GABRIELA LARANJEIRA ABE

Efeitos da fotobiomodulação na adesão e proliferação das células-tronco da papila apical humana em *scaffold* de quitosana com incorporação de coágulo sanguíneo. Estudo *in vitro*

São Paulo

2016

GABRIELA LARANJEIRA ABE

Efeitos da fotobiomodulação na adesão e proliferação das células-tronco da papila apical humana em *scaffold* de quitosana com incorporação de coágulo sanguíneo. Estudo *in vitro*

Versão Corrigida

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

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.

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

Abe, Gabriela Laranjeira.

Efeitos da fotobiomodulação na adesão e proliferação das células-tronco da papila apical humana em *scaffold* de quitosana com incorporação de coágulo sanguíneo. Estudo *in vitro*/ Gabriela Laranjeira Abe ; orientador Marcia Martins Marques -- São Paulo, 2016.

85 p. : fig., 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. Quitosana. 2. Células-tronco mesenquimais. 3. Fotobiomodulação. 4. Coagulação sanguínea. I. Marques, Marcia Martins. II. Título.

Abe GL. Efeitos da fotobiomodulação na adesão e proliferação das células-tronco da papila apical humana em *scaffold* de quitosana com incorporação de coágulo sanguíneo. Estudo *in vitro*. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: 06 / 09 /2016

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). Celso Luiz Caldeira

Instituição: FOUSP

Julgamento: Aprovada

Prof(a). Dr(a). Juliana Marchi

Instituição: UFABC

Julgamento: Aprovada

Prof(a). Dr(a). Flávia Gonçalves

Instituição: UNIB

Julgamento: Aprovada

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, que amo profundamente, que admiro, que me inspiram e por quem eu faço tudo que faço. Aos meus avós, que são anjos enviados dos céus para cuidar de mim, moram no meu coração e os amo sem limites. Ao meu irmão, que sempre me apoia, me escuta, e que é a minha mais honesta amizade, te amo! À minha tia Kiyoko, por ser um exemplo de caráter e por me ajudar em tudo que pode, como se filha sua eu fosse. A Gabriel, por ser a melhor companhia nos momentos mais difíceis e pelo apoio incondicional que me deu. E a toda a minha família e amigos, sem seu apoio eu não teria a confiança necessária para correr atrás dos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, órgão de fomento de meu mestrado (processo 2014/25281-5).

À **Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo**, pela infraestrutura disponibilizada.

Ao **Nucel** e à **Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar** pela disponibilização de infraestrutura para a condução dos experimentos de Curva de Crescimento e Dobra Populacional, e em especial aos seus alunos **Túlio** (doutorando) e **Marcos** (pós-doutorando).

À **Renata Rossetti**, responsável pelo laboratório de Citometria de Fluxo Instituto de Ciências Biomédicas - USP, pelo fundamental apoio na caracterização da linhagem celular utilizada neste estudo.

Ao **Professor Dr. Victor Arana** e à **Dra. Karen Fukushima**, pelo fundamental apoio na obtenção das micrografias de varredura dos materiais utilizados neste estudo.

Aos **professores de Dentística**, pelas lições acadêmicas e por compartilhar com toda a boa vontade os conhecimentos que acumulam e o espírito da docência.

Aos **funcionários do Departamento de Dentística**, que estão prontos a nos acudir a qualquer momento. Especialmente o **Sr. Aldo**, que sempre nos deixa lanchinhos para as noites longas no laboratório! À **Selminha**, que é um anjo enviado dos céus, sempre cheia de boa vontade e simpatia! E à **Soninha**, pela ajuda incondicional!

A toda a **Equipe do Laboratório de Pesquisa Básica**, por fazer o nosso ambiente de trabalho e estudo muito mais agradável e divertido. Especialmente às minhas companheiras diárias **Ana Clara** e **Paula**, que tanto me ajudaram no desenvolvimento deste trabalho. À nossa querida **Débora**, que cuida de todos nós como se fossemos seus filhos. E à **Stella**, por todo o suporte e ajuda constante.

A todos os **amigos de pós-graduação**, que me inspiraram quando eu era recém chegada e que, entra um sai outro, perpetuam o companheirismo e a paixão pela odontologia. Especialmente **Brunna, Sávio, Carlos, Paula, Tamile** e **Éric**, com os quais tive a sorte de estreitar os laços e aprender muito sobre as coisas mais simples.

*“Não viso a enrijecer! Sentir não temo,
É estremecer do homem o bem supremo;
Por alto que lhe cobre o preço o mundo,
Estremecendo, o Imensurável sente a fundo.”*

Fausto, de Goethe.

RESUMO

Abe GL. Efeitos da fotobiomodulação na adesão e proliferação das células-tronco da papila apical humana em *scaffold* de quitosana com incorporação de coágulo sanguíneo. Estudo *in vitro* [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2016. Versão Corrigida.

Revascularização é uma técnica utilizada em dentes jovens, que apresentem rizogênese incompleta e danos irreversíveis ao tecido pulpar, necessitando de tratamento endodôntico, para formar novo tecido em lugar da polpa perdida. Clinicamente os resultados mostram a continuidade da rizogênese e a devolução da vitalidade dental. Porém, pouco se sabe sobre o novo tecido formado e não está estabelecido se este é capaz de desempenhar todas as funções da polpa dentária. Para melhorar as características do tecido formado pela técnica da revascularização, podemos utilizar ferramentas de engenharia tecidual, como células-tronco, fatores de crescimento e arcabouços de sustentação celular (*scaffolds*). As células-tronco (CTs) já estão presentes quando o sangue invade o canal radicular, e utilizar essa reserva de CTs que o hospedeiro possui, procedimento conhecido como *homing*, é uma vantagem em comparação com outras técnicas que injetam CTs obtidas por cultivo em laboratório. Entretanto os aspectos físicos do coágulo sanguíneo formado no interior do canal radicular podem ser melhorados com a adição de hidrogel de quitosana, que interage quimicamente com o sangue e forma um *scaffold* híbrido mais estável. Então, o objetivo deste estudo foi testar a hipótese de que o *scaffold* híbrido, composto por hidrogel de quitosana e sangue, ofereceria maior estabilidade física estrutural, bem como condições favoráveis à adesão e proliferação de células-tronco da papila apical humana (SCAPs; do inglês, *Stem Cell from Apical Papila*). Para isso, investigamos *in vitro* se a incorporação do sangue ao hidrogel de quitosana gera um *scaffold* mais estável, se este é favorável à adesão e proliferação de células-tronco da papila apical e se a fotobiomodulação potencializa essas características celulares. Para isso, SCAPs foram isoladas e caracterizadas por citometria de fluxo, tempo de dobra populacional, e contagem de unidades formadoras de colônias fibroblásticas (CFU-F; do inglês, *Colony Forming Units - Fibroblastic*). Ensaios de incorporação sanguínea, dissolução e embebição foram realizados para determinar o comportamento dos

scaffolds híbridos. A adesão celular foi observada pela coloração PKH26® (do inglês, *Red Fluorescent Cell Linker*) e por microscopias eletrônicas de varredura (MEV); e a proliferação foi investigada pelo ensaio de *AlamarBlue*®. Adicionalmente, a sobrevivência das SCAPs após a degradação do *scaffold* híbrido foi avaliada pela coloração *Live/Dead*®. A população celular estudada apresentou características de células tronco. O *scaffold* híbrido, constituído de densa rede alveolar com poros interconectados, embebeu e dissolveu rapidamente. De acordo com o PKH26® e *AlamarBlue*® SCAPs aderiram e proliferaram no *scaffold* híbrido. SCAPs fotobiomoduladas exibiram maior taxa de proliferação e o ensaio *Live/Dead*® mostrou células vivas após 12 dias de cultivo. Concluiu-se que o *scaffold* híbrido apresenta biocompatibilidade e condições favoráveis de sobrevivência para SCAPs, que são potencializadas pela fotobiomodulação.

Palavras-chave: Quitosana. Células-tronco mesenquimais. Fotobiomodulação. Coágulo sanguíneo.

ABSTRACT

Abe GL. Effects of photobiomodulation on adhesion and proliferation of stem cells from human apical papilla in chitosan scaffold with blood clot incorporation. *In vitro* study [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2016. Versão Corrigida.

Revascularization is a technique used to form a new tissue, replacing the lost pulp, in young permanent teeth presenting incomplete rhizogenesis and irreversible damage, where endodontic treatment is needed. Clinically, the results show the continuity of the root formation and the return of dental vitality. However, little is known about the newly formed tissue and it has not been established if it is able to perform all functions of the dental pulp. To improve the characteristics of the newly formed tissue by the technique of revascularization, tissue engineering tools can be used, represented by stem cells, growth factors and scaffolds for cell supporting. Stem cells (SCs) are already present when the blood invades the root canal, and to use this SCs reserve that the host possesses, procedure known as homing, is an advantage compared with other techniques that inject SCs obtained by cultivation in the laboratory. However the physical aspects of blood clot in the root canal can be improved with the addition of chitosan hydrogel that chemically interacts with the blood and forms a more stable hybrid scaffold. So the aim of this study was to test the hypothesis that the hybrid scaffold, composed of hydrogel chitosan and blood clot, provides greater structural physical stability as well as favorable conditions for adhesion and proliferation of Stem Cells from Apical Papilla (SCAPs). For this, we investigated *in vitro* if the incorporation of blood to chitosan hydrogel, generates a more stable scaffold and if it supports the stem cell adhesion and proliferation, in addition, if photobiomodulation potentiates these cell characteristics. For this, SCAPs were isolated and characterized by flow cytometry, population doubling time, and counting colony forming units - fibroblastic (CFU-F). Blood incorporation assays, dissolution and swelling were conducted to determine the behavior of hybrid scaffolds. Cell adhesion was observed by PHK26® (Red Fluorescent Cell Linker) and scanning electron microscopy (SEM); and proliferation was investigated by alamarBlue® assay. In addition, the survival of SCAPs after degradation of the scaffold was assessed by Live/Dead® staining. The cell population showed stem cell characteristics. The

hybrid scaffold, constituted of dense cellular network with interconnected pores, soaked and dissolved quickly. According to PKH26[®] and alamarBlue[®] assays, the SCAPs adhered and proliferated in the hybrid scaffold. Photobiomodulation leads to SCAPs higher proliferation rate and the Live/Dead[®] test showed live cells after 12 days of cultivation. It was concluded that the hybrid scaffold is biocompatible and favors survival of SCAPs, which was enhanced by photobiomodulation.

Keywords: Chitosan. Mesenchymal Stem Cells. Photobiomodulation. Blood clot.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Do inglês <i>Analysis of Variance</i> (Análise de Variância)
BMP2	Do inglês <i>bone morphogenetic protein 2</i> (proteína morfogenética óssea 2)
CA	Estado da Califórnia, EUA
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CFU-F	Do inglês <i>Colony Forming Units-Fibroblastic</i> (unidades formadoras de colônia–fibroblástica)
CTs	Células-tronco
DE	Densidade de energia
DP	Dobra populacional
DPSCs	Do inglês <i>dental pulp stem cells</i> (células-tronco da polpa dentária)
EDTA	Do inglês <i>ethylenediamine tetracetic acid</i> (ácido etileno diaminotetracético)
EP	Eficiência de Plaqueamento
EUA	Estados Unidos da América
FGF-2	Do inglês, <i>Fibroblast Growth Factor</i> (fator de crescimento fibroblástico-2)
FITC	Do inglês <i>fluorescein isothiocyanate</i>
FBM	Do inglês, <i>Photobiomodulation</i>
FDA	Do inglês <i>Food and Drug Administration</i>
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
GMSC	Do inglês <i>mesenchymal stem cells derived from human gingiva</i>
InGaAlP	Do inglês <i>Indium Gallium Aluminum Phosphide</i> (Fosfeto de índio-gálio-alumínio)
IGF-1	Do inglês, <i>Insulin-like Growth Factor</i> (Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1)

iPSCs	Do inglês <i>induced Pluripotent Stem Cells</i> (células-tronco pluripotentes induzidas)
Laser	Do inglês <i>light amplification by stimulated emission of radiation</i> (amplificação da luz por emissão estimulada de radiação)
Ln	Logaritmo natural
MEC	Matriz Extra celular
MSC	Do inglês <i>mesenchymal stem cell</i> (células-tronco mesenquimais)
NIH	Do inglês <i>National Institutes of Health</i>
NY	Estado de New York, EUA
PBS	Do inglês <i>phosphate buffered saline</i> (tampão fosfato-salina)
PDGF	Do inglês, <i>Platelet Derived Growth Factor</i> (fator de crescimento derivado de plaquetas)
PDLSC	Do inglês <i>Periodontal Derived Ligament Stem Cells</i> (células-tronco do ligamento periodontal)
PKH26	Do inglês <i>red fluorescent cell linker kit for general cell membrane labeling</i>
SCAP	Do inglês <i>Stem Cells from the Apical Papilla</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
SHEDs	Do inglês <i>Stem cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth</i> (células-tronco de dentes decíduos esfoliados humanos)
SP	São Paulo
TGF- β	Do inglês <i>transforming growth factor-β</i> (fator de crescimento transformador beta)
USP	Universidade de São Paulo
VEGF	Do inglês, <i>vascular endothelial growth factor</i>
VC	Vitamina C (Ácidoascórbico)
α -MEM	Do inglês α - <i>Minimal Essential Medium</i> (Meio Mínimo Essencial α)

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
cm	Centímetro
cm ²	Centímetro quadrado
g	Força G
h	Hora
J/cm ²	Joule por centímetro quadrado
λ	Lambda (comprimento de onda)
M	Molar
µg/mL	Micrograma por mililitro
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
µM	Micromolar
mg/mL	Miligrama por mililitro
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
mW	Miliwatt
ng/mL	Nanograma por mililitro
nm	Nanometro
rpm	Rotações por minuto
U/mL	Unidades por mililitro
V	Volt
v/v	Volume por volume
x	Vezes
W	Watt
W/cm ²	Watt por centímetro quadrado

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1	Células-tronco	25
2.1.1	Células-tronco da papila apical humana	26
2.2	Fatores de crescimento	28
2.2.1	Paredes de dentina	28
2.3	Scaffolds	29
2.3.1	Hidrogel de quitosana	29
2.3.2	PuraMatrix®	30
2.3.3	Scaffold natural – coágulo sanguíneo	31
2.4	Fotobiomodulação (FBM)	33
3	PROPOSIÇÃO	35
4	MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1	Primeira fase	37
4.1.1	Preparo do hidrogel de quitosana	37
4.1.2	Preparo do PuraMatrix®	38
4.1.3	Preparo dos scaffolds híbridos	38
4.1.4	Ensaio de incorporação sanguínea	39
4.1.5	Ensaio de dissolução	40
4.1.6	Ensaio de embebição	40
4.1.7	Microscopia Eletrônica de Varredura	41
4.2	Segunda fase	41
4.2.1	Obtenção e isolamento das células da papila apical humana	41
4.2.2	Caracterização imunofenotípica das células isoladas da papila apical humana	43
4.2.3	Tempo de dobra populacional	45
4.2.4	Contagem de unidades formadoras de colônias - fibroblásticas	45
4.3	Terceira fase	46
4.3.1	Aplicação da terapia de fotobiomodulação	47

4.3.2	Ensaio de adesão e proliferação.....	48
4.3.2.1	Ensaio de proliferação com uso de <i>alamarBlue</i> ®	48
4.3.2.2	Ensaio de adesão com uso de PKH26®	49
4.3.2.3	Ensaio <i>Live/Dead</i> ®	49
4.4	Análise estatística	50
5	RESULTADOS	51
5.1.	Primeira fase	51
5.1.1	Ensaio de incorporação sanguínea	51
5.1.2	Ensaio de dissolução	52
5.1.1	Ensaio de embebição	52
5.2.	Segunda fase	53
5.2.1	Caracterização imunofenotípica das células isoladas da papila apical humana.....	53
5.2.2	Tempo de dobra populacional	54
5.2.3	Contagem de unidades formadoras de colônias - fibroblásticas.....	55
5.3.	Terceira fase	56
5.3.1	As SCAPs proliferaram nos <i>scaffolds</i>	56
5.3.2	As SCAPs mostraram adesão aos <i>scaffolds</i> quando observadas pela coloração PKH26® ou por microscopia eletrônica de varredura.....	58
5.3.3	As SCAPs mantiveram sua viabilidade após a completa degradação dos <i>scaffolds</i> híbridos.....	63
6	DISCUSSÃO.....	65
7	CONCLUSÃO	71
	REFERÊNCIAS	73
	ANEXOS	83

1 INTRODUÇÃO

A inflamação e a infecção persistentes, decorrentes da doença cárie, quando não tratadas culminam na perda da vitalidade do tecido pulpar. Esse tecido, depois de perdido, não é capaz de se regenerar e a alternativa terapêutica mais comum até o momento é o tratamento endodôntico. Tal tratamento consiste, em termos gerais, na limpeza mecânica seguida de desinfecção química dos canais radiculares do dente, para que ao final sejam preenchidos com material sintético que ocupa todo o espaço onde antes existia a polpa dentária.

Infelizmente, ainda não existem materiais capazes de desempenhar qualquer das funções biológicas da polpa dentária perdida. Então, o dente tratado endodonticamente não é capaz de produzir dentina terciária e nem de apresentar sensibilidade dolorosa caso acometido por nova lesão de cárie. Tanto a produção de dentina quanto a sensibilidade dolorosa são considerados fatores protetores do dente. O primeiro, por promover o distanciamento do tecido pulpar em relação à fonte agressora, a lesão crescente de cárie. O segundo, por fazer com que o paciente procure atendimento odontológico a tempo de evitar a completa destruição e perda do elemento dental pela lesão de cárie. Por fim, o dente tratado endodonticamente apresenta maior fragilidade estrutural contra traumas mecânicos, o que contribui para o aumento do risco de sua perda.

Em dentes jovens com rizogênese incompleta os danos podem ser ainda maiores já que a formação da raiz é interrompida com a perda da vitalidade do tecido pulpar. A deposição de dentina radicular interrompida resulta em finas paredes radiculares, então, ao final do tratamento endodôntico, essa condição de fragilidade se torna definitiva. Entretanto, o momento fisiológico de intenso metabolismo celular e diferenciação tecidual na região apical do dente com rizogênese incompleta pode ser aproveitado para favorecer a gênese de um tecido similar à polpa, novo, que preencha o interior dos canais radiculares. Existem protocolos clínicos para casos como esse onde, após limpeza e desinfecção dos canais radiculares, é provocado o sangramento dos tecidos periapicais e perirradiculares.

Brevemente, utiliza-se lima endodôntica além do ápice radicular para promover a invasão do sangue para o canal radicular vazio, procedimento conhecido como revascularização.

Estudos tem mostrado que após certo tempo existe a formação de novo tecido no interior do canal radicular. Entretanto, nestes casos a polpa perdida não pode ser considerada como regenerada, já que o tecido formado não é uma reprodução exata da polpa dentária normal, apresentando-se de forma desorganizada e descaracterizada. As análises histológicas deste novo tecido encontraram alta deposição de fibras colágenas, e não o tecido conjuntivo frouxo de que é formada a polpa dental. Também nota-se expressiva formação de matriz mineralizada ao longo das paredes de dentina, mais similar a cemento do que à dentina propriamente. Por fim, encontram-se também ilhas de depósitos minerais no interior do tecido fibroso.

A composição e distribuição celular da polpa dentária são fundamentais para que este tecido seja capaz de desempenhar suas funções protetoras: a produção de dentina terciária e a sensibilidade dolorosa. Em outras palavras, ser capaz de defender-se contra injúrias e desafios que o dente está constantemente exposto no meio bucal, como por exemplo, a cárie. Portanto, a regeneração do tecido pulpar perdido deveria buscar a perfeita reprodução das características histológicas do tecido pulpar sadio a fim de recriar as competências fisiológicas e funcionais da polpa dentária.

Nesse sentido, os avanços da engenharia tecidual podem ser uma ferramenta a favor da regeneração pulpar, e o uso de elementos como *scaffolds* (arcabouços), fatores de crescimento e células-tronco estão entre esses recursos. Em adição, e baseados em resultados de estudos *in vitro* realizados em nosso laboratório que utilizaram a terapia de fotobiomodulação (FBM) sobre células-tronco de polpa dentária, foi proposto que a FBM poderia ser um quarto elemento fundamental da tríade de regeneração tecidual (células-tronco, arcabouços e fatores de crescimento) favorecendo a interação destes elementos. Além desses estudos *in vitro*, existem estudos *in vivo* onde a FBM foi aplicada para induzir *homing* (recrutamento) de células-tronco dos tecidos periapicais e perirradiculares de molares de ratos onde a polpa dentária foi removida e preenchida por coágulo sanguíneo. O coágulo sanguíneo funciona como *scaffold* natural para sustentação celular. Este protocolo tem sido bem sucedido na formação de tecido similar à polpa, no entanto, isto não tem ocorrido de forma sistemática, o que nos levou a buscar alternativas para a regeneração pulpar.

Mesmo com a ação da FBM nos experimentos de regeneração pulpar em ratos, os achados histológicos ainda evidenciaram espécimes com falhas na composição do tecido formado. Esses achados sugerem que a instabilidade mecânica e contração do coágulo sanguíneo poderiam ser as causas desfavoráveis à organização e diferenciação tecidual. Para superar estes problemas, este estudo buscou investigar o uso conjunto de *scaffolds* capazes de interagir quimicamente com o sangue na melhoria das características físicas e biológicas do coágulo sanguíneo. Para isso, foram analisadas as características dos *scaffolds* puros ou associados ao coágulo sanguíneo (*scaffolds* híbridos), bem como o comportamento *in vitro* de células-tronco, quanto à sua adesão e proliferação quando cultivadas nestes *scaffolds*. Adicionalmente, foram avaliados os efeitos da FBM sobre as células-tronco cultivadas nos diferentes *scaffolds* visando à aplicação futura destes conjuntos em estudos translacionais *in vivo*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A engenharia tecidual é uma área interdisciplinar que aplica combinadamente conhecimentos das ciências biológicas, das interações entre os materiais e dos princípios de engenharia. Tudo para o desenvolvimento de soluções terapêuticas e substitutos biológicos que mantenham, melhorem ou restaurem tecidos perdidos (1-3). A tríade de componentes da engenharia tecidual é caracterizada por células-tronco; por fatores de crescimento que dirigem a diferenciação destas células para o tipo celular correspondente ao tecido perdido; e por *scaffolds* que fornecem o suporte físico, ou arcabouço, em três dimensões servindo como matriz extracelular temporária para o crescimento celular e regeneração tecidual (4). É da sintonia fina desses três elementos que depende o sucesso da regeneração tecidual.

2.1 Células-tronco

Células-tronco são definidas por suas duas principais características: autorenovação e capacidade de diferenciação (5). Podem ser de origem embrionária, quando obtidas do zigoto ou da massa celular interna do blastocisto; de origem adulta, encontradas em diversos tecidos do corpo humano; ou pluripotentes induzidas (iPSCs; do inglês, *induced Pluripotent Stem Cells*), quando obtidas a partir de células somáticas que são modificadas geneticamente para voltarem a ser indiferenciadas (6).

Entretanto, são mais frequentemente classificadas de acordo com seu potencial de desenvolvimento, onde se considera os tipos de tecidos que determinada célula é capaz de formar. Apenas o zigoto, e suas primeiras divisões celulares, são capazes de gerar todos os folhetos embrionários e extraembrionários, dando origem assim a um ser por completo e, portanto, chamadas de totipotentes (7). Mais adiante no desenvolvimento do zigoto, já na fase de blastocisto, as células da massa interna são capazes de se diferenciar em qualquer célula dos folhetos embrionários, mas não dos extraembrionários, e são chamadas de pluripotentes (5, 8). Já as células-tronco consideradas de origem adulta, e nelas se incluem as isoladas a partir do cordão umbilical de recém-nascidos, da placenta, ou mesmo dos

tecidos do próprio feto, são chamadas multipotentes. Estas células são restritas a gerar células diferenciadas compatíveis com o tecido de origem (9), por exemplo, as hematopoiéticas da medula óssea podem gerar outras células do sangue (10).

O uso de células-tronco humanas embrionárias, tanto totipotentes quanto pluripotentes, é permeado de discussões éticas devido à forma de obtenção destas células. Logo, na busca de alternativas para desenvolver modelos de estudos em animais, descobriu-se uma nova ferramenta, as iPSCs. Tal tecnologia consiste em reprogramar geneticamente células diferenciadas para que voltem a expressar características de célula-tronco (11). Entretanto, trata-se de uma abordagem onerosa e especializada, portanto células-tronco adultas multipotentes tem sido amplamente estudadas para uso em engenharia tecidual e terapia celular.

As células-tronco adultas podem ser encontradas em vários tecidos derivados dos três folhetos embrionários - ectoderma, mesoderma e endoderme (12, 13). As derivadas do mesoderma, ou mesenquimais, são as mais estudadas na odontologia (14-16). Entre os tecidos craniofaciais já foram localizados diferentes nichos de células-tronco mesenquimais como ligamento periodontal (17, 18), polpa dentária adulta (19, 20), ou de dentes decíduos exfoliados (21), osso mandibular(22) e papila apical (23, 24). Esta ultima tem sido extensamente utilizada como fonte progenitora nos tratamentos endodônticos pela técnica regenerativa, também chamada de revascularização (25-27), e será apresentada com mais detalhes a seguir.

2.1.1 Células-tronco da papila apical humana

A papila apical é originária do ectomesênquima, localiza-se apicalmente ao diafragma epitelial de dentes em desenvolvimento radicular (28) e é separada da polpa dentária por uma zona rica em células densamente povoada, mas possui menor vascularização que a polpa (29).

Na literatura não existem muitos estudos descritivos deste tecido, e a maioria dos encontrados são baseados em modelos de animais. Entretanto, Sonoyama et al. (24) realizaram análises imunoistoquímicas de terceiro molares humanos extraídos de pacientes

jovens, ainda com rizogênese incompleta, e identificaram a presença de células expressando STRO-1. Essa molécula é expressa na superfície de células-tronco mesenquimais humanas como as de medula óssea (BMMSCs, do inglês *Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells*) (30) e as de polpa dentária (DPSCs, do inglês *Dental Pulp Stem Cells*) (19), fato que levou os autores a acreditarem na existência de células-tronco mesenquimais residindo naquele tecido. Em seguida, (24) isolaram as células-tronco da papila apical (SCAPs; do inglês, *Stem Cells from Apical Papilla*), e caracterizaram-nas quanto ao seu potencial de proliferação e diferenciação, além da expressão de outros marcadores tronco em sua membrana celular.

SCAPs são mais proliferativas que BMMSCs, DPSCs e células-tronco do periodonto (PDLSCs, do inglês *Periodontal Derived Ligament Stem Cells*) (24, 31), e seu potencial de diferenciação parece ser maior que o de outras células-tronco de origem dentária, especialmente quanto à diferenciação odonto/osteogênica (31, 32). Teoricamente, como toda célula-tronco de origem mesenquimal, SCAPs são capazes de diferenciarem-se em qualquer célula especializada mesenquimal, mas não em células de outro folheto embrionário; e de fato na literatura não existem relatos de diferenciação endodérmica ou ectodérmica para SCAPs até o momento.

Entretanto, estudos já relacionaram alguns fatores de crescimento com a diferenciação odontogênica (27, 33), osteogênica (34), condrogênica (35), adipogênia (36) e neurogênica (37) de SCAPs; mostrando o vasto potencial destas células. Por exemplo, fatores como BMP-2 (do inglês, *Bone Morphogenetic Protein-2*), BMP4, VEGF (do inglês, *Vascular Endothelial Growth Factor*), TGF- β 1 (do inglês, *Transforming Growth Factor-beta 1*) e estrógeno estão associados ao aumento da diferenciação odontogênica de SCAPs *in vitro* (31, 38-41). Além dos fatores de crescimento, materiais dentários como o agregado de trióxido mineral (MTA; do inglês *Mineral Trioxide Aggregate*) e o hidróxido de cálcio se mostraram capazes de aumentar a migração e proliferação de SCAPs e ainda induzir a diferenciação (42, 43). Até mesmo o estresse mecânico já se mostrou capaz de induzir diferenciação das SCAPs (44).

2.2 Fatores de crescimento

Os fatores de crescimento são substâncias químicas, mais comumente do tipo protéicas, capazes de comandar certos comportamentos celulares. Esses sinais químicos são os responsáveis pela comunicação celular e são naturalmente produzidos por diferentes células do corpo (45, 46). Os fatores de crescimento, depois de produzidos pela célula, podem ter ação em algum sítio dentro da própria célula que o produziu, podem também ser secretados e causarem efeito sobre célula vizinha, ou ainda podem ser levados pela corrente sanguínea e gerarem um efeito distante do local onde foram produzidos.

2.2.1 Paredes de dentina

A dentina possui, encriptados em sua matriz mineral, fatores de crescimento como TGF- β , IGF-1 (do inglês, *Insulin-like Growth Factor-1*) e 2, FGF-2 (do inglês, *Fibroblast Growth Factor-2*), PDGF (do inglês, *Platelet Derived Growth Factor-1*), VEGF, BMP-7 entre outros (45, 46) que estão relacionados ao estímulo de diferenciação celular. Tal composição da dentina pode ser usada a favor da regeneração tecidual, servindo como fonte natural de fatores de crescimento.

De fato, quando realizados os protocolos para a técnica regenerativa, existem passos executados no intuito de expor esses fatores de crescimento presentes nas paredes de dentina. De modo geral, é realizada desinfecção do canal radicular pelo preparo químico-mecânico das paredes de dentina com limas endodônticas e substâncias capazes de expor a matriz mineral e, conseqüentemente, os fatores de crescimento nela contidos (47). Em seguida, o uso da lima endodôntica além do ápice radicular promove o sangramento dos tecidos perirradiculares para dentro do canal já tratado, trazendo consigo células-tronco de origens hematopoiéticas, mas principalmente mesenquimais da papila apical (26, 48). Assim, as células-tronco contidas no coágulo sanguíneo que entrarem em contato íntimo com as paredes de dentina estarão expostas à influência destes fatores, recebendo mais estímulos que as direcionem para diferenciação tecidual.

2.3 Scaffolds

Termo do inglês que significa arcabouço, *scaffolds* são estruturas temporárias que suportam células e fatores de crescimento durante a formação do tecido. À medida que as células cultivadas no *scaffold* proliferam, secretam enzimas que o degradam ao mesmo tempo em que produzem sua própria matriz extra-celular (MEC) (49). Assim, pode-se dizer que scaffolds são matrizes extra-celulares temporárias.

No universo dos *scaffolds*, que podem ser de origem natural ou sintética, e ainda biodegradáveis ou não-biodegradáveis, os hidrogéis tem se destacado no papel de substitutos temporários da MEC. Estes fornecem o arcabouço necessário à adesão e proliferação celular (49) sendo degradados e remodelados pelo novo tecido em formação. Os hidrogéis consistem em cadeia polimérica anfifílica, passível de manipulações detalhadas onde se pode determinar sua rigidez, trama das fibras, diâmetro dos poros e velocidade de degradação, e por isso tão empregados como arcabouço para engenharia tecidual (4, 50).

2.3.1 Hidrogel de quitosana

Dentre os polímeros naturais a quitina é o segundo mais abundante, atrás apenas da celulose, sendo o principal componente do exoesqueleto de artrópodes como os crustáceos. A quitosana, entretanto, só é encontrada naturalmente nas paredes celulares de alguns fungos, mas para fins comerciais é obtida a partir da deacetilação da quitina (51). O hidrogel de quitosana, então, consiste em polissacarídeos de cadeias lineares com diferentes proporções dos carboidratos 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopirranose e 2-amino-2-deoxi-D-glicopirranose, unidos por ligações glicosídicas $\beta(1 \rightarrow 4)$ variando de acordo com o grau de deacetilação (Roberts¹, 1992 apud Signini; Campana Filho, 1998 p. 63) (52).

A quitosana possui efeito antimicrobiano comprovado (53), e sua versatilidade vai desde bandagem para queimaduras até hemostáticos cirúrgicos e veículos para entrega de

¹ Roberts G. Chitin Chemistry. London: The Macmillan Press Ltd. 1992.

fármacos (54). Especialmente sua interação com o sangue tem sido estudada pela medicina, como alternativa ao controle de hemorragias cirúrgicas por potencializar a agregação plaquetária, servindo assim como hemostático (55, 56). Ao estudar a polimerização do hidrogel de quitosana quando misturado ao sangue, constatou-se que a solidificação da mistura ocorre através da coagulação envolvendo a geração de trombina, ativação plaquetária e polimerização da fibrina, formando um *scaffold* híbrido de fibrina e polissacarídeos que resiste à lise e é fisicamente mais estável que o coágulo normal (57). Seu uso em engenharia tecidual também já demonstrou o favorecimento da regeneração de tecidos cartilagosos (57, 58), endoteliais (59) e ósseos (60).

A estabilização do coágulo poderia então ser alcançada ao injetar e incorporar o hidrogel de quitosana no canal radicular preenchido pelo sangue, o que aumentaria também a adesão (61) às paredes de dentina. Além de manter o volume do coágulo, evitando a contração, o *scaffold* híbrido também pode prolongar a liberação dos fatores de crescimento TGF- β 1 e PDGF-AB, favorecendo a diferenciação celular (56).

2.3.2 PuraMatrix®

PuraMatrix® é um hidrogel sintético composto por 1% de peptídeos auto complementares iônicos e 99% de água. Estes peptídeos se apresentam em sequência repetitiva de arginina, alanina, aspartato e alanina (RADARADARADARADA ou RAD16) e sua característica anfifílica resulta na organização espontânea de uma estrutura com configuração beta, ou folha-beta, quando na presença de cátions monovalentes (62). Este hidrogel é comercializado e está disponível para uso em pesquisa, apresentando comportamento favorável à adesão, proliferação e diferenciação celular (63). Por ser considerado biomaterial de referência como *scaffold*, foi utilizado neste estudo para fins de comparação com o hidrogel de quitosana.

2.3.3 *Scaffold* natural – Coágulo sanguíneo

O reparo tecidual promove o restabelecimento da arquitetura e função dos tecidos após uma lesão. É sabido que alguns tecidos tem a capacidade de reestruturar partes lesadas ou perdidas e satisfatoriamente retornar ao seu estado normal; este processo constitui a regeneração. Se os tecidos lesados são incapazes de reconstituição completa ou se as estruturas de suporte do tecido estão danificadas gravemente, o reparo ocorre por deposição do tecido conjuntivo fibroso, processo chamado de cicatrização (64).

No tecido lesionado, o reparo ocorre inicialmente com a formação do coágulo sanguíneo. A trombina converte o fibrinogênio, uma proteína plasmática solúvel presente no sangue, em monômeros de fibrina que se polimerizam para formar um gel insolúvel. Os polímeros de fibrina são então estabilizados por ligações cruzadas e o gel envolve as plaquetas e outras células circundantes formando o tampão hemostático (65, 66).

O coágulo sanguíneo fornece a estrutura e suporte físico necessário à adesão, migração e proliferação celular que iniciam o reparo tecidual. Ele funciona como *scaffold* natural, sendo uma matriz extracelular temporária e é, aos poucos, degradado e substituído pela MEC secretada pelas células que o permeiam. O coágulo é rico em fatores de crescimento como TGF- β e VEGF (56, 67) que desempenham papel importante no tratamento para a revascularização dentária. Além disso, junto com o sangramento que é estimulado, diferentes tipos celulares são recrutados para o interior do canal radicular como células-tronco, que podem vir tanto da papila apical, do periodonto e até da corrente sanguínea (26, 48). Entretanto o coágulo sanguíneo reduz rápida e naturalmente até 50% de seu volume pela contração que sofre com o passar do tempo de coagulação (68-70). Isso se deve pelo mecanismo de contração celular que envolve filamentos de actina, miosina e outras moléculas presentes no citoplasma das plaquetas que se aglutinam no coágulo (71). Essa contração não é desfavorável ao processo de revascularização dentária, que pode ocorrer ainda assim, porém o contato do coágulo e das células-tronco contidas nele com as paredes de dentina do interior do canal radicular pode ser descontinuado em algumas áreas devido a essa contração. Caso o contato seja preservado haveria maior estímulo favorável à diferenciação celular.

A organização e funcionamento celular dos tecidos e órgãos são estudados com o propósito de nos aproximarmos do conhecimento científico necessário para sua criação exclusivamente *in vitro*, engenheiros pelo homem. O principal desafio da engenharia tecidual são os órgãos compostos por células especializadas, como a polpa dentária, que não possuem a capacidade de se regenerar quando perdidos. Nesta dificuldade residem os esforços da engenharia tecidual, e a utilização das células-tronco do próprio hospedeiro através do *homing* eliminaria a fase laboratorial de cultivo e manutenção da viabilidade celular, facilitando os procedimentos. As células-tronco da papila apical são o principal tipo celular, capazes de se diferenciar em tecido pulpar, recrutadas para o interior do canal radicular juntamente com o sangue e todos seus fatores de crescimento, e por isso foram escolhidas como células-alvo deste estudo.

Sabe-se que o coágulo sanguíneo e o hidrogel de quitosana são bastante parecidos estruturalmente, ambos são compostos por cadeia polimérica estabilizada pelas ligações cruzadas entre os polímeros, e quando misturados formam *scaffold* híbrido combinando suas propriedades físicas, químicas e biológicas. Tendo em vista as dificuldades e insucessos da revascularização em dentes com rizogênese incompleta, onde o tecido formado no interior do canal radicular tem características histológicas ainda distantes da polpa dentária normal, a incorporação do hidrogel de quitosana poderia melhorar de várias formas o coágulo e favorecer a diferenciação celular e a regeneração tecidual.

Em associação está a capacidade estimuladora da terapia de fotobiomodulação ao promover a migração e proliferação das células para dentro do *scaffold*, e a presença de fatores de crescimento nas paredes de dentina em contato com o *scaffold* híbrido poderia auxiliar na regeneração do tecido pulpar, resultando na devolução das competências fisiológicas e funcionais da polpa dentária, devolvendo ao dente sua capacidade de defesa contra injúrias e prevenindo a sua perda precoce. Nesse sentido, a investigação da adesão e proliferação de células cultivadas no *scaffold* híbrido e fotobiomoduladas torna-se relevante ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas de engenharia tecidual que envolvam o potencial regenerativo de células do próprio hospedeiro.

2.4 Fotobiomodulação (FBM)

Na terapia de fotobiomodulação (FBM) a absorção de fótons de laser aplicado em baixa intensidade provoca mudanças na configuração molecular dos fotorreceptores, causando alteração da sinalização intracelular (72). Quando esta luz é absorvida na célula pelos cromóforos endógenos (73) as modificações induzidas no fotorreceptor levam à produção de oxigênio singleto, a alterações no potencial de oxirredução, ao aumento transitório da temperatura entre outros eventos (72, 74).

A variedade de efeitos observados após a FBM, como a indução da expressão de fatores de crescimento (75), modulação da inflamação (76), estimulação da angiogênese e bioestimulação direta de células (39, 77-81), depende da combinação ideal dos parâmetros de irradiação e podem ser obtidas modificando-se o comprimento de onda, a dose e a intensidade de luz às quais as células são expostas. De fato, a FBM segue a lei de Arndt-Schultz, ou seja, doses muito baixas não causam efeito, dentro de uma janela terapêutica tem resultados estimuladores e em altas doses tem efeito inibidor (82). Estudos *in vitro* já mostraram desde aumento na migração de fibroblastos em cultura, utilizando dose de energia de 5 J/cm^2 , até queda da viabilidade e proliferação celulares com dano significativo à membrana celular e ao DNA quando altas doses foram utilizadas (10 e 16 J/cm^2) (83).

A FBM mostrou-se ainda capaz de aumentar a expressão e secreção de fatores de crescimento celular, como o fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF; do inglês, *Platelet-derived Growth Factor*) em fibroblastos (84); o TGF- β (do inglês, *Transforming Growth Factor Beta*) e VEGF (do inglês, *Vascular Endothelial Growth Factor*) em cardiomiócitos favorecendo a proliferação, diferenciação e formação de nódulos de mineralização (85); e ainda do bFGF (do inglês, *basic Fibroblast Growth Factor*) de fibroblastos em cultura (75). Esse aumento pode ser um dos mecanismos pelo qual o laser de baixa potência favorece a cicatrização. Além disso, a FBM é capaz de prevenir a morte celular (86), o que é de relevância no processo de regeneração tecidual.

Apesar de ainda pouco estudada em células-tronco, a FBM já demonstrou efeitos positivos, sendo que as doses bioestimulatórias se encontram na faixa de $0,5$ a 8 J/cm^2 . A irradiação de células-tronco derivadas de tecido adiposo com dose de 5 J/cm^2 resultou em

aumento da proliferação, viabilidade e expressão da molécula de adesão celular integrina b1 (87). Em células de medula óssea de ratos a irradiação com comprimento de onda de 635 nm e 0,5, 1, 2 e 5J/cm² também contribuiu significativamente para a proliferação celular (88). Em células-tronco de origem mesenquimal a FBM também tem mostrado resultados dependentes dos parâmetros de irradiação utilizados (89).

Em nosso grupo de pesquisa, observou-se que a irradiação com 3J/cm² e 5J/cm² de células-tronco da polpa submetidas a déficit nutricional promoveu proliferação significativa destas células, e essas mesmas energias tem sido utilizadas em nossos estudos *in vivo* com resultados promissores (39, 77, 90).

3 PROPOSIÇÃO

Na busca de *scaffold* alternativo ao coágulo sanguíneo puro, o objetivo deste estudo foi analisar as características físicas e biológicas de um *scaffold* híbrido, composto por hidrogel de quitosana e sangue. E avaliar os efeitos da fotobiomodulação na adesão e proliferação de células-tronco da papila apical humana quando cultivadas neste *scaffold* híbrido.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo obteve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (Seres Humanos) da Faculdade de Odontologia da USP (Parecer nº 981.086, CAAE: 40392214.5.0000.0075, Anexo A). A execução dos experimentos *in vitro* foi dividida em três fases. Na primeira fase, realizou-se preparo e caracterização dos *scaffolds*, tanto os puros quanto os híbridos, aqueles combinados com coágulo sanguíneo. Na segunda fase, as células-tronco da papila apical humana foram obtidas, isoladas e caracterizadas. E por fim, a análise da adesão e proliferação das células-tronco de papila apical quando cultivadas no *scaffold* de quitosana e no *scaffold* híbrido, sendo este último submetido ou não à terapia de fotobiomodulação (FBM). A descrição detalhada é apresentada a seguir.

4.1 Primeira fase

4.1.1 Preparo do hidrogel de quitosana

O hidrogel de quitosana foi gentilmente cedido a este estudo pelo Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP), com a colaboração da Professora Dra. Flávia Gonçalves. O biomaterial foi purificado e enviado ao Laboratório de Pesquisa Básica Prof. Edmir Matson do departamento de Dentística da FOUSP (LPBD), ainda na fase sólida (apresentação em pó), onde foi esterilizado em autoclave. Em seguida, o pó estéril (50 mg) foi dissolvido em solução de ácido clorídrico 0.1M (44,3 µL) (Synth, SP, Brasil) em água destilada estéril (4,5 mL). A dissolução se deu com auxílio de agitadores magnéticos à temperatura controlada de 4 °C. Ao fim deste processo, obteve-se um hidrogel de quitosana que era sempre armazenado a 4 °C em recipientes estéreis de vidro. Imediatamente antes de cada ensaio, a composição do hidrogel foi finalizada pela adição de reticulante

glicerofosfato, responsável por fazer as ligações cruzadas entre as cadeias poliméricas através de ligações covalentes, acrescido na proporção 4:1 (volume:volume).

Para melhor avaliar o desempenho do hidrogel de quitosana como *scaffold*, este foi comparado a um material já estabelecido como *scaffold* na literatura, o PuraMatrix® (BD Biosciences, MA, EUA) (63, 91).

4.1.2 Preparo do PuraMatrix®

PuraMatrix® é uma solução de aminoácidos (1% volume/peso) em 99% de água. Para uso em todos os ensaios deste estudo, o material foi diluído em água destilada estéril à concentração de 0,15%. Primeiramente, utilizou-se sonicação por 30 min a fim de reduzir a viscosidade inicial do PuraMatrix®. Em seguida, 150 µL do material foram adicionados a 850 µL de água destilada estéril, resultando em solução de trabalho de 0,15%. A cada ensaio com o PuraMatrix®, soluções frescas foram preparadas.

4.1.3 Preparo dos *scaffolds* híbridos

O coágulo sanguíneo foi obtido a partir do sangue de doador universal, do tipo O⁻ para padronizar os coágulos, e somente após o consentimento livre e esclarecido do doador. O sangue recém coletado era imediatamente incorporado ao hidrogel de quitosana (em sua composição final) ou ao PuraMatrix® (0,15%), por meio de agitação vigorosa, na proporção 3:1 (sangue:biomaterial), seguindo o protocolo de Iliescu et al.(61) modificado. Todos os procedimentos foram realizados em temperatura ambiente.

4.1.4 Ensaio de incorporação sanguínea (*Blood-Clotting Index* - BCI)

Para avaliar a compatibilidade dos biomateriais com a coagulação sanguínea, foram obtidos os BCIs de ambos *scaffolds* a partir do protocolo de Fan et al. (92) modificado. Para isso, os *scaffolds* híbridos foram preparados como descrito previamente e 500µL de cada *scaffold* híbrido foi gentilmente depositado no fundo de placa de cultivo celular de 6 poços, em triplicata, e mantidos em estufa a 37 °C por 10 min para permitir a coagulação do sangue. Após esse período, 2 mL de água destilada foram gentilmente adicionados a cada amostra, pelas paredes dos poços, visando não romper mecanicamente o coágulo. Logo em seguida, 1 mL da água destilada foi coletado de volta e transferido para tubo tipo Eppendorf para então ser centrifugado à 100 x *g* por 30 s. O sobrenadante foi coletado e incubado em estufa a 37 °C por 1 hora. Após esse período, 100 µL do sobrenadante de cada réplica foram distribuídos em placas de 96 poços e levados ao espectrofotômetro (Biotek II Biochrom Ltd., Eugendorf, Austria) para leitura de absorbância com filtro de 542nm. Como controle negativo, foram utilizados 500µL de sangue puro diluído diretamente em 2 mL de água destilada, sem que sua coagulação fosse permitida. Logo em seguida, 1 mL foi coletado, centrifugado e incubado como descrito previamente, para que então 100 µL do sobrenadante também fossem distribuídos em placas de 96 poços e levados ao espectrofotômetro.

Ao adicionar água aos *scaffolds* híbridos no fundo dos poços, e também ao sangue puro não coagulado, as hemácias não incorporadas ao material sofrem hemólise e a leitura em espectrofotômetro detecta a hemoglobina contida na solução (92).

O BCI foi calculado seguindo a equação:

$$BCI = \frac{100 \times (\text{absorbância da amostra})}{(\text{absorbância do controle negativo})} \quad (1)$$

Quanto maior o índice, menor a incorporação do sangue.

4.1.5 Ensaio de dissolução

Para o ensaio de dissolução, 500µL de cada *scaffold* foram incubados em duplicata em tubos tipo Eppendorf de 1,5 mL em banho termostático *overnight*. Em seguida, os tubos foram preenchidos com 1 mL de meio mínimo essencial α [α -MEM; do inglês, *α -Minimum Essential Medium*; (GIBCO, NY, EUA)] e a perda de peso após centrifugação das amostras (3.000 x g, 5 min, temperatura ambiente) foi medida em diferentes intervalos de tempo. A cada tempo experimental, após centrifugação, as amostras foram secas com papel filtro e pesadas. Em seguida, 1 mL de α -MEM era novamente adicionado ao tubo, o qual foi incubado a 37 °C. O perfil de dissolução foi medido pela porcentagem de perda de peso a cada intervalo de tempo utilizando-se a seguinte equação:

$$D = \frac{(P_0 - P_r) - (P_x - P_r) \times 100}{(P_0 - P_r)} \quad (2)$$

Onde, D é a porcentagem de dissolução do *scaffold*, P_0 o peso da amostra no tempo zero, P_r o peso do recipiente, e P_x o peso da amostra no tempo avaliado.

4.1.6 Ensaio de embebição (*Swelling*)

Para o ensaio de embebição, 500µL de cada *scaffold* foram incubados em duplicata em tubo tipo Eppendorf de 1,5mL em banho termostático *overnight*. Em seguida, os tubos foram preenchidos com 1 mL de α -MEM e incubados a 37 °C. A cinética de embebição dos *scaffolds* foi analisada por até 10 h. A cada intervalo de tempo, o peso dos espécimes embebidos foi medido após remoção do excesso de água da superfície dos materiais com papel filtro. A taxa de embebição foi calculada de acordo com a equação:

$$TE = \frac{P_t - P_0}{P_0} \quad (3)$$

Onde, TE é a taxa de embebição, e P_t e P_0 são os pesos da amostra embebida num dado momento e no tempo inicial, respectivamente.

4.1.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Com o intuito de visualizar a arquitetura do hidrogel de quitosana e do *scaffold* híbrido, amostras foram preparadas para microscopia eletrônica de varredura (MEV). Quinhentos microlitros (500 μ L) de cada *scaffold* foram transferidos para tubo tipo Eppendorf de 1,5 mL e deixados em banho termostático a 37 °C por 1 hora, a fim de que completassem sua gelificação ou coagulação. Em seguida, as amostras foram processadas pelo método de congelamento lento (93). Brevemente, os *scaffolds* foram incubados a 20 °C negativos por 3 h, em seguida a 80 °C negativos por 24 h. As amostras foram então imersas em nitrogênio líquido e liofilizadas por 48h. Após liofilização, foram montadas em bases metálicas sobre fitas adesivas condutoras, metalizadas com platina (25 nm de recobrimento) (SCD 050, BAL-TEC, Liechtenstein) e visualizadas em microscópio eletrônico de varredura (JEOL 5300, MA, EUA) no Laboratório de Biologia Oral da Faculdade de Odontologia da USP ou no microscópio eletrônico de varredura (QUANTA 600 FEG, FEI Company, OR, EUA) do Laboratório de Caracterização Tecnológica (LCT - Escola Politécnica da USP).

4.2 Segunda fase

4.2.1 Obtenção e isolamento das células da papila apical humana

Terceiros molares humanos que, ao exame radiográfico e clínico, apresentavam-se inclusos, livres de doenças periodontais e com rizogênese incompleta, foram coletados no curso de Especialização em Cirurgia da Fundação da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FFO-FOUSP). Três elementos dentais foram obtidos de três pacientes diferentes, dois do sexo masculino e um do sexo feminino, com idades entre 18-28 anos, saudáveis e sem condições sistêmicas relatadas. Todas as exodontias foram realizadas por indicação ortodôntica ou preventiva.

Culturas primárias de células da papila dentária foram obtidas de acordo com o protocolo de Sonoyama et al. (24) e Trevino et al. (94) modificados. Após exodontias os dentes foram transferidos do alvéolo diretamente para tubos de polipropileno (Corning Inc., NY, EUA) (Figura 4.1A) contendo α -MEM, suplementado com 15% de soro fetal bovino para células-tronco mesenquimais [MSC FBS; do inglês, *Mesenchymal StemCell-qualified Fetal Bovine Serum*; (GIBCO, NY, EUA)], 100 μ M de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich, MO, EUA), 2 mM de L-glutamina e 100 U/mL penicilina e 100 μ g/mL estreptomicina (todos GIBCO) e mantidos a 4°C, por período máximo de 4 h. Essa composição de meio de cultura foi nomeada Meio Clonogênico. Os dentes foram então transportados para o Laboratório de Pesquisa Básica Prof. Edmir Matson onde, em câmara de fluxo laminar, foram desinfetados com solução de iodopovidona a 10% (Icaraí, SP, Brasil) e lavados com tampão fosfato-salina (PBS; do inglês, *Phosphate Buffered Saline*). Após desinfecção e lavagem, a papila apical foi gentilmente destacada da raiz dentária, com auxílio de lâmina de bisturi, pinça delicada e tesoura afiada (Figura 4.1C), para ser fragmentada em porções menores que 0,5mm, e então dispostas em placas do tipo Petri (Corning Inc., NY, EUA) contendo Meio Clonogênico. Os fragmentos oriundos das papilas apicais (Figura 4.1D) de todos os pacientes foram dispostos em conjunto, de maneira a gerar linhagem do tipo *pool* de células.

Figura 4.1 – Fotografias do procedimentos para coleta das células da papila apical de dente com rizogênese incompleta. Transporte do dente recém extraído em meio de cultura a 4 °C (A). Dente com rizogênese incompleta e papilas apicais presentes (B). Uso de bisturi para destacar a papila apical (C). Papila apical separada do dente e posicionada sobre placa tipo Petri para ser fragmentada (D)

Os fragmentos, ou explantes, foram então mantidos em cultivo, incubados em estufas de CO₂ a 37°C, durante o tempo necessário (variando de 24 a 96 h) para que células começassem a migrar dos explantes para o fundo das placas de Petri (Figuras 4.2A-B).

Figura 4.2 - Fotomicrografias de fase de cultivo dos explantes (*) extraídos da papila apical de dentes permanentes. (A) Após 48 h de cultivo. (B) Após 72 h de cultivo. Notar células migrando dos explantes e organizando-se em monocamada contendo células em divisão (setas)

A medida que as células migravam dos fragmentos de tecido, e no momento em que já não se identificavam mitoses ocorrendo nas proximidades destes, foram realizados subcultivos no intuito de aumentar o número de células obtidas do explante. Para tal, utilizou-se solução de tripsina a 0,25% e EDTA a 0,1% (Sigma-Aldrich), por 2-5 min, a 37 °C. A primeira passagem celular foi denominada P0. Os subcultivos seguintes foram feitos até P3, sendo que a cada passagem foram congeladas alíquotas de $1-2 \times 10^6$ células cada. Essas alíquotas foram estocadas em freezer de nitrogênio líquido a 196 °C negativos, compondo assim o banco de células do estudo, para utilização nas posteriores fases.

Todos os procedimentos de cultivo celular foram realizados em capela de fluxo laminar seguindo os protocolos de manutenção de esterilidade de materiais e de soluções utilizadas.

4.2.2 Caracterização imunofenotípica das células isoladas da papila apical humana

Para identificar e caracterizar imunofenotipicamente a população celular cultivada foram utilizados anticorpos monoclonais contra as moléculas de superfície celular, segundo a Tabela 4.1. Alíquotas de células oriundas da papila dentária humana foram cultivadas até a obtenção de no mínimo 10^5 células para cada marcador de superfície a ser investigado. Todo protocolo de marcação foi realizado a 4 °C e as centrifugações a 550 x *g* por 5 min. Células em P3 foram lavadas duas vezes em PBS e colhidas com solução de enzima marinha com atividade colagenolítica e proteolítica (*StemPro Accutase*, GIBCO) por 10 min, sob agitação, para minimizar a degradação de antígenos de superfície. As células foram então coletadas, centrifugadas e ressuspensas em PBS contendo 5% de soro fetal bovino (SFB) a fim de proceder à contagem em câmara de Neubauer e distribuição do adequado número de células (10^5) por marcador. A incubação dos anticorpos primários (200:1) foi de 30 min a 4°C protegido da luz. Após esse período, as células foram lavadas com PBS contendo 5% SFB e os anticorpos secundários foram adicionados na mesma proporção (200:1) por mais 30 min. Finalmente, as células foram lavadas e ressuspensas em 200 µL de PBS contendo 5% SFB, filtradas para serem desaglomeradas por filtro com poros de 70 µm e levadas para análise.

Tabela 4.1 - Marcadores imunofenotípicos testados nas células oriundas da papila apical

Marcadores Positivos		Marcadores Negativos	
<i>Células indiferenciadas nicho perivascular</i>	<i>Células mesenquimais</i>	<i>Células endoteliais</i>	<i>Células hematopoiéticas</i>
CD146	CD105	CD14	CD45
STRO-1	CD90		

A população celular foi contada e classificada por citômetro de fluxo FACSCanto (BD Biosciences, CA, EUA) no Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas

da USP. Os dados foram analisados pelo programa 9.6.2 *FlowJo Software Version* (Tree Star, OR, EUA).

4.2.3 Tempo de dobra populacional

O tempo de dobra da população das células isoladas da papila apical foi determinado através da análise da curva de crescimento, obtida por contagem eletrônica do número de células. Células foram plaqueadas em placas de 6 poços (5×10^4 células por poço), em duplicatas, e cultivadas em Meio Clonogênico por 9 dias. Os tempos avaliados foram 1, 2, 3, 4, 7 e 9 dias. As células de cada poço foram coletadas com solução de tripsina a 0,25% e de EDTA a 0,1% (Sigma-Aldrich), imediatamente fixadas com solução de paraformaldeído (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 Bioscience, MA, EUA). 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 equação: logaritmo natural (Ln) de (número de células em 9 dias menos o número de células em 1 dia) dividido pelo Ln de 2.

$$\text{Dobra Populacional} = \frac{\text{Ln}(\text{n}^{\circ} \text{ de células final} - \text{n}^{\circ} \text{ de células inicial})}{\text{Ln}(2)} \quad (4)$$

4.2.4 Contagem de Unidades Formadoras de Colônias – Fibroblásticas (CFU-F; do inglês, *Colony Formation Units - Fibroblastic*)

Para a contagem do número de CFU-F, células em P2 foram plaqueadas em placas de 6 poços (200 células por poço), em quadruplicata, e cultivadas em Meio Clonogênico por 9 dias. Ao fim desse período, as células foram fixadas em solução de PFA a 4% e coradas com solução de azul de toluidina a 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 aplicado o cálculo da Eficiência de Plaqueamento (EP) pela seguinte equação:

$$\text{Eficiência de Plaqueamento (\%)} = \frac{\text{Números de colônias}}{\text{Número de células plaqueadas}} \times 100 \quad (5)$$

4.3 Terceira fase

Para os próximos ensaios células da papila apical foram ressuspensas em 1 mL dos diferentes *scaffolds* [hidrogel de quitosana, PuraMatrix® ou *scaffolds* híbridos (quitosana e sangue ou PuraMatrix® e sangue)] na densidade de 2×10^6 células/mL e plaqueados da seguinte maneira:

- para placas de 48 poços, 200 µL/poço
- para placas de 96 poços, 100 µL/poço

Após o plaqueamento, nos grupos onde as células estavam ressuspensas nos *scaffolds* puros, o Meio Clonogênico foi adicionado imediatamente. Nos grupos onde as células estavam suspensas nos *scaffolds* híbridos, o Meio Clonogênico só foi adicionado após 10 min, a fim de permitir a coagulação do sangue. As células foram então incubadas a 37 °C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ até o momento do experimento. A proliferação das células da papila apical nos *scaffolds*, irradiadas ou não, foi investigada em todos os grupos experimentais conforme dispostos na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 - Grupos experimentais para ensaio de proliferação

Grupo experimental	Composição	Densidade de energia
Hidrogel de Quitosana (Q)	Células cultivadas no hidrogel de quitosana em condições ideais de nutrição (meio completo)	não
PuraMatrix® (PM)	Células cultivadas no PuraMatrix® em condições ideais de nutrição (meio completo)	não
Scaffold híbrido de Quitosana e sangue (HQ)	Células cultivadas no HQ em condições de subnutrição (meio deficiente em SFB)	não
	Células cultivadas no HQ em condições de subnutrição (meio deficiente em SFB)	3 J/cm ²
Scaffold híbrido de PuraMatrix® e sangue (HPM)	Células no HPM em condições de subnutrição (meio deficiente em SFB)	não
	Células no HPM em condições de subnutrição (meio deficiente em SFB)	3 J/cm ²
Controle dos scaffolds híbridos (C)	Apenas <i>scaffolds</i> híbridos, sem células, em condições de subnutrição (meio deficiente em SFB)	não

4.3.1 Aplicação da terapia de fotobiomodulação (FBM)

Para a FBM foi utilizado equipamento laser de diodo de fosfeto de índio-gálio-alumínio (InGaAlP) (PhotonLase III DMC - Equipamentos, São Carlos, SP, Brasil), em baixa intensidade e modo de operação contínuo, pontual e em contato, aplicando-se parâmetros dosimétricos de acordo com a tabela 4.3.

Tabela 4.3 - Parâmetros de dosimetria das irradiações

Comprimento de onda (nm)	Potência (mW)	Área do feixe (cm ²)	Densidade de Potência (W/cm ²)	Tempo (s)	Densidade de Energia (J/cm ²)	Energia por Ponto(J)
660	20	0,028	0,71	4	3	0,08

Para evitar sobre-irradiações dos grupos experimentais nas microplacas, os poços adjacentes ao poço teste foram mantidos vazios. Para experimentos montados em placas de 96 poços, cada poço foi irradiado em um único ponto em cada sessão; para placas de 48 poços, cada poço foi irradiado em 3 pontos equidistantes em cada sessão. Nessa última situação, foi utilizada matriz metálica para garantir o posicionamento correto da placa de cultura e padronizar as irradiações sempre nos mesmos pontos.

As irradiações ocorreram em dias alternados (a cada 48 h) durante todo o período do experimento. A potência do equipamento foi verificada antes e após todas as sessões de irradiação, com auxílio de medidor de potência (LaserCheck, MM Optics Ltda., São Carlos, SP, Brasil). Não foram necessários ajustes dos parâmetros da irradiação através desse medidor, pois o valor no painel de controle do equipamento estava sempre compatível.

Sabe-se que as células respondem melhor à FBM quando estão cultivadas sob estresse oxidativo (77, 79, 95). Isso devido à ação da FBM de restabelecer a respiração celular, normalizando o seu metabolismo. Portanto, para reproduzir essa situação de estresse celular, a concentração de soro fetal bovino do meio de cultura foi diminuída (79) de 15 % para 5 %, criando ambiente de subnutrição e, em decorrência, estresse oxidativo.

4.3.2 Ensaios de adesão e proliferação

4.3.2.1 Ensaio de proliferação com uso de *alamarBlue*®

O *alamarBlue*® (Invitrogen, CA, EUA) é um indicador redox que produz alteração colorimétrica e um sinal de fluorescência em resposta à atividade metabólica. À medida que as células crescem, a atividade metabólica resulta na redução química do reagente, esta redução leva o indicador REDOX a mudar de oxidado (não fluorescente e azul) para reduzido (fluorescente e vermelho). Foi possível detectar tais variações do reagente utilizando o espectrofotômetro (Biotek II Biochrom Ltd.) pelo método da fluorescência, no comprimento de onda de excitação em 560 nm e de emissão em 590 nm.

O *alamarBlue*® é um reagente seguro e não tóxico, utilizado para análise quantitativa de viabilidade e proliferação celular. Para esse experimento, as células foram cultivadas por 1, 2 e 4 dias em placas de 96 poços, nos *scaffolds* puros e híbridos. Após cada período experimental, o reagente foi acrescentado ao poço na proporção 1:10 (volume:volume) e incubado a 37 °C por 4 h, protegido da luz. Ao fim do período de incubação alíquotas de 50 µL de cada poço foram transferidas para uma nova placa para então proceder à aquisição das medidas de fluorescência em espectrofotômetro. Tal abordagem foi necessária para evitar que a densidade ótica do sangue interferisse na excitação e emissão da fluorescência de cada poço.

4.3.2.2 Ensaio de adesão com uso de PKH26®

A adesão das células da papila apical ao hidrogel de quitosana e ao PuraMatrix® foi avaliada utilizando o *kit* fluorescente (PKH26 *assay kit*; Life Technologies, NY, EUA). Tal reagente se liga aos lipídeos da membrana citoplasmática, sem causar danos celulares, e quando excitado (550 nm) emite fluorescência vermelha (570 nm). Desta forma, as mesmas células puderam ser acompanhadas nos tempos experimentais 1, 2 e 4 dias. O microscópio de fluorescência [Ti S Nikon Inverted Microscope, NY, EUA (obtido com projeto FAPESP 2013/03864-6)] foi utilizado para observar as células cultivadas nos biomateriais.

Devido à densidade ótica dos *scaffolds* híbridos, que impossibilitou a passagem da luz fluorescente, não foi possível capturar nenhuma imagem para observar a adesão das células a estes *scaffolds*.

4.3.2.3 Ensaio Live/Dead®

O *kit* Live/Dead® (Molecular Probes/Life Technologies, NY, EUA) foi utilizado para avaliar qualitativamente a viabilidade das células da papila apical cultivadas no hidrogel de

quitosana após 9 dias de cultura. Em resumo, após lavagem com PBS, 10 μ L de etídio-homodímero-1 (2 μ M) e 5 μ L de calceína (2 μ M) em 10 mL de meio de cultura sem soro fetal bovino foram adicionados às células por 45 min a 37 °C. O microscópio de fluorescência (Ti S Nikon) foi utilizado para observar as células, as quais apresentavam fluorescência verde (células vivas) ou vermelha (células mortas).

4.4 Análise estatística

Após verificação da normalidade dos dados por Kolmogorov-Smirnov, a comparação entre as médias dos grupos foi realizada pelo teste de variância ANOVA complementado pelo teste de Tukey aonível de significância $\alpha = 0,05$. Quando pertinente, o teste t de Student foi utilizado para comparação entre duas médias de dados normais. Os dados quantitativos foram expressos como média $\pm$ desvio-padrão. O pacote estatístico utilizado foi o Graphpad Prism (GraphPad Software, CA, EUA).

5 RESULTADOS

5.1 Primeira fase- Avaliação dos *scaffolds* puros e híbridos

5.1.1 Ensaio de incorporação sanguínea (*Blood-Clotting Index - BCI*)

O coágulo sanguíneo incorporou-se aos biomateriais. O ensaio de incorporação sanguínea avalia atividade antitrombogênica de materiais no sangue humano (92). Essa atividade é quantitativamente expressa por um parâmetro relativo conhecido como índice de coagulação do sangue (BCI). De modo geral, quanto melhor a incorporação do sangue ao material, menos hemoglobina livre estará presente no meio, o que se traduz em menor índice de coagulação (92). A figura 5.1 ilustra graficamente os resultados deste ensaio. A quitosana incorporou significativamente mais sangue que o PuraMatrix®.

Figura 5.1 – Ilustração gráfica do índice de coagulação sanguínea (BCI) do PuraMatrix® e da quitosana. (*) Estatisticamente significativa ($p>0,01$)

5.1.2 Ensaio de dissolução

A incorporação de coágulo sanguíneo melhorou a estabilidade dos biomateriais. A caracterização da quitosana e do PuraMatrix® puros mostrou que ambos são materiais que se dissolvem rapidamente e quase por completo em meio de cultura até 96h (Figura 5.2). A quitosana apresentou dissolução progressiva até 72 h (cerca de 90 %) e então essa dissolução se manteve estável. Os *scaffolds* híbridos dissolveram menos que suas contrapartes puras. O *scaffold* híbrido de quitosana apresentou dissolução progressiva até 12 h (cerca de 60 %) quando, a partir deste tempo, se manteve estável. O *scaffold* híbrido de PuraMatrix® também teve dissolução progressiva porém, até 72 h (cerca de 70 %), quando a dissolução tornou-se estável. Até 96 h nenhum dos *scaffolds* híbridos foi totalmente dissolvido.

Figura 5.2 – Ilustração gráfica das porcentagens de dissolução dos biomateriais puros e híbridos em meio de cultura em função do tempo

5.1.3 Ensaio de embebição (*Swelling*)

A taxa de embebição foi crescente até as primeiras 10 h de análise para todos os materiais puros e híbridos (Figura 5.3). A quitosana apresentou as maiores taxas de embebição até 8 h, que foram significativamente diminuídas quando da incorporação do

sangue (*scaffold* híbrido). O PuraMatrix® apresentou as menores taxas de embebição durante todo o tempo experimental, e quando incorporado ao sangue (*scaffold* híbrido) essas taxas aumentaram.

Figura 5.3 – Ilustração gráfica das taxas de embebição dos biomateriais puros e híbridos em meio de cultura em função do tempo

5.2 Segunda fase - Isolamento e caracterização das células-tronco da papila apical humana

5.2.1 Caracterização imunofenotípica das células isoladas da papila humana

As células da isoladas da papila apical expressaram níveis típicos de marcadores de superfície de células-tronco mesenquimais. Os histogramas obtidos por citometria de fluxo mostraram positividade para marcadores de superfície de células-tronco mesenquimais, tais como CD105, CD90, CD146 e STRO-1 (Figura 5.4). As células também apresentaram ausência ou mínima expressão de marcadores de células hematopoiéticas (CD45) ou endoteliais (CD14).

Figura 5.4 – Histogramas da expressão dos marcadores de membrana. STRO-1 (7,56%), CD90 (93,64%), CD146 (97,83%), CD105 (99,45%), CD45 (0,34%) e CD14 (0,61%)

5.2.2 Tempo de dobra populacional

A curva de crescimento celular está graficamente representada na figura 5.5. As células-tronco da papila apical (SCAPs) cresceram até 7 dias, quando atingiram o *plateau*.

Figura 5.5 – Ilustração gráfica da curva de crescimento

A dobra populacional foi calculada baseada nos dados de contagem de células, como se segue:

$$\text{Dobra Populacional} = \text{Ln} (\text{n}^\circ \text{ células finais} - \text{n}^\circ \text{ células iniciais}) / \text{Ln} 2$$

$$\text{Dobra Populacional} = \text{Ln} (1.057.540 - 27.430) / \text{Ln} 2$$

$$\text{Dobra Populacional} = \text{Ln} (1.030.110) / \text{Ln} 2$$

$$\text{Dobra Populacional} \cong 13,84 / 0,69$$

$$\text{Dobra Populacional} \cong 19,97437$$

$$\text{Tempo de DP} \cong 20 \text{ h}$$

As SCAPs apresentaram dobra populacional aproximada de 20 h.

5.2.3 Contagem de Unidades Formadoras de Colônias – Fibroblásticas

As SCAPs foram capazes de formar colônias e possuem alta eficiência de plaqueamento. A figura 5.6 ilustra colônia de células da papila apical que foi evidenciada por coloração de azul de toluidina. Após 9 dias em cultura foi possível observar a formação de CFU-F em número médio de 57 por poço, representando uma eficiência de plaqueamento de 28 %.

Figura 5.6 – Fotomicrografia de colônia de SCAPs após 9 dias em cultura. (Azul de Toluidina; aumento original 100x)

5.3 Terceira fase - Análise da adesão e proliferação de SCAPs quando cultivadas no *scaffold* de quitosana e no *scaffold* híbrido, sendo este último submetido ou não à terapia de fotobiomodulação (FBM)

5.3.1 As SCAPs proliferaram nos *scaffolds*

Figura 5.7 – Ilustração gráfica da viabilidade celular pelo ensaio *alamarBlue*® no hidrogel de quitosana e no PuraMatrix® ao longo do tempo.(*) significativamente maior que o grupo PuraMatrix® no mesmo tempo experimental ($p<0,05$).(\$) significativamente maior que o tempo 24h no mesmo grupo ($p<0,05$)

SCAPs cultivadas em hidrogel de quitosana apresentaram crescimento significativo no último tempo experimental (Figura 5.7). Adicionalmente, o número de células na quitosana foi significativamente maior que aquele no PuraMatrix® a partir das 96 h. A quantidade de células viáveis cultivadas em PuraMatrix® se manteve estável durante todo o tempo experimental.

A figura 5.8 ilustra o metabolismo próprio das células naturais do sangue, presentes no coágulo sanguíneo. Entretanto, a viabilidade destas células sofre queda significativa ao longo do tempo, e de maneira similar tanto no *scaffold* híbrido de quitosana quando no híbrido de PuraMatrix®.

Figura 5.8 – Ilustração gráfica da viabilidade de células do sangue do doador ao longo do tempo. As células naturais do coágulo sanguíneo apresentaram queda significativa (*) ($p < 0,01$) de viabilidade celular de forma similar (a) nos dois *scaffolds* estudados

Figura 5.9 - Ilustração gráfica da viabilidade celular pelo ensaio *alamarBlue*® nos diferentes grupos ao longo dos tempos experimentais. Em 4 dias todos os grupos experimentais, exceto o **HQ+SCAPs** (§), apresentaram aumento significativo da viabilidade celular (*). Sendo que o grupo **HPM+SCAPs** apresentou valor de viabilidade significativamente maior que os demais grupos (a). O grupo **HPM+SCAPs+FBM** apresentou viabilidade significativamente menor que células crescidas no mesmo *scaffold*, mas sem terem sido submetidas à FBM (b). Para os grupos de quitosana as culturas submetidas à FBM (b) apresentaram aumento significativo de viabilidade celular em relação às culturas não irradiadas (c). Em 6 dias todos os grupos, exceto o **HQ+SCAPs**, apresentaram queda de viabilidade celular

A viabilidade de SCAPs cultivadas nos *scaffolds* híbridos de quitosana e de PuraMatrix®, fotobiomoduladas ou não, está representada na figura 5.9.

5.3.2 As SCAPs mostraram adesão aos *scaffolds* quando observadas pela coloração fluorescente PKH26® ou por microscopia eletrônica de varredura

A coloração com PKH26® vermelho fluorescente evidenciou a morfologia celular no hidrogel de quitosana e no PuraMatrix®. Em ambos, por se tratarem de estruturas tridimensionais, as células se apresentam circulares, em suspensão, diferentemente do formato estrelário ou fusiforme usualmente encontrado em cultivos bidimensionais (em monocamada) (Figuras 5.10 e 5.11). Em adição a microscopia eletrônica de varredura revelou a estrutura dos *scaffolds* híbridos e a presença de células aderidas. O hidrogel de quitosana apresentou organização porosa alveolar, e foi possível notar a malha de fibrina ao longo dos alvéolos do *scaffold*, bem como a morfologia circular das SCAPs (Figura 5.12). Já o PuraMatrix® apresentou organização porosa tubular, a presença da malha de fibrina é menos evidente neste *scaffold*, porém SCAPs também estavam aderidas a ele (Figura 5.13).

Figura 5.10 – Fotomicrografias de fluorescência de SCAPs cultivadas em hidrogel de quitosana por 24 h (A-C), 48h (D-F) e 96h (G-I). Aumentos de 40 x (A, D, G), 100 x (B, E, H) e 200 x (C, F, I). Notar a formação de *clusters* (F – seta branca) e célula aderida ao fundo do poço (C – seta azul)

Figura 5.11 – Fotomicrografias de fluorescência de células isoladas da papila apical cultivadas em PuraMatrix® por 24 h (A-C), 48 h (D-F) e 96 h (G-I). Aumentos de 40 x (A, D, G), 100 x (B, E, H) e 200 x (C, F, I). Notar a morfologia circular da célula (I – seta branca) estendendo sua membrana de maneira a aderir em maior área

Figura 5.12 – Eletromicrografias de varredura ilustrativas da estrutura do *scaffold* híbrido (hidrogel de quitosana e sangue). Aumentos de 500 x (A), 3000 x (B) e 10000 x (C). Notar malha de fibrina (setas brancas) e células isoladas da papila apical (setas azuis)

Figura 5.13 – Eletromicrografias de varredura da estrutura do *scaffold* híbrido (PuraMatrix® e sangue). Aumentos de 500 x (A), 3000 x (B) e 10000 x (C). Notar células isoladas da papila apical (setas azuis)

5.3.3 SCAPs mantiveram sua viabilidade após a completa degradação dos *scaffolds* híbridos

A coloração fluorescente pelo *kit Live/Dead*[®] mostrou que as células sobreviveram mesmo após a completa degradação dos *scaffolds* híbridos, por no mínimo 12 dias (Figura 5.12).

5.12 - Fotomicrografias de fluorescência das SCAPs após 12 dias de cultivo no *scaffold* híbrido de quitosana (A-C) e no *scaffold* híbrido de PuraMatrix[®] (D-E). Células marcadas em verde apresentam-se viáveis e pontos marcados em vermelho representam células mortas (aumentos originais 40 x). Etídio-homodímero-1 (A,D); calceína (B,E); sobreposições (C,F)

6 DISCUSSÃO

Dentes submetidos a tratamento endodôntico, que culmina em obturação dos canais radiculares, não são capazes de desempenhar todas as funções dos dentes vitais. Em dentes jovens com rizogênese incompleta os agravos deste tratamento são ainda maiores já que a formação da raiz é interrompida com a perda do tecido pulpar. Se por um lado materiais obturadores não são capazes de desempenhar qualquer das funções biológicas da polpa dentária perdida, por outro lado, as técnicas regenerativas como a revascularização tem demonstrado relativo sucesso na formação de um tecido no interior dos canais radiculares. É fato que estas técnicas permitem a continuidade da deposição mineral nas raízes em formação (96), porém a morfologia deste tecido formado e a característica do mineral nele depositado, que mais se aproxima do cimento que da dentina radicular, tem levado os pesquisadores a buscarem técnicas alternativas capazes de auxiliarem os processos regenerativos para formação de tecido similar à polpa original. De fato, nosso grupo de pesquisa já demonstrou formação de tecido com características histológicas e imunoistoquímicas muito similares às da polpa dentária quando associou engenharia tecidual baseada no *homing* de células-tronco com a terapia de fotobiomodulação (FBM) em molares de ratos. Porém, o *scaffold* natural (coágulo) utilizado neste estudo não se mostrou estável, demandando novas pesquisas na busca de *scaffolds* alternativos ao coágulo sanguíneo. Nesse sentido, este estudo propôs avaliar a adição do hidrogel de quitosana ao sangue humano buscando a formação de um biomaterial híbrido a fim de contornar a instabilidade do coágulo sanguíneo quando utilizado isoladamente na regeneração da polpa dentária. Adicionalmente, avaliou-se a adesão de SCAPs nos *scaffolds*, bem como sua proliferação quando fotobiomoduladas.

Para avaliar o desempenho do hidrogel de quitosana, o comparamos a um material já estabelecido como *scaffold*, o PuraMatrix®. O índice de coagulação sanguínea (BCI) de ambos os biomateriais demonstrou maior incorporação do sangue no hidrogel de quitosana comparativamente ao PuraMatrix®. Entretanto, o PuraMatrix® também se mostrou capaz de reter o coágulo, mesmo que menos eficientemente que a quitosana. A interação da quitosana com o sangue é capaz de aumentar a adesão e agregação plaquetária (55), o que consequentemente fortalece o tampão hemostático (coágulo), reduz o tempo de coagulação

e contribui para sua maior estabilidade física, pois está quimicamente ligado à estrutura da quitosana. A incorporação do sangue à quitosana não só melhorou a estabilidade do coágulo como também conferiu ao biomaterial maior resistência à degradação hidrolítica, quando incubado em α -MEM. O ensaio de dissolução demonstrou que a partir de 12 h o volume do *scaffold* híbrido se manteve, em comparação com a quitosana pura que continuou dissolvendo-se no α -MEM até quase que completamente às 96 h. O mesmo desfecho positivo ocorreu quanto à embebição, o sangue conferiu ao *scaffold* híbrido de quitosana menor embebição nas primeiras horas, porém, ao fim das 10 h as taxas de ambos (puro e híbrido) se igualaram. Chang et al. (97) também encontraram uma redução da taxa de embebição de hidrogéis quando misturados com o sangue. Esse comportamento do *scaffold* híbrido de quitosana pode ser vantajoso para sua aplicação em regeneração tecidual, pois as primeiras horas, até mesmo os primeiros minutos são determinantes para a adesão celular (98, 99) antes que ocorram as trocas de metabólitos com o meio circundante. Por outro lado, o *scaffold* híbrido de PuraMatrix® não mostrou este comportamento. Na verdade, o *scaffold* híbrido embebeu mais que o puro. Uma provável explicação para este achado seria pela falta de interação química entre o sangue e os componentes do PuraMatrix®, o que facilitaria o processo.

Tanto a quitosana quanto o PuraMatrix® podem ser considerados *scaffolds* de rápida degradação, visto que ao fim de 96 h, os puros se degradam quase que completamente. Essa característica está relacionada com seu grau de embebição e sua morfologia, que modulam o aumento e diminuição da difusão de líquidos nos biomateriais (49). Morfologias alveolares, tubulares e porosas como as observadas nos *scaffolds* deste estudo podem facilitar a difusão, contribuindo para a alta permeabilidade e pouca estabilidade *in vitro*. Por outro lado, essa morfologia é altamente favorável ao fornecimento de nutrientes e oxigênio às células contidas no *scaffold* (4, 50). Cabe ressaltar que a provável aplicação *in vivo* deste *scaffold* híbrido conta com o relativo isolamento oferecido pela câmara pulpar e canais radiculares, condição que pode diminuir a embebição e degradação sofridas pelo *scaffold* e prolongar sua presença como arcabouço de sustentação e nutrição celular.

Os hidrogéis puros de quitosana e PuraMatrix® possibilitaram a adesão de SCAPs à sua estrutura. Entretanto, no hidrogel de quitosana a adesão pareceu ser menos vigorosa, o que possibilitou que SCAPs migrassem no interior de sua estrutura e se aproximassem formando pequenos agregados celulares (*clusters*) em 48 h. No PuraMatrix®, por sua vez,

podemos observar células com extensões da sua membrana citoplasmática (evidenciadas pela coloração PKH26®) o que gera maior área de contato célula/*scaffold* e pode sugerir uma maior adesão. Porém, a formação de *clusters* nunca foi observada. O fato de células não estarem bem aderidas ou envolvidas pelo *scaffold* pode ser um problema para aplicações deste biomaterial em locais de alta vascularização, onde essas células podem não ficar retidas ao *scaffold* e deixarem o local via circulação (100). Mas, outra vez o fato de estarem contidas pelas paredes da câmara pulpar e canais radiculares pode fazer com que a porção de células perdidas seja menor, quando da sua aplicação nas técnicas de regeneração da polpa dentária. Em se tratando dos *scaffolds* híbridos, a densidade ótica que apresentavam por conta da incorporação do sangue não permitiu que fotomicrografias de fluorescência com a coloração PKH26® fossem obtidas. Por essa razão, utilizamos microscopia eletrônica de varredura (MEV) que revelou resultados em 24 h similares àqueles do PKH26®. As MEVs de ambos *scaffolds* mostraram células com morfologia globular, aderidas por prolongamentos de suas membranas citoplasmáticas.

A adesão das SCAPs aos *scaffolds* híbridos era esperada, uma vez que o sangue contém fibronectina plasmática, pertencente à família de glicoproteínas de elevado peso molecular, que se liga a receptores protéicos da membrana celular, chamados integrinas (71). A fibronectina apresenta, dentre muitos aminoácidos, a sequência RGD (do inglês, *arginyl-glycyl-aspartic acid*) tida como um dos fatores específicos de adesão celular (101). Portanto, um *scaffold* híbrido (com a incorporação de sangue) poderia favorecer a adesão celular fornecendo mais sítios específicos de adesão. De fato, os peptídeos que compõem o PuraMatrix® são bastante similares ao RGD, mas a adesão de células a este biomaterial não ocorre por essa via (RGD/integrinas) (62), e tentar incorporar essas moléculas aos biomateriais sintéticos de forma funcional ainda é um desafio (102).

O ensaio de *alamarBlue*® veio substituir o de PKH26®, uma vez que a substância fluorescente está no meio extracelular e pode ser medida em alíquotas dos meios de cultivo sobre as culturas, evitando a sobreposição de fluorescência do coágulo com a das SCAPs e, principalmente evitando a obstrução física que o próprio coágulo estabelece em cultura. Desta forma, foi possível observar aumento significativo da viabilidade celular somente de SCAPs crescidas em *scaffold* puros de quitosana. No *scaffold* puro de PuraMatrix® a viabilidade celular se manteve estável até 6 dias após o plaqueamento. É sabido que a densidade celular influencia na sua capacidade de sobreviver e proliferar dentro de

scaffolds. No presente trabalho utilizamos a mesma concentração do PuraMatrix®, bem como a densidade celular plaqueada nos *scaffolds* puros que as relatadas como ideais por Cavalcanti et al.(63). No entanto, esta densidade se mostrou mais adequada para o crescimento em hidrogel de quitosana, do que no próprio PuraMatrix®. Uma vez que nosso objetivo final era de estudar o comportamento das SCAPs nos *scaffolds* híbridos, decidimos manter estes parâmetros nos demais experimentos, mesmo que não se tenha observado crescimento significativo de SCAPs em PuraMatrix® da mesma forma que Cavalcanti et al. observou de DPSCs neste mesmo *scaffold* em seu estudo.

Com relação aos *scaffolds* híbridos (de quitosana e PuraMatrix®) notou-se que, nos grupos onde não havia SCAPs, as medidas de fluorescência do *alamarBlue*® diminuíram com o passar do tempo. Isso pode ser um indicativo de que o metabolismo das células contidas no sangue do doador (hemáceas, plaquetas, leucócitos, linfócitos, entre outras) também diminuiu. Estas células, por serem especializadas, dependem de nutrientes muito específicos que não estavam disponíveis no nosso meio de cultura regular (Meio Clonogênico), o que pode ter levado à queda do seu metabolismo. Mais ainda, são células que não sofrem divisão celular quando no sangue circulante de onde foram obtidas e, portanto, não tinham como aumentar seu número dentro do coágulo sanguíneo.

Se houve aumento da viabilidade celular quando as SCAPs foram plaqueadas em *scaffolds* puros, era de se esperar que nos grupos de *scaffolds* híbridos o mesmo ocorresse. Em especial, ainda baseados nos resultados em *scaffolds* puros, a fluorescência em *scaffolds* de quitosana deveriam ser maiores que aquelas dos *scaffolds* de PuraMatrix®. No entanto, não foram estes os achados do presente trabalho. Na verdade, o observado foi exatamente o oposto. SCAPs cultivadas em *scaffolds* híbridos de PuraMatrix®, independentemente de terem ou não sido bioestimuladas por FBM, aumentaram significativamente a sua viabilidade, ao menos até o quarto dia após o plaqueamento. Por outro lado, SCAPs crescidas em *scaffold* híbridos de quitosana apresentaram diminuição progressiva de viabilidade celular. Esse resultado só foi revertido pela FBM. Uma provável explicação para tal fenômeno deve residir na relação entre a quitosana pura com o sangue, já que houve maior incorporação do coágulo na quitosana do que no PuraMatrix®. A maior retenção de coágulo no *scaffold* híbrido de quitosana certamente ofereceu uma maior quantidade de fatores de diferenciação para estas células que neste caso tenderiam a diminuir sua capacidade proliferativa e aumentar as suas demandas nutricionais, o que poderia levar à

diminuição de viabilidade observada. Mais ainda, a presença física do coágulo poderia de alguma forma ter interferido na migração destas células, e em decorrência disto, as SCAPs permaneceriam aprisionadas nas áreas de adesão de forma que pela proximidade umas das outras ocorreria uma inibição de contato e consequentemente diminuição da viabilidade celular. Esta ideia é corroborada pelo achado de que a FBM aumentou a viabilidade das SCAPs crescidas no *scaffold* híbrido de quitosana. De fato, a FBM é capaz de induzir migração de células em estresse oxidativo (103) o que poderia ter revertido os efeitos do coágulo na migração das SCAPs. Mais ainda, os efeitos benéficos desta terapia sobre células e tecidos tem sido amplamente apresentados na literatura.

Outro achado interessante foi o aumento significativo da viabilidade das SCAPs crescidas em *scaffold* híbrido de PuraMatrix®, diferentemente do que ocorreu com o PuraMatrix® puro. Na verdade, apesar de o *AlamarBlue*® ser um ensaio de fluorescência, onde a emissão de brilho fluorescente da amostra é detectada por sensores do espectrofotômetro, é importante considerar que a turbidez da amostra pode influenciar na aquisição das medidas. Quando as células são cultivadas em *scaffolds*, parte do seu metabolismo resulta na liberação de enzimas que os degradam lentamente em processo de remodelação do microambiente. Simultaneamente, produzem a própria MEC iniciando assim a formação e organização do novo tecido. Então, nos grupos de *scaffolds* híbridos onde havia SCAPs, estas os degradavam, liberando tanto metabólitos quanto restos estruturais para o meio. De fato, Chang e colaboradores (97), quando estudaram a proliferação de células progenitoras cardíacas cultivadas em *scaffold* híbrido (ácido hialurônico e sangue) detectaram maior liberação de proteínas para o meio nos grupos de *scaffold* com células comparados ao *scaffold* sem células. Tais proteínas livres no meio podem ser responsáveis pela modificação na turbidez das amostras, o que poderia causar medidas de fluorescência não exatas. Adicione-se a esta degradação, o fato do PuraMatrix® ter iniciado sua dissolução mais precocemente que a quitosana e ter incorporado menos sangue que este *scaffold*, fatores que combinados poderiam produzir maior turbidez do meio de cultura para os grupos de *scaffold* híbrido de PuraMatrix®. Em outras palavras, essa degradação do PuraMatrix® deve ter sido de relevância na determinação da turbidez do meio.

Após a completa degradação dos *scaffolds* puros, aos 12 dias, quando não mais se observavam vestígios de suas estruturas, a coloração pelo *kit Live/Dead*® evidenciou a

sobrevivência das SCAPs em cultivo. Ao considerarmos a aplicação clínica do hidrogel de quitosana para compor um *scaffold* híbrido ao ser combinado com o sangue local, esperamos que até o momento de sua completa degradação as células já tenham sido capazes de estabelecerem suas colônias bem como condições de sobrevivência. Outros estudos já demonstraram que o cultivo em *scaffolds* é capaz de fornecer o suporte temporário para tal (39).

Novas condutas para entender o comportamento dos *scaffolds* híbridos e das células cultivadas neles se fazem necessárias. Entretanto, o presente estudo mostrou que a utilização deste *scaffold* híbrido em futuros estudos *in vivo* é promissora e o modelo de revascularização *in vivo*, consolidado em nosso grupo de pesquisa, é o nosso próximo passo. Ademais, os efeitos da fotobiomodulação podem ser mais expressivos no tecido vivo em comparação ao *in vitro*.

7 CONCLUSÃO

O *scaffold* híbrido, composto por hidrogel de quitosana e sangue apresenta estabilidade física e favorece adesão e proliferação de SCAPs. E a fotobiomodulação, nos parâmetros utilizados no presente trabalho, favorece a proliferação de SCAPs cultivadas no *scaffold* híbrido.

REFERÊNCIAS²

1. Langer R, Vacanti J. Tissue engineering. *Science*. 1993 May; 260(5110):920–6. Review.
2. Skalak R, Fox CF. Tissue engineering. Proceedings of a workshop, held at Granlibakken; 1988 Feb. 26-29; Lake Tahoe, CA, Los Angeles:Liss; 1988.
3. Nerem RM. Cellular engineering. *Ann Biomed Eng*. 1991;19(5):529-45.
4. Lee KY, Mooney DJ. Hydrogels for tissue engineering. *Chem Rev*. 2001;101(7):1869-79.
5. De Los Angeles A, Ferrari F, Xi R, Fujiwara Y, Benvenisty N, Deng H, et al. Hallmarks of pluripotency. *Nature*. 2015;525(7570):469-78.
6. Reik W, Surani MA. Germline and pluripotent stem cells. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2015;7(11):a019422. doi: 10.1101/cshperspect.a019422.
7. Boroviak T, Nichols J. The birth of embryonic pluripotency. *Phil Trans R Soc B*. 2014;369(1657):20130541. doi:10.1098/rstb.2013.0541. Review.
8. Wu J, Belmonte JCI. Stem cells: A designer's guide to pluripotency. *Nature*. 2014;516(7530):172-3. doi: 10.1038/516172a
9. Reinke S, Dienelt A, Blankenstein A, Duda GN, Geissler S. Qualifying stem cell sources: how to overcome potential pitfalls in regenerative medicine? *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. 2014. doi: 10.1002/term.1923.
10. Denham M, Conley B, Olsson F, Cole TJ, Mollard R. Stem cells: an overview. *Current Protocols in Cell Biology*. 2005;23.1. 1-1. 18. doi: 10.1002/0471143030.cb2301s28.Review.
11. Ohnuki M, Takahashi K. Present and future challenges of induced pluripotent stem cells. *Phil Trans R Soc B*. 2015;370(1680):20140367. doi:10.1098/rstb.2014.0367
12. Weissman IL. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science*. 2000;287(5457):1442-6.
13. S Dhinsa B, N Mahapatra A, S Khan W. Sources of adult mesenchymal stem cells for ligament and tendon tissue engineering. *Current stem cell research & therapy*. 2015;10(1):26-30.

² De acordo com o Estilo Vancouver.

14. Park Y-J, Cha S, Park Y-S. Regenerative applications using tooth derived stem cells in other than tooth regeneration: a literature review. *Stem cells international*. 2015;2016. doi: 10.1155/2016/9305986.
15. Cao Y, Song M, Kim E, Shon W, Chugal N, Bogen G, et al. Pulp-dentin regeneration current state and future prospects. *J Dent Res*. 2015 Nov;94(11):1544-51. doi:10.1177/0022034515601658.
17. Seo B-M, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahimi J, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *The Lancet*. 2004;364(9429):149-55.
18. Athanassiou-Papaefthymiou M, Papagerakis P, Papagerakis S. Isolation and Characterization of Human Adult Epithelial Stem Cells from the Periodontal Ligament. *Journal of dental research*. 2015;94(11):1591-600. Doi: 10.1177/0022034515606401.
19. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000;97(25):13625-30.
20. Jo Y-Y, Lee H-J, Kook S-Y, Choung H-W, Park J-Y, Chung J-H, et al. Isolation and characterization of postnatal stem cells from human dental tissues. *Tissue engineering*. 2007;13(4):767-73.
21. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003;100(10):5807-12.
22. Lee B-K, Choi S-J, Mack D, Oh S-H. Isolation of mesenchymal stem cells from the mandibular marrow aspirates. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 2011;112(6):e86-e93. Doi: 10.1016/j.tripleo.2011.05.032.
23. Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo B-M, Zhang C, et al. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PloS one*. 2006;1(1):e79.
24. Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S, et al. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *Journal of endodontics*. 2008;34(2):166-71. Doi: 10.1016/j.joen.2007.11.021.
25. Neha K, Kansal R, Garg P, Joshi R, Garg D, Grover H-S. Management of immature teeth by dentin-pulp regeneration: a recent approach. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2011;16(7):e997-1004.
26. Lovelace TW, Henry MA, Hargreaves KM, Diogenes A. Evaluation of the delivery of mesenchymal stem cells into the root canal space of necrotic immature teeth after clinical

regenerative endodontic procedure. *Journal of endodontics*. 2011;37(2):133-8. Doi:10.1016/j.joen.2010.10.009

27. Shrestha S, Torneck CD, Kishen A. Dentin Conditioning with Bioactive Molecule Releasing Nanoparticle System Enhances Adherence, Viability, and Differentiation of Stem Cells from Apical Papilla. *Journal of endodontics*. 2016;42(5):717-23. doi:10.1016/j.joen.2016.01.026.

28. Katchburian E, Arana V. *Histologia e embriologia oral - texto , atlas , correlações clínicas*. 3a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2012.

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

30. Murray IR, West CC, Hardy WR, James AW, Park TS, Nguyen A, et al. Natural history of mesenchymal stem cells, from vessel walls to culture vessels. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2014;71(8):1353-74. doi: 10.1007/s00018-013-1462-6.

31. Chen K, Xiong H, Huang Y, Liu C. Comparative analysis of in vitro periodontal characteristics of stem cells from apical papilla (SCAP) and periodontal ligament stem cells (PDLSCs). *Archives of oral biology*. 2013;58(8):997-1006. doi:10.1016/j.archoralbio.2013.02.010.

32. Huang G-J, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *Journal of dental research*. 2009;88(9):792-806. doi:10.1177/0022034509340867.

33. Shrestha S, Diogenes A, Kishen A. Temporal-controlled dexamethasone releasing chitosan nanoparticle system enhances odontogenic differentiation of stem cells from apical papilla. *Journal of endodontics*. 2015;41(8):1253-8. doi: 10.1016/j.joen.2015.03.024.

34. Wang S, Mu J, Fan Z, Yu Y, Yan M, Lei G, et al. Insulin-like growth factor 1 can promote the osteogenic differentiation and osteogenesis of stem cells from apical papilla. *Stem cell research*. 2012;8(3):346-56. doi: 10.1016/j.scr.2011.12.005.

35. Wang J-J, Dong R, Wang L-P, Wang J-S, Du J, Wang S-L, et al. Histone demethylase KDM2B inhibits the chondrogenic differentiation potentials of stem cells from apical papilla. *International journal of clinical and experimental medicine*. 2015;8(2):2165.

36. Dong R, Yao R, Du J, Wang S, Fan Z. Depletion of histone demethylase KDM2A enhanced the adipogenic and chondrogenic differentiation potentials of stem cells from apical papilla. *Experimental cell research*. 2013;319(18):2874-82. doi:10.1016/j.yexcr.2013.07.008.

37. Lee J-H, Um S, Song I-S, Kim HY, Seo BM. Neurogenic differentiation of human dental stem cells in vitro. *Journal of the Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*. 2014;40(4):173-80. doi:10.5125/jkaoms.2014.40.4.173.
38. Li Y, Yan M, Wang Z, Zheng Y, Li J, Ma S, et al. 17beta-estradiol promotes the odonto/osteogenic differentiation of stem cells from apical papilla via mitogen-activated protein kinase pathway. *Stem cell research & therapy*. 2014;5(6):1. doi:10.1186/scrt515.
39. 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; 2015.
40. Chang H-H, Chang M-C, Wu I-H, Huang G-F, Huang W-L, Wang Y-L, et al. Role of ALK5/Smad2/3 and MEK1/ERK Signaling in Transforming Growth Factor Beta 1–modulated Growth, Collagen Turnover, and Differentiation of Stem Cells from Apical Papilla of Human Tooth. *Journal of endodontics*. 2015;41(8):1272-80. doi:10.1016/j.joen.2015.03.022.
41. Zhang W, Zhang X, Ling J, Wei X, Jian Y. Osteo-/odontogenic differentiation of BMP2 and VEGF gene-co-transfected human stem cells from apical papilla. *Molecular medicine reports*. 2016;13(5):3747-54. doi: 10.3892/mmr.2016.4993.
42. Yan M, Wu J, Yu Y, Wang Y, Xie L, Zhang G, et al. Mineral trioxide aggregate promotes the odonto/osteogenic differentiation and dentinogenesis of stem cells from apical papilla via nuclear factor kappa B signaling pathway. *Journal of endodontics*. 2014;40(5):640-7. doi: 10.1016/j.joen.2014.01.042.
43. Schneider R, Holland GR, Chiego D, Hu JC, Nör JE, Botero TM. White mineral trioxide aggregate induces migration and proliferation of stem cells from the apical papilla. *Journal of endodontics*. 2014;40(7):931-6. doi: 10.1016/j.joen.2013.11.021
44. Mu C, Lv T, Wang Z, Ma S, Ma J, Liu J, et al. Mechanical stress stimulates the osteo/odontoblastic differentiation of human stem cells from apical papilla via erk 1/2 and JNK MAPK pathways. *BioMed research international*. 2014;2014. doi:10.1155/2014/494378.
45. Roberts-Clark D, Smith A. Angiogenic growth factors in human dentine matrix. *Archives of Oral Biology*. 2000;45(11):1013-6.
46. Smith A, Scheven B, Takahashi Y, Ferracane J, Shelton R, Cooper P. Dentine as a bioactive extracellular matrix. *Archives of oral biology*. 2012;57(2):109-21. doi:10.1016/j.archoralbio.2011.07.008.
47. Zhao S, Sloan A, Murray P, Lumley P, Smith A. Ultrastructural localisation of TGF- β exposure in dentine by chemical treatment. *The Histochemical Journal*. 2000;32(8):489-94.

48. Martin G, Ricucci D, Gibbs JL, Lin LM. Histological findings of revascularized/revitalized immature permanent molar with apical periodontitis using platelet-rich plasma. *Journal of endodontics*. 2013;39(1):138-44. doi: 10.1016/j.joen.2012.09.015.
49. Zhu J, Marchant RE. Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds. *Expert review of medical devices*. 2011;8(5):607-26. doi: 10.1586/erd.11.27.
50. Hejčl A, Růžička J, Kapcalová M, Turnovcová K, Krumbholcová E, Přádný M, et al. Adjusting the chemical and physical properties of hydrogels leads to improved stem cell survival and tissue ingrowth in spinal cord injury reconstruction: A comparative study of four methacrylate hydrogels. *Stem cells and development*. 2013;22(20):2794-805. doi:10.1089/scd.2012.0616.
51. Aranaz I, Harris R, Heras A. Chitosan amphiphilic derivatives. *Chemistry and applications*. *Current Organic Chemistry*. 2010;14(3):308.
52. Signini R, Campana Filho SP. Purification and characterization of commercial chitosan. *Polímeros*. 1998;8(4):63-8. doi:10.1590/s0104-1428199800040000953.
53. Sudarshan N, Hoover D, Knorr D. Antibacterial action of chitosan. *Food Biotechnology*. 1992;6(3):257-72.
54. Riva R, Ragelle H, des Rieux A, Duhem N, Jérôme C, Préat V. Chitosan and chitosan derivatives in drug delivery and tissue engineering. *Chitosan for biomaterials II*: Springer; 2011. p. 19-44.
55. Chou TC, Fu E, Wu CJ, Yeh JH. Chitosan enhances platelet adhesion and aggregation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;302(3):480-3.
56. Okamoto Y, Yano R, Miyatake K, Tomohiro I, Shigemasa Y, Minami S. Effects of chitin and chitosan on blood coagulation. *Carbohydrate Polymers*. 2003;53(3):337-42.
57. Marchand C, Rivard G-E, Sun J, Hoemann C. Solidification mechanisms of chitosan-glycerol phosphate/blood implant for articular cartilage repair. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2009;17(7):953-60. doi: 10.1016/j.joca.2008.12.002.
58. Chen Z, Zhao M, Liu K, Wan Y, Li X, Feng G. Novel chitosan hydrogel formed by ethylene glycol chitosan, 1, 6-diisocyanatohexan and polyethylene glycol-400 for tissue engineering scaffold: in vitro and in vivo evaluation. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2014;25(8):1903-13.
59. Fu JH, Zhao M, Lin YR, Tian XD, Wang YD, Wang ZX, et al. Degradable Chitosan-Collagen Composites Seeded With Cells as Tissue Engineered Heart Valves. *Heart Lung Circ*. 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.hlc.2016.05.116>.

60. Douglas TE, Krok-Borkowicz M, Macuda A, Pietryga K, Pamula E. Enrichment of thermosensitive chitosan hydrogels with glycerol and alkaline phosphatase for bone tissue engineering applications. *Acta Bioeng Biomech*. 2016;18(2):51-7.
61. Iliescu M, Hoemann C, Shive M, Chenite A, Buschmann M. Ultrastructure of hybrid chitosan–glycerol phosphate blood clots by environmental scanning electron microscopy. *Microscopy research and technique*. 2008;71(3):236-47.
62. Thonhoff JR, Lou DI, Jordan PM, Zhao X, Wu P. Compatibility of human fetal neural stem cells with hydrogel biomaterials in vitro. *Brain research*. 2008;1187:42-51.
63. Cavalcanti BN, Zeitlin BD, Nör JE. A hydrogel scaffold that maintains viability and supports differentiation of dental pulp stem cells. *Dental Materials*. 2013;29(1):97-102. doi: 10.1016/j.dental.2012.08.002.
64. Contran R. Kumar y Robbins SL, Abbas AK, Fausto N. *Patologia-Bases Patológicas das doenças* 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005.
65. Ferreira CN, Sousa MdO, DUSSE L, Carvalho MdG. O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações. *Revis Bras Hematol Hemoter*. 2010;32(5):416-21.
66. Hoffman M. A cell-based model of coagulation and the role of factor VIIa. *Blood reviews*. 2003;17:S1-S5.
67. Nagy MM, Tawfik HE, Hashem AAR, Abu-Seida AM. Regenerative potential of immature permanent teeth with necrotic pulps after different regenerative protocols. *Journal of endodontics*. 2014;40(2):192-8. doi: 10.1016/j.joen.2013.10.027.
68. Cohen I, Gerrard JM, White JG. Ultrastructure of clots during isometric contraction. *The Journal of Cell Biology*. 1982;93(3):775-87.
69. Morgenstern E, Ruf A, Patscheke H. Ultrastructure of the interaction between human platelets and polymerizing fibrin within the first minutes of clot formation. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*. 1990;1(5):543-6.
70. White JG. Platelet secretion during clot retraction. *Platelets*. 2000;11(6):331-43.
71. Standring S. *Gray's Anatomia*: Elsevier Health Sciences Brazil; 2010.
72. Karu TI. Low-power laser therapy. In: Vo-Dinh T, editor. *Biomedical photonics handbook*. Boca Raton: CRC Press LLC; 2003. Chapter 48.

73. Gao X, Xing D. Molecular mechanisms of cell proliferation induced by low power laser irradiation. *Journal of biomedical science*. 2009;16(1):1. doi: 10.1186/1423-0127-16-4.
74. Xu X, Zhao X, Liu TC-Y, Pan H. Low-intensity laser irradiation improves the mitochondrial dysfunction of C2C12 induced by electrical stimulation. *Photomedicine and laser surgery*. 2008;26(3):197-202. doi: 10.1089/pho.2007.2125.
75. Damante CA, De Micheli G, Miyagi SP, 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. doi: 10.1007/s10103-008-0582-y.
76. Moreira MS, Velasco IT, Ferreira LS, Ariga SKK, Barbeiro DF, Meneguzzo DT, et al. Effect of phototherapy with low intensity laser on local and systemic immunomodulation following focal brain damage in rat. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2009;97(3):145-51. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2009.09.002>.
77. Eduardo FdP, Bueno DF, de Freitas PM, Marques MM, Passos-Bueno MR, Eduardo CdP, et al. Stem cell proliferation under low intensity laser irradiation: a preliminary study. *Lasers in surgery and medicine*. 2008;40(6):433-8. doi: 10.1002/lsm.20646.
78. Sousa LR, Cavalcanti BN, Marques MM. Effect of laser phototherapy on the release of TNF- α AND MMP-1 by endodontic sealer-stimulated macrophages. *Photomedicine and laser surgery*. 2009;27(1):37-42. doi: 10.1089/pho.2007.2220.
79. Pereira AN, Eduardo CdP, Matson E, Marques MM. Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. *Lasers in surgery and medicine*. 2002;31(4):263-7. doi: 10.1002/lsm.10107.
80. Fujihara NA, Hiraki K, Marques MM. Irradiation at 780 nm increases proliferation rate of osteoblasts independently of dexamethasone presence. *Lasers in surgery and medicine*. 2006;38(4):332-6. doi: 10.1002/lsm.20298.
81. Diniz IMA, Matos AB, Marques MM. Laser phototherapy enhances mesenchymal stem cells survival in response to the dental adhesives. *The Scientific World Journal*. 2015;2015. doi:10.1155/2015/671789.
82. Huang Y-Y, Chen AC-H, Carroll JD, Hamblin MR. Biphasic Dose Response in Low Level Light Therapy. 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2203/dose-response.11-009.hamblin>.
83. Hawkins DH, Abrahamse H. The role of laser fluence in cell viability, proliferation, and membrane integrity of wounded human skin fibroblasts following helium-neon laser irradiation. *Lasers in Surgery and Medicine*. 2006;38(1):74-83.

84. Yu W, Naim J, Lanzafame R. The effects of photo-irradiation on the secretion of TGF and PDGF from fibroblasts in vitro. *Lasers Surg Med Suppl.* 1994;6(8). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-1097.1994.tb05017.x>.
85. Khanna A, Shankar LR, Keelan MH, Kornowski R, Leon M, Moses J, et al. Augmentation of the expression of proangiogenic genes in cardiomyocytes with low dose laser irradiation in vitro. *Cardiovascular radiation medicine.* 1999;1(3):265-9.
86. Moreira MS, Velasco IT, Ferreira LS, Ariga SK, Abatepaulo F, Grinberg LT, et al. Effect of laser phototherapy on wound healing following cerebral ischemia by cryogenic injury. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* 2011;105(3):207-15.
87. Mvula B, Mathope T, Moore T, Abrahamse H. The effect of low level laser irradiation on adult human adipose derived stem cells. *Lasers in medical science.* 2008;23(3):277-82.
88. Peplow PV, Chung T-Y, Baxter GD. Laser photobiomodulation of proliferation of cells in culture: a review of human and animal studies. *Photomedicine and Laser Surgery.* 2010;28(S1):S-3-S-40. doi: 10.1089/pho.2010.2771.
89. Fekrazad R, Asefi S, Allahdadi M, Kalhori KA. Effect of Photobiomodulation on Mesenchymal Stem Cells. *Photomedicine and laser surgery.* 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1089/pho.2015.4029>.
90. Marques MM, Diniz IMA, de Cara SPHM, Pedroni ACF, Abe GL, D'Almeida-Couto RS, et al. Photobiomodulation of Dental Derived Mesenchymal Stem Cells: A Systematic Review. *Photomed Laser Surg.* 2016 Apr 8 [Epub ahead of print]. doi: 10.1089/pho.2015.4038.
91. Ting AC, Craft RO, Palmer JA, Gerrand Y-w, Penington AJ, Morrison WA, et al. The adipogenic potential of various extracellular matrices under the influence of an angiogenic growth factor combination in a mouse tissue engineering chamber. *Acta biomaterialia.* 2014;10(5):1907-18.
92. Fan L, Yang H, Yang J, Peng M, Hu J. Preparation and characterization of chitosan/gelatin/PVA hydrogel for wound dressings. *Carbohydrate polymers.* 2016;146:427-34. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.03.002>.
93. Santana BP, Nedel F, Perelló Ferrúa C, e Silva RM, da Silva AF, Demarco FF, et al. Comparing different methods to fix and to dehydrate cells on alginate hydrogel scaffolds using scanning electron microscopy. *Microsc Res Tech [Internet]. WileyBlackwell;* 2015 Apr 14;78(7):553–61. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/jemt.22508>.
94. Trevino EG, Patwardhan AN, Henry MA, Perry G, Dybdal-Hargreaves N, Hargreaves KM, et al. Effect of irrigants on the survival of human stem cells of the apical papilla in a platelet-rich plasma scaffold in human root tips. *Journal of endodontics.* 2011;37(8):1109-15. doi:10.1016/j.joen.2011.05.013.

95. Nara Y, Matono S, Morioka T. Regulatory action of low intensity lasers on mitogenesis of cultured lymphocytes using concanavalin. *Surg Med Lasers*. 1991;4(1):17-20.
96. Lin LM, Ricucci D, Huang GT. Regeneration of the dentine-pulp complex with revitalization/revascularization therapy: challenges and hopes. *Int Endod J*. 2014;47(8):713-24. doi: 10.1111/iej.12210.
97. Chang CY, Chan A, Armstrong P, Luo HC, Higuchi T, Strehin I, et al. Hyaluronic Acid-Human Blood Hydrogels for Stem Cell Transplantation. *Biomaterials*. 2012;33(32):8026-33. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.07.058.
98. Koga H, Shimaya M, Muneta T, Nimura A, Morito T, Hayashi M, et al. Local adherent technique for transplanting mesenchymal stem cells as a potential treatment of cartilage defect. *Arthritis Res Ther*. 102008. p. R84. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/ar2460>.
99. Freshney RI. Culture of specific cell types: Wiley Online Library; 2005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/0471747599.cac023>.
100. Diniz IM, Chen C, Xu X, Ansari S, Zadeh HH, Marques MM, et al. Pluronic F-127 hydrogel as a promising scaffold for encapsulation of dental-derived mesenchymal stem cells. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2015;26(3):1-10. doi: 10.1007/s10856-015-5493-4.
101. Ruoslahti E, Pierschbacher MD. Arg-Gly-Asp: a versatile cell recognition signal. *Cell*. 1986;44(4):517-8. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90259-x](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(86)90259-x).
102. Worthington P, Pochan DJ, Langhans SA. Peptide Hydrogels – Versatile Matrices for 3D Cell Culture in Cancer Medicine. *Front Oncol*. 2015;5. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2015.00092>.
103. Pelliccioli ACA, Martins MD, Dillenburg CS, Marques MM, Squarize CH, Castilho RM. Laser phototherapy accelerates oral keratinocyte migration through the modulation of the mammalian target of rapamycin signaling pathway. *Journal of biomedical optics*. 2014;19(2):028002-.Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1117/1.jbo.19.2.028002>

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Efeitos da laserfototerapia na adesão e proliferação das células-tronco da papila apical humana (SCAPs) em scaffold de quitosana com incorporação de coágulo sanguíneo. Estudo in vitro.

Pesquisador: Márcia Martins Marques

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 40392214.5.0000.0075

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 981.086

Data da Relatoria: 11/03/2015

Apresentação do Projeto:

Revascularização é uma modalidade de tratamento para dentes jovens, com rizogênese incompleta, que apresentam danos irreversíveis ao tecido pulpar. Clinicamente os resultados são animadores, pois mostram em alguns casos a continuidade da rizogênese e manutenção da vitalidade do dente. Entretanto, pouco se sabe sobre este novo tecido formado no interior dos canais radiculares. Não está estabelecido se este tecido é capaz de desempenhar as funções da polpa dentária saudável. Por outro lado, o uso da engenharia tecidual com a colocação de células-tronco, arcabouços e fatores de crescimento no interior dos canais radiculares traz outros problemas relacionados com a origem das células e os custos dos fatores de crescimento, entre outras dificuldades clínicas. Na tentativa de contornar este problema o homing de células-tronco do próprio hospedeiro e o uso de biomateriais que suportem a adesão e proliferação celular, como os scaffolds, facilitam a aplicabilidade clínica por eliminar passos laboratoriais como o cultivo de células in vitro. Nosso grupo de pesquisa tem resultados encorajadores com a aplicação do homing de células-tronco dos tecidos apicais em um arcabouço natural, o coágulo sanguíneo, porém este arcabouço não é estável. As SCAPs são capazes de se diferenciar nos tipos celulares específicos da polpa dental e são recrutadas para o interior do canal radicular quando o

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 981.086

sangramento dos tecidos perirradiculares é provocado. Para estabilizar o coágulo então formado, colocando-o em contato com as paredes de dentina do canal radicular, ricas em fatores de crescimento que dirigem a diferenciação celular, o scaffold de quitosana será incorporado. E para favorecer a adesão e proliferação destas células a laserfototerapia será associada pelo seu papel bioestimulatório, mantendo a viabilidade celular.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo deste estudo é avaliar o comportamento das SCAPs, quanto a sua adesão e proliferação, quando cultivadas em scaffold de quitosana puro ou com incorporação do coágulo sanguíneo, sendo ainda este último bioestimulado com laserfototerapia ou não. Os dados numéricos serão comparados estatisticamente por teste a ser definido pela análise da normalidade dos resultados, enquanto os dados de morfologia serão apresentados de forma qualitativa e/ou ilustrativa.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos são mínimos e inerentes à coleta de sangue. Não haverá risco ou desconforto ao indivíduo além daquele relacionado ao procedimento cirúrgico de exodontia (realizada no Curso de Especialização em Cirurgia da Fundação da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FFO-FOUSP)). Porém, o procedimento de coleta do sangue envolve o uso de agulha e durante a coleta o indivíduo irá sentir pequeno desconforto quando a agulha for usada.

Benefícios: Este trabalho não trará benefício direto ao indivíduo. Os benefícios são para o melhor conhecimento do processo de adesão e proliferação celular, ajudando assim a entender melhor a regeneração tecidual.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa muito bem estruturada e fundamentada em engenharia tecidual.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Constam deste projeto todos os termos de apresentação obrigatória: TCLE e Autorização da Fundectó para coleta dos dentes.

Recomendações:

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

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 981.086

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 Inadequações:

Projeto aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

SAO PAULO, 11 de Março de 2015

Assinado por:

Maria Gabriela Haye Biazevic
(Coordenador)

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br