°, 50°, 70° e 100°) por 1 hora para cada graduação alcoólica. Após secagem, os poços foram corados com vermelho de alizarina a 2% pH 4,2 (Sigma) por 10 minutos e as áreas de mineralização ricas em cálcio evidenciadas pela coloração vermelha. Para quantificação da coloração segundo método de Gregory et al. (2004), 280µL de ácido acético a 10% (Labsynth, Lab Ltda, Diadema, SP, Brasil) foram acrescentados a cada poço e as placas deixadas sob agitação suave por 30 minutos. A camada de células foi raspada com o auxílio de uma ponteira, a solução transferida para tubos *ependorf* de 1,5mL, aquecida a 85°C

por 10 minutos e resfriadas em gelo por 5 minutos. Os tubos foram centrifugados a 13.000rpm por 20 minutos. Um volume de 150µL do sobrenadante foi transferido para uma placa de 96 poços (Corning) e 40µL de hidróxido de amônia a 10% (Quimibras, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) foram adicionados. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Bio-Tek) em um comprimento de onda de 405nm.

3.3. Ensaios *in vivo*

3.3.1. Irradiação por Acelerador linear de Fótons

O protocolo de irradiação para osteorradiationecrose foi realizado na Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba – MG, sob os cuidados do Físico Médico responsável pelo setor de radioterapia do hospital escola da instituição Adriano Bianchini. O aparelho utilizado foi o Acelerador Linear Clinac 600C, energia de 6 MV, feixe de fótons (Varian, EUA), mostrado na Figura 1.

Antes da irradiação, os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (7mg/100g peso corporal, Agener União, Brasil) e xilazina (0,6mg/100g peso corporal, Calier, Brasil) administrados por via intramuscular. Previamente à determinação da dose de irradiação foi realizado um estudo piloto com intuito de verificar os efeitos deletérios dos raios de fótons do aparelho de acelerador linear no tecido ósseo. Nesta análise inicial os animais foram submetidos a diferentes graus de energia: 5Gy, 10 Gy, 20 Gy, 25 Gy e 30Gy na região de calvária do hemisfério esquerdo. Após uma semana, os animais foram eutanasiados e as calvárias retiradas para posterior análise histológica qualitativa, sendo definido que 20 Gy seria a melhor dose experimental. Com a determinação da dose de irradiação e seguindo o protocolo de anestesia, os animais (n=20) foram posicionados adequadamente na base para receber a irradiação com dose total e única de 20 Gy na calvária do hemisfério esquerdo (Figuras 2-3).

Figura 1. Aparelho utilizado foi o Acelerador Linear Clinac 600C, energia de 6 MV, feixe de fótons (Varian, EUA).

Figura.2. Posicionamento dos animais na base do aparelho de acelerador linear de fótons.

Figura 3. Determinação do campo de irradiação.

Os grupos experimentais foram divididos conforme a tabela abaixo:

Tabela I. Divisão dos animais nos grupos experimentais.

<i>Animais</i>	<i>Grupo experimental</i>
Sem Irradiação	Com inserção de células mesenquimais (Cc) Sem inserção de células mesenquimais (C)
Com Irradiação	Com inserção de célula mesenquimais (IRc) Sem inserção de células mesenquimais (IR)

3.3.2. Procedimento cirúrgico para confecção do defeito ósseo

A confecção do defeito ósseo unilateral na calvária foi realizada em todos os animais em ambos os grupos experimentais. Estes animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (7mg/100g peso corporal) e xilazina (0,6mg/100g peso corporal) administrados por via intramuscular. Realizou-se a tricotomia e antisepsia com povidine-iodo alcoólico (PVPI, Cristalia, Brasil) na região dorsal da cabeça (Figura.4). Foi realizada uma incisão na pele e no tecido com lâmina de bisturi nº 15 ao longo da sutura sagital para expor os ossos parietais. O descolamento do periósteo permitiu o acesso para confecção do defeito unilateral de 5 mm de diâmetro no hemisfério esquerdo da calvária com o auxílio de uma broca do tipo trefina com “stop” de 5 mm de diâmetro sob irrigação constante e abundante com soro fisiológico (Figura 5). Após o preenchimento ou não dos defeitos ósseos com as células mesenquimais, foi realizada a sutura com fio de nylon 3.0 (Ethicon Ltda, Brasil) e a ferida cirúrgica lavada com solução de povidine-iodo alcoólica (PVPI, Cristalia, Brasil). Após o procedimento cirúrgico, os animais receberam dose única de analgésico flunixinina meglumina (10mg/100g peso corporal, Banamine, Schering-Plough, Brasil) e dose única de uma solução de antibióticos contendo: benzipenicilina benzitina (156.000UI/100g peso corporal), benzilpenicilina procaína (78.000 UI/100 g peso corporal), benzilpenicilina potássica (78.000UI/100 g peso corporal),

diidroestreptomicina base (sulfato) (65mg/100 g peso corporal) e estreptomicina base (sulfato) (65mg/100 g peso corporal) (Pentabiótico, Fort Dodge, Brasil).

Figura 4. Tricotomia e antissepsia na região dorsal da cabeça do animal.

Figura 5. Protocolo para confecção do defeito unilateral de 5 mm de diâmetro no hemisfério esquerdo da calvária dos ratos submetidos à osteorradionecrose.

As células foram cultivadas até a subconfluência em MTS10% e posteriormente removidas das garrafas de cultura com auxílio de EDTA e collagenase a 2%, para em seguida serem centrifugadas e ressuspensas em α -MEM. As células foram contadas, divididas em vials e centrifugadas novamente para que cada defeito ósseo dos animais dos grupos Cc e IRc recebessem uma concentração de 5×10^5 células carregadas em gel base qsp, o qual foi fornecido gentilmente pelo Professor Doutor Geraldo Melo, da Universidade Federal de Uberlândia (Figura 6).

Figura 6. Defeito cirúrgico realizado pronto para receber as células osteoblásticas em veículo gel dentro dos defeitos.

3.3.3. Cultivo e Inserção das células mesenquimais osteoblásticas

Após a colocação ou não das células osteoblásticas com o auxílio de um pipetador e ponteiros descartáveis para cada animal, foi realizado o processo de sutura da ferida cirúrgica (Figura 7).

Figura 7. Inserção das células osteoblásticas no defeito com o auxílio de pipetador e ponteira, seguido da sutura da ferida cirúrgica.

3.3.4. Coleta de material

Os ratos foram eutanasiados após 30 dias da cirurgia por meio de anestesia (cloridrato de cetamina e xilazina nas doses referidas anteriormente) seguida por decapitação. Após a eutanásia, foi realizada a coleta das calvárias para as análises histológica e microtomográfica.

3.3.5. Análise histológica

As calvárias foram imersas em formaldeído a 4% tamponado, por 24 horas. Em seguida, os espécimes foram descalcificados em EDTA+TRIS a 0,5M, e as soluções trocadas a cada dois dias. Após o período de descalcificação, a ação do ácido foi neutralizada em uma solução de sulfato de sódio a 5%, por vinte e quatro horas. Após esse período as calvárias foram desidratadas em séries crescentes de álcoois, diafanizados em xilol e incluídas em parafina. Foram realizados cortes longitudinais de 6 μm de espessura. Estes cortes foram corados em hematoxilina-eosina e tricrômico de Masson, que permite a avaliação morfológica qualitativa do tecido ósseo neoformado. Foi utilizado um microscópio de luz Leica DM 4000B, acoplado a uma câmera digital de vídeo Leica EC3 para captura das imagens.

3.3.6. Análise microtomográfica (micro-CT)

As calvárias foram imersas em solução de álcool 70%. A análise tomográfica foi realizada por meio do micro-CT SkyScan 1172 (SkyScan, Bélgica) operando com fonte de raios-X de 100 kV detectados por uma câmera de 11-megapixel com resolução de até 1 μm . Os dados foram adquiridos por um software de aquisição de imagens 2D do próprio equipamento e as reconstruções 3D, necessárias para a análise, foram feitas pelo software NRecon. Após as reconstruções, foram analisados, dentro da área de interesse, os seguintes parâmetros: volume de tecido ósseo (mm^3), superfície óssea (mm^2), número trabecular ($1/\text{mm}$), espessura trabecular (mm), densidade de conectividade ($1/\text{mm}^3$), separação trabecular (mm) e porosidade total (%). Estes parâmetros, automaticamente gerados pelo software, são preconizados

pela American Society of Bone and Mineral Research (ASBMR) e descritos por Parfitt et al. (1987).

3.3.7. Análise dos resultados

Os dados quantitativos obtidos foram submetidos aos testes de aderência à curva normal e homogeneidade de variâncias. Constatada a normalidade da distribuição amostral, foi aplicada a análise de variância (ANOVA), seguida de pós-teste, quando apropriado. Caso contrário, foi aplicado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido de pós-teste de Mann-Whitney quando necessário. O nível de significância foi estabelecido em 5%. Toda a análise estatística foi realizada por meio do *software GraphPad Prism*.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Ensaios *in vitro*

4.1.1. Caracterização do fenótipo osteoblástico

A caracterização da diferenciação das células que foram inseridas no defeito crítico do hemisfério esquerdo da calvária foi realizada por meio dos ensaios bioquímicos descritos acima e os grupos foram denominados MEM para as células cultivadas em meio basal e MTS para as células cultivadas em meio osteogênico.

4.1.2. Proliferação celular

Ao final de 7 dias, a proliferação das células cultivadas em meio osteogênico foi superior às células cultivadas em meio não osteogênico, havendo diferença estatística para $p < 0,05$. No período experimental de 10 e 14 dias, observou-se uma maior proliferação das células cultivadas em meio não osteogênico quando comparado às células cultivadas em meio osteogênico ($p < 0,05$).

Figura 8. Proliferação das células da medula óssea divididas em grupo cultivado em meio basal (MEM) e meio osteogênico (MTS), após 7 (A), 10 (B) e 14 (C) dias de cultura. Teste estatístico para $p < 0.05$.

4.1.3. Atividade da Fosfatase Alcalina (ALP)

O ensaio bioquímico da ALP mostrou para os três períodos estudados que a atividade desta proteína se encontrou significativamente maior no grupo de células da medula óssea cultivadas com MTS quando comparado ao grupo cultivado com MEM ($p < 0.05$).

Figura 9. Atividade da fosfatase alcalina das células da medula óssea divididas em grupo cultivado em meio basal (MEM) e meio osteogênico (MTS), após 7 (A), 10 (B) e 14 (C) dias de cultura. Teste estatístico para $p < 0.05$.

4.1.4. Detecção *in situ* da ALP

A detecção *in situ* da ALP pode ser realizada por meio da técnica de *fast red* e os resultados mostram que as células cultivadas em MEM não apresentaram aumento na deposição de ALP ao longo do experimento. Por outro lado, as células em contato com MTS sintetizaram a fosfatase alcalina que foi sendo depositada de maneira crescente até os 14 dias, como pode ser visto na Figura 10.

Figura 10. Detecção *in situ* da fosfatase alcalina das células da medula óssea divididas em grupo cultivado em meio basal (MEM) e meio osteogênico (MTS), após 7, 10 e 14 dias de cultura.

4.1.5. Detecção e quantificação de matriz mineralizada

Os nódulos mineralizados foram detectados e quantificados nos dois grupos experimentais, e os resultados mostraram que o grupo de células em contato com o meio osteogênico formou qualitativamente mais nódulos quando comparado ao grupo de células cultivadas em meio basal. A análise quantitativa também demonstrou um aumento da mineralização no grupo MTS, apesar da ausência de significância estatística.

Figura 11. Quantificação dos nódulos mineralizados nas culturas de células da medula óssea divididas em grupo cultivado em meio basal (MEM) e meio osteogênico (MTS), após 7, 10 e 14 dias de cultura. Teste estatístico para $p < 0.05$

4.2. Ensaios *in vivo*

4.2.1. Caracterização da Osteorradionecrose

O protocolo da osteorradionecrose foi confirmado por meio das análises histológica e microtomográfica das calvárias dos ratos selecionados. A análise qualitativa do tecido ósseo irradiado revelou diminuição no número de osteoblastos e lacunas osteocíticas vazias, diminuição dos espaços medulares, além de diminuição na quantidade dos vasos sanguíneos e desarranjo da matriz mineralizada (Figura 12).

Figura 12. Análise histológica do tecido ósseo da calvária após a realização do protocolo de irradiação, mostrando alterações típicas de osteoradionecrose como diminuição do espaço medular e lacunas osteocíticas vazias.

O resultado da análise microtomográfica mostrou diferença relevante qualitativa e quantitativa na microarquitetura da calvária após 60 dias de irradiação e 30 dias de confecção do defeito crítico entre os grupos controle e irradiado, o que caracteriza uma condição de sucesso no modelo experimental de osteoradionecrose (Figuras 13 e 14).

Figura 13. Imagens A e B correspondem à reconstrução microtomográfica do defeito ósseo na calvária do grupo controle (A) e irradiado (B).

Figura 14. Parâmetros da análise microtomográfica demonstrando menor superfície óssea e menor número de trabéculas no grupo de animais submetidos ao protocolo de osteorradionecrose. Teste T para $p < 0.05$.

4.2.2. Inserção das células osteoblásticas no defeito crítico da calvária

Os parâmetros histológicos e microtomográficos analisados após a inserção das células osteoblásticas mostraram diferenças significativas entre os grupos como visto a seguir.

4.2.2.1. Análise histológica

O defeito cirúrgico nos animais controles mostrou uma neoformação óssea a partir das bordas remanescentes, delimitada por osteoblastos ativos adjacentes à uma matriz mineralizada. A região do defeito estava preenchida parcialmente por tecido ósseo neoformado envolvido por tecido conjuntivo sem infiltrado inflamatório e rico em vasos sanguíneos (Figura 15 A e B). Os animais controles que receberam células osteoblásticas no defeito cirúrgico mostraram aspectos histológicos similares ao grupo controle, mas foi notada uma maior neoformação óssea a partir das bordas remanescentes (Figura 15 C e D). Os animais do grupo que recebeu a irradiação mostraram formação mínima de tecido ósseo na região do defeito, com algumas áreas de reabsorção e ausência de osteoblastos ativos na superfície da matriz (Figura 16 A). Além disso, é evidente a desorganização na arquitetura do tecido conjuntivo de preenchimento do defeito (Figura 17F). Já nos animais que receberam as células osteoblásticas após serem submetidos à irradiação, foi observado que uma nova neoformação óssea significativa (Figuras 15G e 17G) ocorreu na região remanescente do defeito, com a presença evidente de osteoblastos ativos (Figura 16B) na superfície

da nova matriz. Também pode ser visto que a arquitetura do tecido conjuntivo que ocupa a região do defeito é similar à dos grupos controles, sem infiltrado inflamatório e com fibras colágenas organizadas além da presença de vasos sanguíneos.

É importante evidenciar também os aspectos histológicos da medula óssea da calvária, que nos animais controles se mostra bastante celular, com precursores hematopoiéticos e mesenquimais além da presença de megacariócitos (Figura 18A e B). Este aspecto não foi observado na medula do grupo de animais irradiados, onde fica evidente a presença de uma medula escassa e predominantemente adiposa, com poucas células precursoras (Figura 18C). A medula óssea nos animais que receberam as células osteoblásticas no defeito cirúrgico mostrou um aspecto histológico similar aos grupos controles (Figura 18D).

Figura 15. Análise histológica do defeito na calvária de ratos. A-B. Neoformação óssea no defeito da calvária de ratos controles; C-D. Neoformação óssea no defeito da calvária de ratos controles com inserção de células osteoblásticas; E-F. Defeito da calvária de ratos irradiados, mostrando a ausência ou mínima formação óssea nas bordas dos defeitos, com áreas de reabsorção. G-H Neoformação óssea evidenciada a partir das bordas do defeito (setas amarelas), com áreas de osteoblastos ativos. Coloração com tricrômico de Masson, aumento de 10x, microscópio Leica.

Figura 16. A. Ausência de neoformação óssea no defeito da calvária de ratos irradiados, com área de reabsorção (seta branca). B. Neoformação óssea no defeito da calvária de ratos irradiados com inserção de células osteoblásticas carregadas em gel; observar a presença de osteoblastos ativos (seta vazia). Coloração com Tricrômico de Masson, aumento de 40x, microscópio Leica

Figura 17. Análise histológica do defeito na calvária de ratos. A-B. Neoformação óssea no defeito da calvária de ratos controles; C-D. Neoformação óssea no defeito da calvária de ratos controles com inserção de células osteoblásticas; E-F. Defeito da calvária de ratos irradiados, mostrando a ausência ou mínima formação óssea nas bordas do defeito, com áreas de reabsorção (seta preta vazia). G-H. Neoformação óssea evidenciada a partir das bordas do defeito, com áreas de osteoblastos ativos (setas pretas cheias). Coloração com Hematoxilina-eosina, aumento de 10x, microscópio Leica.

Figura 18. Análise histológica da região medular da calvária de ratos. A. Medula da calvária ratos controles; B. Medula da calvária de ratos controles com inserção de células osteoblásticas; C. Medula da calvária de ratos irradiados, mostrando diminuição da região medular e predominância de tecido adiposo (setas brancas). D. Medula da calvária de ratos irradiados após a inserção de células osteoblásticas, mostrando similaridade com as medulas dos grupos controles (asterisco branco). Coloração com Hematoxilina-eosina, aumento de 10x, microscópio Leica.

4.2.2.2. Análise microtomográfica (micro-CT)

A análise das imagens reconstruídas permite evidenciar que a neoformação óssea ocorreu a partir das bordas do defeito. É possível observar que nos dois grupos controles houve nova formação de tecido ósseo de maneira similar (Figura 19 A e B) e formação mínima no defeito da calvária de ratos irradiados (Figura C). A inserção de células osteoblásticas estimulou a neoformação óssea no grupo IRc quando comparado ao grupo IR (Figura 19D). Para a análise quantitativa, foram selecionados parâmetros microtomográficos para avaliar a eficácia da terapia celular, sendo que de sete parâmetros, quatro mostraram diferenças estatisticamente significantes entre os

grupos experimentais. Os parâmetros analisados foram volume ósseo ($p=0,0058$), superfície óssea ($p=0,0144$), separação trabecular ($p=0,5762$), espessura trabecular ($p=0,023$), número trabecular ($p=0,0020$), densidade de conectividade ($1/\text{mm}^3$) e porosidade total ($p=0,1469$). Os valores estão representados nas Figuras 20 e 21.

O volume ósseo mostrou diferenças significativas, sendo que no grupo IR este volume foi menor quando comparado aos grupos controles, apesar de ausência de significância estatística; já o grupo IRc mostrou um aumento significativo do volume quando comparado ao grupo IR e similaridade com o grupo controle C. A superfície óssea do grupo irradiado foi significativamente menor que nos grupos controle (C) e irradiado + células (IRc), e similar à do grupo Cc. Neste mesmo parâmetro, pode ser observado que a inserção das células aumentou significativamente a superfície óssea, com similaridade entre os grupo IRc e C.

A separação trabecular foi semelhante entre os grupos experimentais, sem diferenças estatisticamente significantes. A espessura trabecular mostrou diferença estatística entre os dois grupos controles e o grupo irradiado; porém a inserção das células não aumentou significativamente a espessura das trabéculas no grupo IRc, apesar de observarmos um leve aumento qualitativo. O número trabecular foi significativamente menor no grupo irradiado (IR) quando comparado aos outros grupos experimentais, enfatizando o aumento deste parâmetro no grupo IRc e similaridade de resultados com os dois grupos controles. Apesar da ausência de diferenças estatísticas podemos observar que a densidade de conectividade no grupo IRc é qualitativamente maior quando comparado ao grupo IR e muito similar ao grupo controle C. O último parâmetro analisado foi o de porosidade total, onde podemos observar que todos os grupos experimentais apresentaram valores semelhantes, portanto sem diferença estatística.

Figura 19. A. Reconstrução tridimensional das imagens microtomográficas obtidas a partir dos defeitos da calvária de ratos controles (A), controles mais inserção de células osteoblásticas (B), irradiados (C) e irradiados mais inserção de células osteoblásticas (D).

Figura 20. Análise microtomográfica do volume ósseo, superfície óssea, separação trabecular e espessura trabecular no defeito ósseo da calvária de ratos controles (C), controle mais células osteoblásticas (Cc), irradiados (IR) e irradiados mais células osteoblásticas (IRc). Teste estatístico one-way ANOVA com comparações múltiplas para $p < 0,05$.

Figura 21. Análise microtomográfica do número trabecular, densidade de conectividade e porosidade total no defeito ósseo da calvária de ratos controles (C), controle mais células osteoblásticas (Cc), irradiados (IR) e irradiados mais células osteoblásticas (IRc). Teste estatístico one-way ANOVA com comparações múltiplas para $p < 0,05$.

Discussão

5. DISCUSSÃO

A osteorradioneecrose mandibular é um dos efeitos deletérios da irradiação de tumores de cabeça e pescoço e sua conduta terapêutica ainda é um desafio para os profissionais da área de saúde. Existem diversas modalidades de tratamento, tais como a utilização de medicamentos (pentoxifilina, tocofenol, clondronato), oxigênio hiperbárico, além de cirurgias de ressecção seguidas por reconstrução. O emprego da terapia celular para reconstrução óssea é uma nova proposta que tem sido investigada minuciosamente em casos de insucesso das modalidades já preconizadas (Janus et al., 2017). Diante disso, o presente estudo foi realizado para avaliar o efeito da inserção de células osteoblásticas em defeitos criados na calvária de ratos, após os mesmos serem submetidos ao um protocolo de estabelecimento da osteorradioneecrose.

Inicialmente foi necessária a determinação da dose de irradiação para padronizar o modelo experimental de osteorradioneecrose na calvária de ratos da linhagem *wistar*. Para este fim, foram realizados cálculos de bioequivalência por radioterapia externa, técnica comumente usada para tratamento em tumores de cabeça e pescoço. Os animais irradiados receberam uma dose única de 20 Gy, que equivale a uma dose biológica efetiva de 60 Gy em um fracionamento convencional de radiação no ser humano. De acordo com revisões da literatura, o risco de ocorrer necrose no tecido ósseo se inicia a partir de 50 Gy (Vessink et al., 2003; Jacobson et al., 2010; De Felice et al., 2014). Com o propósito de validar a eficácia da técnica de irradiação no tecido ósseo e demonstrar as alterações histológicas e morfométricas compatíveis com a osteorradioneecrose, foram realizadas as análises histológicas e microtomográficas das calvárias dos ratos dos grupos controle e irradiados. No presente estudo, foi observado uma redução no número de osteoblastos e de osteócitos, redução da vascularização e retração da medula óssea com aumento no número de adipócitos. Estes resultados também foram observados em outras investigações como a de Curi et al. (2015), em espécimes de tecido ósseo de pacientes que foram submetidos ao tratamento de ORN. Estes autores demonstraram a ocorrência de hiperemia, endarterite, trombose, hipocelularidade, perda de conteúdo vascular, aumento de gordura na cavidade da medula óssea e fibrose. Damek-Poprawa et al. (2014) estudaram o comportamento da radiação na mandíbula e tíbia,

observando a presença de osso necrótico característico com ausência de osteócitos e tecido vascular danificado com extravasamento de eritrócitos no tecido ósseo atingido. Tamplen et al. (2011), com o objetivo de desenvolver um modelo de ORN mandibular em ratos, realizaram braquiterapia (radioterapia interna) com dose de 20 Gy. Os resultados na análise histológica mostraram um aumento quantificável dos osteoclastos e diminuição dos osteoblastos quando comparados aos controles. Na avaliação microtomográfica, o volume ósseo foi de 13,8% para o grupo irradiado comparado com 65,9% no grupo controle. Além disso, foi demonstrada diminuição significativa da superfície óssea e do número de trabéculas no grupo irradiado comparado ao grupo controle. As reconstruções tridimensionais do estudo citado demonstraram reduções consideráveis da largura cortical e diminuição da formação óssea nas mandíbulas irradiadas em comparação aos controles; no presente estudo, a reconstrução 3D da região de calvária do grupo irradiado mostrou mínima neoformação óssea no defeito quando comparado ao grupo controle.

O desenvolvimento da osteorradionecrose em ossos como a mandíbula é comumente associado a doenças periodontais, extrações dentárias, cirurgias e traumas (Jacobson et al., 2010). Assim, nos estudos que tem como objetivo desenvolver um modelo experimental de ORN ou estudar uma nova terapêutica para esta condição, são estabelecidos protocolos de traumas *in vivo*. Neste trabalho, a opção de trauma ósseo foi a confecção de um defeito ósseo crítico em calvária. De acordo com Bosch et al. (1998), os defeitos críticos ósseos de 5mm em calvárias de ratos adultos podem ser usados como modelo adequado na avaliação de reparo ósseo na região craniofacial, sendo considerado essencial a criação de uma ferida cirúrgica para o desenvolvimento da ORN no modelo experimental (Meyer, 1970; Jacobson et al., 2010 e Bléry et al., 2015).

Assim, após o desenvolvimento do modelo experimental compatível com osteorradionecrose e inserção das células osteoblásticas diferenciadas no defeito, observamos que a terapia celular estimulou a neoformação de tecido ósseo visto por meio de análise histológica e histomorfométrica. Não encontramos na literatura trabalhos mostrando o efeito positivo de células da medula óssea diferenciadas em osteoblastos em defeitos ósseos da calvária após estabelecimento da ORN. Alguns estudos demonstraram até o momento o efeito positivo da inserção de células em defeitos ósseos, com a utilização de outros tipos celulares (células mesenquimais não diferenciadas, células adiposas, células da polpa dentária, concentrados de medula

óssea) e diferentes locais de defeito ósseo (mandíbula, tíbia, fêmur). Jin et al. (2015) utilizaram células mesenquimais da medula óssea não diferenciadas e associadas com BMP-2 em defeitos mandibulares de ratos machos. Estes autores verificaram que a terapia celular foi efetiva no reparo ósseo após a indução da osteorradionecrose. Manimaran et al. (2014) constataram o sucesso da inserção de células de concentrado autólogo de medula óssea e células-tronco de polpa dentária com plasma rico em plaquetas em dois casos de ORN em humanos com resultado positivo e neoformação óssea a partir do segundo mês de tratamento. As células utilizadas em nosso experimento foram diferenciadas por estímulo químico e o fenótipo osteoblástico foi confirmado pelos ensaios bioquímicos já preconizados e bem estabelecidos na área de cultura celular.

Em lesões osteonecroticas, os precursores osteogênicos e as células progenitoras endoteliais sofrem grande redução, levando à uma osteogênese e vasculogênese insuficiente com consequente necrose tecidual (Voss et al., 2017). Estudos mostram que as células mesenquimais podem auxiliar na recuperação da habilidade de formar um novo tecido ósseo estimulando células remanescentes a produzir fatores de crescimento (Handschel e Meyer, 2011). Uma variedade de fatores de crescimento funcionalmente envolvidos no reparo ósseo são produzidos por células osteogênicas, plaquetas, e células inflamatórias; podemos citar como exemplo as proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs), os fatores de crescimento *insulin-like* (IGF) 1 e 2, o fator de crescimento TGF- β 1, o fator de crescimento derivado de plaquetas e o fator de crescimento fibroblástico (Tsumaki et al., 1999, Gruber et al., 2000; Reddi, 2003). A análise histológica mostrou claramente que a irradiação promoveu efeitos deletérios no tecido ósseo remanescente ao defeito, impedindo a formação adequada de novo osso. Áreas de reabsorção estavam presentes na borda do defeito, assim como um tecido conjuntivo desorganizado e pobre em fibras colágenas e área medular reduzida com grande quantidade de células adiposas. Outros estudos também verificaram necrose óssea, exposição óssea sem recobrimento epitelial, vasos sanguíneos obliterados e diminuição dos espaços medulares com aumento adipocítico (Jin et al., 2015; Bléry et al., 2015). A presença das células osteoblásticas permitiu a formação de novo osso a partir das bordas do defeito ósseo, provavelmente favorecendo o estabelecimento de novos osteoblastos na superfície do tecido ósseo remanescente, como consequência do aumento de número celular na área do defeito e melhorando a atividade funcional na região do

reparo. Fu et al. (2016) sugerem que os efeitos benéficos da terapia celular podem estar associados com a expressão positiva de genes associados ao metabolismo ósseo como o BMP-2 e repressão de genes como PPAR- γ , associado com a diferenciação adipocítica. Outra linha de discussão proposta por Kikuri et al. (2010) sugere que a presença de células mesenquimais na regiões osteonecróticas pode auxiliar no restabelecimento do equilíbrio imunológico entre a inibição da produção de interleucina 17 (Th17) por células T-helper (Treg) e aumento das células T regulatórias. Segundo estes autores, um desequilíbrio imunológico entre Treg/Th17 pode alterar a resposta inflamatória de lesões osteonecróticas, influenciando o reparo e neoformação óssea.

Neste estudo optamos por utilizar a análise microtomográfica como método quantitativo para trazer informações complementares à análise histológica. Uma grande vantagem da microtomografia é o alto número de secções obtidas permitindo a visualização de diferenças espaciais da amostra e obtenção de dados a partir de vários parâmetros já estabelecidos. Além disso, permite a preservação do espécime e a reconstrução das secções em imagens tridimensionais (Rühli et al., 2007). Todos estes benefícios não devem excluir o estudo de secções histológicas, que permitem o estudo preciso da morfologia celular e estrutural dos tecidos, além de obtenção de informações como presença de infiltrado inflamatório e avaliação das células ósseas.

De todos os sete parâmetros microtomográficos selecionados para este estudo, quatro apresentaram diferenças significativas positivas com a realização da terapia celular após o estabelecimento da osteorradionecrose, sendo eles volume ósseo, superfície óssea, espessura e número trabecular. A avaliação destes parâmetros permite sugerir que a presença das células osteoblásticas estimulou a neoformação de um tecido ósseo com volume e arquitetura trabeculares similar aos grupos controles utilizados neste estudo. Outras investigações utilizando outros tipos celulares também relataram aumento na neoformação óssea por meio de análise por micro-CT. Jin et al (2015) observaram que a inserção de células associadas a BMP-2 após quatro semanas de indução da ORN aumentou os valores de volume ósseo, densidade mineral óssea, número de trabéculas e separação trabecular obtidos por microtomografia. Corroborando a terapia celular como nova proposta terapêutica, Janus et al (2017), descreveram um aumento de 36% no volume ósseo no grupo que recebeu células derivadas de tecido adiposo após oito semanas da indução de ORN

na mandíbula quando comparado ao grupo que recebeu solução salina e aumento de 19% quando houve a mistura das células com plasma rico em plaquetas e colágeno.

Os resultados desta investigação permitem sugerir que a utilização de células mesenquimais originárias da medula óssea e diferenciadas em osteoblastos pode melhorar a atividade funcional do tecido ósseo remanescente de defeitos ósseos na calvária causados após o estabelecimento da osteorradionecrose. Estes achados são a base para estudos posteriores sobre os mecanismos moleculares e regulatórios deste efeito, contribuindo assim para a terapêutica e resolução do quadro de osteorradionecrose, promovendo qualidade de vida para pacientes que apresentem este efeito adverso como consequência da radioterapia.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, podemos concluir que:

- Foram obtidas células com o fenótipo osteoblástico necessário para inserção nos defeitos de calvárias de ratos submetidos ao protocolo de osteorradionecrose;
- Os efeitos deletérios da irradiação na neoformação óssea foram comprovados pelos parâmetros estabelecidos pelo estudo;
- A terapia celular foi benéfica para estimular a neoformação óssea vista por meio de análise histológica;
- A análise microtomográfica mostrou por meio de parâmetros selecionados que o volume ósseo, superfície óssea, espessura e número trabecular foram significativamente maiores com a presença de células osteoblásticas no defeito ósseo de ratos irradiados.

Sendo assim, sugerimos que a utilização de células osteoblásticas em defeitos ósseos pode estimular a neoformação óssea e ser um coadjuvante na terapêutica da osteorradionecrose.

Referências

7. REFERÊNCIAS

Aldunate JLCB, Coltro PS, Busnardo FF, Ferreira MC. Osteoradionecrosis in face: pathophysiology, diagnosis and treatment. *Rev Bras Cir Plást* 2010 25(2):381-387.

Beloti MM, Sicchieri LG, de Oliveira PT. The influence of osteoblast differentiation stage on bone formation in autogenously implanted cell-based poly (lactide-co-glycolide) and calcium phosphate constructs. *Tissue Eng Part A* 2012 18:999–1005.

Bléry P, Espitalier F, Hays A, Crauste E, Demarquay C, Pilet P, Sourice S, Guicheux J, Malard O, Benderitter M, Weiss P, Mathieu N. Development of mandibular osteoradionecrosis in rats: Importance of dental extraction. *J Craniomaxillofac Surg* 2015 43(9):1829-1836.

Bosch C, Melsen B, Vargervik K. Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials. *J Craniofac Surg* 1998;9:310-316.

Chen k, Teh TK, Ravi S, Toh SL, Goh JC. Osteochondral interface generation by rabbit bone marrow stromal cells and osteoblasts co-culture. *Tissue engineering Part A* 2012 18 (17-18):1902-1911.

Chrcanovic BR, Reher P, Sousa AA, Harris M. Osteoradionecrosis of the jaw-a current overview-part 1: Physiopathology and risk and predisposing factors. *Oral Maxillofac Surg* 2010 14(1):3-16.

Curi MM, Cardoso CL, de Lima HG, Kowalski LP, Martins MD. Histopathologic and Histomorphometric Analysis of Irradiation Injury in Bone and the Surrounding Soft Tissues of the Jaws. *J Oral Maxillofac Surg* 2016 74(1):190-199.

Curi, MM; Luciano LD. Osteoradionecrosis of the jaws: retrospective study of the background factors and treatment in 104 cases. *J Oral Maxillofac Surg* 35 (1997): 540–544.

Damek-Poprawa M, Both S, Wright AC, Maity A, Akintoye SO. Onset of mandible and tibia osteoradionecrosis: a comparative pilot study in the rat. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology* 2013 115: 201-211.

De Felice F, Musio D, Tombolini V. Osteoradionecrosis and intensity modulated radiation therapy: An overview. *Crit Rev Oncol Hematol* 2016 107:39-43.

Delanian S, Lefaix JL. The radiation-induced fibroatrophic process: therapeutic perspective via the antioxidant pathway. *Radiotherapy and Oncology* 2004 73: 119-131.

Deshpande SS, Gallagher KK, Donneys A, Nelson NS, Guys NP, Felice PA, Page EE, Sun H, Krebsbach PH, Buchman SR. Stem cells rejuvenate radiation-impaired vasculogenesis in murine distraction osteogenesis. *Plast Reconstr Surg* 2015 135:799.

Dhanda J, Pasquier D, Newman L, Shaw R. Current concepts in osteoradionecrosis after head and neck radiotherapy. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2016 28(7):459-466.

Fu Q, Tang NN, Zhang Q, Liu Y, Peng JC, Fang N, Yu LM, Liu JW, Zhang T. Preclinical study of cell therapy for osteonecrosis of the femoral head with allogenic peripheral blood-derived mesenchymal stem cells. *Yonsei Med J* 2016 57(4):1006-1015.

Gruber R, Mayer C, Schulz W, Graninger W, Peterlik M, Watzek G, Luyten FP, Erlacher L. Stimulatory effects of cartilage-derived morphogenetic proteins 1 and 2 on osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells. *Cytokine* 2000 12(11):1630–1638.

Handschel J, Meyer U. Infection, vascularization, remodelling--are stem cells the answers for bone diseases of the jaws? *Head Face Med* 2011 18(7):5.

In't Anker, P.S, Noort, W.A, Scherjon, S.A et al, Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. *Haematologica* 2003 88:845–852.

Jacobson AS, Buchbinder D, Hu K, Urken ML. Paradigm shifts in the management of osteoradionecrosis of the mandible. *Oral Oncol* 2010 46:795-801.

Janus JR, Jackson RS, Lees KA, Voss SG, Wilson ZC, Remmes NB, Keeney MG, Garcia JJ, San Marina S. Human adipose-derived mesenchymal stem cells for osseous rehabilitation of induced osteoradionecrosis: a rodent model. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2017 156(4):616-621.

Jin IG, Kim JH, Wu HG, Kim SK, Park Y, Hwang SJ. Effect of bone marrow-derived stem cells and bone morphogenetic protein-2 on treatment of osteoradionecrosis in a rat model. *J Craniomaxillofac Surg* 2015 43(8):1478-86.

Kikuri T, Kim I, Yamaza T, Akiyama K, Zhang Q, Li Y, Chen C, Chen W, Wang S, Le AD. Cell-based immunotherapy with mesenchymal stem cells cures bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw-like disease in mice. *J Bone Min Res Off J Am Soc Bone Min Res* 2010 25(7):1668–1679.

Lambade PN, Lambade D, Goel M. Osteoradionecrosis of the mandible: a review. *Oral Maxillofac Surg* 2013 17(4):243-9.

Lee IJ, Koom WS, Lee CG, Kim YB, Yoo SW, Keum KC, et al. Risk factors and dose-effect relationship for mandibular osteoradionecrosis in oral and oropharyngeal cancer patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2009 75:1084-91.

Manimaran K, Sankaranarayanan S, Ravi VR, Elangovan S, Chandramohan M, Perumal SM. Treatment of osteoradionecrosis of mandible with bone marrow concentrate and with dental pulp stem cells. *Ann Maxillofac Surg* 2014 4(2):189-192.

Marx RE. Osteorradionecrose. Um novo conceito de sua fisiopatologia. *J Oral Maxillofac Surg* 1983 41: 283.

Meyer I. Infectious diseases of the jaws. *J Oral Surg* 1970 28:17.

O'Dell K, Sinha U. Osteoradionecrosis. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am* 2011 23:455-464.

Rahman S, Maillou P, Barker D, Donachie M. Radiotherapy and the oral environment the effects of radiotherapy on the hard and soft tissues of the mouth and its management. *Eur J Prosthodont Restor Dent* 2013 21(2):80-87.

Reddi AH. Cartilage morphogenetic proteins: role in joint development, homoeostasis, and regeneration. *Ann Rheum Dis* 2003 62 (Suppl 2):ii73–8.

Regaude C. Sur la necrose des os attente par un processus cancéreux et traits par les radiations. *Compt Rend Soc Bio* 1922 87:629 Quoted in *Oral Surg* 195:1954.

Rühli FJ, Kuhn G, Evison R, Müller R, Schultz M. Diagnostic value of micro-CT in comparison with histology in the qualitative assessment of historical human skull bone pathologies. *Am J Phys Anthropol* 2007 133(4):1099-1111.

De Santana Santos T, Flores Abuna RP, Bacha Lopes H, Gonçalves de Almeida AL, Beloti MM, Luiz Rosa A. Association of mesenchymal stem cells and osteoblasts for bone repair. *Regenerative Medicine* 2015 10(2): 127-133.

Sensebé L, Bourin P, Tarte K. Good manufacturing practices production of mesenchymal stem/stromal cells. *Human gene therapy* 2010 22 (1): 19-26.

Silvestre-Rangil J, Silvestre FJ. Clinico-therapeutic management of clinico-therapeutic management of osteoradionecrosis: A literature review and update. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2011 16 (7):e900-4.

Tamplen M, Trapp K, Nishimura I, Armin B, Steinberg M, Beumer J, Abemayor E, Nabili V. Standardized analysis of mandibular osteoradionecrosis in a rat model. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2011 145:404–410.

Tsumaki N, Tanaka K, Arikawa-Hirasawa E, Nakase T, Kimura T, Thomas JT, Ochi T, Luyten FP, Yamada Y. Role of CDMP-1 in skeletal morphogenesis: promotion of mesenchymal cell recruitment and chondrocyte differentiation. *J Cell Biol* 1999 144(1):161–73.

Vissink A, Burlage FR, Spijkervet FK, Jansma J, Coppes RP. Prevention and treatment of the consequences of head and neck radiotherapy. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003 14(3):213-2225.

Voss PJ, Matsumoto A, Alvarado E, Schmelzeisen R, Duttenhöfer F, Poxleitner P. Treatment of stage II medication-related osteonecrosis of the jaw with necrosectomy and autologous bone marrow mesenchymal stem cells. *Odontology* . 2017 Feb 20. doi: 10.1007/s10266-017-0295-4. [Epub ahead of print].

Wang Y, Yao J, Yuan M, Zhang Z, Hu W. Osteoblasts can induce dental pulp stem cells to undergo osteogenic differentiation. *Cytotechnology* 2013 65:223–231.

Xu J, Zheng Z, Fang D, Gao R, Liu Y, Fan ZP, Zhang CM, Wang SL. Early-stage pathogenic sequence of jaw osteoradionecrosis in vivo. *J Dent Res* 2012 91:702–708.

Anexos

ANEXO A - Termo de Convênio com Hospital Escola de UFTM

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
Programa de Pós-Graduação em Biologia Oral

Carta de Solicitação de Convênio entre Instituições de Ensino e Pesquisa

Eu, Ana Luisa Riul Sório, número USP: 9454729, aluna de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Oral, sob orientação da Profª Dr. Karina Fittipaldi Bombonato Prado, solicita ao setor da Radioterapia do Hospital Universitário da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, situado na cidade de Uberaba-MG, convênio como instituição colaboradora na realização das atividades práticas pertinentes à pesquisa da referente dissertação, cujo o tema envolve reparo ósseo em casos de osteorradionecrose.

Ribeirão Preto, 08 de Maio de 2015.

Atenciosamente,

Ana Luisa Riul Sório

Profª Dr. Karina Fittipaldi Bombonato Prado

ANEXO B - Certificado de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
Comissão de Ética no Uso de Animais

Of. CEUA 092/2015

Ribeirão Preto, 09 de outubro de 2015.

Ref. processo nº 2015.1.765.58.5

Senhor Pesquisador,

Informamos que o projeto "Avaliação histológica e microtomográfica do efeito de células osteoblásticas originárias da medula óssea em defeitos ósseos na calvária de ratos submetidos a um modelo experimental de osteorradionecrose." foi **aprovado ad referendum** da Comissão de Ética no Uso de Animais da FORP, em 09/10/2015.

Esclarecemos que o certificado será emitido tão logo a aprovação seja referendada pela Comissão.

Atenciosamente,

Ana Aparecida Ferreira do Nascimento
Secretária da Comissão de Ética no Uso de Animais

Ílma. Sra.
Profa. Dra. Karina Fittipaldi Bombonato Prado
Departamento de Morfologia, Fisiologia e Patologia Básica
desta Faculdade

/aafn

AVENIDA DO CAFÉ S/Nº - TEL: (16) 3315-0251/4123- FAX: (16) 3315-4102
14040-904 - RIBEIRÃO PRETO - SP- BRASIL

ANEXO C - Planilha de Bioequivalência de dose

VARIÁVEIS	
B E D	
A/B	10
DF	20
N	1

VARIÁVEIS	
B E D	31,25
A/B	10
DF	1,8
N	

VARIÁVEIS	
B E D	
A/B	3
DF	2
N	30

VARIÁVEIS	
B E D	100
A/B	3
DF	
N	28

BED =	60
N =	0
DF =	0

BED =	0
N =	14,7128
DF =	

BED =	100
N =	0
DF =	0

BED =	0
N =	
DF =	2,1006

VARIÁVEIS	
B E D	
A/B	10
DF	1,7
N	20

VARIÁVEIS	
B E D	
A/B	10
DF	1,8
N	15

VARIÁVEIS	
B E D	
A/B	3
DF	1,7
N	30

VARIÁVEIS	
B E D	
A/B	3
DF	1,8
N	28

BED =	39,78
N =	0
DF =	0

BED =	31,86
N =	0
DF =	0

BED =	79,9
N =	0
DF =	0

BED =	80,64
N =	0
DF =	0