ANA CLARA FAGUNDES PEDRONI

Efeito da Laserfototerapia associada ou não à Vitamina C na indução de membranas celulares (*cell sheets*) de células-tronco da polpa dentária humana

São Paulo 2016

ANA CLARA FAGUNDES PEDRONI

Efeito da Laserfototerapia associada ou não à Vitamina C na indução de membranas celulares (*cell sheets*) de células-tronco da polpa dentária humana

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Dentística

Orientador: Profa. Dra. Márcia Martins Marques

São Paulo 2016 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.

Catalogação-na-Publicação Serviço de Documentação Odontológica Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Pedroni, Ana Clara Fagundes.

Efeito da Laserfototerapia associada ou não à Vitamina C na indução de membranas celulares (cell sheets) de células-tronco da polpa dentária humana / Ana Clara Fagundes Pedroni ; orientador Márcia Martins Marques. -- São Paulo, 2016.

92 p. : ilus., tab., graf.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Dentística. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida

1. Membrana Celular. 2. Células-tronco. 3. Polpa Dentária. 4. Laser. 5. Vitamina C. I. Marques, Márcia Martins. II. Título.

Pedroni ACF. Efeito da Laserfototerapia associada ou não à Vitamina C na indução de membranas celulares (*cell sheets*) de células-tronco da polpa dentária humana. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Data:// <u>2016</u>		
	Banca Examinadora	
Prof(a). Dr(a)		
Instituição:	Julgamento:	
Prof(a). Dr(a)		
Instituição:	Julgamento:	
Prof(a). Dr(a).		
Instituição:	Julgamento:	

À Minha Mãe, Deni, pelo exemplo de amor, dedicação e trabalho. Aos meus avós, Júlio e Zulmira, pelo exemplo de família e união. Ao meu pai de coração, Walter, por me amar como filha.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço à minha **mãe**, **Deni**, quanto mais anos eu ganho, mais percebo seu imenso amor por nós (minha irmã e eu). Afinal, qual prova de amor poderia ser maior para uma mãe do que abrir mão de ter os filhos para si e permitir que ganhem o mundo. Que mãe generosa eu tenho, que nunca mediu esforços, e por vezes sofrimentos, para ver suas filhas irem atrás de seus sonhos. É meu maior exemplo, no qual procuro me espelhar...e meu melhor porto seguro, sempre pronta para me receber com muito carinho. Não existe distância que afaste nossos corações. Agradeço também ao **Sérgio**, por tomar conta de você quando não podemos estar perto.

Ao meu pai de coração, **Walter**, e minha mãe "postiça", **Neusa**, por cuidarem tão bem de mim aqui em São Paulo! Muito obrigada por todo o carinho e respeito, sem o suporte de vocês seria muito difícil o meu ingresso no mestrado.

Ao meu melhor professor de Excel, calculadora ambulante, companheiro oficial de laboratório aos sábados e domingos, melhor amigo...e ainda namorado nas horas vagas, Rafael, ou "**Pipo**"!. Nem sei ao certo pelo que agradecer, são tantas razões, me limito a dizer que minha vida é muito melhor por você estar nela! Obrigada. E não posso deixar de agradecer também aos seus pais **Vera** e **Tadeu**, por todo o carinho, acolhimento e lanchinhos gostosos!! Agradeco por tudo, amo vocês!

Agradeço a minha querida orientadora, **Márcia**. Voltar ao meio acadêmico após 4 anos intensos de clínica Odontológica não foi fácil, aprendi muitas coisas novas, e o principal, aprendi sobre minhas limitações e dificuldades. Muito obrigada por compreender minha lenta readaptação inicial, e por respeitar minha curva de aprendizagem nesse novo mundo da pesquisa acadêmica – sem perder a fé em mim!! Estamos apenas iniciando nossa jornada, sei que ainda tenho muito a aprender contigo e comigo mesma, e que os melhores frutos ainda estão por vir. Obrigada por tudo, te admiro muito!

Um agradecimento mais que especial aos "Pedronadas", minha família maravilhosa, que mesmo quando distantes se fazem muito presentes, não só nesse período como em todos da minha vida, amo muito a cada um!! Em especial aos meus avós, Júlio e Zulmira - exemplos de amor, força e caridade – meus tios Matilde, Marcelo, Silvana, Euder, Anderson, Salete e Sezar...e todos os primos queridos! E Claro, a "porrolinha", minha irmã Luísa, por me aturar todos os dias. Nossa família é minha maior riqueza.

AGRADECIMENTOS

À FOUSP, em nome do Diretor Prof. Dr. Waldyr Jorge, pelo suporte acadêmico e de infraestrutura durante o curso de mestrado.

Aos **pacientes da FOUSP**, sejam aos das clínicas da Dentística ou de pósgraduação, sem os quais não existiria clínica ou mesmo pesquisa odontológica, agradeço a confiança em nome de todos os dentistas, professores, pesquisadores e alunos de odontologia – todos que em algum momento dependeram dessa confiança para aprenderem suas profissões. E ainda um obrigada aos pacientes que um dia concordaram em doar material biológico para pesquisas no país.

Aos **professores da FOUSP**, os quais tiveram papel importante na minha formação acadêmica no período de cumprimento de disciplinas.

Ao Instituto de Biologia (IB) (Departamentos de Genética), em nome do Prof. Dr. Oswaldo Keith Okamoto, pela oportunidade de aprimorar meus conhecimentos em células-tronco, e disponibilidade em tirar todas as minhas dúvidas! Bem como aos colegas com os quais tive o prazer de conviver durante a Disciplina de Biologia Molecular das Células-tronco, Isabella, Ana Carolina, Fabiano, Daniela e Ernesto. Ainda, agradeço também ao Prof. Keith, bem como à Profa. Dra. Katiucia Batista da Silva Paiva, pelas sugestões valiosas dadas à essa pesquisa durante o exame de Qualificação.

Ainda agradeço ao Departamento de Imunologia do Instituto de Biologia (IB) pelo auxílio técnico nos testes de Citometria de Flúxo, em particular à bióloga responsável pelo Citômetro, **Andréa Glatt**.

Ao **Nucel**, em nome da **Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar** pela disponibilização de infraestrutura para a condução dos experimentos de Curva de Crescimento e DP,

e em especial aos seus alunos **Túlio (doutorando) e Marcus (pós-doc)**, pela paciência em me reensinar a calcular uma equação da reta!

Aos **Departamentos** de Estomatologia, Biologia Oral e Dentística da FOUSP, pelo acolhimento ao pós-graduando e acesso ilimitado às suas dependências.

Aos professores doutores do Departamento de Estomatologia Fábio Daumas Nunes, e Décio dos Santos Pinto Júnior pelo suporte técnico nesta pesquisa e outras de nosso laboratório. Estendo os agradecimentos aos técnicos do departamento – Elisa, Juvani, Edna e Adriana - muito competentes e prestativos, nunca negando um auxílio.

À **Profa. Dra. Carla Renata Sipert**, pela amizade e coorientação em todos os meus testes de biologia molecular. Agradeço imensamente por todos os ensinamentos e por estar sempre tão disponível. Você é um grande exemplo!

Aos professores do Departamento de Dentística o meu muito obrigada por todos os ensinamentos e ótimo convívio diário. Agradeço por me receberem tão bem e pela confiança em mim depositada durante as Disciplinas em que pude colaborar junto aos alunos de graduação, tanto nas atividades teóricas quanto laboratórios de pré-clínica e clínica. Nesse contexto, não posso deixar de agradecer especialmente à **Profa. Dra. Luciana Fávaro Francisconi dos Rios**, pelas orientações nas Disciplinas do Departamento, você nasceu para ser professora!! E claro, agradeço imensamente às **Profas. Dras. Márcia Martins Marques e Maria Aparecida Cerqueira Luz** pelas oportunidades de experiência em docência concedidas a mim durante esse período, através da ministração de palestra no congresso CUBO e aulas na Graduação na Disciplina de Clínica Direta, respectivamente. Agradeço à confiança, sem dúvida contribuíram muito para minha formação como Mestre. Aproveito para agradecer ao **CPDIG** em nome dos funcionários **Diego e Leandro**, pelo grande auxílio na confecção de material didático audiovisual, que desenvolvemos para ser apresentado aos alunos de graduação, e que agora faz parte do acervo didático do departamento da FOUSP. Agradeço ainda a todos os funcionários da Informática da FOUSP, em especial aos **Sr.s. Alcimar e Marinho**, que prontamente fizeram muito mais do que lhes era requerido para ajudar na finalização desse trabalho ("resgate" de um *notebook* em pane!).

À **Profa. Dra. Patrícia de Moraes,** pela amizade e por todos os auxílios "extramuro". Muito obrigada pelo desapego em me ceder tão prontamente material didático e de estudo para o congresso da ALOPE (Chile), seus conselhos fizeram minha apresentação muito mais confiante.

Ainda sobre o Congresso ALOPE, não posso deixar de agradecer pela oportunidade desse evento ao **Instituto Sorrir Para Vida**, em nome da **Dra. Marisa Helena de Carvalho**, em extensão à todos os funcionários, colaboradoes, dentistas voluntários e pacientes - bem como tantos outros ótimos momentos compartilhados nesses anos. É um prazer enorme fazer parte dessa equipe tão dedicada, verdadeiros exemplos de amor à Odontologia e ao próximo. Muito obrigada por construírem um mundo melhor.

Ao **LELO**, Laboratório Especial de Laser em Odontologia, seus professores e funcionários e pacientes, por guiarem meus primeiros passos na Laserterapia, mesmo antes do meu ingresso no mestrado. Bem como por estarem sempre de portas abertas quando surge alguma urgência odontológica a ser resolvida!! Obrigada **Lili, Leni** e **Ana** por serem sempre tão gentis e compreensivas comigo.

Ao Laboratório de Pesquisa Básica da FOUSP, em nome da Profa. Dra. Márcia Martins Marques, pelo suporte técnico, operacional e financeiro à essa pesquisa.

Aos funcionários da FOUSP e outros institutos, sem os quais seria impossível a execução dos trabalhos: Aldo, Arnaldo, David, Leandro, Selminha e Soninha (Departamento de Dentística); Douglas (em nome do Departamento de Biologia Oral); Vânia e Glaucia (em nome da Biblioteca da FOUSP); Kátia e Alessandra (Secretaria de Pós-Graduação). E tantos outros que não tive tanto contato, mas que são insubstituíveis em suas tarefas para o bom andamento da Instituição. Obrigada a todos pelo carinho, atenção, dedicação e ajuda preciosa.

À Dedé (**Debora**), nossa mãezona postiça (como diria a Ivana!), por toda a sua dedicação e carinho ao nosso laboratório. Sempre cuidando de todas nós como uma legítima mãe, que conhece a hora do puxão de orelha tanto quanto do carinho! Obrigada por todos os momentos dentro e fora do lab...em especial pelo café delicioso passado já no fim da tarde, aquele que só podia ser apreciado por nós, "madrugadoras" da Dentística.

Aos queridos amigos de laboratório Sueli Miyagi, Stella Moreira, Roberta Couto, Talita Lopez, Thaís Elmadjian, Renata Duarte, Rejane Andrade, Karen Kai (UFabc), Karen Fukushima, Natacha (cirurgia), Natália (cirurgia) Giovanna Sarra, Natali, Giovanna Lopes e Allef. Muito obrigada por todos os momentos compartilhados, por todas as ajudas e muuuuuuuitos ensinamentos...mesmo quando supostamente eu estava ensinando, sempre aprendi em dobro. Especialmente à Sueli, Stella e Roberta, muito obrigada por compartilhar da experiência de vocês e se fazerem disponíveis para nos ensinar mesmo com todas as ocupações que tem.

Ivana Diniz, você é uma grande inspiração! Até hoje me surpreende com sua competência como profissional...realmente um ponto fora da curva. Muito obrigada por sua paciência em me ensinar praticamente tudo que sei sobre um laboratório de cultura celular. Não bastasse, ainda é uma grande amiga, ótima companheira de risadas e uma cervejinha! Torço muito pelo seu sucesso e felicidade.

Gabi Abe e Paula Loures, minhas grandes parceiras nesses últimos dois anos, e espero que para a vida. Nós somos tão diferentes umas das outras...e não poderia ser melhor! Gabi, super centrada e objetiva, Paulinha emoção e coração. Agradeço pela ótima convivência diária, todas as ajudas mútuas, as longas conversas, "madrugadas" e finais de semana de *hard job*. Espero sempre ter uma casa para visitar vocês, seja em Minas, Bahia ou pelo mundo afora!

Aos colegas de pós-graduação da Dentística pela amizade e atividades que desenvolvemos juntos. Em especial à Maria Cecília, Camilinha, Daniele, Beatriz, Christian e Lívia, pela amizade e colaboração dentro e fora da FOUSP.

À **Cibele Pelissari** (doutoranda em Estomatologia) pela ajuda nos processamentos histológicos e por ser sempre tão prestativa e paciente com minhas dúvidas.

Também agradeço a todos os **alunos da graduação** que porventura tenham tido contato comigo nas aulas teóricas, seminários, laboratórios ou clínicas. Aprendi muito mais do que ensinei.

Agradeço à **CAPES** pelo suporte financeiro na forma da bolsa de mestrado, que possibilitou minha dedicação exclusiva à pesquisa durante esse período.

RESUMO

Pedroni ACF. Efeito da Laserfototerapia associada ou não à Vitamina C na indução de membranas celulares (*cell sheets*) de células-tronco da polpa dentária humana [dissertação] São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2016. Versão Corrigida.

Membranas celulares (MCs; Cell Sheets), constituídas por células-tronco (CTs), são autodestacáveis da placa de cultivo, e sem subcultivos geram grande guantidade de células que podem ser transplantadas de maneira mais próxima da fisiologia celular. mantendo-se as ligações celulares e a matriz extracelular produzidas em cultura. O ácido ascórbico ou vitamina C (VC) tem efeito indutor da formação destas MCs, aumentando a longevidade e tempo de indiferenciação das CTs. A similaridade observada entre respostas biológicas da VC em MCs e aquelas da Laserfototerapia (LFT) sobre células e tecidos, nos levou à hipótese de que estas terapias poderiam se complementar melhorando o prognóstico de futura aplicação clínica dessas MCs em regenerações de tecidos de interesse odontológico. Para testar essa hipótese, LFT e VC foram aplicadas associadas ou não na indução de MCs de células-tronco da polpa dentária humana (hDPSCs). Para tanto, hDPSCs descongeladas, que expressaram níveis típicos de marcadores de superfície de células-tronco mesenquimais, foram plaqueadas em placas de 6 poços (5x10⁴ células por poço). Vinte e quatro horas depois do plaqueamento as culturas foram submetidas aos tratamentos dos grupos experimentais: Controle: hDPSCs em P3 cultivadas com meio clonogênico; Senescente: hDPSCs em P27 cultivadas com meio clonogênico; VC: P3 cultivadas com meio clonogênico acrescido de VC (20 µg/ml); Laser: P3 cultivadas com meio clonogênico e submetido à LFT (contato e pontual - 5 pontos / poço, 660 nm, 20 mW, 0,028 cm², 0,71 W/cm², 7 segundos, 5 J/cm², 0,14 J por ponto, 48 horas de intervalo) e Laser+VC: P3 cultivadas com meio clonogênico acrescido de VC e submetido à LFT. Em 24 horas, 7 e 13 dias as hDPSCs dos diferentes grupos experimentais foram observadas macro e microscopicamente, e atividade da enzima telomerase foi avaliada por PCR-TRAP, complementado por ELISA. Para a avaliação da expressão de genes relacionados à natureza e indiferenciação (Mitofilina e Oct 4) e à longevidade (fase catalítica da enzima telomerase - hTERT); bem como à senescência das células do grupo senescente (β-galactosidase), as hDPSCs de todos os grupos experimentais foram submetidas ao RT-qPCR As hDPSCs foram capazes de formar MCs somente nos grupos VC e Laser+VC (100%), entre 10 e 13 dias. As MCs do grupo Laser+VC apresentaram maior facilidade na manipulação. Atividade de Telomerase nas hDPSCs foi observada somente em 24 horas (Controle e LFT) e em 7 dias (VC e Laser+VC). Os marcadores de indiferenciação (Oct 4) e mesenquimal (mitofilina), bem como a hTERT foram expressos nas hDPSCs de todos os grupos experimentais. O Oct4 e o hTERT, em 7 dias, apresentaram expressões significativamente maiores nos grupos VC e Laser+VC em comparação com os demais (p < 0,0001, p = 0,0009, respectivamente). A expressão da mitofilina foi significativamente maior no grupo Laser+VC, em 7 dias (p =0,033). A técnica de obtenção de MCs de hDPSCs por essa metodologia foi considerada adequada para ser testada em procedimentos regenerativos. A LFT quando associada à VC não interferiu na formação das MCs, nem na manutenção da longevidade e indiferenciação das hDPSCs. Adicionalmente, a LFT melhorou a manipulação das MCs. Assim sendo, a associação de VC e LFT na indução de MCs parece promissora para futura utilização de MCs na odontologia regenerativa.

Palavras-chave: *Cell Sheet*. Membrana Celular. Células-tronco da Polpa Dentária Humana. Vitamina C. Laser. Regeneração tecidual. Laser de Baixa Potência.

ABSTRACT

Pedroni ACF. Effect of laserphototherapy associated or not to Vitamin C in the induction of cell sheets of human dental pulp stem cells [dissertation] São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2016. Versão corrigida.

Cell Sheets, consisting of stem cells (SCs) are self detachable from the cultivation plate, and with no subcultivation can generate large amount of cells. The cell sheets can be transplanted closer to cell physiology environment by keeping the cell connections and the extracellular matrix produced in culture. Ascorbic acid or Vitamin C (VC) has inductive effect on cell sheet formation, increasing the longevity and the stemness of the cell for long period of time. The similarity between biological responses of VC in cell sheets and those of Laserphototherapy (LPT, Laser) on cells and tissues led us to hypothesize that these therapies could improve the prognosis of future clinical application of these cell sheets in regeneration of dental tissues. To test this hypothesis, LPT and VC were applied, associated or not, to induce human dental pulp stem cells (hDPSCs). Therefore, hDPSCs, which expressed typical levels of mesenchymal stem cell surface markers, were plated in 6-well plates (5x10⁴ cells per well). Twenty-four hours later they were subjected to the treatment of experimental groups: Control: hDPSCs in P3 cultured with regular medium; Senescent: hDPSCs in P27 cultured with regular medium; VC: P3 cultured with regular medium supplemented with VC (20 µg/ml); Laser: P3 cultures with regular medium and submitted to LPT (punctual and contact mode-5 points / well, 660 nm, 20 mW, 0.028 cm², 0.71 W/cm², 7 sec, 5 J/cm², 0.14 J per point, 48 hours-intervals) and Laser+VC: P3 cultured with regular medium supplemented with VC and submitted to LPT Within 24 hours, 7 and 13 days the hDPSCs of the different experimental groups were observed macroscopically and microscopically, and the telomerase enzyme activity was assessed by PCR-TRAP, complemented by ELISA. To evaluate the expression of genes related to the nature and differentiation (Mitofilina and Oct 4), longevity (catalytic phase of telomerase-hTERT enzyme), and the senescence of the senescent group cells (β-galactosidase), the hDPSCs of all experimental groups were subjected to RT-qPCR. The RT-qPCR data were compared by ANOVA complemented by the Tukey's test ($p \le 0.05$). The hDPSCs were able to form cell sheets only in the VC and Laser+VC groups (100%). Additionally, the cell sheets of the Laser+VC group presented easier handling. Telomerase activity in hDPSCs was observed only in 24 hours (Control and Laser) and seven days (VC and Laser + VC). The undifferentiating marker (Oct 4) and mesenchymal marker (mitofilin), as well as hTERT were expressed in hDPSCs of all experimental groups. Oct4 and hTERT presented expressions significantly higher at 7 days in VC and Laser+VC groups than in all other groups (p < 0.0001, p = 0.0009, respectively). The expression of mitofilin was significantly higher in the Laser+VC group, in 7 days (p = 0.0338). The technique of obtaining cell sheets of hDPSCs by the methodology here presented was considered appropriate to be further tested in regenerative procedures. The LPT when combined with VC did not interfere with the formation of the cell sheets, neither in the maintenance of longevity and undifferentiating status of hDPSCs. Moreover, LPT improved the handling of the cell sheets. Thus, the association of VC and LPT in the induction of cell sheets seems promising for future use in regenerative dentistry.

Keywords: Cell Sheet. Human Dental Pulp Stem Cell. Vitamin C. Laser. Tissue Regeneration, Low Level Laser.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Do inglês Analysis of Variance (Análise de Variância)
anti-DIG-POD	anti-digoxigenina conjugado à peroxidase
APC	Do inglês allophycocyanin
AT	Atividade de telomerase
ATP	Do inglês adhenosintriphosphate (trifosfato de adenosina)
BMP2	Do inglês bone matrix protein 1 (proteína da matriz óssea 1)
BSA	Do inglês <i>bovine serum albumine</i> (albumina de soro bovino)
CA	Estado da Califórnia, EUA
cDNA	Do inglês complementar deoxyribonucleic acid
	(ácido desoxirribonucleico complementar)
CFU-F	Do inglês Colony Forming Units - Fibroblastic
	(unidades formadoras de colônia – fibroblástica)
cit c	Do inglês cytochrome c oxidase (citocromo c oxidase)
CL	Do inglês cicle threshold (ciclo limiar)
CTs	Células-tronco
DE	Densidade de energia
DE	Estado do Delaware, EUA
DEPC	Água tratada com 0,1% de dietilpirocarbonato
DIG	Marcador digoxigenina
DNA	Do inglês deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucléico)
DP	Dobra populacional
DPSCs	Do inglês <i>dental pulp stem cells</i> (células-tronco da
	polpa dentária)
EDTA	Do inglês ethylenidiaminetetracetic acid (ácido etileno
	diaminotetracético)
ELISA	Do inglês Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EP	Eficiênica de Plaqueamento
EUA	Estados Unidos da América
FITC	Do inglês fluorescein isothiocyanate
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
GAPDH	Do inglês glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

GLB1	Do inglês galactosidade beta 1
	(gene; o alvo seria a β-galactosidase)
GMSC	Do inglês mesenchymal stem cells derived from human
	Gingiva
hDPSCs	Do inglês <i>human dental pulp stem cells</i>
HE	Hematoxilina e eosina
HGF	Do inglês, hepatocyte growth fator
hTERT	Do inglês human telomerase reverse transcriptase
IB	Instituto de Biologia da Universidade de São Paulo
lgG1k	Imunoglobulina G 1 kappa
lgG2k	Imunoglobulina G 2 kappa
IL	Estado de Illinois, EUA
IMMT	Do inglês innermembrane protein, mitochondrial (alvo
	Mitofilina)
InGaAIP	Do inglês Indium Gallium Aluminum Phosphide (Fosfeto de
	índio-gálio-alumínio)
LFT	Laserfototerapia
Ln	Logaritmo natural
MEC	Matriz Extra celular
MSC	Do inglês mesenchymal stem cell
	(células-tronco mesenquimais)
NO	Do inglês nitric oxide (óxido nítrico)
Notch-1	Do inglês translocation-associated Notch homolog 1
NIH	Do inglês National Institutes of Health
NY	Estado de New York, EUA
Oct 4; Oct 3/4	Do inglês Octamer-binding Transcription fator 4 (alvo)
OCT 4 POU5F1	Do inglês Octamer-binding Transcription fator 4 - POU
	domain-class 5-transcription fator 1 (alvo – gene)
OR	Estado de Oregon, EUA
P1	Primeira Passagem de subcultivo da célula em uso
P2	Segunda Passagem de subcultivo da célula em uso
P3	Terceira Passagem de subcultivo da célula em uso
P27	Vigésima Sétima Passagem de subcultivo da célula em uso

PBS	Do inglês phosphate buffered saline (tampão fosfato-salina)
PBSA	Do inglês calcium and magnesium-free phosphate buffered
	saline (tampão fosfato-salino sem cálcio e magnésio)
PCR	Do inglês polimerase change reaction
PDL	Do inglês Periodontal Ligament Cells
PDLSC	Do inglês Periodontal Ligament Stem Cells
	(células-tronco do ligamento periodontal)
PE	Do inglês <i>phycoerythrin</i>
PFA	Paraformaldeído
pPDLSC	Do inglês Pig Periodontal Ligament Stem Cells
RNA	Do inglês ribonucleic acid (ácido ribonucléico)
ROS	Do inglês reactive oxygen species (espécies reativas de
	oxigênio)
RT – qPCR	Do inglês Reverse Transcriptase - Quantitative Polimerase
	Chain Reaction
SCAP	Do inglês Stem Cells from the Apical Papilla
SCs	Do inglês stem cells
SFB	Soro Fetal Bovino
SHEDs	Do inglês Stem cells from Human Exfoliated Deciduous
	Teeth (células-tronco de dentes decíduos esfoliados humanos)
SP	São Paulo
TAGGG	Pares de bases de determinação do telômero
TERT	Do inglês Telomerase reverse transcriptase
TGF-β	Do inglês <i>transforming growth factor-β</i> (fator de
	crescimento transformador β)
ТМ	Troca de meio
ТМВ	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
TRAP	Do inglês Telomeric Repeat Amplification Protocol
USP	Universidade de São Paulo
VEGF	Do inglês, vascular endothelial growth fator
VC	Vitamina C (Ácido ascórbico)
α-MEM	Do inglês α- <i>Minimal Essential Medium</i> (Meio Mínimo
	Essencial α)

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
µg/µl	Miligrama por microlitro
µg/ml	Miligrama por mililitro
μL	Microlitro
μm	Milímetro
cm ²	Centímetro quadrado
CO ₂	Dióxido de carbono
G	Grama
H ₂ O	Água
J	Joules
J/cm ²	Joules por centímetro quadrado
Μ	Molar
mM	Milímetro
mW	Miliwatt
ng/µl	Nanograma por microlitro
Nm	Nanograma
NO	Óxido nítrico
Pmol	Picomol
W/cm ²	Watt por centímetro quadrado
–ΔΔCt	Do inglês cicle threshold variation

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	. 22
2 REVISÃO DA LITERATURA	. 25
2.1 Regeneração tecidual e uma nova era na Odontologia	. 25
2.2 Limitações do cultivo celular <i>in vitro</i>	. 27
2.2.1 Limite de Hayflick	. 27
2.2.2 Telômeros e a descoberta da Enzima Telomerase	. 28
2.2.3 Células-tronco	. 30
2.2.4 Telomerase em células-tronco	. 31
2.3 Células-tronco e regeneração tecidual guiada	. 32
2.3.1 Células-tronco da Polpa Dentária Humana	. 32
2.3.2 Ácido Ascórbico na regeneração tecidual	. 33
2.4 Membranas celulares (<i>Cell Sheets)</i> na Engenharia Tecidual	. 34
2.4.1 Ácido Ascórbico induzindo a formação de MCs (Cell Sheet)	. 36
2.5 Laserfototerapia (LFT)	. 39
2.5.1 Mecanismos de ação da LFT	. 40
2.5.2 Laserfototerapia em células e tecidos	. 42
2.5.3 LFT influencia a potencialidade de células-tronco	. 43
3 PROPOSIÇÃO	. 46
4 MATERIAIS E MÉTODOS	. 47
4.1 Cultivo celular	. 47
4.1.1 Recaracterização das células	. 48
4.1.1.1 Caracterização imunofenotípica por citometria de fluxo	. 48
4.1.1.2 Contagem de Unidades Formadoras de Colônias -Fibroblásticas (CFU-F	; do
inglês coloning formation units-fibroblastic)	. 49
4.1.1.3 Tempo de Dobra da População (DP)	. 50
4.2 MCs (<i>Cell Sheets</i>) de hDPSC	. 51
4.2.1 Grupos Experimentais	. 51
4.2.2 Aplicação da Laserfototerapia (LFT)	. 52
4.2.3 Análise das Membranas celulares (Cell Sheets)	. 53
4.2.3.1 Macroscopia das MCs	.54
4.2.3.2 Microscopia das MCs	. 55

4.2.3.3 Análise da Atividade de Telomerase	55
4.2.3.4 Transcrição Reversa seguida de PCR quantitativa em Tempo Real (R	Т-
qPCR) das células nos diferentes grupos experimentais	57
5 RESULTADOS	61
5.1 Recaracterização das células	61
5.1.1 As hDPSCs foram capazes de formar colônias	61
5.1.2 As hDPSCs apresentam dobra populacional aproximada de 20 horas	62
5.1.3 As hDPSCs expressaram níveis típicos de marcadores de superfície o	de
células-tronco mesenquimais	63
5.2 As hDPSC foram capazes de formar MCs (Cell Sheets)	64
5.2.1 Macroscopia	64
5.2.2 Microscopia	66
5.3 Atividade da Enzima Telomerase	68
5.4 Imunofenotipagem das células dos diferentes grupos experimentais	69
5.4.1 Células na P3	69
5.4.2 Células na P27 (senescentes)	71
6 DISCUSSÃO	72
7 CONCLUSÃO	79
REFERÊNCIAS	80
ANEXO	94

1 INTRODUÇÃO

A regeneração de organismos vivos ainda é um desafio para as diversas áreas biológicas. Nas últimas três décadas, a engenharia tecidual, baseada na tríade células-tronco (CTs), fatores de crescimento e arcabouços (*scaffolds*) (Skalak; Fox, 1988; Langer; Vacanti, 1993) tem buscado novas soluções regenerativas capazes de restaurar, repor, manter ou melhorar funções biológicas.

Na Odontologia o interesse em pesquisas nessa área é crescente, principalmente após o isolamento e caracterização de células-tronco da polpa dentária humana (hDPSCs, do inglês human dental pulp stem cells) (Gronthos et al., 2000). Terapias celulares baseadas nessas técnicas já foram aplicadas em pesquisas da área com relativo sucesso na reposição/reparação de tecidos periodontais e dentários (lohara et al., 2004; Ding et al., 2010; Ferreira et al., 2012b; Moreira et al., 2013; Arany et al., 2014). No entanto, ainda há muito o que se estudar, principalmente no que tange à obtenção de novos tecidos com não apenas características celulares, mas também organização e dimensões originais que caracterizariam, por exemplo, um dente completo e funcional. Assim, os esforços atuais estão voltados para o desenvolvimento de materiais ideais, capazes de agir como arcabouço temporário para as células; domínio de fatores indutores da diferenciação celular guiada; bem como aprimoramento das funções biológicas celulares (Horst et al., 2012; Rosa et al., 2012).

Com relação às funções biológicas celulares, apesar da grande capacidade proliferativa, em cultivo, as CTs possuem um limite biológico de divisões. Quando então passam por alterações que as levam ao estado de senescência replicativa ou diferenciação em tipos celulares especializados (Hayflick, 1965; Silva et al., 2012; Binato et al., 2013). Esse fato dificulta seu estudo *in vitro* e a obtenção de grande quantidade de CTs viáveis para o transplante, representando um empecilho na Medicina Regenerativa (Binato et al., 2013). Visando transpor essa limitação, pesquisadores vem buscando alternativas para obter grande quantidade de CTs para estoque sem danos celulares, aumentando sua longevidade e mantendo sua característica indiferenciada. Uma das formas descritas na literatura para alcançar esse objetivo é a realização dos cultivos de MCs (*Cell Sheets*) (Okano et al., 1993 e 1995; Yamato; Okano, 2004; Yang et al., 2005; Wei et al., 2012). Esse último consiste

em cultivar as células com estímulos específicos e sem nenhum subcultivo, até que essa camada celular se "auto destaque" em uníssimo da superfície de cultivo – fornecendo grande quantidade de células ao mesmo tempo que mantém a matriz extracelular (MEC) praticamente intacta, ou seja as próprias CTs sintetizam um arcabouço. Os principais estímulos específicos descritos para essa técnica são o cultivo em placas especiais com alternância de polaridade sensível à temperatura (*UpCell dishes*) (Okano et al., 1993; 1995), ou a suplementação do meio de cultivo com ácido ascórbico em concentrações ideais (Nakamura et al., 2010; Wei et al., 2012; 2013).

O ácido ascórbico (ou Vitamina C, VC) é um nutriente comum e vital para a saúde humana, seja participando da síntese e função de fatores do sistema imunológico, agindo na biossíntese de colágeno e outros constituintes da MEC (Halliwell 2001; Wei et al., 2012), ou como cofator em reações biológicas (Fraga et al.,1991). Para a indução das membranas de CTs este deve ser adicionado ao meio de cultivo em concentrações específicas, onde atua como indutor de crescimento, proliferação celular e síntese de DNA (Wei et al., 2012). Além disso, é capaz de inibir a diferenciação e regular a expressão de marcadores de pluripotência como o Oct-4 e Sox-2 (Potdar; D'Souza, 2010). Wei et al., 2012, demonstraram que 20 μ g/ml de VC é capaz de induzir a formação de MCs de PDLSCs (do inglês *Periodontal Ligament Stem Cells*); aumentar o metabolismo celular e a produção de componentes da MEC como colágeno tipo 1, integrina β 1 e fibronectina; inibir e reparar danos oxidativos ao DNA; e finalmente elevar a atividade da telomerase – enzima que catalisa a formação dos telômeros retardando o seu encurtamento – o que atrasaria o envelhecimento celular.

A Laserfototerapia (LFT), de forma similar à VC, é capaz de atuar no metabolismo de células, em especial daquelas que se encontram em estresse oxidativo (Hamblin; Demidova, 2006; Hamblin 2008; Eduardo et al., 2008). De fato, nosso grupo de pesquisa já demonstrou que a bioestimulação obtida com a LFT se mostrou eficaz na indução de proliferação com a manutenção de viabilidade e indiferenciação das CTs na ausência de fatores de crescimento (Ferreira et al., 2012a). Adicionalmente, a LFT também já se mostrou capaz de prevenir a morte celular (Moreira et al., 2011), bem como prolongar a longevidade celular tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Park et al., 2015). Assim sendo, a LFT poderia ser também utilizada para a obtenção de membranas de CTs.

Em suma, a grande vantagem do uso das MCs seria a de se conseguir grande quantidade de CTs em um arcabouço natural e que poderia ser transplantada para sítios que poderiam induzir as CTs pelos fatores de crescimento locais do tecido a ser reposto. Assim sendo, essas MCs poderiam ser utilizadas na odontologia regenerativa, quer seja como auxiliar no reimplante dentário, na regeneração de defeitos ósseos periodontais, entre outros.

Atualmente, os reimplantes dentários vêm sendo utilizados em cirurgias de transplante autógeno de terceiros molares (Mejàre et al., 2004; Teixeira et al., 2006; Cho et al., 2013; Kang et al., 2013; Chung et al., 2014) para reposição de dentes extraídos por diversas razões. O uso de MCs envolvendo as raízes de dentes reimplantados tem sido testado *in vivo* com o objetivo de regenerar o ligamento periodontal e evitar uma futura reabsorção radicular (Tsumanuma et al., 2011; Zhou et al., 2012; Zhao et al., 2013). No entanto, os resultados dos poucos trabalhos da literatura ainda são insatisfatórios, o que demanda novos estudos na obtenção de MCs com características físicas e biológicas que favoreçam a sua futura utilização clínica.

Pela similaridade observada entre as respostas biológicas da VC nas MCs e aquelas da LFT sobre células e tecidos, a hipótese do presente trabalho é que estas terapias poderiam se complementar melhorando o prognóstico da sua futura aplicação clínica dessas membranas em regenerações de tecidos de interesse odontológico. Para testar essa hipótese, LFT e VC foram aplicadas associadas ou não na indução de membranas de células-tronco da polpa dentária humana (hDPSCs) que tiveram suas características de manipulação física, longevidade e manutenção da indiferenciação avaliadas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Regeneração tecidual e uma nova era na Odontologia

Durante a história prévia da Ciência Odontológica, tradicionalmente, buscou-se a reposição e/ou reparo dos tecidos e órgãos da região crânio facial (Grossman, 1966; Harada et al., 2008), sendo que, para esse fim, muitos já foram os avanços alcançados no desenvolvimento e aprimoramento de materiais sintéticos. No entanto, o limite de sucesso dessas técnicas convencionais tem ido cada vez mais de encontro a uma variável comum: a biologia desses tecidos (Natiella et al., 1970) - e consequentemente à interação materiais-tecidos. Assim, as pesquisas odontológicas passaram a buscar uma compreensão maior da biologia básica, e aplicar seus princípios e técnicas laboratoriais de pesquisa na investigação de seus substratos de estudo, tanto os tecidos dentários (Harada et al., 2008; Sharma et al., 2013; Wei et al., 2013), quanto periodontais (Wang et al., 2014) e orofaciais. Assim, estamos passando por uma mudança na filosofia de ensino e pesquisa na área.

Por exemplo, na cirurgia, técnicas de enxertia tem cada vez mais buscado a regeneração de tecidos perdidos por técnicas adaptadas da Engenharia Tecidual; bem como a Endodontia vem dando largos passos na busca da regeneração do tecido dentário associando a terapia celular com células-tronco (CTs) à scaffolds (Horst et al., 2012; Moreira et al., 2013). No entanto, ainda não somos capazes de neoformar dentes completos, funcionais e com todas as características necessárias para que se fale em técnicas de regeneração do órgão dentário como um todo (Horst et al., 2012; Diniz 2015), assim, a melhor alternativa para reposição de dentes perdidos ainda está nas próteses artificiais, sejam suportadas por dentes ou por implantes osseointegrados.

Em um âmbito mais geral dos estudos com CTs vemos uma intensa investigação científica, devido à possibilidade de inúmeras aplicações terapêuticas (Silva et al., 2012), como a substituição de tecidos, a construção de modelos para entender os mecanismos de certas doenças ou para realizar testes de novas drogas (Denham et al., 2005). Dessa forma, espera-se conseguir a cura para doenças como Parkinson (Kim et al., 2002; Lindvall, 2016), lesões medulares (McDonald et al., 1999), insuficiência cardíaca (Min et al., 2002) e diabetes, bem como regenerar órgãos danificados ou perdidos, à exemplo dos dentes (Denham et al., 2005; Horst et al., 2012). Antes de se atingirem esses objetivos, todavia, vários desafios se apresentam para os pesquisadores. Formas de se conseguir a diferenciação celular para o tipo exato necessário, formas de se controlar adequadamente a multiplicação celular, questões éticas envolvidas na manipulação das CTs, possibilidade de rejeição das células pelo organismo, além de formas apropriadas de se transplantarem as células para os órgãos doentes são exemplos de questões ainda sem respostas definitivas (Denham et al., 2005).

Pesquisas avançadas nessa área já demonstraram ser possível neoformar todos os tecidos formadores de um elemento dental, no entanto sem a organização ou função necessárias ao órgão. Ainda são muitas as dúvidas a serem sanadas antes que se alcance o mérito de formar um elemento dental capaz de substituir as técnicas reparadoras atuais (Diniz, 2015; Horst et al., 2012). Conhecimentos de sinalização celular para formação organizada de todos os tecidos; controle da divisão das células de forma a obter um dente com a morfologia desejada; controle do tempo de proliferação dessas células, sinalização de parada de crescimento do elemento e processos relacionados à erupção dental ainda precisariam ser elucidados (Horst et al., 2012). A complexidade para chegar a todas essas respostas de cunho molecular e genético, e saber como trabalha-las a favor, é um grande obstáculo. No entanto, os avanços já obtidos pelos novos estudos em bioengenharia nos possibilitam vislumbrar soluções para alternativas regenerativas propostas nos primórdios da Odontologia, e que, por barreiras biológicas não se mostraram efetivas no passado (Rosa et al., 2012). Assim, técnicas como regeneração do complexo dentinho-pulpar, regeneração periodontal, reimplante e transplante dentais têm sido revistas e reformuladas com base nos novos conhecimentos e técnicas regenerativas (Rosa et al., 2012; Kang et al., 2013).

2.2 Limitações do cultivo celular in vitro

2.2.1 Limite de Hayflick

Na Década de 60, Leonard Hayflick realizou um importante estudo voltado à observação das divisões celulares in vitro. Após cultivar linhagens celulares humanas por tempo prolongado, concluiu que essas paravam de proliferar após um número limite de divisões, por um processo hoje conhecido como senescência replicativa. Este autor propôs também que esse fenômeno celular poderia ser utilizado em modelos de estudos do envelhecimento humano em nível molecular e celular (Hayflick, 1965). Pouco tempo depois (1973) Alexei Olovnikov propôs uma conecção entre a senescência celular e o "problema de replicação nas pontas dos cromossomos" - recém descrito por James D. Watson - em uma teoria que chamou de "Teoria da Marginotomia". Nela, propos que o encurtamento dos telômeros seria um mecanismo intrínseco que, como um relógio, controlaria o número de divisões celulares antes da senescência celular (Olovnikov, 1973). Já o "problema de replicação da ponta dos cromossomos" foi descrito por Watson como sendo um processo natural das células em divisão, onde, durante a replicação do DNA, a polimerase não conseguiria replicar completamente a extremidade 5' de cada cromossomo, levando a uma pequena região não copiada. Watson salientou que, se não houvesse um mecanismo compensatório, os telômeros se encurtariam progressivamente com as divisões celulares sucessivas (Watson; Crick, 1974). Posteriormente (1988), Greider e Blackburn (1996) viriam a observar pela primeira vez essa perda progressiva no comprimento dos telômeros, em células se dividindo in vitro.

Os telômeros são estruturas presentes nas extremidades de cromossomos de células eucarióticas (Muller, 1938; McClintock, 1941) que protegem o cromossomo da degradação, fusão e recombinação (Kalmbach et al., 2014). Nos mamíferos, são formados pela repetição da terminação de oligonucleotídeos TTAGGG, e componentes proteicos associados (Blackburn; Gall, 1978). Em um processo fisiológico natural, as células em divisão sofrem redução gradativa dos telômeros,

que ao atingirem um grau crítico de encurtamento, passam a reconhecer danos ao DNA, sinalizando o processo de apoptose ou entrando em senescência.

Até hoje se dá o nome de "Limite de Hayflick" ao comprimento mínimo de encurtamente dos telômeros que desencadeiaria os processos de senescência ou apoptose, apesar de essa associação causal (limite de divisões celulares *versus* encurtamento dos telômeros) não ter sido feita por esse pesquisador. Apesar da importancia das análises feitas por Hayflick, muitas dúvidas ainda pairavam sobre o assunto, e essa capacidade replicativa se mostrava bastante heterogênea entre alguns diferentes tipos celulares - indicando que, provavelmente, existiam múltiplos mecanismos nesse processo de envelhecimento celular a serem ainda desvendados (Armstrong et al., 2014).

2.2.2 Telômeros e a descoberta da Enzima Telomerase

Em 1984, foi descoberta e isolada a Telomerase, enzima responsável pela manutenção e elongação dos telômeros (Greider; Blackburn, 1985), capaz de repor oligonucleotídeos perdidos pelos telômeros durante as divisões celulares. Já Cooke e Smith (1986) notaram que a média do comprimento dos telômeros de cromossomos sexuais em espermatozóides era muito maior do que em células adultas. Eles consideraram a possibilidade de que células adultas poderiam ser deficientes na enzima telomerase. Em 1994, pesquisadores detectaram atividade de telomerase (AT) em 90 de 101 amostras celulares de tumor (provenientes de 12 tipos diferentes de tumor) e em 98 de 100 linhagens de células imortalizadas. Curiosamente, os mesmos não encontraram atividade em 50 amostras de células somáticas normais, o que reforçou a idéia de que a AT poderia contribuir para a imortalidade de células tumorais, bem como estar ausente em tecidos somáticos normais (Kim et al., 1994; Granger et al., 2002). Estudos nos próximos anos confirmaram uma redução no comprimento médio dos telômeros com divisões celulares em diferentes tipos de células somáticas, mas não nas células germinativas (Greider; Blackburn et al., 1996). Estas observações apoiaram a conclusão de que as células somáticas são aparentemente incapazes de manter o comprimento dos telômeros (Figura 2.1).



Figura 2.1 - Comprimento dos telômeros em função do desenvolvimento celular de células-tronco embrionárias, células-tronco adultas e células somáticas

A correlação entre o comprimento dos telômeros e potencial replicativo tornouse uma ligação mecânica, quando foi demonstrado que o potencial replicativo de fibroblastos humanos primários pode ser prorrogado indefinidamente pelo prolongamento artificial dos telômeros (Bodnar et al., 1998). Para testar esta hipótese, esse artigo publicado no periódico Science avaliou células que tiveram a AT propositalmente estimulada. Dois tipos de células humanas telomerase-negativas, foram transfectadas com vectores que codificam a subunidade catalítica da telomerase humana (hTERT). As células que tiveram a AT estimulada tiveram seus telômeros alongados, divisão vigorosa, e redução da expressão gênica de βgalactosidase (biomarcador para a senescência), quando comparadas ao controle de células normais telomerase-negativas. Também apresentavam cariótipo normal, sem sinais de tumorização - apesar de ultrapassarem o seu tempo de vida normal em pelo menos 20 duplicações - estabelecendo assim uma relação causal entre o encurtamento do telômero e senescência celular in vitro. Concluiram que a capacidade de manter células humanas normais em um estado fenotipicamente jovem poderia ter importantes aplicações em pesquisa e na Medicina (Bodnar et al., 1998). Esses experimentos estabeleceram que a perda progressiva do telomero é na verdade a principal causa da senescência replicativa como tinha sido proposto anteriormente (Olovnikov, 1973).

A estimilação forçada ou o aumento da AT ainda não foram totalmente esclarecidas. Tão pouco os processos pelo qual as células agem e/ou regulam tanto o encurtamento dos telômeros, quanto sua reposição promovida pela telomerase ou recombinação gênica. Mas já se sabe que algumas substâncias são capazes de ativar ou inibir essa enzima alterando o ciclo celular, a exemplo da Vitamina C (Wei et al., 2012).

2.2.3 Células-tronco

Células-tronco (CTs) são células indiferenciadas que possuem a capacidade de auto-renovação e também a habilidade de se transformar em pelo menos um tipo de célula diferenciada ou madura (Denham et al., 2005). São classificadas de acordo com sua capacidade de diferenciação, podendo ser: 1 - unipotentes, 2 multipotentes, 3 – pluripotentes e 4 – totipotentes. Assim, na seguência, 1 - são capazes de se diferenciar em apenas um tipo de célula adulta (ex: CTs musculares): 2 - dois ou mais tipos de celulares (células do feto em desenvolvimento e CTs adultas, como as mesenguimais e hematopoiéticas); 3 - capazes de se transformar em todos os tipos de células de um organismo adulto, excetuando linhagens extraembrionárias (ex.: CTs embrionárias, derivadas da massa celular interna de embriões em estágio de blastocisto); 4 - podem se transformar em qualquer tipo de célula adulta e também nos tecidos extra embrionários (que inclui os oócitos fertilizados e os blastômeros de embriões antes do estágio de mórula). Além dessas, recentemente também foram descritas CTs derivadas de tecidos neoplásicos, as CTs cancerígenas, que resultam em células neoplásicas indiferenciadas, parcial ou totalmente diferenciadas (Denham et al., 2005).

Também podemos citar a "reprogramação de células somáticas" (ou seja, adultas), descritas pela primeira vez por Takahashi e Yamanaka (2006). Nomeadas como "*Induced Pluripotent Stem Cells*" (iPSC ou iPS) essas células são modificadas artificialmente ao ponto de passarem a apresentar características semelhantes às células-tronco embrionárias (ou seja, pluripotentes) (González et al., 2011). Esse importante estudo preliminar utilizou células de fibroblastos de ratos adultos (Takahashi; Yamanaka, 2006), onde a expressão forçada dos fatores de transcrição

c-Myc / Klf4 / Oct4 / Sox2 foi capaz de induzir a transformação dessas em IPSs. Esses fatores passaram a ser conhecido então como Fatores de Yamanaka, e continuam servindo de base para outros pesquisadores que já foram capazes de reprogramar diversas outras células adultas, inclusive linhagens celulares de origem dentária (SCAP, SHED e DPSCs) (Yamasaki et al., 2014).

As terapias com CTs apresentam um grande potencial em termos de regeneração de tecidos vivos, o que tem impulsionado uma série de linhas de pesquisas voltadas para o cultivo *in vitro* desses tipos celulares (Denham et al., 2005). Assim, soluções para os limites biológicos desses cultivos, como a necessidade de grande número de células, controle da diferenciação / indiferenciação e da viabilidade das CTs vêm sendo alvo constante das pesquisas. Além das dificuldades biológicas acima observadas, os avanços em estudos com CTs, principalmente de origem embrionárias, também são dificultados por fatores éticos, aumentando ainda mais a necessidade de conhecimento sobre o potencial de CTs originadas de tecidos adultos, em especial as oriundas de tecidos que normalmente seriam descartados, como as linhagens de CTs mesenquimais isoladas dos tecidos dentários e adjacentes a esses (Gronthos et al., 2000; Gronthos et al., 2002).

2.2.4 Telomerase em células-tronco

Normalmente todos os tipos de CTs apresentam atividade de telomerase (AT), o que contribui para a grande capacidade de multiplicação e auto-renovação dessas células. No entanto a AT não é igual em todos os tipos de células-tronco (Lansdorp, 2008). As CT adultas possuem baixa AT, permitindo que ocorra lento e progressivo encurtamento dos telômeros, mas sempre mantendo células disponíveis durante toda a vida do organismo (Kalmbach et al., 2014). Já as CTs embrionárias apresentam alta AT, o que manteria estável o comprimento dos telômeros a cada divisão celular e, teoricamente, confere capacidade ilimitada de multiplicação a essas linhagens celulares (Denham et al., 2005). Alguns estudos demonstraram a indução de efeitos pela telomerase em CT a partir de mecanismos diferentes dos da construção de telômeros (Lansdorp, 2008). Camundongos transgênicos com expressão aumentada da subunidade catalítica da telomerase (TERT) apresentaram

ativação de CT epidérmicas e migração dessas células quando se instituía estímulo proliferativo. Houve aumento da proliferação de queratinócitos, do crescimento capilar e da hiperplasia celular (Flores et al., 2005; Sarin et al., 2005).

Existem relatos na literatura de efeitos extrateloméricos da telomerase, ou seja, não ligados ao elongamento de telômeros (Sarin et al., 2005). É possível que a telomerase participe do processo de reparação do DNA celular. Foi mostrado que células que tiveram a AT suprimida apresentavam significativa perda da capacidade de reparação do DNA (Masutomi et al., 2005). Já se verificou, também, participação da telomerase em outros mecanismos de apoptose celular (Bollmann, 2008), e como fator regulatório das propriedades imunomodulatórias de CTs da medulla (Chen et al., 2014). Armstrong et al. (2005) compararam CTs embrionárias normais com outras induzidas a uma superexpressão da subunidade TERT e descobriram que essas últimas apresentaram maior capacidade de auto-renovação, resistência à apoptose, aumento de proliferação e maior resistência ao estresse oxidativo. A maioria das células somáticas humanas tem níveis indetectáveis de AT devido à repressão do hTERT desde fases precoces do desenvolvimento embrionário. Conseqüentemente, as células somáticas humanas perdem cerca de 50 a 200 pares de base de DNA telomérico a cada divisão celular (Cong; Shay, 2008).

2.3 Células-tronco e regeneração tecidual guiada

2.3.1 Células-tronco da Polpa Dentária Humana

Em tecidos saudáveis, as células-tronco progenitoras presentes na polpa dentária humana, normalmente encontram-se em estado quiescente. Porém, na presença de lesões que danifiquem ou destruam odontoblastos – a exemplo de cáries, traumas e restaurações – fatores de crescimento são liberados pela MEC, recrutando e induzindo esses tipos celulares a migrar, proliferar e se diferenciar, com a finalidade de substituir as células danificadas (lohara et al., 2004; Harada et al., 2008; Ferracane et al., 2010; Harumi et al., 2011).

O dente humano e suas estruturas de suporte são fontes de múltiplas linhagens de células-tronco multipotentes. Estas células podem ser isoladas da polpa dentária (DPSC, do inglês, *Dental Pulp Stem Cells*) (Gronthos et al., 2000); da polpa de dentes decíduos esfoliados (SHED, *Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous*) (Miura et al., 2003); do ligamento periodontal (PDLSC, *Periodontal Ligament Stem Cells*) (Seo et al., 2004); da papila apical (SCAP, *Stem Cells from the Apical Papilla*) (Sonoyama et al., 2008) e da gengiva humana (GMSC, *Mesenchymal Stem Cells derived from human Gingiva*) (Zhang et al., 2009).

As células-tronco da polpa dentária (DPSCs), foram primeiramente isoladas por Gronthos et al. (2000), sendo descritas como células mesenquimais multipotentes e capazes de regenerar o complexo dentino-pulpar. Estas podem ser caracterizadas através de marcadores de superfície, como: marcadores mesenquimais STRO-1, CD13, CD44, CD24, CD29, CD73, CD90, CD105, CD106 e CD146 e marcadores de células embrionárias Oct 3-4 e Nanog (Kawashima, 2012; Sharma et al., 2013). Recentemente a Mitofilina também foi descrita como um de seus marcadores, sendo expressa nessas células quando ainda se apresentam indiferenciadas (Hwang et al., 2015). Desde então tem aumentado o interesse em modelos de estudo baseados nesse tipo de CTs, principalmente devido à sua multipotencialidade em se diferenciar em diversos tipos celulares de interesse para a regeneração tecidual, fácil isolamento e cultivo, baixa imunogenicidade, e que não enfrenta barreiras éticas, já que tem por fonte um tecido que normalmente seria descartado após extrações dentárias (Gronthos et al., 2000; Pierdomenico et al., 2005; Arany et al., 2014; Ding et al., 2015; Jayaraman et al., 2016).

2.3.2 Ácido Ascórbico na regeneração tecidual

O ácido ascórbico, ou Vitamina C (VC), é um nutriente hidrossolúvel comum e vital para a saúde humana, sendo essencial para a síntese e função de fatores do sistema imunológico, biossíntese de colágeno e outros constituintes da MEC, agindo também como cofator em diversas reações biológicas (Stone; Meister, 1962; Nandi et al., 2005; Korkmaz; Kolankaya, 2009).

Fraga et al. (1991) demonstraram que a ingestão de 60 ou 250 mg / por dia de VC protegeria o DNA de espermatozoides humanos de danos oxidativos endógenos, causados por espécies reativas de oxigênio, reduzindo riscos de mutações gênicas. No corpo humano, a VC é encontrada predominantemente na forma de Ascorbato (mono- ânion) (Levine et al.,1999), capaz de reduzir radicais livres altamente reativos, gerando então o radical Ascorbil, sua forma ionizada, que é relativamente pouco reativa (Bielski et al., 1975), razão essa principal de seu efeito antioxidante. O Ascorbato também eliminaria várias espécies reativas não-radicais, tais como ácido hipocloroso, ozônio e agentes derivados de nitração pelo peroxinitrito (Halliwell, 2001).

Seu efeito benéfico sobre o metabolismo e longevidade celular tem sido amplamente aplicado, com diversas finalidades, em estudos *in vivo* e *in vitro* (Halliwell, 2001), inclusive com células-tronco. Tendo em vista a complexidade dos processos e reações do ciclo celular influenciadas por VC, alguns autores sugerem que outras intervenções, além da supressão dos radicais livres, poderiam somar-se e justificar a eficiência dessa vitamina. Assim, em estudos mais atuais, foram reconhecidas: 1) sua ação sobre o aumento da expressão de Nanog através da ativação da via de sinalização JAK / STAT (Wu et al., 2014); 2) repressão da expressão dos genes p53 (Shi et al., 2010) e TET1 (Chen et al., 2013), agindo no processo de senescência celular e auxiliando na reprogramação de células somáticas em IPSs; 3) aumento da atividade da enzina telomerase em PDLSCs; onde 4) também induziu a formação de *Cell Sheets* através do aumento do metabolismo celular e, consequentemente, da produção e deposição de MEC (Wei et al., 2012).

2.4 Membranas celulares (Cell Sheets) na engenharia tecidual

A engenharia tecidual para a reposição de tecidos perdidos envolve três fatores primordiais: células, fatores de modulação (adesão, proliferação e diferenciação) e arcabouço (scaffolds), tendo ainda como fator determinante do sucesso *in vivo* o suprimento sanguíneo adequado para nutrir e oxigenar os novos tecidos (Bartold et al., 2016). Além das limitações biológicas das células, relatadas anteriormente no

texto, a utilização de scaffolds tem como empecilho a nutrição e a oxigenação das células que proliferam em seu interior, além da resposta imunológica do hospedeiro a este corpo estranho (Pirraco, 2011; Yamato; Okano, 2004). Visando transpor a necessidade de utilização desse aparato, Teruno Okano e colaboradores (1993) desenvolveram uma placa de cultivo especial (UpCell dish) (CellSeed Inc., Shinjukuku, Tóquio, Japão), que possibilita a formação de uma membrana celular organizada capaz de soltar-se da placa praticamente intacta (Cell Sheet), sendo possível o transporte e implantação dessas células sem a necessidade de um scaffold mediador (Okano et al., 1993; 1995; Yang et al., 2005; 2007; Wang et al., 2014; Long et al., 2014). Isso ocorre devida à capacidade da UpCell dish em promover inversão na polaridade de sua superfície de adesão quando exposta à variação brusca de temperatura (de 37 °C para 20 °C), transformando a placa hidrofóbica - como todas as placas de Petri tradicionais - em hidrofílica, o que promove um desprendimento dessas células do fundo da placa sem a necessidade de uso de agendes de digestão enzimática, mantendo seus depósitos de MEC. Uma segunda técnica já bem estabelecida para a obtenção destas MCs em laboratório é a indução através da suplementação do meio de cultivo com ácido ascórbico (vitamina C, VC), em concentração ideal (Nakamura et al., 2010; Wei et al., 2012) (Figura 2.2).



Figura 2.2 - Membrana celular (Cell Sheet) de hDPSC induzida por Vitamina C

A engenharia tecidual mediada por MCs já tem sido aplicada em diversos tecidos / órgãos como córnea, miocárdio, fígado e tecidos periodontais (Nishida et al., 2004; Shimizu et al., 2006; Ohashi et al., 2007; Ding et al., 2010; Zhao et al., 2013).Também já foram desenvolvidas culturas em 3D, onde a sobreposição das
monocamadas de MCs, do mesmo tipo celular ou não, possibilitou a formação de estruturas funcionais complexas, mimetizando, neste caso, o tecido cardíaco (Haraguchi et al., 2012). Dentro da Odontologia regenerativa, a Periodontia tem se destacado na aplicação das MCs, principalmente na tentativa de repor o tecido periodontal perdido ao redor de raízes dentárias (Fujita et al., 2009; Kelm; Fussenegge, 2010; Wei et al., 2012).

Sendo a MEC mediadora da transmissão de sinais químicos e mecânicos fundamentais na fisiologia celular, como a adesão, migração, proliferação, diferenciação e morte, além de prover suporte e sítios físicos para agregação das células (Freshney, 2005; 2006), o simples fato de os processos de obtenção das MCs serem capazes de manter a MEC praticamente intacta - já que não são realizados subcultivos que empregariam enzimas proteolíticas - poderiam representar uma vantagem aos métodos tradicionais de cultivo (Yang et al., 2005; Zhou et al., 2012).

2.4.1 Ácido Ascórbico induzindo a formação de MCs (Cell Sheet)

Inicialmente o ácido ascórbico (vitamina C, VC) passou a ser utilizado nas concentrações entre 50 a 100 µg/ml, apenas como complementação na técnica original de obtenção das MCs pelo cultivo nas UpCell dishes - não sendo esse estímulo, nessas concentrações, capaz de formar sozinho MCs verdadeiras, ou seja, que se soltassem passivamente da placa. O objetivo era aumentar a deposição de componentes da MEC, bem como induzir o início da diferenciação em tecidos osteóides ainda in vitro (Flores et al., 2008a; Flores et al., 2008b; Wang et al., 2014).

O primeiro a sugerir a indução de formação de MCs apenas pela suplementação com VC e em placas de cultivo convencionais, foi Park et al. (2006). Neste estudo, os condrócitos suínos imaturos foram induzidos por meio suplementado com 50 µg/mL de VC com o objetivo de reconstruir de cartilagem suina. As células foram mantidas em cultura por 1 a 5 semanas quando foram aplicadas em articulações de suínos. Ensaios bioquímicos mostraram que a deposição de glicosaminoglicanos foi gradual e contínua. Histologicamente a deposição de glicosaminoglicanos foi se tornando cada vez mais homogênea e intensa com o passar das semanas.

A primeira membrana celular de tecidos orais utilizando o ácido ascórbico foi desenvolvida por Flores et al. (2008a). Os autores isolaram células de ligamento periodontal humanos e conseguiram desenvolver cell sheets por meio do uso da *UpCell dish* associado a um meio de diferenciação osteogênica contendo 50µg/ml de ácido ascórbico-2-fostato, 10 nM de dexametasona e 10 mM de β-glicerofosfato. O objetivo do estudo foi avaliar o comportamento de cell sheets induzidas por três semanas em cultura na regeneração do complexo ligamento/cemento da região de periodonto. Após 1 a 6 semanas no dorso de camundongos associados a discos de dentina foi observada formação de dentina e ligamentos periodontais imaturos na região de membrana próxima ao dente.

Em Zhou et al., 2012, culturas de fibroblastos do ligamento periodontal (PDL) de cães foram enriquecidas com 100 µg/ml de VC para estimular a formação da membrana celular. As culturas foram mantidas por 8 semanas, sem subcultivos, até que a membrana celular se auto destacasse da placa. Dentes extraídos tiveram seus tecidos moles removidos e os canais tratados, e então suas raízes foram envolvidas pela membrana de PDL e reimplantadas em seus alvéolos. O tecido regenerado apresentou grande quantidade de colágeno tipo III, tipo I e fibronectina.

Wei et al. (2012) estudaram a gualidade de MCs do ligamento periodontal de suínos (pPDLSC) induzidas apenas por ação da VC. Para isto, foram comparadas MCs produzidas em placa termo ajustável (UpCell dish) (grupo controle) e aquela induzida pela VC isolada, em diferentes dosagens. Foram plaqueadas 1 x 10⁵ células em placas de 60 mm para todos os grupos, após a confluência o meio clonogênico era reposto e suplementado com dosagens variadas de VC (0 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml ou 50 µg/ml). Após 10 a 13 dias as MCs descolaram das placas e foram aplicadas em lesões periodontais induzidas em dentes de mini pigs. Após 12 semanas in loco os animais foram submetidos à eutanásia e as amostras processadas para análise histológica, microscopia eletrônica de transmissão (MET) e RT-PCR. Nas dosagens até 10 µg/ml não houve a formação de MCs. As concentrações 20 e 50 µg/ml formaram MCs, no entanto não houve diferença histológica. O sucesso da formação de MCs foi de 80 % na técnica UpCell dish enquanto que no grupo induzido por VC foi de 100 %. Por MET foi observada formação de junções tight entre as células e a manutenção da matriz extracelular endógena nos grupos tratados com VC. Além disso, no grupo tratado com 20 µg/ml de VC houve melhor taxa de proliferação, atividade de telomerase e maiores níveis de RNAm de proteínas de matriz extracelular (colágeno tipo I, β1 integrina e fibronectina), de marcadores de indiferenciação (Oct4, Sox2 e Nanog) e de marcadores osteogênicos (RUNX2, ALP e OCN). No modelo animal a porcentagem de cemento / ligamento / osso alveolar-símile foi significantemente maior no grupo VC que no grupo *UpCell dish*. Complementando este estudo, a dosagem 20 µg/ml de vitamina C também foi capaz de induzir a formação de MCs de células-tronco mesenquimais de outras fontes (medula óssea e cordão umbilical humano) sugerindo seu potencial em estudos de regeneração tecidual.

O único trabalho encontrado na literatura que analisou o comportamento de MCs de DPSCs no periodonto de dentes suínos foi Cao et al. (2015). Neste estudo, as DPSCs foram transfectadas com o gene HGF (do inglês, hepatocyte growth fator) que é um fator de crescimento angiogênico frequentemente utilizado para a regeneração periodontal. Sabe-se que este fator é um potente mitógeno, com atividade antiapoptótica e morfogênica podendo aprimorar o processo de regeneração de diversos órgãos (Matsumoto; Nakamura, 1997). O comportamento de MCs foi comparado com a injeção das mesmas células (cultivadas pelo método tradicional, ou seja, sem indução de MCs), transfectadas ou não pelo fator, em lesões periodontais induzidas. Para a produção das MCs foram cultivadas 1 x 105 HGF-DPSCs ou DPSCs em placas de petri de 60 mm contendo meio de cultivo aMEM suplementado com 20 µg/ml de VC por 10 a 15 dias. Após 12 semanas os animais foram submetidos à eutanásia. Histologicamente foi observado que, tanto nos grupos de células injetadas quanto de MCs (transfectados ou não), houve produção de novo osso alveolar. No grupo controle onde não foi realizado nenhum tratamento os defeitos foram preenchidos de forma irregular com tecido fibroso e epitélio. A análise por tomografia computadorizada (TC) mostrou que maior volume de osso produzido nos grupos de MCs (transfectados ou não) que nos grupos de células injetadas. Quanto à produção de tecidos moles, os grupos MCs foram capazes de repor tecidos próximo da normalidade, sendo em maior grau que nos grupos onde as células foram injetadas. Não houve diferença entre as MCs com células-transfectadas ou não na produção de tecidos moles. Os autores sugerem o uso de MCs (HGF-DPSCs ou DPSCs) para técnicas de regeneração periodontal.

2.5 Laserfototerapia (LFT)

A Laserfototerapia (LFT), ou LLLT (do inglês, *Low Level Laser Therapy*), é a aplicação de luz laser em baixa intensidade (comprimentos de onda entre 600 - 1100 nm, ou seja, vermelho ao infravermelho próximo), variando na potência e densidade de energia (geralmente entre 1 mW a 500 mW e 1 a 20 J/cm², respectivamente) de acordo com o tipo de tecido / célula e objetivos do tratamento (Karu; Afanas'eva, 1995; Huang et al., 2011; Alghamdi et al., 2012). Sendo esses principalmente a modulação de processos inflamatório e cicatricial, alívio de dor e, mais recentemente, a promoção de regeneração tecidual. A luz absorvida é capaz de causar alterações químicas, assim como ocorre no processo de fotossíntese nas plantas (Huang et al., 2011), não possuindo efeito térmico perceptível (Huang et al., 2009).

O primeiro a descrever seus efeitos foi Endre Mester (1967), quando observou que os pêlos de camundongos irradiados cresceram mais rápido do que os de controles não irradiados. Já a pioneira em teorias para explicar os fenômenos da fotomodulação foi Tina Karu, em sua teoria da fotodissociação, onde sugere que fotoaceptores intracelulares estariam envolvidos na absorção da luz (Karu, 1989). Resumidamente, a luz ativaria fotoaceptores mitocondriais desligando componentes reguladores da cadeia respiratória e reestabelecendo o fluxo de elétrons com produção de ATP (do inglês, *adenosinetriphosphate*) (Huang et al., 2009, 2011; Alghamdi et al., 2012). Moléculas sinalizadoras produzidas nesse processo poderiam ainda desencadear eventos moleculares e celulares bioestimulatórios.

Assim, uma reação fotobiológica envolve a absorção de luz em um comprimento de onda específico por uma molécula fotorreceptora (fotoaceptora; cromóforo) nativa, que pode eventualmente assumir um estado eletronicamente excitado em decorrência da absorção de luz (Karu, 1999). Esse é o caso da citocromo c oxidase (cit c), uma enzima situada na membrana interna mitocondrial, descrita por diversos autores como sendo sensível à irradiação na região do vermelho ou do infravermelho próximo (Karu, 1989; Karu et al., 1995; Karu, 1999; Gao; Xing, 2009; Huang et al., 2011).

2.5.1 Mecanismos de ação da LFT

Os mecanismos de ação da LFT ainda não foram totalmente esclarecidos, no entanto existe um consenso entre autores de que os cromóforos celulares seriam os responsáveis pela captação da luz visível em células de mamíferos. Dentre os cromóforos sensíveis aos comprimentos de onda da luz vermelha (aproximadamente 660 nm), o mais estudado na literatura atual é a enzima Citocromo C Oxidase (cit-c) (Karu e Afanas'eva, 1995), componente da cadeia respiratória que se encontra na membrana interna mitocondrial (Figura 2.3). Assim, essa organela tem sido considerada como local provável do início do processo de fotobiomodulação, onde desencadeia uma cascata de eventos biológicos (Hamblin; Demidova, 2006; Hamblin, 2008).



Estrutura da cadeia de transporte de elétrons na membrana interna mitocondrial.

Figura 2.3 – Ilustração de uma mitocôndria detalhando a membrana mitocondrial interna, local da absorção dos fótons de laser no comprimento de luz vermelha (A). Na maior ampliação (B), vemos a representação ilustrativa da estrutura da cadeia transportadora de elétrons na membrana mitocondrial interna em uma célula com metabolismo normal. Nessa condição, a citocromo c (cit c) - enzima terminal (complexo IV) da cadeia respiratória – é responsável por mediar a transferência de elétrons ao oxigênio molecular, gerando como produto uma molécula de água (H₂O) e bombeando 2 H⁺ para o espaço intermembranoso. Isso gera uma concentração de prótons nessa região, levando a um gradiente osmótico que induz a passagem desses prótons pela molécula ATP sintase. Esse processo é conhecido como "força próton-motora", e é capaz de promover uma alteração conformacional na molécula de ATP sintase, que sofre rotação, produzindo energia suficiente para converter o ADP em ATP

A redução das atividades metabólicas celulares em situações adversas é um mecanismo protetor de sobrevivência celular, e em consequência, há diminuição dos ciclos respiratórios (Tata; Waynant, 2011). Isso se dá pela ligação de NO (óxido nítrico), ao invés de oxigênio, em sítios dentro do complexo IV reduzindo-se assim a taxa de conversão de ADP (do inglês, adenosine diphosphate) em ATP pela ATP sintase (fosforilação oxidativa). O óxido nítrico, por sua vez, é uma molécula reguladora do fluxo de elétrons na cadeia mitocondrial. Variações no fluxo de elétrons na cadeia respiratória, portanto, ditarão a produção de maior ou menor quantidade de ATP. Por outro lado, o desligamento de NO dos sítios do complexo IV implica em reestabelecimento do ciclo de elétrons normal na cadeia respiratória. Existem evidências de que fótons de luz possam desfazer a ligação do NO nos sítios do cit c (Huang et al., 2011). Dessa forma, a LFT tem a habilidade de reverter a inibição da respiração celular induzida pelo NO e, como já mencionado, aumentar a atividade de bombeamento de prótons de hidrogênio pela cit c. O aumento de ciclos respiratórios com a remoção do NO gera energia, mas também maior disponibilidade de elétrons para captura pelo oxigênio molecular, levando à produção de ROS. Isso explicaria porque os efeitos da laserfototerapia são vistos principalmente em células/tecidos que se encontram em algum deseguilíbrio, ou seja, mais propensos aos processos de Redução / Oxidação (REDOX) - como privações nutricionais, inflamações, cultivos in vitro, estresse oxidativo, entre outros - enquanto essa parece não influenciar significativamente o metabolismo de células e tecidos que se encontram em normalidade (Hamblin, 2008).

Em síntese, o processo subsequente à absorção do fóton de luz pelo cit-c, que reestabelece a respiração mitocondrial, induz ao aumento da produção de ATP e consequentemente do metabolismo celular. Em concomitância, alterações na cadeia iônica promovem a modulação de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) capazes de sinalizar fatores de transcrição gênica que levariam às respostas secundárias (efeitos tardios) nas células e tecidos circundantes. Entre as espécies reativas de oxigênio mais relatadas após LFT estão o superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH⁻), oxigênio singleto (1O_2) e óxido nítrico (NO), sempre em baixas concentrações (Chaudhari et al., 2012). Assim temos que, se por um lado grandes quantidades de ROS podem ser danosas aos tecidos, levando à senescência celular, apoptose e carcinogênese (Balaban et al., 2005), por outro encontramos que baixos níveis de ROS – como os

decorrentes das LFT – podem atuar como sinalizadores celulares, tendo papel inclusive na manutenção da indiferenciação e na diferenciação de células-tronco, bem como na auto-renovação de HSCs (do inglês, *Hematopoietic Stem Cells*) (Chaudheri et al., 2002).

Dentre os principais efeitos tardios descritos para o fenômeno de fotobiomodulação estão o aumento da proliferação e migração celular e a modulação dos níveis de citocinas, fatores de crescimento e mediadores inflamatórios, além do aumento da oxigenação dos tecidos (Kato et al., 1981; Karu 1989; Karu, 1995; Karu e Afanas'eva, 1995; Karu, 1999; Karu; Kolyakok 2005; Karu et al., 2005; Hamblin e Demidova, 2006; Hamblin, 2008; Karu, 2008; Chen et al., 2009; Huang et al., 2011). Assim, respostas secundárias seriam as responsáveis pela ação da LFT, não apenas imediatamente, mas também cerca de 24 a 72 horas após a irradiação (Hamblin; Demidova, 2006).

2.5.2 Laserfototerapia em células e tecidos

Assim como os fatores de crescimento, a Laserfototerapia (LFT) também tem mostrado ser capaz de induzir a proliferação e migração celular, além de influenciar na potencialidade e auto-renovação de CTs (Eduardo et al., 2008; Damante et al., 2009; Ferreira, 2011; Ferreira et al., 2012a; Ferreira et al., 2012b; Giannelli et al., 2013; Diniz, 2015). Nosso grupo de pesquisa vem há anos estudando os efeitos da laserfototerapia sobre células e tecidos (Pereira et al., 2002; Fujihara et al., 2006; Eduardo et al., 2008; Damante et al., 2009; Sousa et al., 2009; Moreira et al., 2011, 2013; Diniz, 2015; Diniz et al., 2015). Estes estudos mostraram a capacidade da LFT em influenciar o metabolismo e fisiologia celular de acordo com o microambiente em que se encontram e com os parâmetros de irradiação empregados. Neste sentido, os estudos mais recentes apontaram para a possibilidade desta terapia poder ser aplicada na engenharia tecidual com o objetivo de melhorar as respostas de células-tronco favorecendo a regeneração de tecidos.

Em consequência da LFT são observados aumento na síntese de DNA e RNA, por exemplo, com produção de proteínas constituintes da matriz extracelular (fibronectina e colágeno), aumento na proliferação e migração celular, propriedades imunomodulatórias melhoradas, angiogênese, efeitos neurotróficos, entre outros (Tadakuma et al., 1993; Souil et al., 2001; Garavello et al., 2004; Eduardo et al., 2008; Damante et al., 2009; Sousa et al., 2009; Moreira et al., 2011). Ou seja, respostas biológicas bastante semelhantes às induzidas pela vitamina C, citadas anteriormente.

2.5.3 LFT influencia a potencialidade de células-tronco

A LFT pode manter a indiferenciação ou induzir a diferenciação de célulastronco a depender do microambiente e dosimetria (Ferreira et al., 2012a; Ferreira et al., 2012b; Giannelli et al., 2013; Arany et al., 2014; Diniz, 2015). Sendo a combinação de fatores de crescimento e parâmetros ideais de irradiação os principais fatores estudados na atualidade, que guiarão para o objetivo esperado (Ferreira et al., 2012b; Arany et al., 2014; Diniz, 2015).

A falar especificamente da LFT, além da forma de aplicação (ex: contínua / pulsada; em contato / sem contato; frequência do tratamento), alterações na resposta à irradiação também podem ser conseguidas através da modificação do comprimento de onda (vermelho / infravermelho), densidade de energia (DE) e densidade de potência (DP) às quais as células serão expostas. Nosso grupo de pesquisa encontrou que as densidades de energia de 3 J/cm² e 5 J/cm², aplicadas em hDPSCs em condições de déficit nutricional, foram capazes de promover proliferação significativa destas células, sendo 5 J/cm² também capaz de induzir diferenciação, quando associada a fatores de crescimento, sejam endógenos ou exógenos (Eduardo et al., 2008; Ferreira, 2011; Ferreira, 2012a; Ferreira, 2012b; Diniz, 2015). Ferreira et al., (2012b) e Arany et al., (2014) demonstraram que a LFT seria capaz de induzir, nas CTs da polpa, o aumento da expressão de marcadores de diferenciação para tecidos mineralizados, quando associadas a fatores de crescimento BMP2 (incorporado) e TGF- β (endógeno), in vitro e in vivo, respectivamente. Em contrapartida, na ausência de fatores de crescimento, a LFT com 5 J/cm² passou a expressar marcadores celulares de indiferenciação, Nestin e CD90 (Ferreira et al., 2012a), sugerindo que a presença de fatores de crescimento poderia ser um direcionador da ação da LFT, induzindo diferenciação ou, na ausência, mantendo a multipotência de CTs mesenquimais. Assim, em Gianelli et al. (2013), a LFT mostrou ser capaz de estimular a proliferação de MSCs (*Mesenchymal Stem Cells*) via Notch-1 - um fator importante na regulação da auto-renovação, ou seja, na capacidade de gerar célula-filha multipotente como a célula-mãe - onde observaram altos níveis desse e de seu receptor no citoplasma e núcleo 72 horas após a irradiação das células.

Muitos são também os estudos relacionados à diferenciação de células-tronco induzidas por LFT (Abramovitch-Gottlib et al., 2005; Matsui., 2007; Mvula et al., 2008; Hou et al., 2008; Matsui et al., 2008; Wu et al., 2013; Arany et al., 2014; Diniz, 2015). Entre essas pesquisas, Arany et al. (2014) destaca-se em importância já que comprovou a aplicação clínica do laser induzindo regeneração dentária in vivo. Reportaram também os efeitos da LFT e seu mecanismo de ação na ativação de TGF-β latente para promoção de diferenciação de DPSCs e formação de dentina terciária in vivo. Para tal utilizaram um modelo acelular com soluções de soro para testar o microambiente pós-cicatrização hemostática de feridas, o qual poderia estar presente durante o tratamento com a LFT, e que conteria guantidades abundantes de TGF-β latente derivado de soro ou plaquetas. Observaram que a terapia induz alterações conformacionais em constituintes complexos do soro, e que um desses constituintes seria o TGF-\u00b31. Em seguida, utilizando células normais ou mutadas no resíduo metionina (posição 253) da molécula do TGF-B1, o qual é conhecidamente sensível à sensibilização por espécies reativas de oxigênio (ROS), os autores confirmaram que a presença de superóxido, peróxido de hidrogênio ou radicais hidroxila é necessária para que haja ativação do TGF-β por meio da LFT. A LFT ainda promoveu a diminuição na expressão de marcadores de células-tronco, como STRO-1, CD90, CD117 e CD44, sugerindo que a transição celular induzida pelo laser, nessa situação de microambiente com presença de fator de crescimento, seria voltada para diferenciação, ou seja, longe do estado multipotente inicial. Ao mesmo tempo, encontraram maior expressão de marcadores odontoblásticos, como DMP1, DSP e OPN do que os controles não-irradiados. In vivo, utilizando modelo de camundongo knockout condicional para TGF- β , a LFT induziu quantidades de dentina terciária similares ao grupo controle. Células da polpa dental não-irradiadas derivadas desse modelo foram capazes de produzir tecido mineralizado quando induzidas por BMP4, mas não foram responsivas à estimulação por TGF-β1. Dessa forma, os autores constataram o papel do eixo ROS-TGF-β1 em mediar os efeitos regenerativos da LFT na indução de dentina terciária.

Diante do exposto, ainda há muito que se estudar para o entendimento dos efeitos biológicos da LFT e, em especial, na regeneração tecidual.

3 PROPOSIÇÃO

Objetivo geral:

O objetivo do trabalho foi o de avaliar o efeito da LFT associada ou não à Vitamina C na formação de MCs (Cell Sheets) de hDPSCs.

Objetivos específicos:

- Analisar a capacidade da LFT associada ou não à VC na formação de MCs;
- Analisar as características macroscópicas e microscópicas das MCs formadas;
- Analisar as características fenotípicas, bem como a atividade da Enzima Telomerase das hDPSCs nas MCs.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cultivo celular

Células da polpa dentária de terceiros molares extraídos por razões ortodônticas, de pacientes com idades entre 15-27 anos (n=5), foram previamente isoladas e caracterizadas como células-tronco de polpa dentária humana (hDPSCs do inglês dental pulp stem cells) por Diniz (2015). Alíquotas congeladas destas células (P1; \cong 10⁶ células por criotubo) que se encontravam estocadas no biorrepositóriodo Laboratóriode Pesquisa Básica Prof. Edmir Matson do Departamento de Dentística da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP) foram utilizadas. O presente estudo recebeu a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da FOUSP (CAAE: 40392114.3.0000.0075).

As hDPSCs foram descongeladas em banho de água à 37 °C e cultivadas em meio de cultura α -MEM (GIBCO / *Life Technologies*, Grand Island, NY, EUA) suplementado com 15 % de soro fetal bovino (MSC-SFB, GIBCO) e soluções para concentração final de 100 U/ml de penicilina + estreptomicina (Pen Strep, GIBCO), 2 mM de L-glutamina (GIBCO) e 0.1 mM de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, EUA). Esse meio foi denominado de meio clonogênico. As células foram então incubadas à 37 °C numa atmosfera úmida contendo 95 % de ar e 5 % de dióxido de carbono (CO₂).

A monitorização do crescimento celular foi realizada diariamente em microscópio invertido de fase e o meio de cultivo trocado a cada 2 ou 3 dias, de acordo com o metabolismo celular. Os subcultivos foram feitos quando as células atingiam a subconfluência (aproximadamente 70-80 % do fundo da placa ocupado por células). O meio do frasco de cultivo foi aspirado e as células lavadas duas vezes com solução tampão fosfato-salina sem cálcio e sem magnésio (PBSA, do inglês *calcium and magnesium-free phosphate buffered saline*), pH 7,2. A seguir, as células fora destacadas com 2 ml de uma solução de tripsina à 0,25 % (LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil) em estufa à 37 °C por 3-5 min, e então a tripsina foi inativada por meio de cultura contendo soro fetal bovino. As células em suspensão foram

transferidas para um tubo de ensaio e centrifugadas (300 X g) durante 5 minutos, à temperatura ambiente.

O precipitado de células resultante da centrifugação foi ressuspendido em 1 ml de meio fresco. Essa suspensão de células foi então replaqueada em novos frascos de cultivo, criando novas passagens da cultura. Com o intuito de manter a menor passagem possível, foram realizados estoques congelados de alíquotas de células na segunda passagem (P2). As células utilizadas nos experimentos foram expandidas até, no máximo, P3, exceto por uma alíquota de células que continuou sendo subcultivada até a passagem 27 (P27) para serem plaqueadas posteriormente como grupo controle senescente. Todos os procedimentos de cultivo celular foram realizados em capela de fluxo laminar, seguindo os protocolos de manutenção de esterilidade dos materiais e soluções utilizadas (normas de segurança NBR/IEC 601.2.22 e IEC 60825-1/2001-8).

4.1.1 Recaracterização das células

Para verificar se as células mantiveram as características de células-tronco mesenquimais após o descongelamento, as mesmas foram recaracterizadas por citometria de fluxo, pela dobra populacional e pela capacidade de gerar colônias.

4.1.1.1 Caracterização imunofenotípica por citometria do fluxo

Para identificar e caracterizar imunofenotipicamente a progenia das populações celulares de polpa dentária foi utilizado o seguinte painel de anticorpos primários, conjugados com fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) ou aloficocianina (APC), contra moléculas de superfície humanas, a saber: CD14-PE, CD44-APC, CD45-APC (BD Biosciences, CA, EUA), CD146-APC (Biolegend, CA, EUA), STRO-1-FITC (BD Biosciences) e, ainda, os anticorpos não acoplados de fábrica CD105, Oct ³/₄ e Nanog, bem como seus controles isotípicos IgG1k-FITC e IgG2k-FITC (todos BD Biosciences).

As culturas foram subcultivadas até a obtenção de no mínimo 1 x 10⁶ células por marcador de superfície. Todo protocolo de citometria foi realizado à 4 °C e as centrifugações realizadas a 550 x g por 5 minutos. As placas de cultivos foram acondicionadas em recipiente gelado e então as células foram lavadas duas vezes em PBSA e colhidas com solução de enzima marinha com atividade colagenolítica e proteolítica (*StemPro Accutase*; GIBCO) por 10 minutos, sob agitação, para minimizar a internalização de antígenos de superfície. As células foram então centrifugadas e fixadas em 10 ml de solução de paraformaldeído (PFA) à 4 % e uma alíquota de 10 µl foi coletada para contagem do número de células em câmara de Neubauer. Esse conteúdo foi armazenado à 4 °C até o dia da leitura das amostras no citômetro de fluxo, não ultrapassando o período de 7 dias.

No dia da análise as células foram lavadas duas vezes em PBSA à 4 °C. O sobrenadante foi descartado e solução de albumina de soro bovino (BSA; do inglês, *bovine serum albumine*) à 5 % foi adicionada às células por 1 hora para bloqueio de sítios inespecíficos. As células foram ressuspendidas em PBSA (3% BSA) e marcadas com anticorpos primários (200:1) com tempo de incubação de 1 hora. Além desse passo, os anticorpos que não vinham de fábrica conjugados ao fluorocromo (CD105, Oct ¾ e Nanog) foram incubados por mais 1 hora com fluoróforos próprios ao fim (controles isotípicos IgG1k-FITC e IgG2k-FITC). A suspensão de células foi então lavada três vezes em PBSA. A seguir, a suspensão de células marcadas foi filtrada (70 µm) e colocada em tubos para ser contada e classificada em leitura no citômetro de fluxo *FACSCalibur (Becton Dickinson,* CA, EUA) no Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP. Foram adquiridos 50.000 eventos dentro do *gate*. Os dados foram analisados pelo programa 9.6.2 FlowJo Software Version (*Tree Star*, OR, EUA).

4.1.1.2 Contagem de Unidades Formadoras de Colônias – Fibroblásticas (CFU-F do inglês coloning formation units-fibroblastic)

Para a contagem do número de CFU-F, hDPSCs em P2 foram plaqueadas à densidade de 200 células/poço de 35 mm, em quadruplicata, e cultivadas em meio clonogênico por 9 dias. A quantidade de CFU-F por poço foi assessada ao final deste

período. As placas foram fixadas em solução de PFA à 4 % e coradas com solução de azul de toluidina à 0,1 % (Sigma-Aldrich) em 1 % de PFA em PBS e, a seguir, fotografadas. O número de CFU-F nas fotografias foi determinado utilizando o programa Image-J (NIH, National Institutes of Health, MD, EUA). Contagem maior que 50 células por colônia foi considerada como positiva (1 unidade). Para servir também como indicador da viabilidade celular, foi aplicadado o cálculo da Eficiênica de Plaqueamento (EP) pela seguinte fómula:

Eficiência de Plaqueamento (%) = $\frac{N \hat{u} \text{meros de colônias}}{N \hat{u} \text{mero de células plaqueadas}} \times 100$

4.1.1.3 Tempo de Dobra da População (DP)

O tempo de dobra da população das hDPSCs foi determinado através da análise da curva de crescimento, obtida por contagem eletrônica do número de células. hDPSCs foram plaqueadas em poços de 35 mm (5 x 10⁴ células por poço) e cultivadas em meio clonogênico por 9 dias. Foram plaqueados dois poços por tempo experimental. Os tempos avaliados foram 24, 48, 72, 96, 168 e 216 horas. As hDPSCs de cada poço foram coletadas por tripsinização e imediatamente fixadas com solução de PFA a 4 % e armazenadas a 4 °C em tubos de ensaio para posterior contagem eletrônica no Citômetro de fluxo *BD Accuri C6 FlowCytometer* (BD Biosciences). Os dados de contagem celular foram utilizados para obter a curva de crescimento e para o cálculo do tempo de dobra populacional aplicando-se a seguinte fórmula: logarítmo natural (Ln) de (número de células em 216 horas menos o número de células em 24 horas) dividido pelo Ln de 2.

Dobra Populacional = $\frac{\text{Ln} (n^{\circ} \text{ de células final} - n^{\circ} \text{ de células inicial})}{\text{Ln}(2)}$

4.2 MCs (Cell Sheets) de hDPSC

Para a obtenção de MCs as hDPSCs de uma mesma passagem (P3) foram plaqueadas em placas de 6 poços de 35 mm cada ($5x10^4$ células por poço). As células foram cultivadas em meio clonogênico e incubadasem estufa a 37 °C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂.

4.2.1 Grupos Experimentais

Vinte e quatro horas após o plaqueamento das células nos poços, as culturas foram submetidas aos tratamentos de acordo com os grupos experimentais (Tabela 4.1).

Grupos					
Experimentais	Tratamentos				
Controle negativo (P3)	Células em P3 cultivadas em meio clonogênico, sem tratamento adicional				
Controle positivo de	Células em P27 (senescentes) cultivadas em meio clonogênico,				
Senescência (P27)	sem tratamento adicional				
VC	Células em P3 cultivadas em meio clonogênico suplementado				
(controle positivo)	com 20 µg/ml de ácido ascórbico (vitamina C; VC)				
Laser	Células em P3 cultivadas em meio clonogênico e submetidas à				
	laserfototerapia (LFT)				
Laser+VC	Células em P3 cultivadas em meio clonogênico suplementado				
	com 20 µg/ml de VC e submetidas à LFT				

Tabela 4.1 – Grupos experimentais

Para a LFT foi utilizado um equipamento laser de diodo de fosfeto de índio-gálioalumínio (InGaAIP) (PhotonLase III DMC - Equipamentos, São Carlos, SP, Brasil), em baixa intensidade e modo de operação contínuo, pontual e em contato, aplicando-se os seguintes parâmetros dosimétricos: Comprimento de onda = 660 nm (luz vermelha), Potência = 20 mW, Área do feixe = 0,028 cm², Densidade de Potência = 0,71 W/cm², Tempo = 7 segundos, Densidade de Energia = 5 J/cm² e Energia = 0,14 J por ponto. As irradiações ocorreram em dias alternados durante todo o período do experimento, de forma pontual (5 pontos / poço) e em contato na base da placa. A potência do equipamento foi aferida antes e após todas as sessões de irradiação, com auxílio de medidor de potência (*Laser Check, MM OpticsLtda,* São Carlos, SP, Brasil). O valor da emissão foi programado para o parâmetro do estudo através desse medidor, e não pelo valor no painel de controle do equipamento (Figura 4.1).



Figura 4.1 – (A) Ilustração das irradiações realizadas nas placas de 6 poços, onde, para evitar sobre-irradiação dos grupos experimentais, os poços intercalados eram mantidos vazios. Foram irradiados 5 pontos equidistantes, em contato como o fundo da placa (lado externo). (B) Fotografia ilustrando a aferição da potência de saída do equipamento realizada a cada sessão de LFT, observa-se a marcação de 20 mW de potência, no comprimento de onda 660 nm, mesmo quando é interposta uma placa igual à utilizada para os experimentos

4.2.3 Análise das Membranas celulares (Cell Sheets)

As culturas foram mantidas nos poços, sem subcultivos, até que as MCs se soltassem da placa espontaneamente, o que ocorreu entre 10 e 13 dias, a depender do grupo. As trocas dos meios de cultivo foram realizadas a cada 2 dias (protocolo adaptado do proposto por Wei et al., 2012). Todo o meio de cultura dos poços era trocado por meio fresco de acordo com o grupo experimental, ou seja, meio clonogênico para os grupos controles e laser e meio clonogênico acrescido de 20 µg/ml de ácido ascórbico (vitamina C) para os grupos VC e Laser+VC.

MCs As dos diferentes grupos experimentais foram analisadas macroscopicamente por método visual (fotografias dos poços) e suas células por microscopia (microscopia de luz e de fase). A atividade da enzima telomerase foi identificada por TRAP (do inglês Telomeric Repeat Amplification Protocol), seguido de ELISA (do inglês Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Para a avaliação da manutenção da indiferenciação das células (Mitofilina e Oct 4), presença da fase catalítica da enzima telomerase (hTERT) e confirmação da senescência das células do grupo senescente (β-galactosidase), as hDPSCs das membranas de todos os grupos experimentais foram submetidas ao RT _ qPCR (do inglês ReverseTranscriptase- Quantitative Polimerase Chain Reaction). As amostras foram coletadas em tempos experimentais pré-determinados e de acordo com as recomendações de cada análise a ser realizada. A figura 4.2 apresenta o cronograma experimental das trocas de meios e coletas para as diferentes análises das MCs dos diferentes grupos experimentais.

Grupos		Dias experimentais											
	1	' 2⁰	3⁰	4º	5⁰	6º	7⁰	8º	<u>9</u> ⁰	10º	11º	12º	13º
Controle ^{*a}	Р		-		-		-		-		-		-
Senescente *a	Р		-		-		-		-		-		-
VC	P	VC	-	VC	-	VC	-	VC	-	VC	-	VC	-
Laser	P	LFT	-	LFT	-	LFT	-	LFT	-	LFT	-	LFT	-
Laser + VC	P	LFT+VC	-	LFT+VC	-	LFT+VC	-	LFT+VC	-	LFT+VC	-	LFT+VC	-
<u>Coletas</u>													
Amostras ^{*b}	-	-	24h	-	-	-	7 dias	-	-	-	-	-	13 dias
Cell Sheets ^{*c}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*c	*c	*c	*c
Troca de Meio	-	TM	-	TM	-	TM	-	TM	-	TM	-	TM	-

Figura 4.2 - Fluxograma dos experimentos e coletas de material para as diferentes análises. VC = acréscimo de solução de Vitamina C de modo a obter concentração final de 20 μg/ml em cada poço; LFT = laserfototerapia; TM = troca de meio.

*^a: grupos controle (P3 e senescente) não receberam tratamentos adicionais, apenas troca do meio clonogênico nos mesmos tempos em que os demais grupos.

*^b: coleta das amostras para os experimentos de Atividade de Telomerase (24 horas após primeira indução, 7 e 13 dias) e RT-qPCR (24 horas após primeira indução e 7 dias).

*^c: coleta das MCs (*Cell Sheets*) para processamento histológico. Os tempos variaram entre 10 e 13 dias, conforme ocorria o descolamento espontâneo em cada grupo

4.2.3.1 Macroscopia das MCs

Entre o 10º e 13º dia após o plaqueamento, quando as MCs se destacavam dos poços de cultivo, ou ao menos suas bordas se destacavam, estas foram manipuladas e removidas das placas para serem submetidas às análises posteriores. Neste momento, a análise macroscópica se baseou na manutenção de integridade das mesmas de forma qualitativa. Para esta análise macroscópica foi utilizada a técnica de coloração "Panótico rápido" onde as MCs foram fixadas e coradas com hematoxilina e eosina (HE) diretamente dentro da placa de cultivo. A fixação foi realizada com solução de triarilmetano à 0,1% por 5 segundos, seguida de coloração com eosina e depois hematoxilina em processamentos de 5 segundos para cada solução, posteriormente os poços foram lavados com água Mili-Q (pH 7) e imediatamente levados para análise e tomada fotográfica.

Para análise microscópica, as MCs foram processadas para visualização em microscopia de luz utilizando processo histológico de rotina. Brevemente, as hDPSCs foram lavadas com PBS e fixadas em solução de PFA a 4 % (por 24 horas, em temperatura ambiente) e então removidas da placa. Em alguns grupos, onde as MCs se soltaram espontaneamente, foram utilizadas pinças para a sua remoção da placa, em outros grupos, onde as membranas não se formaram adequadamente e as células ainda se mantinham parcialmente aderidas às placas, houve a necessidade de se utilizar *scrapers* para auxiliar na sua remoção do poço.

O material fixado dos diferentes grupos experimentais foi processado com método de rotina para inclusão em parafina e, a seguir, foram obtidos cortes histológicos de 5 µm que foram corados com HE.

4.2.3.3 Análise da Atividade de Telomerase

A atividade da telomerase das hDPSCs das MCs dos diferentes grupos experimentais foi identificada utilizando o Kit Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA (Roche Ltd., Mannheim, Alemanha) de acordo com o protocolo do fabricante, com pequenas modificações. Foram coletadas quadruplicatas biológicas das MCs, nos tempos de 24 horas, 7 e 13 dias após a instituição de cada tratamento de acordo com os grupos experimentais.

A coleta das amostras para este ensaio foi realizada como se segue: as células das membranas foram tripsinizadas e centrifugadas em microcentrífuga à 3000 x g por 10 minutos à 4 °C, o precipitado de células foi ressuspenso em PBS e a centrifugação foi repetida para lavagem. O sobrenadante foi descartado e o precipitado criopreservado à - 80 °C até que todas as amostras de todos os grupos nos diferentes tempos fossem coletadas. Para a extração do RNA, após a obtenção de todas as amostras, essas foram descongeladas em gelo, ressuspensas em 200 µl do reagente de lise do Kit e incubadas em gelo por 30 minutos, na sequência foram centrifugadas à 16000 x g por 20 minutos à 4 °C e 175 µl do sobrenadante foi

transferido para um novo tubo de microcentrífuga. Esse conteúdo foi congelado rapidamente em nitrogênio líquido e mantido em freezer à - 80 °C.

As amostras foram padronizadas por Quantificação de Proteínas Totais, utilizando o *Kit Pierce BCA Protein Assay* (*Thermo Fisher Scientific, Rockford,* IL, EUA), com leitura por absorbância em espectrofotômetro (*Synergy H1 - Biotek, Winooski, EUA*) utilizando filtro de comprimento de onda de 562 nm. A concentração foi então calculada individualmente para cada amostra, de forma a ter uma concentração final de 15 µg/µl em um volume de 25 µl, sendo que, para alcançar esse volume, acrescentava-se água tratada com 0,1% de dietilpirocarbonato (DEPC) (*Invitrogen, Carlsbad,* CA, EUA).

Para a Reação de PCR, que amplificou as terminações teloméricas através do protocolo de TRAP (do inglês *Telomeric Repeat Amplification Protocol*) (Kim et al., 1994), 2 µl das amostras padronizadas (30 µg) foram acrescidas a 25 µl do Reagente de Mistura fornecido pelo kit e água Ultra Pure (Gibco) até o volume final de 50 µl. Também foram preparados um Controle Negativo e um Positivo para atividade dessa enzima, através da reconstituição de células liofilizadas providas pelo kit. O Termociclador (*Techne Progene Thermal Cycler*, Cambridge, Inglaterra) foi ajustado para os seguintes parâmetros: 25 °C durante 60 minutos; 94 °C por 5 minutos; 40 ciclos de: 94 °C por 30 segundos; 50 °C por 30 segundos; 72 °C por 30 segundos; extensão à 72 °C por 5 minutos, seguido de armazenamento imediato à 4 °C do cDNA resultante, temperatura em que foi mantido até o passo da análise por ELISA.

Para a detecção da enzima telomerase ativa e visualização por colorimetria, foi realizado o ensaio de ELISA também provido pelo kit (Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA). Cinco microlitros de cada produto de PCR (TRAP) foram desnaturados com solução contendo hidróxido de sódio (≤ 0,5 %) e hibridizados com marcador digoxigenina (DIG), um detector específico de banda de repetição telomérica. Cem microlitros de cada produto de hibridização foram imobilizados através de um *primer* marcador de biotina em uma microplaca revestida de estreptavidina. Finalmente, o produto de PCR que se aderiu à placa foi detectado com um anticorpo anti-DIG conjugado à peroxidase (anti-DIG-POD), o qual reagiu como substrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina), adicionado à reação, para formar um produto de reação colorido. A absorbância relativa foi medida utilizando espectrofotômetro (Synergy H1) com filtro no comprimento de onda de 450 nm (comprimento de onda de referência 690 nm).

Para análise dos resultados através dos valores de absorbância as recomendações do fabricante foram seguidas. Primeiramente o valor da leitura de Absorbância ($A_{450 \text{ nm}}$) foi subtraído do "*blank*", ou seja, da leitura de Absorbância no comprimento de onda de referência ($A_{690 \text{ nm}}$). Posteriormente calculou-se a média de absorbância das amostras de Controle Negativo e esse valor foi descontado de todas as amostras. As amostras foram consideradas como "Positivas para a Atividade de Telomerase" quando a diferença entre as absorbâncias ($\Delta A = A_{450 \text{ nm}} - A_{690 \text{ nm}}$) era $\geq 0,2$.

4.2.3.4 Transcrição Reversa seguida de PCR quantitativa em Tempo Real (RTqPCR) das células nos diferentes grupos experimentais

Para estas análises as hDPSCs foram plaqueadas em poços de 35 mm de diâmetro em placas de 6 poços (5 x 10⁴ células por poço) em duplicata por grupos experimental. Após 24 horas do plaqueamento, os poços foram submetidos aos tratamentos de acordo com os grupos experimentais. Células dos 5 grupos experimentais foram coletadas nos tempos 0 horas (plaqueamento), 24 horas após iniciar os tratamentos (VC, Laser ou Laser+VC) e 7 dias a decorrer após o início dos tratamentos.

O RNA total foi extraído das amostras de cada grupo experimental coletadas em 0 hora, 24 horas e 7 dias (Figura 4.3), utilizando-se o kit de extração RNeasy Mini Kit (Qiagen, CA, EUA), segundo recomendações do fabricante. Em resumo, as células foram lavadas 2 vezes com PBS gelado e, em seguida, 350 µl de solução tampão de lise (RLT) foi adicionada em cada poço e coletada em tubos de microcentrífuga, submersas em nitrogênio líquido e imediatamente armazenadas em freezer à - 80 °C.

Posteriormente, as amostras foram descongeladas em gelo e a reação interrompida com 350 µl de etanol à 70 %. Seguiu-se a purificação do RNA através de inserção em colunas de sílica (RNeasy *silica-membrane spin columns*, Qiagen) seguida de lavagens sucessivas com os tampões RW1 e RPE por meio de centrifugações de 10 segundos à 8000 x g em temperatura ambiente. A concentração do RNA total foi mensurada em espectrofotômetro (Synergy H1) utilizando filtros nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm.

Com a finalidade de eliminar traços de DNA genômico que pudessem ter contaminado as amostras, alíquotas de 300 ng de RNA total em volume de 8 µl diluídas em H₂O com 0,1% de dietilpirocarbonato (DEPC) foram tratadas com o kit DNAse I (Invitrogen), segundo recomendações do fabricante (Tabela 4.2).

Tabela 4.2 - Reagentes para tratamento com DNAse I					
Reagente	Volume				
RNA + H ₂ O DEPC	8µl				
Tampão	1µl				
DNAse I	1µl				
Incubação à 37 C por 30 min.					
EDTA (stop)	1µl				
Incubação à 37°C por 30 min.					
Volume total	11 µl				

Para a confecção da fita de DNA complementar (cDNA) o produto da reação anterior - RNA tratado com DNAse - foi transcrito utilizando o kit SuperScript® III Reverse Transcriptase (Invitrogen), de acordo com as recomendações do fabricante. O mix da reação foi preparado em tubos de microcentrífuga, de acordo com a Tabela 4.3.

Reagente	Volume				
Random primer (100ng/µl)	1µl				
DNTP 10mM	1µl				
RNA (amostra)	11µl				
Incubação a*					
Tampão 5x	4µl				
DTT (0,1M)	1µl				
RNAse OUT	1µl				
Superscript III RT	1µl				
Volume Final	20 µl				
Incubaçã	o b*				

Tabela 4.3 - Reagentes para a confecção da fita de cDNA

A reação foi incubada em banho seco (Digital Dry Bath Heat blocks -Benchmark Scientific, Nova Jersey, EUA), com os seguintes parâmetros: (a*) primeira incubação à 65 °C por 5 minutos, seguida de 1 minuto em gelo; (b*); segunda incubação à 25 °C por 5 minutos; 50 °C por 60 minutos e posteriormente 70°C por 15 minutos. As amostras de cDNA foram armazenadas à 4 °C.

Para análise dos níveis de expressão gênica nos grupos experimentais avaliados foram realizadas reações de qPCR. O cDNA sintetizado foi o molde utilizado para a reação pelo método do SYBR Green Dye I. As reações foram realizadas em um volume final de 10 µL, contendo 1 µL de amostra/cDNA (diluição 1:8), 10 pmol de cada *primer* (400 nmol; *foward+reverse*), 5 µL de SYBR Green Master Mix® (AB AppliedBiosystems, Warrington, Reino Unido) e água *ultra pure* q.s.p. As reações foram realizadas no equipamento da mesma marca, AppliedBiosystems ABI 7500 Real Time PCR empregando condições padrão do equipamento para a termociclagem das reações. Os genes avaliados estão descritos na Tabela 4.4.

Alvo	Gene	Gene ID (pubmed)	Sequência dos <i>primers</i> (5´- 3´)
GAPDH* ^a	GAPDH	2507	F: GCATCCTGGGCTACACTGA
		2597	R: CCACCACCCTGTTGCTGTA
OCT-4* ^b		5460	F: GATCACCCTGGGATATACAC
	F003F1	5400	R: GCTTTGCATATCTCCTGAAG
Mitofilina* ^c	IMMT	10080	F: CAAAGCCAAAGAAGAGTTAGAG
		10909	R: CAGCTCATGATACTGAGATAC
Telomerase* ^d	TEDT	7015	F: AGAACGCAGGGATGTC
		7015	R: CAGCTTGAGCAGGAATG
β-galactosidase* ^e		2720	F: GACAGTACCAGTTTTCTGAG
	GLB1	2720	R: ATAGACTCTTTCTCTAGCAGC

Tabela 4.4 - Primers dos genes Alvos e características do ensaio dadas pelo fabricante (Sigma)

*^aGAPDH (do inglês glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase);

*^b OCT4 - POU5F1 (do inglês Octamer-binding Transcription fator 4 – POU domain - class 5 – transcription fator 1);

*^c Mitofilina - *IMMT* (do inglês *inner membrane protein, mitochondrial*);

*^d Telomerase - TERT (do inglês Telomerase reverse transcriptase);

*^eβ-galactosidase – *GLB1* (do inglês *Galactosidade beta* 1)

O processo de ciclagem térmica foi realizado por meio de desnaturação inicial, seguida de ciclos de amplificação. Após o término do último ciclo, as amostras foram submetidas à análise da curva de dissociação, conferindo-se a ausência de qualquer curva bimodal ou sinal anormal de amplificação. Para cada par de *primers* foi

realizada uma reação sem amostra de cDNA como controle negativo, para avaliação de uma possível contaminação. O protocolo de termociclagem foi: 2 minutos à 50 °C, 10 minutos à 95 °C, 40 ciclos de 15 segundos à 95 °C e 1 minuto à 60 °C. Além das curvas de amplificação, foi realizada a curva de dissociação (*melting curve*) para verificar a especificidade da amplificação, confirmando a ausência da formação de dímeros de *primer* ou qualquer outro produto inespecífico, garantindo a confiabilidade dos resultados.

Esses foram analisados com base no valor de Ct (ciclo limiar – ou *cicle threshold*), determinado com base no controle negativo (sem amostra). As médias dos valores de Ct de medidas em duplicata foram utilizadas para calcular a expressão do gene alvo, com normalização ao controle endógeno (GAPDH), e então comparadas com a amostra calibradora, para o cálculo da quantificação relativa pela fórmula 2–ΔΔ Ct.

Expressão Relativa = $\frac{Eficiência^{\Delta Ct \ alvo(\Delta Ct \ calibradora - \Delta Ct \ amostra)}}{Eficiência^{\Delta Ct \ normalizador \ (\Delta Ct \ calibradora - \Delta Ct \ amostra)}}$

Os valores da expressão relativa de cada gene foram submetidos à análise estatística de variância (ANOVA), complementada pelo Teste de Tukey (p< 0,05).

5 RESULTADOS

5.1 Recaracterização das células

As hDPSCs após seu descongelamento (P1) apresentaram morfologia heterogênia, com predominância de células ora fusiformes, ora estrelárias (Figura 5.1A). Quando subconfluentes, apareciam mais espraiadas (Figura 5.1B).



Figura 5.1 - Fotomicrografias de fase de culturas da linhagem hDPSC (P1). (A) - 30 horas após descongelamento; (B) - 96 horas em cultivo pós-descongelamento a cultura apresenta-se subconfluente e células em divisão ainda são observadas (setas); (C) - 30 horas após o primeiro subcultivo (P2), realizado em fase log, as células já apresentam um tempo de confluência menor (HE) (Aumento original 100X)

5.1.1 As hDPSCs foram capazes de formar colônias

A figura 5.2 mostra colônias de hDPSCs que foram visualizadas por coloração de azul de toluidina. Após 9 dias em cultura foi possível observar a formação de CFU-F em número médio de 46 por poço, representando uma eficiência de plaqueamento de 23%.



5.1.2 As hDPSCs apresentam dobra populacional aproximada de 20 horas

A curva de crescimento das hDPSCs está graficamente representada na Figura 5.3. As células cresceram até 96 horas quando atingiram o *plateau*.



Figura 5.3 - Representação gráfica da Curva de Crescimento

Baseado nos dados de contagem de células foi calculada a dobra populacional, como se segue:

Dobra Populacional = Ln (nº células finais - nº células iniciais) / Ln 2 Dobra Populacional = Ln (911360-130110) / Ln2 Dobra Populacional = Ln (781250) / Ln2 Dobra Populacional \cong 13,56 / 0,69 Dobra Populacional \cong 19,65 **Tempo de DP** \cong 20 horas 5.1.3 As hDPSCs expressaram níveis típicos de marcadores de superfície de célulastronco mesenquimais

A figura 5.4 apresenta os histogramas das hDPSCs (P2) obtidos por citometria de fluxo. As culturas expressaram os marcadores de células-tronco mesenquimais (CD44, CD105, CD146, STRO-1) e os de indiferenciação (Nanog, Oct ³/₄). Os marcadores de células hematopoiéticas (CD45) e endoteliais (CD14) apresentaram expressão ausente ou mínima.



Figura 5.4 - Ilustração gráfica da imunofenotipagem das hDPSCs após o descongelamento. Os números dentro dos gráficos indicam porcentagem (%) de células positivas ao anticorpo primário para o marcador de superfície em questão. Os picos de cor cinza claro representam os controles isotípicos de cada marcador. Os picos cinza-escuro representam a população celular marcada com o anticorpo

5.2 As hDPSC foram capazes de formar MCs (Cell Sheets)

5.2.1 Macroscopia

O método de cultivo adotado foi eficiente em formar membranas (*Cell Sheets*) de hDPSCs, no tempo proposto para o período experimental, somente nos grupos VC e Laser+VC. Essas MCs apresentaram as características esperadas, ou seja, foram capazes de se soltar completamente da placa de cultivo, sem que para tal fosse necessário qualquer estímulo adicional, ou seja, soltaram-se espontaneamente (Hasegawa et al., 2005; Yang et al., 2007; Wei et al., 2012). O tempo em que isso ocorreu variou entre 10 e 13 dias. Não ocorreu a formação de *Cell Sheet* nos demais grupos (Controle e Laser) no tempo experimental, já que não se destacaram espontaneamente, apesar de suas bordas terem começado a se soltar (Figura 5.5C). Assim, essas culturas tiveram de ser coletadas com a ajuda de *scraper*. O Grupo Senescente não formou cultivos capazes de serem removidos adequadamente nem sequer com *scrapers*.

Ao longo de todo o experimento, foram obtidas 20 MCs no Grupo VC (100%), que se soltaram entre o 10° e 12° dias (Figura 5.5A). O Grupo Laser+VC também formou 20 MCs (100 %), mas essas levaram de 11 a 13 dias para se soltar espontaneamente do fundo das placas de cultivo celular (Figura 5.5B). Estas MCs foram facilmente manipuladas com o uso de pinças. Podiam ser removidas do poço quando se enrolavam sobre si mesmas e ao serem repostas no meio de cultura eram capazes de se abrir novamente sem serem rompidas com esta manipulação. Foi observado que as MCs do grupo Laser+VC, não se dobravam tanto quanto as do grupo VC e ao retornar ao meio de cultura rapidamente se abriam, dando a ideia de serem mais robustas.

Oito cultivos (40 %) do grupo Laser puderam ser coletados com a ajuda de *scraper*, no entanto, rompiam-se facilmente durante a manipulação.



Figura 5.5 - Fotografias de uma membrana celulardo grupo VC (A) e Laser+ VC (B). No 10° dia (A) e 13° dia (B) após o plaqueamento, quando estavam completamente não aderidas à placa. Já em C temos a fotografia de uma placa do grupo Controle, onde observa-se que nenhuma cultura celular formou verdadeiras membranas capazes de se soltar por completo (B e C coradas pela técnica do Panótico rápido)



Figura 5.6 - Observe nas fotografias desta membrana do grupo VC, 10 dias após o plaqueamento, que esta é facilmente manipulada com o auxílio de pinça cirúrgica de ponta romba e cureta de Molt. A membrana celular pode ser manipulada (A-D) e transportada para fora da placa de cultivo (B) e ainda assim abrir-se novamente ao ser reposicionada no meio de cultivo (C, D), sem que ocorra qualquer ruptura

5.2.2 Microscopia

Nas bordas que se soltavam espontaneamente (Figura 5.6A), a membrana aparecia enrolada e em microscopia de fase era possível se observar células que se espraiavam a partir destes aglomerados enrolados em direção ao fundo da placa (Figura 5.6B), similar ao que acontece nos explantes em cultivos primários. Nas áreas mais centrais da membrana era possível observar as hDPSCs confluentes, muito próximas e compactadas (Figura 5.6C).



Figura 5.7 - Membrana de hDPSCs do grupo Laser em 13 dias. (A) fotografia mostrando uma das bordas se soltando; (B) em fotomicroscopia de fase observe a membrana enrolada e as células espraiando-se em direção ao fundo da placa de cultivo a partir da borda da membrana; (C) em fotomicroscopia de fase uma área confluente da membrana; (D) fotomicroscopia de luz (aumento original de 100x)



Figura 5.8 - Fotomicrografias de MCs dos grupos VC e Laser+VC durante os tempos experimentais 24 horas após início das induções, 48 horas e 7 dias (A, B e C; D, E e F respectivamente). Corados com hematoxilina e eosina diretamente dentro dos poços de cultivo, pela técnica do panótico rápido (aumento original de 100x)

Foram obtidos também cortes histológicos de MCs incluídas em parafina no 13º dia, sendo essas coradas com HE. Nesses cortes histológicos, era possível se ver grande quantidade de células com morfologias semelhantes, dispostas em múltiplas camadas e sobrepostas umas às outras, além de uma MEC densa. Não houve diferença aparente entre os grupos.



Figura 5.9 - Fotomicrografias de cortes corados por HE de MCs (*cell sheets*) dos grupos VC (**A**, **B**) e Laser+VC (**C**, **D**). **A**, **C** - aumento original 10X e **B**, **D** - aumento original 40X

5.3 Atividade da Enzima Telomerase

A figura 5.10 ilustra graficamente os resultados de atividade de telomerase das hDPSCs nos diferentes grupos e tempos experimentais (24 horas, 7 e 13 dias). Os níveis de atividade quando iguais ou superiores a 0,2 foram considerados positivos. Atividade de telomerase foi observada somente em 24 horas (Controle e Laser) e em 7 dias (VC e Laser+VC), em 13 dias a atividade de telomerase não foi mais observada.

Em 7 dias os grupos onde MCs características foram obtidas apresentaram atividade de telomerase em 7 dias, enquanto as culturas dos demais grupos, esta atividade, neste tempo experimental, já não era mais observada.

Células sem tratamento (Controle), bem como aquelas tratadas somente com laser, deixaram de apresentar atividade de telomerase nos tempos experimentais posteriores a 24 horas, enquanto as hDPSCs senescentes não foram capazes de expressar esta atividade em nenhum tempo experimental. Células tratadas com VC, independentemente de serem ou não irradiadas, somente apresentaram atividade no tempo de 7 dias. A partir da análise desses resultados não foram mais avaliados ensaios no 13º dia, já que não foi observada atividade de telomerase.



Figura 5.10 - Gráfico da atividade de telomerase nos diferentes grupos e tempos experimentais. Valores acima da linha vermelha indicam atividade positiva da telomerase

5.4 Expressão gênica dos marcadores nos diferentes grupos experimentais

5.4.1 Células na P3

A figura 5.11 ilustra graficamente os resultados do RT-qPCR referentes à caracterização dos cultivos de hDPSCs após 24 horas e 7 dias nos diferentes grupos experimentais. O marcador de indiferenciação Oct-4 foi expresso em hDPSCs de todos os grupos experimentais, com aumento significativo em 7 dias nos grupos onde as MCs formam formadas, ou seja, grupos VC e Laser+VC.



Figura 5.11 - Imunofenotipagem de hDPSCs dos diferentes grupos experimentais em 24 horas e 7 dias. As células expressam o marcador de indiferenciação Oct 4.* Semelhantes entre si e significativamente maior que os demais no mesmo tempo experimental (p < 0.0001)

A mitofilina foi expressa nas hDPSCs de todos os grupos experimentais durante todo o experimento. Em 7 dias houve aumento significativo da expressão deste marcador mesenquimal no grupo Laser+VC, em comparação com o grupo Laser (Figura 5.12).



Figura 5.12 - Imunofenotipagem de hDPSCs dos diferentes grupos experimentais em 24 horas e 7 dias. As células expressam o marcador mesenquimal Mitofilina. * Significativamente maior que os demais no mesmo tempo experimental (p = 0,0338)

A figura 5.13 ilustra graficamente os resultados referentes à expressão da fase catalítica da enzima telomerase (hTERT) das hDPSCs após 24 horas e 7 dias em cultivo nos diferentes grupos experimentais. Esse marcador foi expresso em hDPSCs de todos os grupos experimentais, com aumento significativo em 7 dias nos grupos onde as MCs foram formadas, ou seja, grupos VC e Laser+VC.



Figura 5.13 - Representação gráfica da expressão da fase catalítica da enzima telomerase (TERT) nas culturas de hDPSCs nos diferentes grupos experimentais em 24 horas e 7 dias. * Semelhantes entre si e significativamante maior que os demais no mesmo tempo experimental (p = 0,0009)

Uma alíquota das células da linhagem hDPSC descongelada continuou passando pelo processo de subcultivo até a passagem P27, quando a morfologia celular se apresentava distinta daquela das primeiras passagens (Figura 5.14). Adicionalmente, houveexpressão positiva do gene característico de células nesse estado, o da β-galactosidase, acessada por RT-qPCR (Figura 5.15).



Figura 5.14 - Fotomicrografia de fase de culturas da linhagem hDSPC em passagem P27. As células apresentam citoplasma amplo, formato irregular, citoplasma granular com muitas inclusões e liberação de detritos celulares no meio. (A) -24 horas após o plaqueamento; (B) - 7 dias após o plaqueamento, observa-se que as células ainda não atingiram confluência. (C) - 48 horas após o plaqueamento, corado em HE pela técnica do panótico rápido (Aumento original 100X)



Figura 5.15 - Representação gráfica do resultado do RT-qPCR para a expressão gênica do gene GLB1 (β-galactosidase), marcador de senescência celular. *Significativamante maior (p = 0,0379)
6 DISCUSSÃO

Até o presente momento, um único trabalho induzindo MCs de DPSCs foi encontrado (Cao et al., 2015). Neste, foi analisado o comportamento de MCs de DPSCs implantadas no periodonto de dentes suínos. As DPSCs foram transfectadas com o gene HGF (do inglês, hepatocyte growth fator) que é um fator de crescimento angiogênico frequentemente utilizado para a regeneração periodontal. Sabe-se que este fator é um potente mitógeno, com atividade antiapoptótica e morfogênica podendo aprimorar o processo de regeneração de diversos órgãos (Matsumoto; Nakamura, 1997). A análise por tomografia computadorizada (TC) mostrou um maior volume de osso produzido nos grupos de MCs (transfectados ou não) que nos grupos de células injetadas (grupo controle de células cultivadas pelo método tradicional, ou seja, sem indução de MCs). Quanto à produção de tecidos moles, os grupos MCs foram capazes de repor tecidos próximo da normalidade, sendo em maior grau que nos grupos onde as células foram injetadas. Esse trabalho mostrou claramente as vantagens de se aplicar as MCs na regeneração periodontal. Curiosamente, quando comparamos o trabalho de Cao et al. (2015) com o presente trabalho, temos que ambos associaram técnicas indutoras do processo de angiogênese, pela transfecção direta do gene HGF ou aplicação da LFT, respectivamente. De fato a LFT já se mostrou capaz de ativar in vivo o fator de crescimento angiogênico VEGF (do inglês, vascular endothelial growth factor) (Park et al., 2015).

A Laserfototerapia (LFT) foi utilizada na densidade de energia de 5 J/cm² a qual já demonstrou, em trabalhos prévios da nossa equipe com hDPSCs, efeito proliferativo com a manutenção do fenótipo celular ou de diferenciação quando aplicada associada a fatores de crescimento (Ferreira, 2011; Ferreira et al., 2012b; Diniz, 2015). Os modelos de estudos *in vitro* da LFT geralmente trabalham com células em condição de estresse, normalmente induzido por déficit nutricional através da redução do SFB (Eduardo et al., 2008), que permitem a evidenciação dos possíveis efeitos da terapia. Essa condição mimetiza o microambiente em que células respondem melhor a esse tratamento, ou seja, quando estão em condições biologicamente desfavoráveis (Hamblin; Demidova, 2006). No presente trabalho

ficariam confluentes e sem subcultivos, onde seria esperada uma diminuição do metabolismo celular. De forma que se a LFT pudesse exercer algum efeito nas hDPSCs, este efeito poderia ser detectado da mesma forma que são detectados quando a terapia é aplicada às células em estresse nutricional. No entanto, a hipótese de que a LFT isolada seria capaz de formar MCs de hDPSCs não se confirmou. Por outro lado, os resultados do presente trabalho mostraram que a LFT não prejudica a ação da VC na formação de MCs in vitro. Assim sendo, pode-se supor que no momento dos transplantes da MC para o paciente, a LFT pudesse ser novamente aplicada, agora in vivo, sem prejuízo da integridade da MC. Com isso, poderiam ser tomadas todas as vantagens biológicas de LFT, ou seja, ela favoreceria a manutenção da viabilidade de células das MCs, induziria síntese de VEGF, promovendo condições de nutrição para estas células, bem como poderia ativar fatores de crescimento latentes (Arany et al., 2014). Adicionalmente, é sabido que a LFT pode potencializar os mecanismos de migração e de diferenciação destas células que, no tecido, entrariam em contato com os fatores de crescimentos locais culminando com o sucesso do transplante.

Apesar de as hDPSCs utilizadas serem de um estoque de células criopreservadas, essas apresentaram comportamento celular favorável ao cultivo, o que foi acessado pelos testes preliminares de CFU-F (média 46 células / poço) e eficiênica de plaqueamento (EP) (média de 23%), indo de acordo com o relatado por Gronthos et al. (2002). A técnica do CFU-F, é um método que exige um comportamento celular favorável, já que consiste em semear um número reduzido de células por placa, de forma a ficarem totalmente isoladas umas das outras. Assim, também é um método para inibir o "cross-feeding" e o "condicionamento do meio", sendo, portanto, considerado um bom indicador da viabilidade celular. Mais ainda, para validar sua utilização no estudo, foi realizada nova análise do fenótipo destas células, que poderiam ter perdido suas características durante o processo de congelamento, estocagem e/ou descongelamento. Essa análise mostrou expressão positiva para os marcadores clássicos de células tronco (CD44, CD105, CD146 e STRO-1, Nanog e Oct 4) e negativa para o CD45 e CD14, portanto, confirmando seu fenótipo de CT mesenquimal indiferenciada. Assim sendo, não houve necessidade de realizar novo isolamento e caracterização de células obtidas de novas polpas dentárias humanas.

A escolha do modelo de cultivo para obtenção de MCs através de indução por VC, em detrimento do método de cultivo na UpCell dish, se deu pelo fato de ser uma metodologia descrita como eficaz em melhorar propriedades fisiológicas nas células, além da formação já esperada da MC. Em grande parte dos trabalhos de obtenção de MCs, em especial os que utilizam a placa UpCell dish, os pesquisadores fazem um cultivo semelhante à indução de diferenciação - inclusive usando meio de diferenciação, em muitos casos (Zhao et al., 2013). No entanto, nosso objetivo era conseguir uma MC de células que se mantivessem indiferenciadas, assim foram seguidas as recomendações de Wei et al. (2012), onde o meio de cultivo é sempre completamente removido e a monocamada lavada com PBS, sem a utilização de fatores de crescimento. O objetivo era alcançar resultados que refletissem realmente o comportamento celular perante as diferentes condições experimentais propostas (Laser e / ou VC), tentando ao máximo evitar o "cross-feeding", que ocorre naturalmente quando o meio é "condicionado" pelo acúmulo de substâncias secretadas pelas próprias células. Na verdade, o trabalho de Wei et al. (2012) foi inovador, ao testar diferentes concentrações de VC na formação dessas MCs onde ficou definido que a concentração de 20 µg/ml de VC era capaz de formar, mesmo sem a UpCell dish, MCs com maior eficiência do que a placa especial (100 % contra 80 %). Adicionalmente, encontraram maior expressão de componentes da MEC como colágeno tipo1, integrina β1 e fibronectina; inibição e reparo de danos oxidativos ao DNA; e aumento na atividade da telomerase (AT) – o que atrasaria o envelhecimento celular.

Somente hDPSCs dos grupos tratados com VC e Laser + VC foram capazes de formar verdadeiras MCs, o que ocorreu em período semelhante ao descrito por Wei et al. (2012), ou seja de 10 a 13 dias em cultura. Coincidentemente, somente células destes grupos mantiveram, mesmo após 7 dias em confluência, o fenótipo de CTs mesenquimais indiferenciadas, bem como atividade de telomerase, confirmada tanto por teste enzimático quanto pela expressão gênica da proteína telomerase. Estes resultados indicam fortemente que os tratamentos com VC, com ou sem a associação com a LFT, são capazes de manter o fenótipo e o metabolismo das hDPSCs nas MCs de forma que ao serem transplantadas, essas MCs preservariam a capacidade regenerativa de suas células, que em função do contato com os fatores de crescimento locais levaria ao sucesso do transplante.

As hDPSCs das MCs obtidas apresentaram expressão de mitofilina, mais ainda esta expressão foi aumentada em 7 dias quando as células foram tratadas por Laser+VC. A mitofilina é um marcador de CTs da polpa dentária humana quando indiferenciadas (Hwang et al., 2015) e por esta razão foi escolhida para esta análise. Em consonância com este resultado, a expressão de Oct-4, outro marcador de indiferenciação celular, também teve sua expressão aumentada nestas células. No entanto, não ficou claro o porquê, a VC associada à LFT foi o único grupo que levou ao aumento de expressão da mitofilina. A mitofilina é uma proteína da parede da mitocôndria que caracteriza as células tronco de polpa dentária e que desaparece quando as células se diferenciam (Hwang et al., 2015). Mais ainda, ela se expressa em células que tem alto potencial para diferenciação osteogênica (Hwang et al., 2015). A depleção de mitofilina leva à deposição precoce de matriz óssea, resultado semelhante ao obtido quando a LFT é associada à BMP2 ou BMP4 (Ferreira, 2011; Ferreira et al.,2012b; Diniz, 2015). Portanto, seria esperado que a expressão da mitofilina fosse diminuída quando da aplicação da LFT. De fato, a expressão da mitofilina foi pequena quando da aplicação da LFT sozinha, mas ainda fica sem explicação porquê a associação desta terapia com a VC teve efeito oposto nestas células. Sabe-se que tanto a LFT, quanto a VC tem atividades na parede da mitocôndria, onde a mitofilina está localizada. Talvez haja algum tipo de interação de funções oxidativas, onde a citocromo c oxidade, que é o cromóforo que absorve a energia da laser, possa junto com a VC promover este aumento de expressão. Este é um tema de importância para futuros estudos que busquem esclarecer ainda mais os mecanismos de ação da LFT.

Em um processo fisiológico natural, as células em divisão sofrem redução gradativa dos telômeros, que ao atingirem um grau crítico de encurtamento passam a reconhecer danos ao DNA, iniciando o processo de apoptose ou entrando em senescência. Assim, o aumento da atividade de telomerase nas MCs induzidas por VC (20 µg/ml) associada ou não à LFT, pode ser visto como um auxílio importante na manutenção e prolongamento da vitalidade dessas células, aumentando a sobrevida e possibilitando o aumento dos estoques celulares e da possibilidade de sucesso de sua aplicação em engenharia tecidual.

Os resultados do presente estudo mostraram que quando as hDPSCs são cultivadas no modelo de formação de MCs - ou seja, sem subcultivos, em baixa passagem e pelo período de até 13 dias - as células não apresentam alterações

morfológicas significativas, como o observado nas análises histológicas. E, apesar do tratamento com VC, isolado ou associado à LFT, ter sido capaz de melhorar a expressão de marcadores celulares relacionados à longevidade e manutenção da potencialidade dessas células em baixas passagens (P3), este, ou mesmo a LFT isolada, não foram capazes de reverter o quadro de senescência já estabelecido em hDPSCs cultivadas em altas passagens (P27). Assim, a recomendação de manutenção de linhagens em baixas passagens para a aplicação em terapias regenerativas ainda se faz necessária.

Em suma, MCs foram obtidas somente quando o estímulo VC foi aplicado, tanto isolado quanto associado à LFT, sendo que a LFT associada à VC permitiu a formação das MCs, sem interferir na manutenção da longevidade e indiferenciação das hDPSCs. Adicionalmente, a LFT associada à VC promoveu a formação de MCs de mais fácil manipulação do que o grupo VC isolada, o que favoreceria a sua utilização na clínica. As MCs induzidas por VC e Laser+VC se mostraram apropriadas para serem testadas *in vivo* em pesquisas de regeneração na Odontologia. Os dados fornecidos nesta análise colaboraram para uma melhor compreensão acerca do comportamento das hDPSCs cultivadas nesse modelo. Entretanto, são necessários estudos mais abrangentes envolvendo um maior número de linhagens avaliadas, bem como modelos de trabalhos translacionais, onde essa membrana celular possa ter sua real capacidade de regeneração avaliada *in vivo*.

7 CONCLUSÃO

- A associação de Laserfototerapia (LFT) e vitamina C (VC), bem como a VC isolada foram capazes de induzir a formação de MCs de hDPSCs. Já a LFT sozinha não foi capaz de formar MCs funcionais;
- A LFT associada à VC promoveu a formação de MCs de mais fácil manipulação do que aquelas formadas em resposta à VC isolada. Microscopicamente as hDPSCs nos diferentes grupos não apresentaram diferenças perceptíveis;
- As hDPSCs das MCs apresentaram, até 7 dias, atividade de telomerase e expressão tanto de genes marcadores de células-tronco mesenquimais (Oct4 e Mitofilina), quanto da enzima telomerase (hTERT).

REFERÊNCIAS¹

Abramovitch-Gottlib L, Gross T, Naveh D, Geresh S, Rosenwaks S, Bar I, 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.

Alghamdi KM, Kumar A, Moussa NA. Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. Lasers Med Sci. 2012;27:237-49.

Arany PR, Cho A, Hunt TD, Sidhu G, Shin K, Hahm E, et al. Photoactivation of endogenous latent transforming growth factor- β 1 directs dental stem cell differentiation for regeneration. Sci Transl Med. 2014;6(238):238-69.

Armstrong L, Al-Aama J, Stojkovic M, Lako M. The epigenetic contribution to stem cell ageing–can we rejuvenate our older cells? Stem Cells. 2014 set;32(9):2291-8.

Armstrong L, Saretzki G, Peters H, Wappler I, Evans J, Lako M, et al. Overexpression of telomerase confers growth advantage, stress resistance, and enhanced differentiation of ESCs toward the hematopoietic lineage. Stem Cells. 2005 Apr;23(4):516-29.

Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. Cell. 2005;120(4):483–95.

Bartold PM, Gronthos S, Ivanovski S, Fisher A, Hutmacher DW. Tissue engineered periodontal products. J Periodontal Res. 2016 Feb;51(1):1-15.

Bielski BH, Richter HW, Chan PC. Some properties of the ascorbate free radical. Ann N Y Acad Sci. 1975 Sep 30;258:231-7.

Binato R, Souza TF, Silva CL, Du Rocher B, Mencalha A, Pizzatti L, et al. Stability of human mesenchymal stem cells during in vitro culture: considerations for cell therapy. Cell Prolif. 2013 Feb;46(1):10-22.

Blackburn EH; Gall JG. A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in Tetrahymena. J Mol Biol. 1978;120(1):33-53.

¹ De acordo com o Estilo Vancouver

Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Wright WE. Extension of lifespan by introduction of telomerase into normal human cells. Science. 1998;279(5349):349-52.

Bollmann FM. The many faces of telomerase: emerging extratelomeric effects. Bioessays. 2008;30(8):728-32.

Cao Y, Liu Z, Xie Y, Hu J, Wang H, Wang S, et al. Adenovirus-mediated transfer of hepatocyte growth factor gene to human dental pulp stem cells under good manufacturing practice improves their potential for periodontal regeneration in swine. Stem Cell Res Ther. 2015 Dec 15;6(1):249.

Chaudhari P, Ye Z, Jang YY. Roles of reactive oxygen species in the fate of stem cells. Antioxid Redox Signal. 2012;20(12):1881-90.

Chen ACH, Huang YY, Arany PR, Hamblin MR. Role of reactive oxygen species in low level light therapy. In SPIE BiOS: Biomedical Optics International Society for Optics and Photonics. 2009 Feb;(pp. 716502-716502).

Chen C, Akiyama K, Yamaza T, You YO, Xu X, Shi S, et al. Telomerase governs immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells by regulating FAS ligand expression. EMBO Molecular Medicine. 2014 mar;6(3):322-34.

Chen J, Guo L, Zhang L, Wu H, Yang J, Pei D. Vitamin C modulates TET1 function during somatic cell reprogramming. Nature genetics. 2013;45(12):1504-9.

Cho JH, Hwang HS, Chang HS, Hwang YC. Application of orthodontic forces prior to autotransplantation–case reports. Int Endod J. 2013;46:187-94.

Chung WC, Tu YK, Lin YH, Lu HK. Outcomes of autotransplanted teeth with complete root formation: a systematic review and meta-analysis. J Clin Periodontol. 2014;41(4):412-23.

Cong Y, SHAY JW. Actions of human telomerase beyond telomeres. Cell Res. 2008;18(7):725-32.

Cooke HJ, Smith BA. Variability at the telomeres of the human X/Y pseudoautosomal region. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1986;51(1):213-9.

Damante CA, De Micheli G, Miyagi SPH, Feist IS, Marques MM. Effect of laser phototherapy on the release of fibroblast growth factors by human gingival fibroblasts. Lasers Med Sci. 2009;24(6):885-91.

Denham M, Conley B, Olsson F, Cole TJ, Mollard R. Stem cells: an overview. Curr Protoc Cell Biol. 2005;23(23):1. doi: 10.1002/0471143030.cb2301s28.

Ding G, Liu Y, Wang W, Wei F, Liu D, Wang S. Allogeneic periodontal ligament stem cell therapy for periodontitis in swine. Stem Cells. 2010 Oct;28(10):1829-38.

Ding G, Niu J, Liu Y. Dental pulp stem cells suppress the proliferation of lymphocytes via transforming growth factor- β 1. Hum Cell. 2015 Apr;28(2):81-90.

Diniz IMA. Diferenciação odonto/osteogênica de células-tronco mesenquimais fotomoduladas em hidrogel com incorporação de proteína morfogenética óssea 4 [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia da; 2015.

Diniz IMA, Matos AB, Marques MM. Laser phototherapy enhances mesenchymal stem cells survival in response to the dental adhesives. Sci World J. 2015:671789.

Eduardo FDP, Bueno DF, Freitas PM, Marques MM, Passos-Bueno MR, Eduardo CDP, et al. Stem cell proliferation under low intensity laser irradiation: a preliminary study. Lasers Surg Med. 2008;40(6):433–8.

Ferracane JL, Cooper PR, Smith AJ. Can interaction of materials with the dentin-pulp complex contribute to dentin regeneration? Odontology. 2010 Feb;98(1):2-14.

Ferreira LS, Moura-Netto C, Destro MFSS, Maranduba, Marques MM. Laser phototherapy improves the proliferation but not the differentiation of human dental pulp stem cells. Medicina Oral Patología Oral y Cirurgia Bucal (Barcelona 2012a-WFLD):131. doi:10.4317/medoral.17643599.

Ferreira LS, Cai S, Barros JA, Patel SA, Chen W, Marques MM. Effects of laser phototherapy and growth factors PDGF and BMP-2 on the odontogenic differentiation of dental pulp stem cells. Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal (Barcelona 2012b-WFLD):90-91. doi:10.4317/medoral.17643600.

Ferreira LS. Efeito da fototerapia com laser em baixa intensidade na expressão de marcadores de células- tronco de polpa dentária humana [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2011.

Flores I, Cayuela ML, Blasco MA. Effects of telomerase and telomere length on epidermal stem cell behavior. Science. 2005, jul;309(573):1253-6.

Flores MG, Hasegawa M, Yamato M, Takagi R, Okano T, Ishikawa I. Cementumperiodontal ligament complex regeneration using the cell sheet technique. J Periodontal Res. 2008a Jun;43(3):364-71.

Flores MG, Yashiro R, Washio K, Yamato M, Okano T, Ishikawa I. Periodontal ligament cell sheet promotes periodontal regeneration in athymic rats. J Clin Periodontol. 2008b Dec;35(12):1066-72.

Fraga CG, Motchnik PA, Shigenaga MK, Helbock HJ, Jacob RA, Ames, BN. Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. Proceedings National Academy Sciences. 1991;88(24):11003-6.

Freshney RI. Basic principles of cell culture. Hoboken: John Wiley & Sons; 2006.

Freshney RI. Culture of animal cells: A manual of basic technique. 5th. New York: Edition, Wiley; 2005.

Fujihara NA, Hiraki KRN, Marques MM. Irradiation at 780 nm increases proliferation rate of osteoblasts independently of dexamethasone presence. Lasers Surg Med. 2006;38(4):332–6.

Fujita H, Shimizu K, Nagamori E. Application of a cell sheet-polymer film complex with temperature sensitivity for increased mechanical strength and cell alignment capability. Biotechnol Bioeng. 2009 Jun 1;103(2):370-7.

Gao X, Xing D. Molecular mechanisms of cell proliferation induced by low power laser irradiation. J Biomed Sci. 2009;16:4.

Garavello I, Baranauskas V, Da Cruz-Höfling MA. The effects of low laser irradiation on angiogenesis in injured rat tibiae. Histol Histopathol. 2004;19(1):43–8.

Giannelli M, Chellini F, Sassoli C, Francini F, Pini A, Squecco R, et al. Photoactivation of bone marrow mesenchymal stromal cells with diode laser: Effects and mechanisms of action. J Cell Physiol. 2013;228(1):172–81.

González F, Boué S, Belmonte JCI. Methods for making induced pluripotent stem cells: reprogramming a la carte. Nature Reviews Genetics. 2011;12(4):231-42.

Granger MP, Wright WE, Shay JW. Telomerase in cancer and aging. Crit Rev Oncol Hematol. 2002;41(1):29-40.

Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. Cell. 1985;43(2)1:405-13.

Greider CW, Blackburn EH. Telomeres, telomerase and cancer. Sci Am. 1996;274(2):92-7.

Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. J Dent Res. 2002;81(8):531-5.

Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. Proc Natl Acad Sci USA. 2000;97:13625–30.

Grossman LI. Intentional replantation of teeth. J Am Dent Assoc. 1966;72(5):1111-8.

Halliwell B. Vitamin C and genomic stability. Mutation Research. 2001;475(1):29–35.

Hamblin MR, Demidova TN. Mechanisms of low level light therapy. International Society for Optics and Photonics. Biomedical Optics. 2006. Feb:614001-614001.

Hamblin MR. The role of nitric oxide in low level light therapy. Proc SPIE. 2008;(6846):684602–14.

Harada M, Kenmotsu S, Nakasone N, Nakamura KO, Ohshima H. Cell dynamics in the pulpal healing processing following cavity preparation in rat molars. Histochem Cell Biol. 2008 Oct;130(4):773-83.

Haraguchi Y, Shimizu T, Sasagawa T, Sekine H, Sakaguchi K, Okano T, et al. Fabrication of functional three-dimensional tissues by stacking cell sheets in vitro. Nature protocols. 2012;7(5):850-8.

Harumi SPM, Kerkis I, Maranduba CMC, Gomes CM, Martins MD, Marques MM. Expression of extracellular matrix proteins in human dental pulp stem cells depends on the donor tooth conditions. J Endod. 2011:36(5):826-31.

Hasegawa M, Yamato M, Kikuchi A, Okano T, Ishikawa I. Human periodontal ligament cell sheets can regenerate periodontal ligament tissue in na athymic rat model. Tissue Eng. 2005;(11):469-78.

Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. Exp Cell Res. 1965;(37):614-36.

Horst OV, Chavez MG, Jheon AH, Desai T, Klein OD. Stem Cell and Biomaterials Research in Dental Tissue Engineering and Regeneration. Dent Clin N Am. 2012;56:495-520.

Hou J, Zhang H, Yuan X, Li J, Wei Y, Hu S. In vitro effects of low-level laser irradiation for bone marrow mesenchymal stem cells: proliferation, growth factors secretion and myogenic differentiation. Lasers Surg Med. 2008;40(10):726–33.

Huang YY, Chen ACH, Carroll JD, Hamblin MR. Biphasic dose response in low level light therapy. Dose Response. 2009;7(4):358–83.

Huang YY, Sharma SK, Carroll J, Hamblin MR. Biphasic dose response in low level light therapy - an update. Dose Response. 2011;9(4):602-18.

Hwang HI, Lee TH, Jang YJ. Cell Proliferation-Inducing Protein 52/Mitofilin Is a Surface Antigen on Undifferentiated Human Dental Pulp Stem Cells. Stem Cells Dev. 2015, Jun; 24(11):1309-19.

Iohara K, Nakashima M, Ito M, Ishikawa M, Nakasima A, Akamine A. Dentin regeneration by dental pulp stem cell therapy with recombinant human bone morphogenetic protein 2. J Dent Res. 2004;(83):590-95.

Jayaraman P, Govindasamy V, Gnanasegaran N, Kunasekaran W, Vasanthan P, Kasim NH. Expression patterns of immune genes in long-term cultured dental stem cells. Clin Oral Investig. 2016 Jan;20(1):109-16.

Kalmbach K, Robinson LG, Wang F, Liu L, Keefe D. Telomere Length Reprogramming in Embryos and Stem Cells. Biomed Res Int. 2014;(2014):925121

Kang JY, Chang HS, Hwang YC, Hwang IN, Oh WM, Lee BN. Autogenous tooth transplantation for replacing a lost tooth: case reports. Rest Dent Endod. 2013;38(1):48-51.

Karu, Afanas'eva. [Cytochrome c oxidase as the primary photoacceptor upon laser exposure of cultured cells to visible and near IR-range light]. Dokl Akad Nauk. 1995 Jun;342(5):693-5.

Karu T, Pyatibrat L, Kalendo G. Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro. J Photochem Photobiol B Biol. 1995;27(3):219–23.

Karu T. Interaction of monochromatic visible light and near infra- red radiation with cells: currently discussed mechanisms, SPIEProc. 1995;2391(1995):576-86.

Karu T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. J Photochem Photobiol B. 1999, Mar;49(1):1-17.

Karu TI, Kolyakov SF Exact action spectra for cellular responses relevant to phototherapy. Photomed Laser Surg. 2005;(23):355-36.

Karu TI, Pyatibrat LV, Afanasyeva NI. Cellular effects of low power laser therapy can be mediated by nitric oxide. Lasers Surg Med. 2005, Apr;36(4):307-14.

Karu TI. Laser biostimulation: a photobiological phenomenon. J Photochem Photobiol. 1989;(4)3: 638-40.

Karu TI. Mitochondrial signaling in mammalian cells activated by red and near-Irradiation. Photochem Photobiol. 2008, Sep-Oct;84(5):1091-9.

Kato K, Shinizawa K, Yoshikawa S. Cytochrome oxidase is a possible photoreceptor in mitochondria, Photobiochem. Photobiophys. 1981;(2):263-9.

Kawashima N. Characterisation of dental pulp stem cells: a new horizon for tissue regeneration. Arch Oral Biol. 2012 Nov;57(11):1439-58.

Kelm JM, Fussenegger M. Scaffold-free cell delivery for use in regenerative medicine. Adv Drug Deliv Rev. 2010 Jun 15;62(7-8):753-64.

Kim JH, Auerbach JM, Gómez JAR, Velasco I, Gavin D, McKay R, et al. Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. Nature. 2002;418(6893):50-6.

Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Shay JW, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. Science. 1994 Dec 23;266(5193):2011-5.

Korkmaz A, Kolankaya D. The protective effects of ascorbic acid against renal ischemiareperfusion injury in male rats. Renal Fail. 2009;(31):36–43.

Langer R, Vacanti J. Tissue engineering. Science. 1993;(260):920.

Lansdorp PM. Telomeres, stem cells, and hematology. Blood. 2008 feb;(111)4:1759-66.

Levine M, Rumse SC, Daruwala R, Park JB, Wang Y. Criteria and recommendations for vitamin C intake. JAMA. 1999;(281)15:1415-23.

Lindhe J. Tratado de periodontia clínica e implantologia oral. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999.

Lindvall O. Clinical translation of stem cell transplantation in Parkinson's disease. J Int Med. 2016;(279)1:30-40.

Long T, Zhu Z, Awad HA, Schwarz EM, Hilton MJ, Dong Y. The effect of mesenchymal stem cell sheets on structural allograft healing of critical sized femoral defects in mice. Biomaterials. 2014;(35)9:2752-9.

Masutomi K, Possemato R, Wong JM, Currier JL, Tothova, ZHahn WC, et al. The telomerase reverse transcriptase regulates chromatin state and DNA damage responses. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Jun 7;102(23):8222-7.

Matsui S, Takeuchi H, Tsujimoto Y, Matsushima K. Effects of Smads and BMPs induced by Ga-Al-As laser irradiation on calcification ability of human dental pulp cells. J Oral Sci. 2008;50(1):75–81.

Matsui S, Tsujimoto Y, Matsushima K. Stimulatory effects of hydroxyl radical generation by Ga-Al-As laser irradiation on mineralization ability of human dental pulp cells. Biol Pharm Bull. 2007;30(1):27–31.

Matsumoto K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor (HGF) as a tissue organizer for organogenesis and regeneration. Biochem Biophys Res Commun. 1997 Oct 29;239(3):639-44.

McClintock B. The stability of broken ends of chromosomes in zea mays. Genetics. 1941;(26)2:234-82.

McDonald JW, Liu XZ, Qu Y, Liu S, Mickey SK, Choi DW, et al. Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. Nat Med. 1999 Dec;5(12):1410-2.

Mejàre B, Wannfors K, Jansson L. A prospective study on transplantation of third molars with complete root formation. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2004;(97):231-8.

Min JY, Yang Y, Converso KL, Liu L, Huang Q, Xiao YF, et al. Transplantation of embryonic stem cells improves cardiac function in postinfarcted rats. J Appl Physiol (1985). 2002 Jan;92(1):288-96.

Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Shi S, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 May 13;100(10):5807-12.

Moreira MS, Carvalho RA, Diniz IMA, Neves II, Almeida F, Gavini G, et al. Laser phototherapy improves dentin pulp complex regeneration in vivo. Pulp Regeneration – Translational Opportunities. 2013. Resumo

Moreira MS, Velasco IT, Ferreira LS, Ariga SK, Abatepaulo F, Marques MM, et al. Effect of laser phototherapy on wound healing following cerebral ischemia by cryogenic injury. J Photochem Photobiol B. 2011 Dec 2;105(3):207-15.

Müller H. The remaking of chromosomes. Collect Net. 1938;(13):181-98. Mvula B, Mathope T, Moore T, Abrahamse H. The effect of low level laser irradiation on adult human adipose derived stem cells. Lasers Med Sci. 2008;23(3):277–82. Nakamura A, Akahane M, Shigematsu H, TadokoroM, Morita Y, Tanaka Y, et al. Cell sheet transplantation of cultured mesenchymal stem cells enhances bone formation in a rat nonunion model. Bone. 2010;(46):418–24.

Nandi D, Patra RC, Swarup D. Effect of cysteine, methionine, ascorbic acid and thiamine on arsenic-induced oxidative stress and biochemical alterations in rats. Toxicology. 2005;(211):226–35.

Natiella JR, Armitage JE, Greene GW. The replantation and transplantation of teeth: A review. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1970;(3)29:397-419.

Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, Watanabe K, Okano T, Tano Y, et al. Corneal reconstruction with tissue engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. N Engl J Med. 2004;(351):1187–96.

Ohashi K, Yokoyama T, Yamato M, Kuge H, Okano T, Nakajima Y, et al. Engineering functional two- and three-dimensional liver systems in vivo using hepatic tissue sheets. Nat Med. 2007;(13):880–5.

Okano T, Yamada N, Okuhara M, Sakurai Y. Mechanism of cell detachment from temperature-modulated, hydrophilic–hydrophobic polymer surfaces. Biomaterials. 1995;(16):297–303.

Okano T, Yamada N, Sakai H, Sakurai Y. A novel recovery system for cultured cells using plasma-treated polystyrene dishes grafted with poly (N-isopropylacrylamide). J Biomed Mater Res. 1993;(27):1243–51.

Olovnikov AM. A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. J Theor Biol. 1973;(41)1:181-90.

Park K, Huang J, Azar F, Jin RL, Min BH, Hasty K, et al. Scaffold-free, engineered porcine cartilage construct for cartilage defect repair--in vitro and in vivo study. Artif Organs. 2006 Aug;30(8):586-96.

Park IS, Mondal A, Chung PS, Ahn JC. Vascular regeneration effect of adiposederived stem cells with light-emitting diode phototherapy in ischemic tissue. Lasers Med Sci. 2015 Feb;30(2):533-41 Pereira AN, Eduardo CP, Matson E, Marques MM. Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. Lasers Surg Med. 2002;31(4):263–7.

Pierdomenico L, Bonsi L, Calvitti M, Rondelli D, Arpinati M, Bagnara GP, et al. Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. Transplantation. 2005 Sep 27;80(6):836-42.

Pirraco RPLS. Co-cultures and cell sheet engineering as relevant tools to improve the outcome of bone tissue engineering strategies [tese]. Portugal: Engenharia de Tecidos, Medicina Regenerativa e Células-Tronco. Universidade de Minho; 2011.

Potdar PD, D'Souza SB. Ascorbic acid induces in vitro proliferation of human subcutaneous adipose tissue derived mesenchymal stem cells with upregulation of embryonic stem cell pluripotency markers Oct4 and SOX 2. Hum Cell. 2010;(23):152–5.

Rosa V, Della Bona A, Cavalcanti BN, Nör JE. Tissue engineering: from research to dental clinics. Dent Mater. 2012;28(4):341-8.

Sarin KY, Cheung P, Gilison D, Lee E, Tennen RI, Artandi SE, et al. Conditional telomerase induction causes proliferation of hair follicle stem cells. Nature. 2005 Aug 18;436(7053):1048-52.

Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, Shi S, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. Lancet. 2004 Jul 10-16;364(9429):149-55.

Sharma LA, Sharma A, Dias GJ. Advances in regeneration of dental pulp – a literature review. J Investig Clin Dent. 2013 Aug;(4):1-14.

Shi Y, Zhao Y, Deng H. Powering reprogramming with vitamin C. Cell Stem Cell. 2010;(1)6:1-2.

Shimizu T, Sekine H, Yang J, Isoi Y, Yamato M, Okano T, et al. Polysurgery of cell sheet grafts overcomes diffusion limits to produce thick, vascularized myocardial tissues. FASEB J. 2006;(20):708-10.

Silva FDS, Almeida PN, Rettore JVP, Maranduba CP, Souza CMD, Maranduba CMDC. Toward personalized cell therapies by using stem cells: seven relevant topics for safety and success in stem cell therapy. Biomed Biotechnol. 2012;(2012):758102.

Skalak R, Fox CF. Tissue engineering: Proceedings of a workshop, held at Granlibakken. Lake Tahoe, California, February 26–29, 1988. UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology, 107, New York, NY: Liss.

Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Huang GT, et al. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. J Endod. 2008 Feb;34(2):166-71.

Souil E, Capon A, Mordon S, Dinh-Xuan AT, Polla BS, Bachelet M. Treatment with 815-nm diode laser induces long-lasting expression of 72-kDa heat shock protein in normal rat skin. Br J Dermatol. 2001;144(2):260–6.

Sousa LR, Cavalcanti BN, Marques MM. Effect of laser phototherapy on the release of TNF-alpha and MMP-1 by endodontic sealer-stimulated macrophages. Photomed Laser Surg. 2009;27(1):37–42.

Stone N, Meister A. Function of ascorbic acid in the conversion of proline to collagen hydroxyproline. Nature. 1962;(194):555–7.

Tadakuma T. Possible Application of the laser in immunobiology. Keio J Med. 1993;42(4):180–2.

Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell. 2006;(4)126:663-76.

Tata DB, Waynant RW. Laser therapy: A review of its mechanism of action and potential medical applications. Laser Photon Rev. 2011;5(1):1–12.

Teixeira CS, Pasternak B Jr, Vansan LP, Sousa-Neto MD. Autogenous transplantation of teeth with complete root formation: two case reports. Int Endod J. 2006;(39):977985.

Tsumanuma Y, Iwata T, Washio K, Yoshida T, Yamada A, Okano T, et al. Comparison of different tissue-derived stem cell sheets for periodontal regeneration in a canine 1-wall defect model. Biomaterials. 2011;(25)32: 5819-25.

Wang J, Zhang R, Shen Y, Xu C, Qi S, Xu Y, et al. Recent Advances in Cell Sheet Technology for Periodontal Regeneration.Current stem cell research & therapy. 2014;(3)9:162-73.

Watson JD; Crick FHC. Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid, Nature, n.4356, April 1953. Reimpresso: Nature. 1974;(248)5451:765.

Wei F, Qu C, Song T, Ding G, Fan Z, Wang S, et al. Vitamin C treatment promotes mesenchymal stem cell sheet formation and tissue regeneration by elevating telomerase activity. J Cell Physiol. 2012;(9)2:3216-24.

Wei F, Song T, Ding G, Xu J, Liu Y, Wang S, et al. Functional tooth restoration by allogeneic mesenchymal stem cell-based bio-root regeneration in swine. Stem Cells Dev. 2013;(12)22:1752-62.

Wu H, Wu Y, Ai Z, Yang L, Gao Y, Zhang Y, et al. Vitamin C enhances nanog expression via activation of the JAK/STAT signaling pathway. Stem Cells. 2014;(1)32:166-76.

Wu JY, Chen CH, Yeh LY, Yeh ML, Ting CC, Wang YH. Low-power laser irradiation promotes the proliferation and osteogenic differentiation of human periodontal ligament cells via cyclic adenosine monophosphate. Int J Oral Sci 2013;5(2):85–91.

Yamasaki S, Taguchi Y, Shimamoto A, Mukasa H, Tahara H, Okamoto T. Generation of human induced pluripotent tem (iPS) ells in serum-and feeder-free defined culture and TGF-ß1 regulation of pluripotency. PLoS One. 2014;(9):87151.

Yamato M, Okano T. Cell sheet engineering. Materials today. 2004;(5)7:42-7.

Yang J, Yamato M, Kohno C, Nishimoto A, Sekine H, Okano T, et al. Cell sheet engineering: recreating tissues without biodegradable scaffolds. Biomaterials. 2005;(33)26:6415-22.

Yang J, Yamato M, Shimizu T, Sekine H, Ohashi K, Okano T, et al. Reconstruction of functional tissues with cell sheet engineering. Biomaterials. 2007; 28(34):5033-43.

Zhang Q, Shi S, Liu Y, Uyanne J, Shi Y, Le AD, et al. Mesenchymal stem cells derived from human gingiva are capable of immunomodulatory functions and ameliorate inflammation-related tissue destruction in experimental colitis. J Immunol. 2009 Dec 15;183(12):7787-98.

Zhao YH, Zhang M, Liu NX, Lv X, Zhang J, Chen YJ, et al. The combined use of cell sheet fragments of periodontal ligament stem cells and platelet-rich fibrin granules for avulsed tooth reimplantation. Biomaterials. 2013;(22)34:5506-20.

Zhou Y, Li Y, Mao L, Peng H. Periodontal healing by periodontal ligament cell sheets in a teeth replantation model. Archives of Oral Biology. 2012;(2)57:169-76.

ANEXO - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeito da Laserfototerapia na manutenção da atividade de telomerase e da expressão de genes marcadores de Celulas-Tronco da Polpa Dentaria Humana Pesquisador: Marcia Martino Narques

Área Temática: Varala: 2 CAAE: 40392114.3.0000.0075

Instituição Proponente: Universidade de Sao Paulo Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.355.054

Apresentação do Projeto:

Este projeto foi anteriormente aprovado, com parecer emitido em fevereiro de 2015, sob nº 944.749 e CAAE nº 40392114.3.0000.0075, sendo agora avallada a emenda submetida.

Será realizada uma nova cultura primária, onde as células serão isoladas da poipa dentária humana e posteriormente caracterizadas, constituíndo uma nova linhagem que será denominada de DPSC3. Para o isolamento da nova linhagem de células-tronco de poloa dentária humana (hDPSC-3), serão coletados manos extraidos por razões ortodônticas ou preventivas, preferer inclusos. Dentes extraidos por razões patológicas, como lesões carlosas extensas elou periodontite não serão Incluídos

As células utilizadas neste projeto de pesquisa serão isoladas, congeladas e armazenadas no Biorrepositório do Laboratório de Pesquisa Básica Prof. Edmir Matson, de acordo com a Resolução 441/2011. O Biorrepositório permanecerá sob responsabilidade institucional e gerenciamento da prof. Márcia Martins Marques. Essas celulas poderão ser utilizadas em investigações futuras, quando autorizadas pelo doador por meio da assinatura do TCLE. O armazenamento das células será feito em tubo criogênico, estocados em reservatorio de nitrogênio líquido a 182°C, com identificação da linhagem oelular estabelecida a partir de cada doador, data do congelamento, passagem celular e nome do pesquisador que realizou o isolamento celular, mantendo-se o nome







de telomerase e da expressão de genes marcadores de hDPSCs, guando formam Cell Sheet, bem como a concentração de NO liberado nesses tipos de cultura. Esta análise será realizada porque o NO está Intimamente ligado aos mecanismos de ação tanto da LFT guanto da VC. Portanto será observado se: - A LFT Induzirá a formação da Cell Sheet

- Serà availado se as hDPSCs permanecem indiferenciadas
- Sera availada a qualidade das Cell Sheets e a monología celula
- Serão comparados os 3 tipos de Cell Sheets entre si
- Serà medida a atividade da enzima telomerase
- Será medida a concentração de NO liberado nesses tipos de cultura.

Como justificativa da emenda, foi sugerido eliminar a fase piloto do experimento, porque ambos os meios de cultivos são utilizados com sucesso segundo a literatura. Sendo sugerido que a fase do experimento propriamente dito fosse implementada com as análises de celulas tronco estocadas em biorrepositório e com uma segunda linhagem celular que será denominada DPSC3,como já foi referido no projeto.

Availação dos Riscos e Beneficios:

Como serão utilizadas alíguotas de Células-tronco da polpa dentaria humana (hDPSC) congeladas provenientes de outro projeto de pesquisa (CAE 09731212.2.0000.0075), os riscos deste estudo são aqueles relacionados a manipulação de celuías-tronco, como mutação genica indesejada. Em virtude da EMENDA apresentada, os riscos para o participante da pesquisa (Doador dos dentes), são aqueles aos quais o paciente esta exposto quando da exodontia indicada, ou seja risco inerente ao próprio procedimento cirúrgico realizado e não decorrente da pesquisa em si. Não haverá beneficio direto para o participante da pesquisa, mas este estudo contribuira para um maior entendimento da laser fototerapia (LFT) em baixa intensidade na promoção da regeneração tecidual, bem como ao se availar a associação entre LFT, iongevidade e manutenção da indiferenciação em celulas-tronco da poipa dentaria humana (hDPSCs), poderemos ter novas perspectivas para aplicação da engenharia tecidual na Medicina e Odontologia.

Comentarios e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante, não havendo impedimento ético.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos obrigatorios foram apresentados:- Informações basicas do projeto; Declarações diversas; Projeto detalhado; TCLE; e Folha de rosto.

Endereço: Av Prof Lineu Prester Bairro: Cidade Universitária	6 2227 CEP:	05.508-000	
UF: SP Municipio: Telefone: (11)3091-7960	SAO PAULO Fax: (11)3001-7814	E-mail:	cepfo@uep.br

Pégine 12 de 10

orma

Brazi



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO



do doador em siglio durante todo o tempo de armazenagem. As células que não forem recongeladas serão descartadas conforme normas vigentes de órgãos técnicos competentes, e de acordo com o TCLE. mantendo-se a confidencialidade e autonomía do doador. As amostras ficarão armazenadas no Biorrepositório durante o tempo desta pesquisa e autorizações de renovação do armazenamento serão solicitadas ao CEP pelo pesquisador responsável. As celulas-tronco da poipa dentaria de terceiros molares extraidos por razões ortodônticas de pacientes com

idade entre 18 e 35 anos serão isoladas pela técnica descrita por Gronthos et al. 2000. A monitorização do crescimento celular será realizada diariamente em microscópio de fase invertido e o meio de cultura será trocado a cada 2 ou 3 días. Os subcultivos serão feitos quando as celuías atingirem a subconfluência. Todos os procedimentos de cultivo celular serão realizados sob capela de fuxo laminar, seguindo os protocolos de manutenção de esterilização de materiais e soluções utilizadas. Para identificar e caracterizar imunofenotipicamente a progenia das populações celulares de polpa dentária descongeladas serão utilizados anticorpos monocionais contra as moléculas de superficie humanas CD146 e STRO1 (marcadores de células-tronco mesenquimais). Células com 20 días de cultura serão colhidas e analisadas quanto à expressão positiva de CD146 e STRO1. A população celular será contada, classificada e selecionada por ditimetro de fluxo FACS. Na primeira parte do experimento, as celulas tronco da polpa dentaria de dentes aduitos humanos (hDPSCs) congeladas, provenientes de outro projeto de pesquisa (CAE 09731212.2.0000.0075), foram cultivadas por 10 a 13 días, em placas de 6 poços (35mm de diâmetro cada) divididas em 3 grupos, sendo um submetido a laserfototerapia (LFT) (DE = 5 Jiom²), outro a LFT associada a vitamina C (VC) e o terceiro apenas com VC (grupo controle). As Cell Sheets foram availadas, e comparadas entre si, por análise morfológica (H&E), de expressão gênica para os marcadores de oélulastronco (RT – qPCR) e mensuração da atividade da Enzima Telomerase e da concentração de NO liberado nesses tipos de cultura. A justificativa da emenda é que no exame de qualificação da pesquisadora foi sugerido que se repetissem os testes em uma segunda linhagem celular, agora denominada DPSC3, alim de confirmar os resultados obtidos. Portanto nesta segunda fase, será realizada uma nova cultura primária, onde as células serão isoladas da poipa dentária humana e posteriormente caracterizadas, sendo então submetidas aos mesmos procedimentos realizados na primeira parte do experimento, como ja explicado.

Objetivo da Pesquisa

Baseada na hipótese de que as teraplas com Vitamina C (VC) e Laser (laserfototerapla, LFT) poderiam promover respostas biológicas semelhantes em celulas-tronco da poipa dentaria humana (hDPSCs), o objetivo desse estudo será avallar o efeito da LFT na manutenção da atividade

ço: Av Prof Lineu Prestes 2227 Cidade Universitária Bairro: Cidade Universitària UF: SP Municipio: SAO PAULO Telefone: (11)3091-7960 Fax: (11)3091-7814 CEP: 05.508-000 E-mail: cepfo@usp.br Danies III. as dd



Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final, utilizando-se da opção "Enviar Notificação" (descrita

no Manual "Submeter Notificação", disponível na Central de Suporte - canto superior direito do site www.saude.gov.br/plataformabrasil). Qualquer alteração no projeto original deve ser apresentada "emenda" a este CEP, de forma objetiva e com justificativas para nova apreciação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequaçõ Emenda aprovada.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_555897 E1.pdf	12/11/2015 16:52:46		Acelto
Folha de Rosto	convert_jpg_to_pdf_net_2015_11_12_1 9_41_17.pdf	12/11/2015 16:50:38	Marcia Martins Marcues	Acelto
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorização_Pesquisa_FUNDECTO_CE P.pdf	13/10/2015 15:37:55	Marcia Martins Marques	Acelto
Declaração de Manuselo Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Regulamento_Biorrepositorio.doc	06/10/2015 23:14:52	Marcia Martins Marques	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_PosQualific_CEP.docx	06/10/2015 23:14:04	Marcia Martins Marques	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de	TCLE_ANAmestrado.docx	05/10/2015 23:12:12	Marcia Martins Marques	Aceito

Situação do Parecer:

essita Apreciação da CONEP:

Enderec	: Av Prof Lineu Preste	a 2227			
Bairro:	Cidade Universitária		CEP:	05.508-000	
UF: SP	Municipio:	SAO P	AULO		
elefone	(11)3091-7980	Fax	(11)3001-7814	E-mail:	cepfo@usp.br