PABLO RUBEN GARRIDO VILLAVICENCIO

Efeitos da terapia de fotobiomodulação sobre a matriz extracelular de membrana celular (cell sheet) de células-tronco da polpa dentária humana

São Paulo

2018

PABLO RUBEN GARRIDO VILLAVICENCIO

Efeitos da terapia de fotobiomodulação sobre a matriz extracelular de membrana celular (*cell sheet*) de células-tronco da polpa dentária humana

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia/Dentística para obter o título de Doutor em Ciências.

Orientador: Profa. Dra. Márcia Martins Marques

São Paulo

2018

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

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

Garrido, Villavicencio Pablo Ruben.
Efeito da terapia de fotobiomodulação sobre a matriz extracelular de membrana celular (*cell sheet*) de células-tronco da polpa dentária humana / Pablo Ruben Garrido Villavicencio ; orientador Márcia Martins Marques. -- São Paulo, 2018.

80p. : fig.; 30 cm.

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

Versão corrigida

1. Células-tronco. 2. Polpa dentária. 3. Membrana celular. 4. Terapia de fotobiomodulação. 5. Matriz extracelular. 6. Microscopia eletrônica de varredura. I. Marques, Márcia Martins. II. Título.

Garrido P. Efeitos da terapia de fotobiomodulação sobre a matriz extracelular de membrana celular (*cell sheet*) de células-tronco da polpa dentária humana. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: 09 / 11 / 2018

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). Luiz Antonio Pugliesi Alves de Lima

Instituição: FOUSP Julgamento: Aprovado

Prof(a). Dr(a). Maria Cristina Zindel Deboni

Instituição: FOUSP Julgamento: Aprovado

Prof(a). Dr(a). Fernanda de Paula Eduardo

Instituição: Hospital Albert Einstein Paulo Julgamento: Aprovado

DEDICATÓRIA

Quero dedicar este trabalho a Deus, à minha família e aos meus amigos por nunca me deixarem a sós em nenhum momento deste caminho; para eles o meu respeito e carinho para

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela aprovação do projeto DINTER entre a Universidade de São Paulo e a Universidade Central do Equador.

À Universidade Central do Equador pelo financiamento deste projeto de pesquisa.

À Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, por me dar as boas-vindas durante todo esse tempo e me permitir usar suas instalações para realizar meu projeto de pesquisa.

A todos os professores e alunos da Faculdade de Odontologia de São Paulo, dos Departamentos de Dentística e de Estomatología; particularmente do Laboratório de Pesquisa Básicas do Departamento de Dentística e o de Patología Oral com os quais compartilhei minhas ilusões, trabalho e esforço. Obrigado por me ensinar e me fazer divertir enquanto descobri as alegrias e também as dificuldades de investigar.

À minha orientadora e coordenadora do programa DINTER, Márcia Martins Marques, pela ajuda, pela orientação e pela entrega desinteressada do conhecimento; Obrigado por todos os detalhes e momentos dedicados a esclarecer qualquer tipo de dúvida que tive.

Para a equipe de pesquisa que fez parte desta tese, principalmente Ana Clara Pedroni, Diego Pulzatto Cury, Flávia Rosin, Giovana Sarra, Maria Stella Moreira, e seu apoio altruísta me permitiu concluir este trabalho da melhor maneira.

Para o meu pai por ser um exemplo e uma grande motivação para seguir em frente neste belo caminho chamado vida

RESUMO

Garrido P. Efeitos da terapia de fotobiomodulação sobre a matriz extracelular de membrana celular (cell sheet) de células-tronco da polpa dentária humana [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2018. Versão Corrigida

A terapia de fotobiomodulação (PBMT do inglês *photobiomodulation therapy*) exerce efeitos benéficos em processos relevantes para a regeneração tecidual. A técnica de membranas celulares (CSs; *cell sheets*) pode gerar grande quantidade de células organizadas em uma matriz extracelular (MEC) produzida por essas células. A constituição de MEC das CSs pode ser de importância para a regeneração de tecidos. O colágeno tipo I, a fibronectina e a tenascina são proteínas da MEC já detectadas em CSs de células-tronco da polpa dentária humana. O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos de diferentes parâmetros de PBMT sobre a arquitetura (histologia), composição proteica (Western blotting e imunoistoquímica) e ultraestrutura (MEV e MET) da MEC de CSs de células-tronco da polpa dental humana. As células-tronco foram descongeladas e recaracterizadas através da análise de seu perfil imunofenotípico avaliado pela expressão de moléculas de superfície utilizando citometria de fluxo para marcadores associados a células-tronco mesenquimais (MSC do inglês *mesenchymal stem cells*; CD105, CD146 e CD44) e não associados (CD45, CD34 e CD14). As CSs foram formadas em placas de cultivo celular após 15 dias em cultura em meio clonogênico suplementado com vitamina C (20 µg/ml). As culturas celulares foram alocadas em 3 grupos experimentais diferentes, como segue: Controle: nenhum tratamento adicional; PBMT1 e PBMT2. A PBMT foi realizada com um laser diodo vermelho contínuo, aplicando-se os seguintes parâmetros gerais: 660nm, 20mW, 0,028cm^2 e 0,71W/cm^2. Os parâmetros do PBMT1 foram: 4s, 3J/cm^2 e 0,08J por ponto, e o PBMT2: 7s, 5J/cm^2 e 0,14J por ponto. As irradiações foram realizadas em dias alternados durante todo o período do experimento, em modo pontual (5 pontos / poço ou 13 por placas de 100 mm de diâmetro) em contato com a base da placa. Após a formação das CSs, 15 dias após o plaqueamento, estas foram submetidas a análises histológica, imunoistoquímica, Western blotting, microscopia eletrônica de transmissão e de varredura.

Comparações estatísticas foram realizadas ($p < 0,05$). As células apresentaram perfil imunofenotípico clássico de MSCs, mostrando a expressão de marcadores associados a MSCs, enquanto a expressão dos marcadores não associados a MSCs estavam ausentes. O colágeno tipo I, colágeno tipo III e fibronectina estavam presentes no MEC das CSs. Western blotting revelou maior síntese de fibronectina nas CSs submetidas ao PBMT1. A ultraestrutura geral dos CSs foi diversa nos 3 grupos experimentais. As CSs do grupo PBMT1 apresentaram aspecto epitelióide, enquanto no grupo PBMT2 as CSs apresentaram células isoladas e fusiformes dispostas em feixes unidirecionais. MET identificou uma MEC mais madura e sinais de apoptose nos grupos submetidos à PBMT. A PBMT influenciou a composição e ultraestrutura da MEC de CSs de células-tronco da polpa dentária. Assim, a PBMT pode ser importante na determinação da qualidade mecânica das CSs, o que pode favorecer a terapia celular, facilitando o transplante das células-tronco.

Palavras-chave: Células-tronco da polpa dentária. Membrana celular. Terapia de fotobiomodulação. Matriz extracelular. Microscopia eletrônica de varredura, Microscopia eletrônica de transmissão, Imunoistoquímica. Western blotting.

ABSTRACT

Garrido P. Effects of photobiomodulation therapy on the extracellular matrix of human dental pulp cell sheets [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2018. Versão Corrigida.

Photobiomodulation therapy (PBMT) improves processes relevant to tissue regeneration. The technique of cell sheets (CSs) can generate large amount of cells organized in an extracellular matrix (ECM) produced by these cells. The constitution of the ECM of CSs could be of importance for tissue regeneration. Type I collagen, fibronectin and tenascin are ECM proteins already detected in CSs of human dental pulp stem cells. The aim of this study was to investigate the effects of different PBMT parameters on the architecture (histology), protein composition (Western blotting and immunohistochemistry) and ultrastructure (SEM and MET) of the MEC of CSs of human dental pulp stem cells. Dental pulp stem cells were thawed and recharacterized by the expression profile of the surface molecules using flow cytometry for mesenchymal stem cells (MSC) -associated (CD105, CD146 and CD44,) and non associated (CD45, CD34 and CD14) markers. The CSs were formed in cell culture plates after 15 days in culture in clonogenic medium supplemented with vitamin C (20 µg/ml). The cell cultures were allocated in 3 different experimental groups, as follows: Control: no further treatment; PBMT1 and PBMT2. PBMT was performed with CW red diode laser applying the following general parameters: 660nm, 20mW, 0.028cm^2 spot size and 0.71W/cm^2. The PBMT1 parameters were: 4s, 3J/cm^2 and 0.08J per point, and the PBMT2: 7s, 5J/cm^2, and 0.14J per point. The irradiations were done on alternate days throughout the experimental time, in a punctual mode (5 points/well or 13 points/100mm-diameter dishes) in contact at the base of the plate. After the CSs formation, 15 days after plating, they were submitted to histology, immunohistochemistry, Western blotting, transmission electron microscopy and scanning electron microscopy analyses. Statistical comparisons were performed ($p<0.05$). The cells presented the classical immunoprofile of MSCs showing the expression of MSCs-associated markers, whereas the expression of the MSCs non-associated markers were absent. The type I collagen, type III collagen and fibronectin were present in the MEC of the CSs. Western blotting revealed a higher amount of fibronectin in the CSs submitted to PBMT1. The overall

ultrastructure of the CSs was diverse in the 3 experimental groups. PBMT1 leads to epithelial-like CS, whereas the PBMT2 leads to a CSs with isolated fusiform cells arranged in unidirectional bundles. MET identified a more mature ECM and signs of apoptosis in the PBMT groups. PBMT may influence the composition and ultrastructure of the ECM of CSs of dental pulp stem cells. Thus, PBMT could be of importance in the determination of the mechanical quality of CSs, which may favor cell therapy by improving the CS transplantation approach.

Keywords: Dental pulp stem cells. Cell sheet. Photobiomodulation therapy. Extracellular matrix. Scanning electron microscopy. Transmission electron microscopy, Immunohystochemistry. Western blotting.

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1 - A: Fotografias das irradiações em placas de 100 mm de diâmetro (A) e de placas de 6 poços (B). Nas placas de 6 poços para evitar sobreirradiação dos grupos experimentais, os poços intercalados eram mantidos vazios 49

Figura 5.1 - Ilustração gráfica da imunofenotipagem das hDPSCs após o descongelamento (P4). Os números dentro dos gráficos indicam porcentagem (%) de células positivas ao anticorpo primário para o marcador de superfície em questão. Os picos à esquerda representam os controles isotípicos de cada marcador. 57

Figura 5.2 - Fotografias das membranas celulares. (A) *Cell sheet* (CS) flutuando em PBS dentro de um poço de placa de 6 poços e em (B) esta mesma CS em maior aproximação mostrando sua aparência epitelióide 58

Figura 5.3 - Fotomicrografias das membranas celulares do grupo controle (A-C), PBMT1 (D-F) e PBMT2 (G-I). (A,D,G) Cortes semifinos das CSs corados por azul de toluidina (Aumento original 100x); (B,E,H) reações imunoístoquímicas para detecção de colágeno tipo I (Aumento original 40X) e (C,F,I) reações imunoístoquímicas para detecção de fibronectina (Aumento original 40X) 59

Figura 5.4 - Eletromicrografias de varredura de CSs do grupo controle (A-C), PBMT1 (D-F) e PBMT2 (G-I) 61

Figura 5.5 - Eletromicrografias de transmissão representativas dos espécimes de CSs dos grupos: controle (A-D), PBMT1 (E-H) e PBMT2 (I-L). RER: retículo endoplasmático rugoso, setas indicam o RER, enquanto cabeças de setas indicam mitocôndrias 64

Figura 5.6 - Representação gráfica dos resultados do ensaio de Western blot. Colágeno tipo I (A), Colágeno tipo III (B) e Integrina (D) 65

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Grupos experimentais 48

Tabela 4.2- Parâmetros da terapia de fotobiomodulação (PBMT) 48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASCs	células-tronco adultas do inglês *Adult Stem Cells*
ATP	trifisfato de adenosina do inglês *adenosin triphosphate*
cAMP	monofosfato de adenosina cíclica
Cox	citocromo C oxidase
CS	membrana das células-tronco do inglês *cell sheets*
DFPCs	células-tronco do folículo dentário
ECM	matriz extracelular do inglês *extracelular matrix*
ESCs	células-tronco embrionárias do inglês *Embryionic Stem Cells*
hDPSCs	células-tronco da polpa dental do inglês *Dental Pulp Stem Cells*
iPS	células pluripotentes induzidas (do inglês *induced pluripotent stem cells*)
ISCT	Sociedade Internacional de Terapia Celular do inglês *International Society of Cellular Therapy*
MMP	potencial da membrana mitocondrial do inglês *mitochondrial membrane potential*
MSCs	células-tronco mesenquimais do inglês *mesenchymal stem cells*
Nd:YAG	do inglês n*eodymiun ittrium aluminium garnet*
PDLSCs	células-tronco do ligamento periodontal
ROS	espécies reativas de oxigênio
SC	células mesenquimais do inglês *stem cells*
SCAPs	células-tronco da papila apical
SHED	células-tronco de dentes decíduos esfoliados humanos do inglês *Stem cells from human exfoliated deciduous teeth*
PBMT	terapia de fotobiomodulação do inglês *photobiomodulation therapy*
RER	retículo endoplasmático rugoso

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
mg/ml	microgramas sobre mililitros
nm	nanometros
kDa	Kilo Daltons
J/cm^2	Joules/centímetros quadrados
mW/cm^2	mili Watts sobre centímetros quadrados
W	Watts
mW	mili Watts
Na	sódio
K	potássio
g	gramas
X g	X gravidade
cm	centímetros
°C	graus Centígrados
µg/ml	microgramas sobre mililitros
µg	microgramas
H_2O_2	água oxigenada
M	molar
kV	kilo Volts
mM	mili Molar
<	maior que
β	beta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 23

2 REVISÃO DA LITERATURA 27

2.1 Células-Tronco Da Polpa Dentária Humana 27
2.1.1 Aspectos Gerais 27
2.1.2 Membrana De Células-Tronco 29
2.1.3 Proteínas Extracelulares 30

2.2 Fotobiomodulação 34
2.2.1 Aspectos Gerais 34
2.2.2 Parâmetros De Irradiação Na PBMT 35
2.2.3 Parâmetros da PBMT 37

4 MATERIAL E MÉTODOS 45

4.1 Cultura Celular 45

4.2 Imunofenotipagem Para Recaracterização Das Células 46

4.3 Cell Sheet (CS) de hDPSCs 47

4.4 Grupos Experimentais 47

4.5 Terapia de Fotobiomodulação (PBMT) 48

4.6 Análise das membranas celulares (Cell Sheets) 50
4.6.1 Histologia e imunoistoquímica 50
4.6.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) 51
4.6.3 Microscopia eletrônica de transmissão (MET) 52
4.6.4 Western blotting 52

4.5 Análise estatística 55

5 RESULTADOS 57

5.1 Perfil imunofenotípico das células 57

5.2 Membranas Celulares (Cell Sheets) 58

5.3 Histologia e imunoístoquímica 58

5.4 Ultraestrutura das Membranas Celulares 60
5.4.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) 60
5.4.2Microscopia eletrônica de transmissão (MET) 62

6 DISCUSSÃO **67**

REFERÊNCIAS **75**

1 INTRODUÇÃO

A terapia de fotobiomodulação (PBMT do inglês *photobiomodulation therapy*) foi proposta por Marques e colaboradores como um quarto elemento da engenharia tecidual por apresentar efeitos que podem melhorar sua eficácia quando aplicada juntamente com a tríade célula-tronco, fatores de crescimento e *scaffolds* (Marques et al., 2016). A PBMT é capaz de melhorar as condições ambientais de células em estresse oxidativo, estresse esse que pode ocorrer quando do transplante das células. Esta terapia pode prevenir a morte celular, e melhorar a viabilidade, a migração e a diferenciação das células recém-implantadas, bem como aumentar a nutrição da mesmas por promover angiogênese e síntese ou a ativação de fatores de crescimento, entre eles o VEGF (do inglês *vascular endothelial growth factor*) e o FGF (do inglês *fibroblastic growth fator)* (AlGhamdi et al., 2011; Arany et al., 2014; Cury et al., 2013; Damante et al., 2009; Diniz et al., 2018; Eduardo et al., 2008; Ferreira et al., 2018; Moreira et al., 2011; Pedroni et al., 2018b).

Outras estratégias e técnicas, além da PBMT, tem sido propostas com o intuito de aumentar a eficácia da engenharia tecidual e da terapia celular. Entre elas, se destaca a técnica das membranas celulares (CSs; *Cell Sheets*) que consiste em cultivar células em sua própria matriz extracelular (MEC) usando estímulos específicos até que as mesmas se soltem do fundo da placa espontaneamente. Essa técnica fornece um grande número de células, enquanto a ECM produzida por essas células permanece praticamente intacta (Pedroni, et al., 2018).

As CSs de células-tronco da polpa dentária humana apresentam características que favorecem a engenharia de tecidos e a terapia celular de forma geral. Na verdade, vários fatores devem ser destacados neste aspecto. Primeiramente, o fato das células-tronco nas CSs sintetizarem sua própria MEC e, desta forma, ao serem transplantadas para o tecido receptor, não existir a necessidade de se utilizar um *scaffold* adicional, já que a própria MEC já é um *scaffold* natural para estas células. Adicionalmente, as CSs mantem as células-tronco numa situação mais próxima à sua fisiologia, já que as

células estão ligadas umas às outras e à MEC e podem oferecer uma quantidade grande de células-tronco no momento do transplante. Outra vantagem de se utilizar CSs de células-tronco de polpa dentária humana é que estas células são facilmente obtidas sem causar morbidades aos pacientes. O seu isolamento não enfrenta barreiras éticas, pois sua origem é um tecido que normalmente seria descartado após, por exemplo, extrações dentárias (Arany et al., 2014; de Sa Silva et al., 2012; Ding, Niu, 2015; Gronthos, 2000; Jayaraman et al., 2016). Adicionalmente, Pedroni e colaboradores (2018b) avaliaram o potencial das células-tronco de polpa dentária humana para manter seu estado indiferenciado e sua capacidade de diferenciação osteogênica quando arranjadas nas CSs. De acordo com este estudo as DPSCs sobreviveram nas CSs por pelo menos 96 h e retiveram seus marcadores de células-tronco e seu potencial de diferenciação osteogênica, mesmo após serem dissociadas das CSs (Pedroni, et al., 2018).

Para que as CSs se formem e mantenham a telomerase de suas células ativas, há que se adicionar vitamina C (VC) ao meio de cultivo dessas células. Sabe-se que a VC e a PBMT apresentam efeitos opostos no metabolismo celular (por exemplo, VC é antioxidante e PBMT gera espécies reativas de oxigênio). Porém, já foi demonstrado que a PBMT não interfere com a formação de CSs induzidas por VC. Além disso, o PBMT melhorou a diferenciação funcional das células isoladas dos CSs (Pedroni, et al., 2018). Mais ainda, em estudo anterior Pedroni (2016) reportaram que as CSs tratadas pela PBMT mostraram-se mais maleáveis durante sua manipulação e sugeriram que este achado poderia estar relacionado à qualidade da MEC formada pelas células irradiadas.

A MEC fornece estímulos químicos e mecânicos que influenciam o comportamento das células. A maioria das células adere às proteínas e fibras da MEC através de receptores de adesão transmembrana (Kaufman, 2017). As proteínas presentes nas MECs da CSs e que tem uma maior presença na MEC de todo tecido conjuntivo são colágeno, fibronectina e tenascina. O colágeno tipo I é a proteína mais abundante em tecidos mineralizados, enquanto a fibronectina e tenascina são proteínas adesivas. (Alberts,1989)

Estas proteínas foram descritas em células tronco da polpa dentária humana (Harumi et al., 2010).

Todos os achados acima apresentados nos entusiasmaram a continuar estudando as CSs de células-tronco da polpa dentária humana. E o aspecto que nos chamou especial atenção foi a MEC das CSs. A literatura compulsada aponta para uma possível influência da PBMT nas características morfológicos e/ou de composição da MEC das CSs. Para testar esta hipótese o presente trabalho teve o objetivo de investigar o efeito de diferentes parâmetros de PBMT sobre a arquitetura (histologia), composição proteica (Western blotting e imunoistoquímica) e ultraestrutura (MEV e MET) da MEC de CSs de células-tronco da polpa dental humana.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Células-Tronco Da Polpa Dentária Humana

2.1.1 Aspectos Gerais

As células-tronco (SCs do inglês *stem cell*) são células com grande potencial de diferenciação e proliferação. As SCs sofrem divisão assimétrica dando origem a outra SC e uma célula progenitora. Estas células estão presentes em todo o corpo, constituindo, por exemplo, de 5% a 0,1% da medula óssea humana e das células hematopoiéticas circulantes (Pivoriuunas et al., 2010).

As SCs podem ser isoladas de diversos tecidos. Células provenientes dos tecidos embrionários, por exemplo, são capazes de originar células que podem se diferenciar em todos os tipos celulares. As SCs mesenquimais (MSCs do inglês *Mesenchymal Stem Cells*) também podem se diferenciar numa grande variedade de células, porém de forma mais limitada. Em geral, têm grande capacidade de se diferenciar em tecidos conjuntivos especializados (D'Alimonte et al., 2017; Liao, 2014).

As MSCs são responsáveis pelo equilíbrio e pelos diferentes processos de regeneração quando os tecidos sofrem algum tipo de lesão (D'Alimonte et al., 2017). O primeiro tipo de MSC foi isolado da medula óssea (SCs hematopoiéticas) e, em seguida, outras MSCs foram isoladas dos tecidos adiposos, do cordão umbilical, da polpa dentária, entre outros. (Liao, 2014; Pivoriuunas et al., 2010).

Apesar de os estudos *in vitro* já terem explorado uma série de SCs oriundas de diversos tecidos, sabemos que a quantidade de SCs estudada ainda corresponde apenas a uma pequena fração das possibilidades

disponíveis. Sendo assim, sua distribuição nos organismos vivos ainda precisa de maiores elucidações (Liao, 2014).

Partindo-se das semelhanças existentes entre o tecido pulpar em relação ao da medula óssea, acreditava-se que MSCs poderiam também estar presentes na polpa dentária. Desta forma, foi possível isolar e caracterizar as primeiras células-tronco da polpa dentária humana (hDPSCs do inglês *human dental pulp stem cells*), as quais são capazes de manter propriedades multipotentes após criopreservação a curto e longo prazo (Botelho, 2017).

O dente humano e as estruturas ao seu redor são uma das fontes de células-tronco em nosso organismo. Estas células têm sido isoladas e caracterizadas, podendo ter origem no ligamento periodontal, polpa dentária, papila apical, dentes decíduos humanos esfoliados, folículo dental e da gengiva humana (Wei et al., 2012).

Os estudos realizados com as hDPSCs criaram um panorama muito promissor para futuras aplicações clínicas. A regeneração tecidual é composta por três elementos fundamentais: células-tronco, *scaffold* e fatores de crescimento. No campo celular, as hDPSCs estão se tornando muito importantes devido às suas capacidades de proliferação e diferenciação (Langer, 1993).

Apesar das habilidades citadas acima, a regeneração da polpa dentária a partir do transplante de hDPSCs ainda não foi comprovada. Porém, já é possível utilizar este tipo de células para regenerar outros tipos de tecidos conjuntivos especializados (Wang et al., 2012). Diniz et al., 2018 provou que a associação de hDPSCs com *scaffold* e fatores de crescimento apropriados pode ajudar a proliferação de células do tecido ósseo (Diniz et al., 2018).

O maior desafio da engenharia tecidual consiste na dificuldade de formação de tecidos capazes de manter sua função. Esta limitação está relacionada principalmente à obtenção de *scaffolds* adequados. Diversos tipos de *scaffolds* vem sendo simulados, entretanto, estes ainda não são totalmente

viáveis para a completa formação de órgãos, uma vez que eles podem impedir a migração, produzir reações inflamatórias no hospedeiro e apresentar dificuldades para vascularização (Wei et al., 2012).

As membranas celulares (CSs do inglês *Cell Sheets*) são uma alternativa de *scaffold* promissora. Neste tipo de tratamento, as SCs são estimuladas a produzir sua própria matriz extracelular (MEC) antes de serem implantadas no hospedeiro (Pedroni, 2016).

Uma variável para suplantar os *scaffolds* são membranas celulares (SCs do inglês *Cell Sheets*) onde os SCs são estimulados a produzir sua própria matriz antes de serem implantados no hospedeiro. No entanto, seu processo de obtenção é extremamente sensível e delicado (Wei et al., 2012).

2.1.2 Membrana De Células-Tronco

Como mencionado, as hDPSCs têm uma grande capacidade de proliferação e diferenciação em vários tipos de células específicas de diversos tecidos conjuntivos especializados. Entretanto, quando em confluência, as hDPSCs podem sofrer processos de apoptose celular ou senescência; ou seja, podem morrer ou perder completamente suas capacidades de proliferação e diferenciação. Todos esses processos limitam a aplicação na medicina regenerativa. A fim de contornar estas limitações, foram desenvolvidos métodos que utilizam fatores capazes de limitar a senescência e apoptose. A vitamina C (VC) e a terapia de fotobiomodulação (PBMT do inglês *Photobiomodulation Therapy*), por exemplo, são estímulos capazes de formar membranas celulares sem os inconvenientes acima citados (Pedroni, et al., 2018).

Acredita-se que a formação das CSs permite solucionar as desvantagens dos *scaffolds*, uma vez que distribuem adequadamente fatores de crescimento próprios para cada tipo de célula. Essas membranas são

desenvolvidas em laboratórios de cultivo celular e constituem uma técnica sensível que requer grande treinamento e habilidade do operador. Um meio de cultura adequado ao tipo celular em questão, bem como a concentração de vitamina C administrada nesse meio são fatores de vital importância. A VC é um estímulo determinante para a formação das SCs, uma vez que permite a criação de junções íntimas entre as próprias células e entre as células e a MEC, permitindo| sua integridade quando destacada do fundo do poço de cultivo (Wei et al., 2012).

O período ideal de aplicação da VC ao meio de cultura é no momento onde a subconfluência celular pode ser observada, ou seja, quando as células cobrem cerca de 70 a 80% da placa de cultivo, uma vez que a confluência pode levar ao estágio de senescência das MSC. Na presença da VC, as MSC continuam-se multiplicando e, consequentemente, formando diversas camadas celulares que resultam em um tecido capaz de se destacar do fundo do poço (Pedroni, et al., 2018a; Wei et al., 2012).

A concentração ideal desta vitamina também já foi estudada, sendo demonstrado que o ácido ascórbico a 10 mg/ml é capaz de manter a atividade de telomerase aumentada (A. C. F. Pedroni, 2018a).

2.1.3 Proteínas Extracelulares

As características da célula utilizada têm forte influência no resultado obtido através da regeneração tecidual. A qualidade celular pode ser determinada através do tipo e quantidade de proteínas secretadas pelas células. Sendo assim, a síntese protéica tem sido um meio de estudo para determinar e comparar diversas reações celulares em diferentes tipos de tratamento (Alberts et al., 1989).

Como é de conhecimento geral, a regeneração tecidual não depende apenas de fatores relacionados às células, mas também aos relacionados ao *scaffold* ou à MEC. Em geral, a MEC é composta pelo líquido intersticial rico em proteoglicanos; e por proteínas que conferem a característica de resistência ou elasticidade do tecido (Devlin, 2008, Ashcroft, , 1997).

O processo pelo qual as proteínas são sintetizadas é conhecido como biossíntese, sendo este um processo complexo influenciado por muitos fatores. A biossíntese é um processo específico para cada célula e consiste em duas etapas: transcrição e tradução (Devlin, 2008). Na primeira etapa, o DNA é transcrito pelo RNA mensageiro (RNAm) e então esta informação é levada aos ribossomos, onde a mensagem contida no RNAm é decodificada, resultando na síntese de proteínas, finalizando a etapa de tradução (Devlin, 2008).

As células podem secretar dois tipos de proteínas: as proteínas enzimáticas, cuja função é catalisar todas as reações bioquímicas; e as proteínas estruturais, que são aquelas que dão suporte aos tecidos, como por exemplo, o colágeno, a integrina, a fibronectina e a tenascina (Devlin, 2008).

O colágeno é uma proteína que forma fibras e é secretado por células do tecido conjuntivo, como os fibroblastos e outros tipos celulares de tecidos conjuntivos especializados. É o componente mais abundante da pele e ossos, cobrindo 25% da massa total de proteínas em mamíferos (Alberts et al., 1989; Devlin, 2008).

O processo pelo qual é produzido o colágeno tem uma complexidade ainda maior do que aquele envolvido na produção das demais proteínas. A síntese do colágeno é um processo muito especial, uma vez que cada uma das cadeias polipepticas são sintetizadas pelos ribossomos ligados a membrana do retículo endoplasmático e, em seguida, são transloucadas para o interior do reticulo, onde se tornam precursores responsáveis por formar cadeias conhecidas como procadeias ct, que irão continuar a se unir ao longo de todo o retículo endoplasmático (Devlin, 2008).

No retículo endoplasmático, os resíduos de prolina e de lisina são hidroxilados e, posteriormente, glicosilados no aparelho de Golgi. Após a sua secreção, os propeptídeos das moléculas de procolágeno são degradados por proteases, convertendo-os em moléculas de tropocolágeno. Já no espaço extracelular, várias moléculas de tropocolágeno são associadas através de ligações reticuladas, formando fibrilas e fibras. Uma vez transportado para fora da célula ocorre o fenômeno de alinhamento e maturação das moléculas do tropocolágeno em um processo chamado fibrogênese. Essa maturação consiste apenas no fortalecimento dos cruzamentos intermoleculares e depende diretamente das características mecânicas de cada tecido conjuntivo (Devlin, 2008).

As células interagem com a matriz extracelular tanto mecanicamente quanto quimicamente, produzindo efeitos notáveis na arquitetura do tecido, no qual diversas forças atuam sobre as fibrilas de colágeno secretadas. Essa interação entre as células e MEC promove um deslocamento que exerce tração sobre as fibrilas, causando sua compactação e estiramento. Essas forças vão acomodando e organizando as fibrilas (Alberts et al., 1989).

O diâmetro e organização das fibras de colágeno nos diferentes tecidos é muito variável e, portanto, existem diversos tipos dessa proteína - especificamente 21. Sua classificação é dada devido à organização de suas moléculas: o colágeno tipo I, por exemplo, é constituído por fibrilas estriadas de 20 a 100 nm de diâmetro, agrupadas para formar fibras de colágeno maiores. O colágeno tipo I é sintetizado por fibroblastos, osteoblastos e condroblastos e sua principal função é a resistência ao alongamento. Por outro lado, o colágeno tipo III é formado em grande parte por fibrilas de 50 nm que têm tradicionalmente estrutura reticular e é sintetizado pelas células do músculo liso e fibroblastos. Sua principal função é apoiar os órgãos expansíveis (Alberts et al., 1989).

A fibronectina é outra proteína localizada na matriz extracelular da maioria dos tecidos. Seu peso molecular é de aproximadamente 440 kDa. Em sua síntese, uma grande e única molécula de RNA mensageiro é produzida e amadurece de maneira alternada, criando vários tipos de fibronectina -

exatamente 20 tipos diferentes. Em sua grande maioria, estas proteínas são constituídas por um domínio tipo III de fibronectina. Um dos tipos de fibronectina é solúvel e circula pelo sangue, onde ajuda na coagulação, na cicatrização e na fagocitose. Os demais tipos estão organizados na superfície celular, depositando-se na matriz extracelular como fibrilas de fibronectina muito insolúveis; sendo organizado pelas células para formar fibras (Alberts et al., 1989).

As moléculas de fibronectina são apenas organizadas em fibrilas na superfície de certas células, uma vez que para esse processo elas precisam de proteínas específicas da membrana celular. Existe uma grande interação das fibrilas de fibronectina com a actina intracelular e com a integrina da membrana. A integrina é uma proteína constituinte da estrutura da membrana celular responsável por atuar como âncora nas proteínas da MEC. Por sua vez, a actina, juntamente com a miosina, forma um citoesqueleto que puxa a matriz de fibronectina, gerando forças de tração. Esta interação é capaz de estimular a formação e montagem da fibronectina. Esse estímulo é produzido pela mesma célula e é de vital importância para a formação de mais fibrilas. Por outro lado, existem também proteínas cuja função é evitar a secreção de fibronectina para que fibrilas não sejam formadas (Alberts et al., 1989).

A importância da fibronectina não é apenas na adesão da célula à MEC, uma vez que também desempenha um papel importante na migração celular no momento da embriogênese, auxiliando a formar vasos sanguíneos funcionais e, consequentemente, contribuindo para o transporte de nutrientes. Além disto, também participa do processo de proliferação celular, uma vez que esta proteína é encontrada em níveis elevados quando as células deixam o estado de senescência por contato (Alberts et al., 1989).

2.2 Fotobiomodulação

2.2.1 Aspectos Gerais

A terapia de fotobiomodulação (PBMT do inglês *photobiomodulation therapy*) é baseada na exposição de tecidos biológicos a formas não ionizantes de fontes de luz, incluindo lasers, LEDs e luzes de banda larga, tanto no espectro visível, quanto no infravermelho, levando a modulação das funções celulares. A PBMT é utilizada para tratar condições de tecidos patológicos, auxiliar na analgesia, controlar processos inflamatórios e também para promover a cicatrização de tecidos (Eduardo et al., 2008).

A primeira evidência da ação da irradiação de laser de baixa intensidade veio dos experimentos do Dr. Endre Mester na Universidade de Medicina de Semmelweis (Hungria) em 1967 na tentativa de repetir uma das experiências descritas por McGuff em Boston. O experimento consistia em raspar o dorso de camundongos e aplicar luz de um laser de rubi (694 nm) com a intenção de causar um câncer de pele. Entretanto, para sua surpresa, os animais não desenvolveram câncer e seus pelos animais voltaram a crescer mais rapidamente do que no grupo não tratado (de Freitas, 2016; McGuff, 1965).

Na PBMT, há a aplicação direta de luz com um comprimento de onda entre 405 e 1100 nm e uma potência de saída menor que centenas de miliwatts e densidade de energia menor que 10 J/cm^2. Dentre as terapias não invasivas e indolores, a PBMT é uma estratégia muito promissora, uma vez que cumpre o objetivo de causar analgesia e estimular a regeneração de diferentes tecidos (de Freitas, 2016).

As características da PBMT permitem a luz entrar nos tecidos e nas células de forma não destrutiva, porque produz um som térmico baixo e efeitos de vibração insignificantes, induzindo reações fotoquímicas que

resultam na modulação de diferentes processos celulares (Tani et al., 2018, Marques et al., 2016).

Como descrito, a PBMT biomodula a atividade de algumas funções celulares. Os mecanismos ainda estão sendo estudados, existindo diversas teorias que buscam descrever o mecanismo exato de ação da PBMT. Dentre elas, algumas propõe que o laser excite moléculas da cadeia respiratória mitocondrial, intensificando a formação de um gradiente transmomentâneo de prótons eletromecânicos nas mitocôndrias. Assim, ele é capaz de aumentar a proliferação celular devido ao aumento da liberação de cálcio para o citoplasma, responsável por desencadear o processo de mitose. O aumento a curto prazo no pH intracelular também desencadearia sinais mitogênicos nas células, com aumentando da produção de ATP (Pereira, Longo, 2012).

Sabe-se que a falta de conhecimento e aplicação de parâmetros corretos para cada tipo de tratamento muito provavelmente levará a resultados diferentes dos desejados. Em alguns casos, doses muito altas ou muito baixas com pequenas variações no tempo e número de aplicações pode causar um efeito não significativo ou simplesmente inibir o efeito desejado (de Freitas, 2016).

2.2.2 Parâmetros De Irradiação Na PBMT

Ao entrar no campo da PBMT, seja ela de baixa ou alta intensidade, é impossível não discutir os parâmetros de irradiação envolvidos. Os principais parâmetros geralmente descritos ao discutir a PBMT são: tipo e comprimento de onda, potência do laser, intensidade no local tratado, tempo de aplicação e energia total aplicada na área (de Freitas, 2016).

O comprimento de onda, por exemplo, é a distância entre a crista de uma onda para a crista da próxima onda, e é o parâmetro comumente utilizado no campo médico para destacar a informação do espectro de luz. Os

comprimentos de onda que podem ser definidos como irradiação de laser são aqueles que alcançam até 1mm. Comprimentos maiores do que este são chamados de microondas e aqueles próximos de 10 cm entram no campo de ondas de rádio (Franzen, 2016).

Acima de 400 nanômetros (nm), a luz ultravioleta torna-se violeta e entra na faixa do espectro visível. Podemos citar, por exemplo, a cor turquesa a 488 nm; a cor verde a 514 nm, onde o laser Argon está localizado; o laser de frequência dupla Nd:YAG (do inglês *neodymiun ittrium aluminium garnet*) de 532nm com cor dentro da faixa do verde; o laser Hélio-Neón de 632.8nm correspondendo à cor vermelha e comumente usada na acupuntura; o laser de diodo, que possui um comprimento de onda de 650nm e é frequentemente utilizado em diagnóstico de cáries ou como laser apontador (Franzen, 2016).

A PBMT refere-se ao uso de luz na região do infravermelho, vermelho ou próximo, com comprimentos de onda geralmente na faixa de 600-700 nm e 780-1100 nm. Foi verificado que o intervalo de comprimentos de onda entre 700-780 nm não é eficaz, uma vez que não é capaz de estimular os fotorreceptores celulares. Entretanto, ele pode ser usado no tratamento necessário para estimular um tecido profundo, porque sua dispersão nos tecidos superficiais é menor (de Freitas, 2016).

O laser geralmente tem uma densidade de potência ou irradiância entre 5 mW/cm^2 e 5 W/cm^2. As irradiações deste tipo podem ser uma onda contínua ou uma luz pulsada que consiste em um feixe de densidade relativamente baixa (0,04 a 5 J/cm^2), mas a potência de saída pode variar amplamente de 1 mW a 500 mW para evitar efeitos térmicos. (de Freitas, 2016; Huang, 2009) Em doses baixas (2 J/cm^2), PBMT estimula a proliferação, enquanto em altas doses (16 J/cm^2) a PBMT é supressiva, destacando a dependência da dose das respostas biológicas frente a exposição à luz (de Freitas, 2016).

2.2.3 Parâmetros da PBMT

O efeito bioestimulador da PBMT foi relatado há cerca de 40 anos. Após este período, procurou-se determinar qual o melhor protocolo para promover efeitos positivos capazes de produzir estimulação a nível celular; tanto para diferenciação como proliferação, bem como em analgesia e outras terapias antimicrobianas com baixa irradiação de energia (Fernandes et al., 2016).

Muitos conflitos em torno de todos os parâmetros que compõem a PBMT foram gerados e, apesar de alcançar algum consenso, existem fatores que ainda não foram totalmente explicados ou aceitos. Por exemplo, alguns estudos reportam a quantidade de radiação, mas não a área onde a luz foi aplicada. Uma vez que a intensidade da luz não é constante, o laser pode não dar uma intensidade específica. No entanto, vários parâmetros podem ser modificados a fim de calcular a intensidade da luz com base na energia incidente total e na superfície irradiada, assumindo um perfil de intensidade plana (van Breugel, 1992).

É possível aceitar que a densidade de energia varie de 0,1 a 24,7 Mw/cm^2, enquanto a dose de energia apresente variações de 0,02 a $12J/cm^2$; a depender das condições e dos efeitos que são desejados (van Breugel & Bar, 1992). Em nosso estudo, por exemplo, os efeitos desejados podem ser: estimulação para a produção de proteínas da MEC e proliferação celular. É muito claro que os efeitos do PBMT não ocorreram em altas densidades de energia, ou seja, em densidades variando de 2,5 a 24,7 mW/cm^2 (van Breugel, 1992).

Atualmente, a energia total fornecida na superfície é o foco e a variação dos estudos de PBMT. Esta dose depende da densidade da energia, da área a ser irradiada e do tempo de exposição (van Breugel, 1992).

Para alcançar efeitos biológicos significativos, os comprimentos de onda do laser podem ser vermelhos ou próximos do infravermelho (600-1200 nm) e, para induzir a proliferação celular, as densidades de energia podem

variar de 0,1 a 10 J/cm^2, enquanto que as energias maiores que esse valor (> 10 J/cm^2) podem promover efeitos antiproliferativos (AlGhamdi, Kumar, & Moussa, 2012).

Atualmente, trabalha-se com comprimentos de onda padronizados a 660nm variando a densidade de energia em relação ao tempo em função da potência (van Breugel & Bar, 1992).

A densidade de energia possivelmente constitui um fator importante para alcançar uma melhora na proliferação e diferenciação celular. Entratanto, o efeito da variação da densidade de energia ainda é desconhecido, principalmente em CSs de hDPSCs. Diferentes densidades de energia já foram testadas e as densidades que oscilaram entre 0,5 e 4 J/cm^2 foram as mais efetivas para estimular o crescimento e diferenciação celular (Fernandes et al., 2016). Além disso, uma dose baixa (1,2 J/cm^2) foi mais favorável na viabilidade celular de 6 a 24 horas após a irradiação em comparação com os outras doses (Fernandes et al., 2016).

Em relação à dose, são usadas variações de 0,05 J/cm^2 a 42 J/cm^2. O equipamento de laser pode variar para diferentes espectros de luz: para luz vermelha, por exemplo, a potência varia de 0,02 mW a 119 mW; já para infravermelha, de 50 mW a 800 mW (Fernandes et al., 2016).

2.2.4 Mecanismo De Ação Celular

As aplicações terapêuticas da PBMT também atuam na secreção e modulação de proteínas, moléculas fotoativas e células. Como dito acima, a PBMT refere-se ao uso de fótons em uma irradiância não térmica para regular a atividade biológica; permitindo assim a reparação do tecido, redução da inflamação e cicatrização de feridas em vários tecidos (Hwang et al., 2018).

Durante este processo, uma molécula excitada pela PBMT pode interagir com uma molécula vizinha para melhorar os efeitos fotobiológicos, incluindo a regulação de um gene alvo, a destruição de enzimas em uma

resposta catabólica e a secreção de uma proteína específica pelas células (Hwang et al., 2018).

A resposta celular à PBMT depende da absorção de um comprimento de onda específico por algumas moléculas fotorreceptoras. Cada fotorreceptor produz uma reação metabólica diferente e, por isso, a determinação do fotorreceptor primário é de extrema importância. (van Breugel, 1992) por esta razão, o mecanismo da luz para estimular a proliferação de vários tipos de células foi considerada como o efeito fisiológico mais importante em PBMT (Fernandes et al., 2016).

O conhecimento em nível celular dos mecanismos de ação da PBMT visando aplicações clínicas em pacientes foi obtido principalmente de estudos *in vitro*, grande parte utilizando células em cultura (Marques et al., 2016). Em resumo, a célula absorve um comprimento de onda específico de luz e entra no estado de excitação, no qual os processos moleculares primários podem levar a uma resposta mensurável. Esta fase é conhecida como o espectro de ação (van Breugel, 1992).

A PBMT atua sobre as células-tronco produzindo um aumento na proliferação destas; isto é, é capaz de estimular um aumento significativo no número e, ao mesmo tempo, é de recrutar células-tronco do próprio hospedeiro para colaborar no processo regenerativo. Além disso, pode estimular a produção de proteínas da matriz extracelular, conferindo às MSCSs melhores propriedades biofísicas (Marques et al., 2016; Pedroni, 2016). Além de a PBMT promover um aumento na taxa de proliferação das células, também pode melhorar o suprimento sanguíneo, prevenir a morte celular, induzir a migração celular e a síntese ou ativação de fatores de crescimento para as células recém implantadas (Fernandes et al., 2016).

Uma das teorias do mecanismo de ação da PBMT sugere que ocorra estimulação nas mitocôndrias (Eduardo et al., 2008; Friedmann, 1991). As mitocôndrias são participantes importantes na amplificação da apoptose ao libertar o citocromo c e outras proteínas no citoplasma e no núcleo (Yang et al., 2012).

A citocromo C oxidase (Cox) é a enzima terminal da cadeia de transporte de elétrons que regula a transferência de elétrons do citocromo c para o oxigênio molecular. (de Freitas, 2016; Karu, 2010) A Cox atua como um fotorreceptor e transdutor de sinais de luz nas regiões do infravermelho, vermelho e infravermelho próximo. Acredita-se que a PBMT aumenta a disponibilidade de elétrons para a redução do oxigênio molecular no centro catalítico de Cox, aumentando o potencial da membrana mitocondrial (MMP) e os níveis de ATP, cAMP e ROS (de Freitas, 2016; Wu et al., 2014).

O Citocromo C no citoplasma forma o apoptosoma, promovendo a morte celular. (Cerca de 85% do citocromo c total existe dentro das cristas mitocondriais e está conectado à porção periférica do espaço intermembrana (IMS) por junções de cristas relativamente estreitas. Há duas etapas necessárias para facilitar a libertação completa do citocromo c. O primeiro passo envolve a remodelação das cristas mitocôndrias no estágio inicial da apoptose, que redistribui o citocromo c das cristas mitocondriais para o espaço intermembranoso. O segundo passo é a liberação do citocromo c para o citosol através dos poros formados na membrana externa mitocondrial (Yang et al., 2012).

Uma vez produzida a absorção de um fóton com energia do cromóforo de Cox, há um aumento no potencial da membrana mitocondrial, causando um aumento na síntese de ATP e mudanças nas concentrações de espécies reativas de oxigênio (ROS), Ca2 + e NO (Karu, 2010).

Outra teoria afirma que o efeito da PBMT atua sobre as mitocôndrias e o núcleo. Essa alteração na ultraestrutura mitocondrial induz alterações na síntese de ATP, no potencial redox intracelular, no pH e nos níveis de monofosfato de adenosina cíclica (cAMP) (Karu, 2010).

A mitocôndria possui várias proteínas que ajudam na remodelação das cristas mitocondriais, sendo uma delas a mitofilina. As células com menor quantidade de mitofilina exibem membranas internas mitocondriais desorganizadas, o que faz com que as membranas internas da mitocôndria não consigam formar cristas tubulares ou vesiculares. No entanto, o

envolvimento da mitofilina na regulação da liberação do citocromo c durante a apoptose permanece obscuro (Yang et al., 2012).

Células estáveis com deficiência de mitofilina são mais propensas à apoptose e respondem melhor aos tratamentos de PBMT. Com isto, pode-se deduzir que isso se deve ao fato de que o citocromo c atua diretamente na recepção da luz emitida pelo laser. A falta de mitofilina pode desencadear a liberação completa do citocromo c após a exposição a sinais de morte (Yang et al., 2012).

A PBMT também pode aumenta a atividade de Cox. Esta suposição é apoiada devido ao aumento do consumo de oxigênio durante o PBMT. Isto é, devido ao fato que a maior parte do consumo de oxigênio de uma célula ocorre no Cox na mitocôndria (Eduardo, et al., 2008).

Além do ATP e AMPc, o nível de óxido nítrico (NO) também é aumentado, seja pela liberação de complexos metálicos em Cox ou pela regulação positiva da atividade de Cox, como a redutase do nitrito (de Freitas, 2016; Poyton, 2011). Assim, mais cálcio é liberado para o citoplasma da mitocôndria. Este cálcio adicional transportado para o citoplasma desencadeia a mitose e aumenta a proliferação celular (Eduardo Fde et al., 2008).

A PBMT produz também uma elevação de curto prazo no pH intracelular pela criação do gradiente eletro mecânico de prótons que desencadeia sinais mitogênicos nas células (Friedmann et al., 1991).

É bem conhecido que a PBMT aumenta a produção de ATP, ativa a Na, K-ATPase e outros transportadores. Assim, o nível intracelular de K é aumentado e a concentração de Na e o potencial da membrana são diminuídos (Eduardo, et al., 2008).

Desta forma, podemos afirmar que a PBMT intervém na migração, diferenciação e proliferação celular e também pode estimular a produção de proteínas específicas da matriz extracelular (Frozanfar, 2013).

3 PROPOSIÇÃO

Geral:

Avaliar os efeitos da terapia de fotobiomodulação (PBMT) sobre a matriz extracelular (MEC) formada em Membranas Celulares (CSs, *Cell Sheets*) de células-tronco da polpa dentária humana.

Específica:

Analisar os efeitos de diferentes parâmetros da PBMT na arquitetura (histologia), composição proteica (Western blotting e imunoistoquímica) e na ultraestrutura (MEV e MET) da MEC das CSs de células-tronco da polpa dentária humana.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP) da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. (CEE#40392114.3.0000.0075). Os experimentos foram iniciados apenas após a devida aprovação.

4.1 Cultura Celular

Células-tronco de polpa dentária humana (linhagem hDPSC4) do banco de células da FOUSP foram gentilmente doadas pelo Laboratório de Pesquisas Básicas do departamento de Dentística para este estudo. Uma alíquota dessas células foi descongelada e então as células foram cultivadas em meio de cultura clonogênico (Mclono) composto por: α-MEM (GIBCO / Life Technologies, Grand Island, NY, EUA) suplementado com concentrações finais de 15% de soro fetal bovino (MSC-FBS, Gibco), 100 U/ml de solução de antibióticos (penicilina e estreptomicina; Pen Strep, Gibco), 2 mM de L-glutamina (Gibco) e 0,1 mM de solução de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, EUA). As células foram então incubadas a 37 °C numa atmosfera úmida contendo 95 % de ar e 5 % de dióxido de carbono (CO_2).

A monitorização do crescimento celular foi realizada diariamente em microscópio invertido de fase e o meio de cultivo trocado a cada 2 dias, de acordo com o metabolismo celular. Os subcultivos foram feitos quando as células atingiram a subconfluência (aproximadamente 70-80 % do fundo da placa ocupado por células). As células foram destacadas com enzima proteolítica, nesse caso uma solução de tripsina a 0,25 % (LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil), transferidas para um tubo de centrifugação e centrifugadas a 300g por 5 minutos. As células foram ressuspensas e replaqueadas em novos frascos, criando novas passagens da cultura. Com o intuito de manter a

menor passagem possível, foram realizados estoques congelados de alíquotas de células em segunda passagem (P2). As células foram expandidas até no máximo P4.

Todos os procedimentos de cultivo celular foram realizados em capela de fluxo laminar, seguindo os protocolos de esterilidade dos materiais e soluções (normas de segurança NBR/IEC 601.2.22 e IEC 60825-1/2001-8).

4.2 Imunofenotipagem para recaracterização das células

As hDPSC4 tiveram seu perfil imunofenotípico avaliado por citometria de fluxo. Todo protocolo de citometria foi realizado a 4 ºC e as centrifugações realizadas a 550 xg por 5 minutos. Células em P4 (1 x 10^6 células por marcador de superfície). 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 internalização de antígenos de superfície. As células foram então centrifugadas e fixadas em solução de paraformaldeído (PFA) a 4% por 1 hora. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes em PBS e contadas em câmara de Neubauer. O sobrenadante foi descartado e solução de albumina de soro bovino (BSA; do inglês *bovine serum albumine*) a 5% foi adicionada às células por 1 h para bloqueio de sítios inespecíficos. As células foram ressuspendidas em PBS (3% BSA) e marcadas com anticorpos primários (1:200) com tempo de incubação de 1 h. As células foram então lavadas três vezes em PBS. Finalmente a suspensão de células foi filtrada (70 µm) e transferidas para tubos tipo Eppendorf e a seguir submetidas ao citômetro de fluxo. Foi utilizado o seguinte painel de anticorpos primários, conjugados com fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) ou aloficocianina (APC), contra moléculas de superfície humanas, a saber: CD146-PE (BD, CA, EUA), CD44-APC (BD Biosciences, CA, EUA) e CD105 FITCH (BD Biosciences, CA, EUA), CD45-APC, CD34-FITCH, e CD14-FITC (BD Biosciences). Os marcadores negativos utilizados para esta recaracterização das hDPSC4 foram CD45, CD34 e CD14 e os positivos CD146, CD105 e CD44.

As células foram classificadas em um citômetro de fluxo (FACS Calibur, BD Biosciences), e 50.000 eventos foram analisados usando o software FlowJo versão 9.6.2 (Tree Star, Ashland, OR, EUA).

4.3 *Cell Sheet* (CS) de hDPSCs

As hDPSC4s de uma mesma passagem (P4) foram plaqueadas em placas de 100 mm de diâmetro ($4x10^4$ células por placa) para os experimentos de Western blot e para as análises morfológicas e imunoistoquímicas foram plaqueadas $5x10^3$ células por poço em placas de seis poços. As células foram cultivadas em meio clonogênico e incubadas em estufa a 37 °C em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2. A monitorização do crescimento celular foi realizada diariamente em microscópio invertido de fase e o meio de cultivo trocado a cada 2 dias. Quando os subcultivos atingiram a subconfluência foi acrescida uma solução de ácido ascórbico (Vitamina C, VC) ao meio, de forma a gerar uma concentração final de 10 µg/ml. As células foram mantidas nos poços, sem subcultivos, por 15 a 18 dias, ou até que as CSs se soltassem da placa espontaneamente. Todo o meio de cultura dos poços foi trocado por meio clonogênico fresco acrescido de 10 µg/ml de VC a cada 2 dias.

4.4 Grupos Experimentais

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

Tabela 4.1 - Grupos experimentais

Grupos Experimentais	Tratamentos
Controle Positivo	hDPSC4s sem tratamento adicional
PBMT1	hDPSC4s submetidas à terapia de fotobiomodulação (PBMT)- 3 J/cm^2
PBMT2	hDPSC4s submetidas à PBMT- 5 J/cm^2

4.5 Terapia de Fotobiomodulação (PBMT do inglês *photobiomodulation therapy*)

Para a PBMT foi utilizado um equipamento de laser de diodo de fosfeto de índio-gálio-alumínio (InGaAlP do inglês *Aluminium gallium indium phosphide*) (Photon Lase III DMC - Equipamentos, São Carlos, SP, Brasil), no modo de operação contínuo, pontual e em contato, aplicando-se os parâmetros dosimétricos descritos na Tabela 4.2.

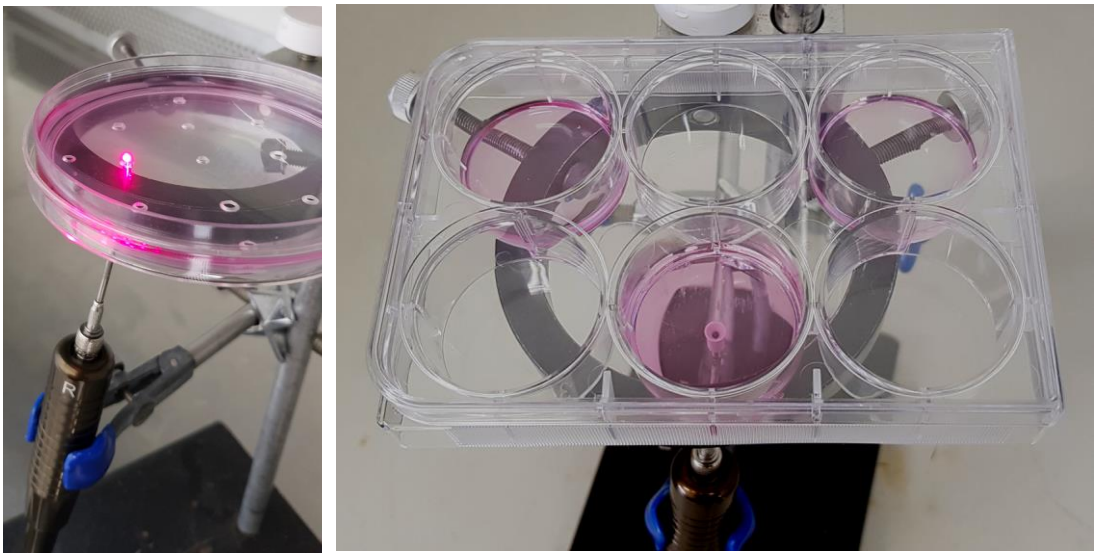
Tabela 4.2 Parâmetros da terapia de fotobiomodulação (PBMT)

Grupo experimental	Comprimento de onda (nm)	Potência (mW)	Área do feixe (cm²)	Densidade de Potência (W/cm²)	Tempo (s)	Densidade de energia (J/cm²)	Energia por ponto (J)
Grupo PBM1	λ = 660	P = 20	0,028	DP = 0,71	t = 4	DE = 3	E = 0,08
Grupo PBM2	λ = 660	P = 20	0,028	DP = 0,71	t = 7	DE = 5	E = 0,14

As irradiações ocorreram em dias alternados durante todo o período do experimento, de forma pontual [13 pontos/poço de 100mm de diâmetro (Figura 5.1A) e 5 pontos por poço de placas de 6 poços (Figura 5.1B)] e em contato com a base da placa. A potência do equipamento foi aferida antes e após todas as sessões de irradiação, com auxílio de medidor de potência (Laser Check, MM Optics Ltda, São

Carlos, SP, Brasil). O valor da emissão foi programado para os parâmetros do estudo através desse medidor, e não pelo valor no painel de controle.

Figura 4.1 - A: Fotografias das irradiações em placas de 100 mm de diâmetro (A) e de placas de 6 poços (B). Nas placas de 6 poços para evitar sobreirradiação dos grupos experimentais, os poços intercalados eram mantidos vazios. Para as placas de 10mm foi feita uma guia de irradiação com 11 pontos.



4.6 Análise das membranas celulares (*Cell Sheets*)

As culturas foram mantidas nos poços, sem subcultivos, até que as membranas celulares se soltassem das placas espontaneamente, isto ocorreu entre 14 e 18 dias. As membranas celulares dos diferentes grupos experimentais foram analisadas nos seus aspectos morfológicos e bioquímicos. Para tanto, CSs foram preparadas para análises em microscopia de luz (histologia e imunoistoquímica), e em microscopia eletrônica de varredura e de transmissão e, finalmente, outras CSs foram preparadas para serem submetidas à técnica do Western blot a fim de mensurar as quantidades de proteínas de sua matriz extracelular (MEC).

4.6.1 Histologia e imunoistoquímica

Para a avaliação histológica e imunoistoquímica das CSs foram utilizadas CSs de 2 poços de placas de 6 poços de cada grupo experimental. Essas CSs foram processadas para microscopia de luz usando processo histológico de rotina. Resumidamente, os CSs foram lavadas com PBS, fixadas numa solução de paraformaldeído a 4% (24 horas à temperatura ambiente) e depois removidas das placas. Após a fixação, as CSs foram emblocadas em parafina. Cortes histológicos de 5 µm foram obtidos e corados com hematoxilina e eosina (HE).

A imunoistoquímica foi utilizada para analisar o colágeno tipo I e a fibronectina que são componentes da matriz extracelular (MEC). Brevemente, dos blocos acima citados foram feitas secções de 3 µm de espessura, fixadas em lâminas revestidas com silano. As secções desparafinadas foram reidratadas utilizando um gradiente decrescente de etanol. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com solução de H_2O_2 a 3% por 45 minutos. A recuperação do epítopo induzida pelo calor foi realizada com tampão fosfato-citrato (P4809, Sigma-Aldrich) a 96 °C, pH 6,0,

durante 20 minutos. A ligação não específica foi bloqueada por incubação com Protein Block (X0909, Dako, Carpinteria, CA, EUA) por 10 minutos. As lâmimas contendo os cortes das CSs foram incubadas com anticorpo monoclonal anti-colágeno tipo I de humano desenvolvido em camundongo (Chemicon Austrália, Victoria, Austrália, diluição 1: 300) ou anticorpo monoclonal anti-fibronectina humana desenvolvido em camundongo (Calbiochem, CA, EUA, diluição 1:50) numa câmara úmida a 4 °C *overnigh*t. Todos os anticorpos foram diluídos em diluente de anticorpo (S0809, DAKO). As secções das CSs foram incubadas com o sistema Chain Polymer-Conjugated Technology-based detection system (EnVision®, DAKO) durante 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, a reação foi revelada por uma mistura de substrato cromogênico (3,3'-diaminobenzidina, D5905, Sigma-Aldrich). As secções foram contrastadas com a hematoxilina de Harris. Todos as lavagens foram realizadas com solução de PBS à temperatura ambiente. Um espécime de polpa dentária de rato foi utilizado como controle positivo para todas as proteínas avaliadas (os anticorpos primários reagiam com rato e humano). A supressão do anticorpo primário serviu como um controle negativo.

4.6.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para a microscopia eletrônica de varredura, as CSs foram fixadas com a solução de Karnovsky modificado (glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 2% em solução tampão fosfato de sódio a 0,1M e pH 7,4) por 1 hora em temperatura ambiente, em seguidas as amostras foram lavadas com tampão fosfato de sódio a 0,1M e pH 7,4, e então as CSs foram pós-fixadas com 1% de tetróxido de ósmio por 1 hora em temperatura ambiente, lavadas com água destilada e desidratas em álcool (70-100%) por 5 minutos em cada álcool e secas em aparelho ponto crítico Balzers CPD-030 (Balzers, Liechtenstein) utilizando CO_2 líquido. As amostras secas foram montadas em bases metálicas (*stubs*) e cobertas com íons de ouro em aparelho Balzers Union SCD-040 (Balzers, Liechtenstein) e analisadas ao microscópio eletrônico de varredura Neoscope JCM-5000 (Tóquio, Japão).

4.6.3 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Para a microscopia eletrônica de transmissão, fragmentos de 2x2mm das CSs foram cortados após a pós-fixação com 1% de tetróxido de ósmio, conforme descrito na técnica de microscopia eletrônica de varredura, desidratados em álcool 70-95% por 5 minutos cada, 4 vezes no álcool 100% pelo mesmo tempo e 4 vezes em óxido de propileno também por 5 minutos cada. Em seguida as amostras foram embebidas em resina Spurr® (EMS, 14300) nas seguintes proporções: 1:1 e 3:1 resina: óxido de propileno por 1 hora cada e em seguida, em resina pura *overnight*, todas em temperatura ambiente. As amostras foram emblocadas em resina pura e a polimerização foi realizada em estufa a 60°C durante 72 horas. Cortes de 50nm foram realizados, montados em telas de cobre de 200-mesh (EMS, G200-Cu), os cortes então, foram contrastados em 4% de acetato de uranila e 0,4% de citrato de chumbo (Cury, 2016). As amostras foram analisadas no microscópio eletrônico de transmissão Tecnai FEI G20 (Hillsboro, Oregon, EUA) a 200kV.

4.6.4 Western blotting

Foi realizada quantificação das proteínas para os grupos Controle, PBMT1 e PBMT2. O meio de cultura foi então descartado e as células foram lavadas com PBS a 4°C. Para extração das proteínas, as células foram raspadas com o auxílio de *cell scraper* imersas em tampão RIPA (50 mM Tris-HCl, 150mM cloreto de sódio, 1% Triton X100, 1% desoxicolato de sódio, 0,1% de SDS, 1mM EDTA) acrescido de inibidor de protease (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Essa solução foi então coletada e centrifugada a 11000 x g por 20 minutos a 4ºC. Depois da centrifugação, o sobrenadante foi coletado e as proteínas foram quantificadas pelo método do ácido

biocinconínico (BCA) (Protein Assay Reagent Kit, ThermoScientific, EUA). As amostras foram então alíquotadas em tubos tipo Eppendorf numa concentração de 30µg de proteína e congeladas em -80ºC até a realização dos ensaios de Western blotting.

As alíquotas foram diluídas em tampão da amostra (3% de SDS, 150 mM Tris pH 6,8, 15% de β-mercaptoetanol, 30% de glicerol e 0,01% de azul de bromofenol) e, em seguida, mantidas em banho-maria a 95ºC. Após a desnaturação das proteínas, as amostras foram submetidas à eletroforese com gel de corrida à base de acrilamida a 100 V em temperatura ambiente. A concentração de acrilamida foi definida de acordo com o peso molecular das proteínas estudadas, variando de 7,5 a 10%. Foi utilizada cuba para eletroforese vertical (BioRad, Hercules, CA, EUA) acoplada a fonte de elétrons (LPS 300V, Loccus do Brasil LTDA, São Paulo, Brasil). Para o controle da eletroforese e posteriormente do blot, utilizou-se padrão de peso molecular Precision Plus Kaleidoscope Protein Standard (Bio Rad, Hercules, CA, EUA). Após a eletroforese, procedeu-se a transferência das proteínas do gel de acrilamida para membranas de nitrocelulose (Amersham-GE Healthcare Life Science, Little Chalfont, Reino Unido) sob voltagem de 60 V por 1 hora e 30 minutos a 4 ºC. Depois da transferência, as membranas foram incubadas com BSA 5% por 1h, para bloqueio de sítios inespecíficos. Em seguida, foram incubadas *overnight* a 4 ºC com os anticorpos primários. As concentrações utilizadas para a fibronectina (Anti-Fibronectin abcam ab2413) foi de 1: 1000 (5µL do anticorpo para 5mL de 5% de BSA), para a integrina (Anti-Integrin abcam ab52971) foi de 1: 500 (10µL do anticorpo para 5mL de 5% BSA) e para a ß-actina (Anti-actina abcam ab8227) foi de 1:5000. Após a incubação com o anticorpo primário, as membranas foram lavadas em TBST (150 mM cloreto de sódio, 20 mM Tris base pH 7,6, 0,1% Tween 20) sob agitação em temperatura ambiente (3 lavagens de 5 minutos cada) e, em seguida, foi realizada a incubação com anticorpo secundário por 1 hora e 30 minutos em temperatura ambiente. Os anticorpos secundários utilizados neste estudo foram: para integrina anti-coelho IgG (abcam ab205718) foi usado na concentração de 1: 11000, e o anti-camundongo IgG (abcam ab6785) na concentração de 1: 11000 foi usado para integrina. Em seguida, as

membranas foram lavadas com TBST (3 lavagens de 5 minutos cada) e imersas em solução contendo luminol (ECL Prime, Amershan-GE Healthcare Life Science, Little Chalfont, Reino Unido) para análise por quimioluminescência. As membranas foram então digitalizadas em escaner para blot (C-Digit®, Li-Cor Biosciences, Lincoln, Reino Unido). A quantificação das bandas foi feita pela análise de densidade utilizando o programa Image J. Os ensaios de Western blotting foram feitos em triplicata experimental para todos os grupos.

Para a quantificação de colágenos Tipos I e III os procedimentos acima descritos foram utilizados com algumas modificações. Brevemente, as CSs foram homogeneizadas com tampão de extração RIPA modificado (0,625% Nonidet P-40, 0,625% ácido desoxicólico, 6,25mM fosfato de sódio pH 7,2, 1mM EDTA pH 8,0) contendo 10µg/ml de inibidor de protease (Ramos et al., 2018). As amostras homogeneizadas foram centrifugadas por 10 minutos a 4°C a 10000 xg, o sobrenadante foi separado e utilizado para determinar a concentração de proteínas pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Uma quantidade de 30 µg de proteínas foi pipetada com Tampão de Amostra Laemmli 4x Bio-Rad #1610747 e 10% de β-Mercaptoetanol, agitadas por 5 minutos a 95 °C e então submetidas à eletroforese em gel de 10% SDS-Poliacrilamida. As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose utilizando o equipamento Trans-Blot® TurboTM, com o kit de transferência Trans-Blot® TurboTM RTA Transfer Kit, Nitrocellulose Bio-Rad #170-4270. As membranas foram bloqueadas com 5 % de BSA em TBST por 1 hora em temperatura ambiente, e incubadas *overnight* a 4°C com os seguintes anticorpos primários: anti-COL1A1 (Rhea Imuny IM-0283) para o colágeno tipo I, anti-COL3A1 (Cusabio CSB-MA000282) para colágeno tipo III e anti-β-Tubulina 3 (Aves TUJ), diluídos com 5 % de BSA em TBST nas proporções de 1:500 (colágeno tipo I), 1:1.000 (colágeno tipo III) e 1:5.000 (β-Tubulina 3). Em seguida as membranas foram lavadas por 15 minutos com TBST e incubadas com anticorpos secundários em temperatura ambiente por 1 hora, lavadas por 30 minutos com TBST e incubadas por 2 minutos com o reagente LuminataTM Forte Western HRP Substrato (Millipore #WBLUF0500). As membranas foram reveladas no equipamento Fusion Fx (Vilber Lourmat

Byosystems), com o software VisioCapt que também foi utilizado para a densitometria das bandas.

Para a análise estatística das proteínas analisados por Western blotting, a densitometria das bandas foi obtida com o software VisioCapt, os colágenos tipos I e III foram normalizados pela proteína endógena β-Tubulina III e as proteínas, fibronectina e integrina foram normalizadas por β-Actina.

4.5 Análise estatística

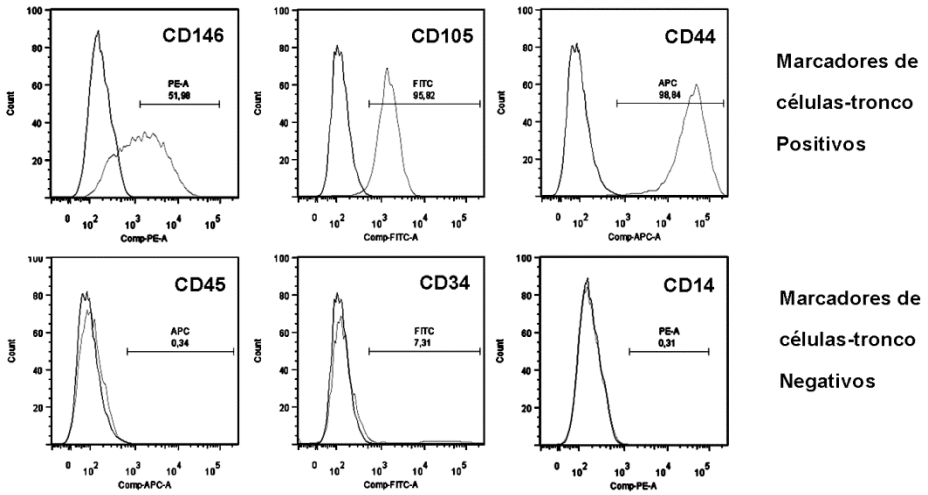
Inicialmente foi realizado o teste de Lilliefor para checar a normalidade dos dados, em seguida uma análise de ANOVA, seguida de pós-teste de Tukey de múltiplas comparações. Para diferença estatística foi adotado $p<0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Perfil imunofenotípico das células

A recaracterização das hDPSCs realizada pela detecção de marcadores de superfície de células-tronco mesenquimais por citometria de fluxo mostrou que essas células expressaram os níveis típicos desses marcadores de superfície. A Figura 5.1 apresenta os histogramas das hDPSCs obtidos por citometria de fluxo. As culturas expressaram os marcadores de células-tronco mesenquimais (CD146, CD105 e CD44). Os marcadores de células hematopoiéticas (CD45 e CD34) e endoteliais (CD14) apresentaram expressão ausente ou mínima.

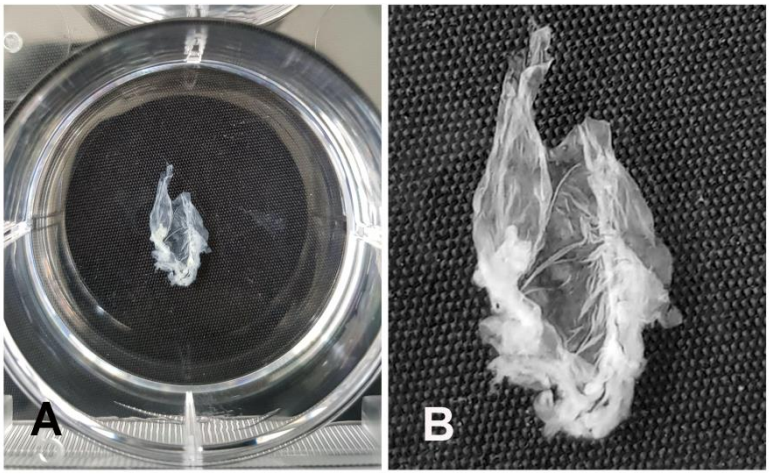
Figura 5.1 - Ilustração gráfica da imunofenotipagem das hDPSCs após o descongelamento (P4). Os números dentro dos gráficos indicam porcentagem (%) de células positivas ao anticorpo primário para o marcador de superfície em questão. Os picos à esquerda representam os controles isotípicos de cada marcador. Os picos à direita, quando presentes, representam a população celular marcada com o anticorpo



5.2 Membranas Celulares (*Cell Sheets*)

As *cell sheets* (CSs) se soltaram entre 13 e 15 dias das placas de cultivo celular. A Figura 5.2 ilustra o aspecto macroscópico das CSs imediatamente após se soltarem das placas de cultivo celular. Essas finas membranas assumiam um aspecto epitelióide e se enrolavam sobre si mesmas, porém podiam ser manipuladas e esticadas com o uso de pinças.

Figura 5.2 - Fotografias das membranas celulares. (A) *Cell sheet* (CS) flutuando em PBS dentro de um poço de placa de 6 poços e em (B) esta mesma CS em maior aproximação mostrando sua aparência epitelioide



5.3 Histologia e imunoístoquímica

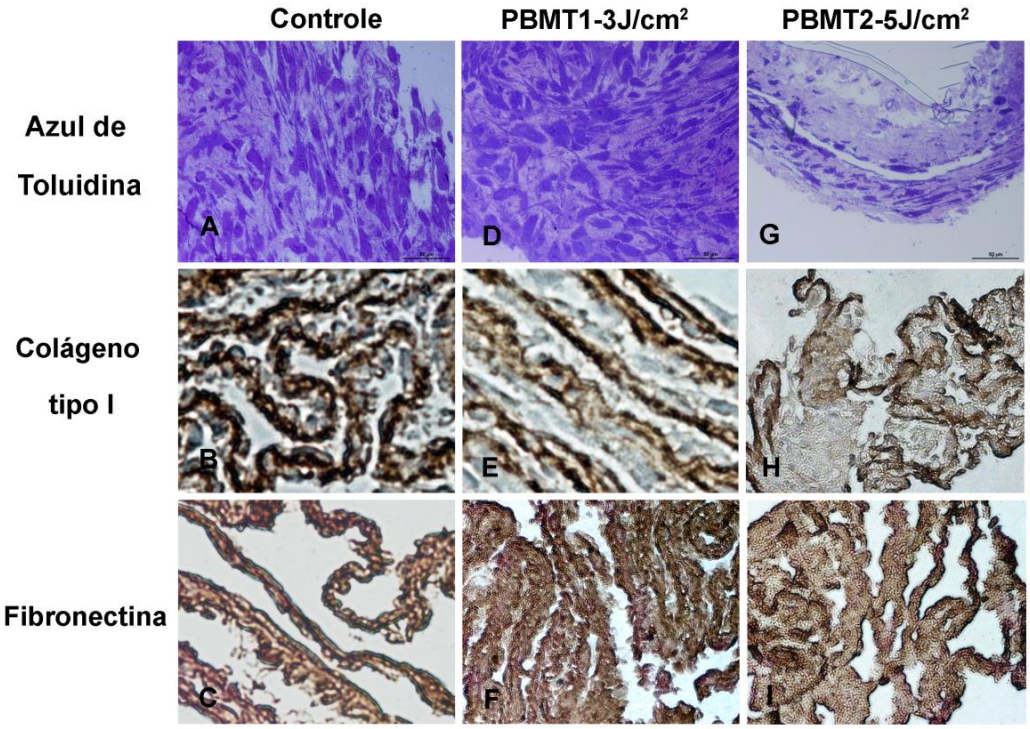
A Figura 5.3 ilustra os aspectos histológicos e imunoistoquímicos das CSs do grupo controle (Figuras. 5.1A-C), PBMT1 (Figuras. 5.1D-F) e PBMT2 (Figuras. 5.1G-I). Nos cortes histológicos corados com azul de toluidina, as CSs apresentaram células arranjadas dentro de uma matriz extracelular (MEC). As células do grupo controle (Figuras.5.1A) apresentaram corpo celular amplo, ora arredondado, ora poligonal, distribuídas de forma espaçada numa MEC delicada. As células do grupo PBMT1 (Figuras. 5.1D) apresentavam corpo celular amplo e espraiado, algumas vezes de aspecto fusiforme numa MEC mais densa. As CSs do grupo PBMT2

(Figuras.5.1G) apresentaram corpo celular pequeno, fino e alongado que se arranjavam como feixes sobre ampla MEC.

O colágeno tipo I foi detectado nas reações imunoistoquímicas nas CSs de todos os grupos experimentais como forte marcação mais próxima das células e mais fraca na MEC subjacente (Figuras. 5.1 B,E,H). O grupo PBMT2, que apresentou uma MEC mais ampla, mostrou maior predominância de marcação fraca em comparação com os demais grupos (Figuras. 5.1H).

A fibronectina também foi detectada nas CSs de todos os grupos experimentais (Figuras. 5.1C,F,I). Nos grupos controle e PBMT1 a reação mostrou forte marcação de fibronectina por toda a MEC (Figuras. 5.1C,F, respectivamente). No grupo PBMT2 a marcação foi mais fraca e também distribuída de forma uniforme por toda a MEC (Figura.5.1I).

Figura 5.3 - Fotomicrografias das membranas celulares do grupo controle (A-C), PBMT1 (D-F) e PBMT2 (G-I). (A,D,G) Cortes semifinos das CSs corados por azul de toluidina (Aumento original 100x); (B,E,H) reações imunoístoquímicas para detecção de colágeno tipo I (Aumento original 40X) e (C,F,I) reações imunoístoquímicas para detecção de fibronectina (Aumento original 40X)



5.4 Ultraestrutura das Membranas Celulares

A ultraestrutura das CSs dos 3 grupos experimentais foi observada tanto em microscopia eletrônica de varredura (MEV), quanto em microscopia eletrônica de transmissão (MET).

5.4.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

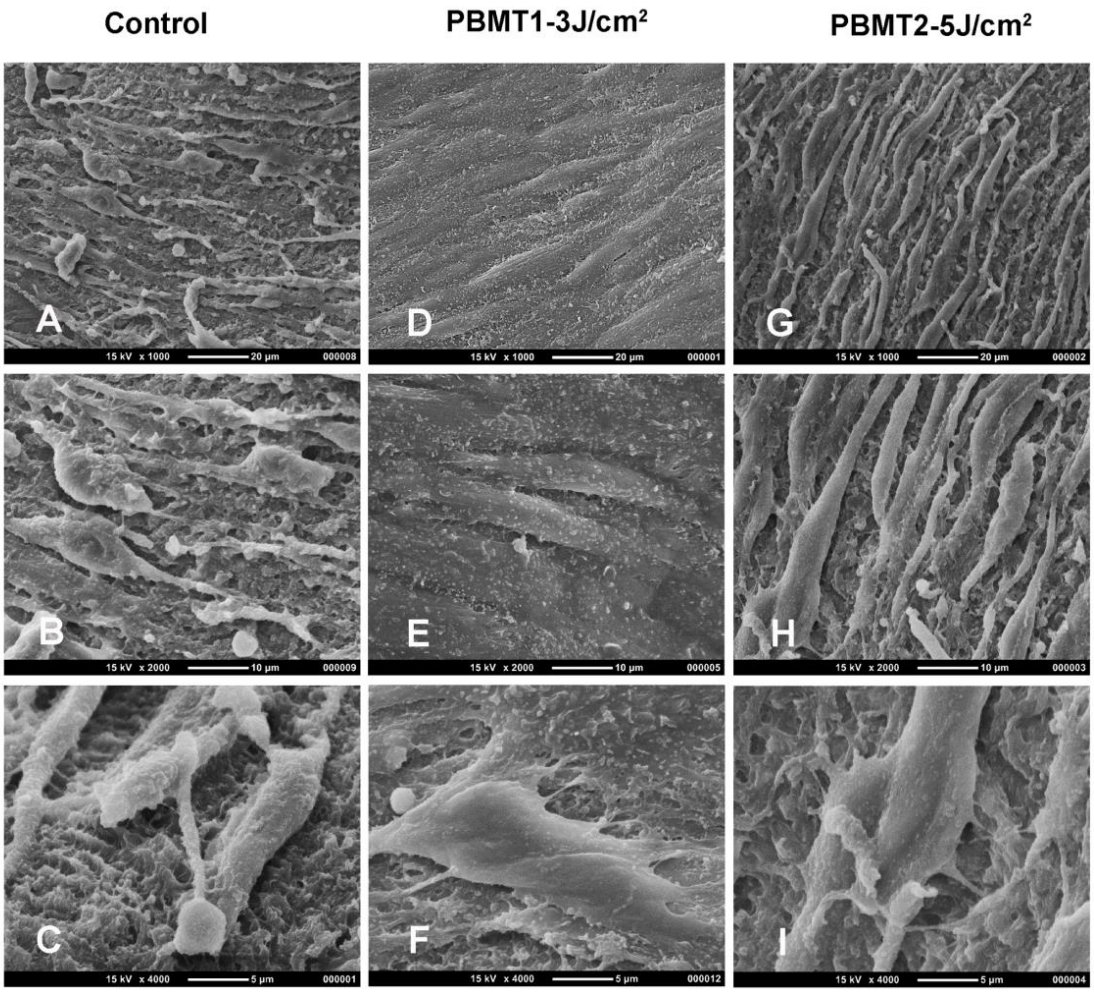
A Figura 5.4 apresenta o aspecto superficial das CSs dos 3 grupos experimentais em eletromicrografias de varredura. Tanto a morfologia geral das CSs, quanto a morfologia de suas células individualmente, e mesmo como estas se relacionaram com sua matriz extracelular (MEC) foram diversas nos diferentes grupos experimentais.

As CSs do grupo controle (Figuras. 5.4A-C), que cresceram sem terem sido submetidas à PBMT, apresentaram células distribuídas de forma aleatória na sua superfície (Figuras. 5.4A). Estas células se apresentavam espaçadas, com corpo celular rotundo e extensões citoplasmáticas curtas (Figuras. 5.4B,C). Em maior aumento era possível observar que essas células pareciam estar apenas apostas sobre a MEC (Figura. 5.4C). A MEC apresentou aspecto corrugado, delicado, com finas projeções para a superfície (Figura.5.4C).

As CSs do grupo PBMT1 (Figuras. 5.4D-F), que foram submetidas à PBMT com 3J/cm^2, apresentaram um aspecto epitelióide, ou seja, de lençol de células justapostas e achatadas (Figuras. 5.4D,E). Individualmente estas células eram grandes, achatadas e próximas (Figura. 5.4E) e em maior aumento mostraram extensões citoplasmáticas finas em íntimo contato com a MEC e com as demais células da CS (Figuras. 5.4F). Estas CSs apresentavam tanto sobre suas células, quanto de permeio aos demais componentes de sua MEC, estruturas pequenas e arredondadas (Figuras. 5.4A-F). A MEC mostrou aspecto liso e compacto (Figura.5.4F).

As CSs do grupo PBMT2 (Figuras 5.4G-I), submetidas à PBMT com a densidade de energia de 5J/cm^2, apresentaram morfologia geral bastante ordenada, com células isoladas e arranjadas em feixes unidirecionais (Figura 5.5G). Individualmente as células apresentaram-se finas e alongadas num aspecto tubular e estavam dispostas de forma paralela umas as outras (Figuras. 5.4H,I). Estas células apresentam prolongamentos finos (lamilipódias) em íntimo contato com a sua MEC que exibia aspecto poroso (Figura. 5.4I).

Figura 5.4 - Eletromicrografias de varredura de CSs do grupo controle (A-C), PBMT1 (D-F) e PBMT2 (G-I)



5.4.2 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A MET revelou a morfologia da MEC das CSs de todos os grupos experimentais. Foram observadas diferenças morfológicas nas células, nas MECs, bem como na disposição dessas células dentro das MECs (Fig. 5.5).

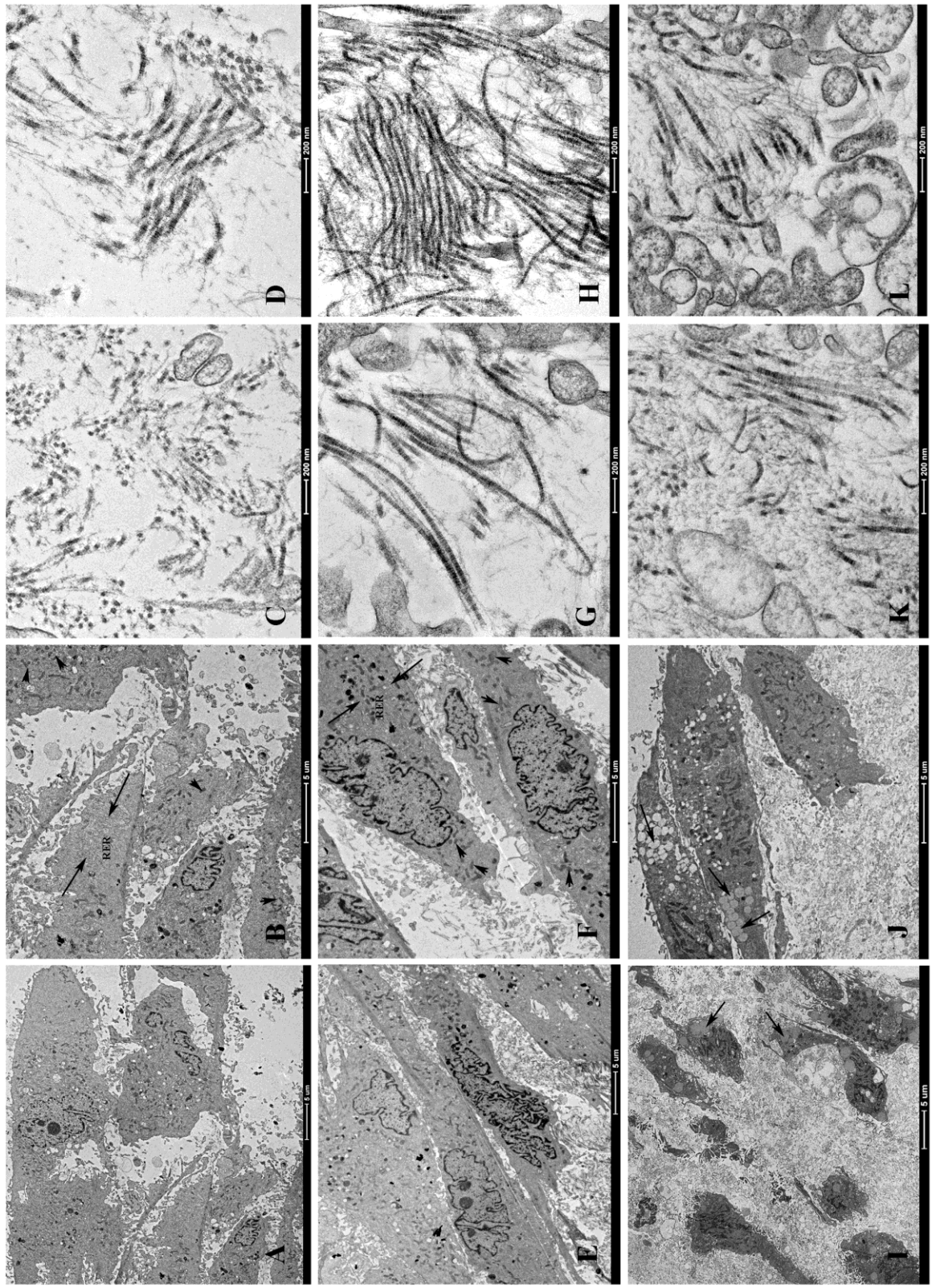
No grupo controle (Figuras.5.5A-D) as células apresentavam formato arredondado ou ovoide, com núcleos centralizados e nucléolos evidentes (Figuras 5.5A,B). Além disso, apresentavam citoplasma abundante e rico em mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso (RER) (Figura 5.5B). A MEC apresentava alguns elementos fibrilares com periodicidade discreta, interpretados como fibras de colágeno, às vezes formando pequenos feixes cortados em diferentes sentidos. Estes elementos apareciam de forma discreta de permeio a uma MEC rica em material amorfo (Figuras.5.5C,D).

No grupo tratado com a PBMT1 (Figuras. 5.5E-H) as células apareciam mais alongadas, com núcleo grande, endentado e com nucléolos múltiplos. O citoplasma também apareceu denso e rico em mitocôndrias e RER (Figura.5.5F). A MEC deste grupo mostrou uma quantidade mais expressiva dos elementos fibrilares, que apresentavam periodicidade evidentes (Figuras.5.5G,H). Esses elementos eram mais longos e formavam feixes maiores que aqueles do grupo controle. Além dos elementos fibrilares, também havia grande quantidade de material amorfo na MEC por entre as células.

No grupo tratado com o PBMT2 (Figuras.5.5I-L), parâmetro de maior energia, mostrou células ainda mais alongadas que aquelas observadas no grupo PBMT2. Essas células tinham núcleos sem nucléolos evidentes e muitas delas apresentavam achados de células entrando em apoptose, como a condensação da cromatina nos núcleos que apareciam fragmentados (Figuras.5.5I,J). No citoplasma, bem como em alguns núcleos, era comum encontrar vesículas similares àquelas de autofagia celular (Figuras.5.5I,J) . Mais ainda, no espaço extracelular eram observadas muitas vesículas, algumas vazias, outras contendo material amorfo e ainda outras com elementos que lembravam a mitocôndrias, com dupla membrana, bem como núcleos soltos com característica de núcleos em fase final de apoptose (Figuras 5.5I-L). Em algumas áreas estes elementos circulares estavam de permeio a feixes de fibras

com periodicidade e aparência similar àquelas observadas no grupo PBMT1 (Figuras.5.5K,L).

Figura 5.5 - Eletromicrografias de transmissão representativas dos espécimes de CSs dos grupos: controle (A-D), PBMT1 (E-H) e PBMT2 (I-L). RER: retículo endoplasmático rugoso, setas indicam o RER, enquanto cabeças de setas indicam mitocôndrias



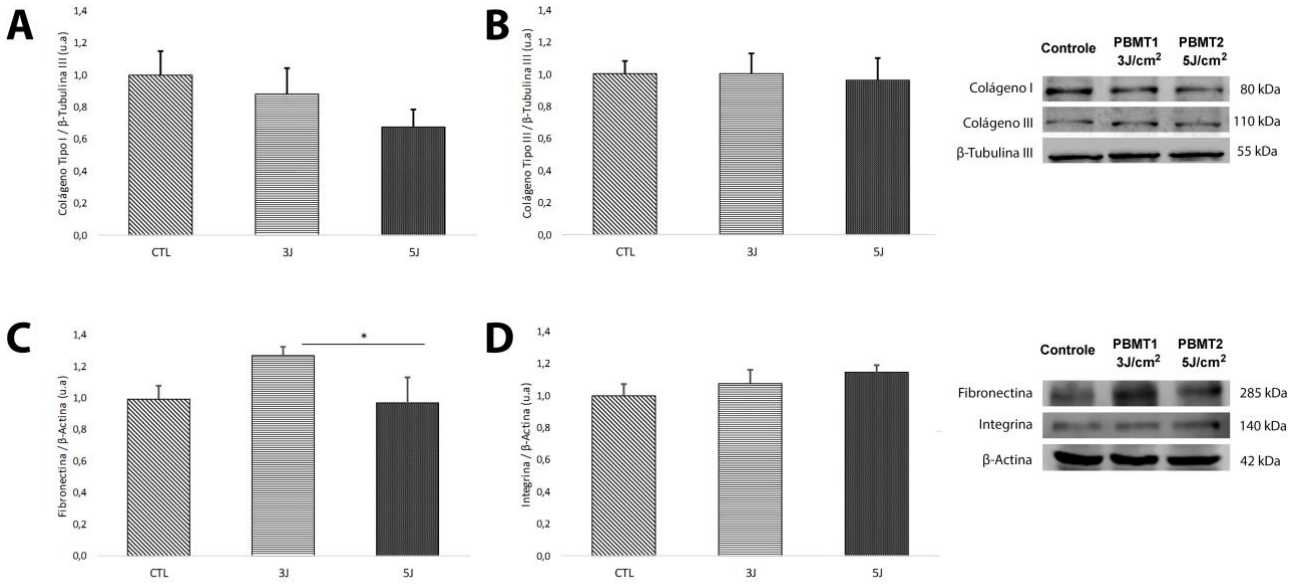
5.5 Western blotting

Foram quantificados na MEC das CSs os colágenos tipos I e III, bem como a fibronectina. Adicionalmente, foi quantificada a integrina, que é uma proteína de adesão à MEC. A Figura 5.6 lustra os resultados desta análise.

Os colágenos tanto do tipo I quanto do tipo III foram detectados nas CSs em quantidades similares nos 3 grupos experimentais. A fibronectina também foi detectada nas CSs dos 3 grupos, sendo que o grupo tratado com a PBMT1 (3J/cm^2) apresentou quantidade similar à do grupo controle (p=0,057) e significativamente maior que aquela do grupo tratado com PBMT2 (p=0,038). A quantidade de fibronectina nos grupos controle e PBMT2 foram similares.

A integrina apresentou quantidades similares nos 3 grupos experimentais.

Figura 5.6 - Representação gráfica dos resultados do ensaio de Western blot. Colágeno tipo I (A), Colágeno tipo III (B) e Integrina (D) foram detectados em quantidades similares nos 3 grupos experimentais. O grupo PBMT2 apresentou quantidade de fibronectina significativamente maior que nos demais grupos experimentais (*significativamente diferente; p=0,0383)



6 DISCUSSÃO

A engenharia de tecidos é um tratamento de regeneração no qual células-tronco, *scaffolds* e fatores de crescimento estão associados. Estes componentes formam uma tríade, que deve ser harmoniosamente balanceada para se obter os resultados esperados. A técnica das membranas celulares (CSs, *cell sheets*) nasce como um tratamento alternativo, já que associam dois dos três elementos da tríade de engenharia de tecidos. Pedroni e colaboradores (2018) mostraram que a terapia de fotobiomodulação (PBMT do inglês *photobiomodulation therapy*) não interfere na formação de CSs de células-tronco de polpa dentária humana e, em estudo anterior, observaram que as CSs submetidas à PBMT pareceriam apresentar maior resistência mecânica ao serem manipuladas (Pedroni, 2016). Assim sendo, com a hipótese que a PBMT pudesse influenciar na composição e organização da matriz extracelular (MEC) das CSs, o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos de diferentes parâmetros de PBMT sobre a arquitetura, composição proteica e ultraestrutura da MEC de CSs de células-tronco da polpa dentária humana. O principal achado do presente estudo foi a obtenção de uma CS com maior quantidade de fibronectina e de aspecto mais maduro quando a PBMT foi aplicada nos parâmetros de 660nm, 20mW e 3J/cm^2. Mais ainda, a PBMT promoveu a formação de CSs mais organizadas, independentemente do parâmetro empregado na PBMT.

A natureza das células que formaram as CSs é de relevância para este estudo. Neste sentido, células que já haviam sido caracterizadas como células-tronco de polpa dentária humana foram descongeladas e recaracterizadas. A recaracterização mostrou que as células, mesmo após os processos de congelamento e descongelamento, não tiveram alteração de sua natureza. Na verdade, elas expressaram marcadores de superfície celular característicos de células-tronco mesenquimais (MSCs do inglês *mesenchymal stem cells*), a saber CD146, CD44 e CD105, e não expressaram os marcadores não-associados às MSCs, como CD45, CD34 e CD14. Esse experimento foi importante para que tivéssemos certeza que as células seriam células-tronco e, portanto, poderiam

formar CSs com características favoráveis para uma futura aplicação em engenharia tecidual ou terapia celular.

Como esperado, após 13 a 15 dias em cultivo, com vitamina C (VC) no meio de cultura, as CSs se soltaram do fundo da placa de cultivo espontaneamente, independentemente dos grupos experimentais, e puderam ser analisadas pelas diversas técnicas aqui desenvolvidas. Esse achado confirma os resultados anteriores que mostraram que a PBMT não interfere com a formação de CSs induzidas por VC (Pedroni et al., 2018a,b)

No presente estudo, foi realizada uma caracterização do ponto de vista morfológico por microscopia de luz, eletrônica de varredura e de transmissão. Mais ainda, as proteínas da MEC, a saber, colágenos tipo I, III e fibronectina foram quantificados com o uso da técnica do Western blot no intuito de se verificar possíveis diferenças entre as CSs de grupos irradiados e não-irradiados. Os resultados mostraram diferenças morfológicas interessantes entre as CSs dos diversos grupos experimentais, bem como uma quantidade aumentada de fibronectina no grupo submetido à PBMT 1, ou seja, na PBMT que utilizou a menor densidade de energia ($3J/cm^2$).

Os métodos mais adequados para se observar os efeitos da PBMT em cultivo celular são aqueles em que as células são cultivadas sob algum tipo de estresse, por exemplo, submeter as células a déficit nutricional (Almeida-Lopes et al., 2001; Pereira et al., 2002), ou ao contato com substâncias que comprometem a proliferação celular, como a dexametasona (Fujihara et al., 2006). No presente estudo, optamos por não colocar as células em déficit nutricional e as CSs foram cultivadas nas condições ideais e ainda sob a indução de VC. Neste caso, não seria esperado observar diferenças na formação da MEC entre os grupos experimentais. No entanto, quando as células confluem, mesmo que sua telomerase continue ativa como demonstrado por Pedroni et al., 2018a, há uma diminuição do metabolismo celular que, por inibição de contato diminuem sua capacidade proliferativa, entre outras. Neste caso, com metabolismo diminuído, se a PBMT pudesse modificar a formação e a remodelação da MEC sintetizada pelas células-tronco polpa dentária humana nas CSs, este efeito poderia ser detectado, oque de fato ocorreu. A PBMT foi capaz de alterar a morfologia das CSs. A disposição das células, bem como a sua

morfologia individual foram influenciadas pela PBMT. Células de CSs não irradiadas tinham aspecto mais indiferenciado, com corpo celular mais amplo e se dispunham na matriz de forma aleatória e dispersa. Quando submetidas à PBMT, em ambos os parâmetros aplicados, estas células passaram a ser mais achatadas e próximas num arranjo mais organizado, achados estes confirmados pela microscopia eletrônica de varredura. Superficialmente, as CSs do grupo PBMT1 se assemelhavam a epitélios, enquanto no grupo PBMT2 as células assumiam aspecto fibroblástico, alongadas e chegavam a formar feixes celulares nas CSs. Esse achado foi similar ao observado por (Almeida, 2001) que mostraram que a PBMT levou a uma polarização dos fibroblastos, que formaram feixes em diferentes direções.

Os achados do presente estudo indicam que a PBMT parece exercer efeitos na disposição do citoesqueleto celular. Oliveira et al., 2009 avaliando ao citoesqueleto de fibroblastos L929 com faloidina-rodamina submetidos à PBMT verificaram que as células exibiram maior distribuição e organização dos filamentos de actina por todo o citoplasma comparado com as células não irradiadas (Oliveira, 2009). Mais ainda, já foi reportado que a PBMT favorece a regeneração de tecidos ao invés da cicatrização, provavelmente por esta capacidade de modificar o citoesqueleto celular. Moreira e colaboradores (2011) demonstraram esta capacidade da PBMT que regenerou o tecido nervoso do cérebro de ratos após trauma criogênico. No entanto, em nenhum dos trabalhos que reportaram alterações morfológicas das células em resposta à PBMT foi apresentada uma explicação para estes achados (Moreira et al., 2011).

As MECs das CSs dos três grupos experimentais apresentaram diferenças, tanto do ponto de vista de quantidade de proteínas, quanto de interação com as células das CSs. Todas as CSs, independentemente dos grupos experimentais, apresentaram as proteínas de MEC estudadas, a saber: colágenos tipos I e II e fibronectina. Em estudo anterior, Pedroni et al., (2018) demonstraram a presença destas proteínas em CSs e, além disso, esse trabalho mostrou que as CSs apresentam grande expressão de integrinas (Pedroni, et al., 2018). As integrinas também foram analisadas no presente estudo, porém essa proteína da membrana celular apareceu em quantidades similares em todos os grupos estudados. Sabe-se que as integrinas são responsáveis pela ligação das proteínas da MEC às células (Devlin, 2008). Mais ainda, essa interação suporta a autorenovação de células-

tronco e sua pluripotência (Braam et al., 2008). De fato, esse efeito da integrina deve também ter influência na manutenção da atividade da telomerase e da indiferenciação das células-tronco de polpa dentária humana nas CSs demonstrada por Pedroni et al., 2018a e 2018b, respectivamente (Pedroni, Diniz, et al., 2018; Pedroni, et al., 2018).

A alteração morfológica dos CSs do grupo PBMT1 deve estar intimamente relacionada com a grande formação de fibronectina. Esta proteína deve ter sido responsável pelo aspecto epitelióide assumido pelas células CS do grupo PBMT1. Corroborando com essa hipótese, Brownell et al. (1981) já propuseram que a fibronectina pode melhorar a montagem da membrana basal. Esta capacidade é consistente com a distribuição de fibronectina in vivo, como constituinte de muitas membranas basais embrionárias e principal componente de leitos de feridas (Clark et al., 1982) Fibronectina suporta migração celular e após diferenciação usando a capacidade de promover a montagem de ECM madura na forma de membrana basal. Isso poderia estar ocorrendo nos CSs tratados com PBMT1, uma vez que a síntese dos colágenos tipo I e tipo II não foi aumentada, a aparência morfológica das fibras de colágeno nas imagens do TEM indicaram uma maior maturidade dessas fibras quando comparadas com as CSs controle. A confirmação desta suposta diferenciação epitelial dos CSs induzida por PBMT1 deve ser testada no futuro, analisando a possível síntese de colágeno tipo IV e a presença de citoqueratina nas células desse grupo. Se a diferenciação epitelial dos CSs pudesse ser confirmada, este achado pode ser importante para a futura engenharia de tecidos para substituição de tecidos com membranas basais, como epitélios e endotélios.

Eletronmicrografias de transmissão revelaram CSs do grupo controle com achados de células saudáveis, o que também era esperado, uma vez que Pedroni e colaboradores (2018b) mostraram que as células em SCs são vitais até 96 horas após a sua formação. No entanto, sob a ação do PBMT, especialmente na maior densidade energética, foram observadas algumas alterações morfológicas nos SCs, além de fibras colágenas mais maduras, sinais de autofagia e apoptose, bem como a presença de componentes intracelulares dispersos com a MEC. De fato, Friedman et al. (1991) já chamavam a atenção para a possibilidade de dano celular ao aplicar PBMT em altas doses. Segundo esses autores, o PBMT intensifica a formação de um gradiente transmembrana de prótons eletroquímicos na mitocôndria por um

processo antiportal, que quando a aplicação de PBMT é realizada em densidades mais altas de energia laser pode levar ao influxo de água e explosão das células. Assim, para CSs de hDPSCs, talvez o 5J / cm2 seja uma densidade de energia muito alta que levou à desctrução de algumas células, como observado nas imagens TEM. Assim, os CSs tratados com este parâmetro PBMT não foram os mais adequados para serem aplicados na engenharia de tecidos.

O colágeno, segundo as análises de imunoistoquímica e de Western blotting, foi formado pelas células-tronco nas CSs de todos os grupos experimentais e em quantidades similares, respectivamente. Este resultado não era esperado já que é sabido que a PBMT pode aumentar a produção de colágeno (Ayuk, 2018) na dependência dos parâmetros utilizados. No entanto, as eletromicrografias de transmissão indicaram que ao menos do ponto de vista morfológico, a qualidade do colágeno da MEC foi diferente quando comparamos o grupo controle não irradiado e os grupos PBMT. Na verdade, o colágeno nos grupos PBMT apresentaram características mais maduras, formando feixes maiores e com periodicidade mais evidentes que aqueles observados no grupo controle.

Achados resultantes de efeito positivo da PBMT foram aqueles relacionados à qualidade da MEC formada nos grupos PBMT, que apesar de não ter sido detectado nos testes que avaliaram a quantidade de colágeno sintetizados, as fibrilas colagênicas nas eletromicrografias de transmissão se mostraram mais maduras, mais espessas e mais longas e com periodicidades mais marcantes e evidentes que nas MECs das CSs do grupo controle. Isso indica que a PBMT realmente poderia ser responsável pela formação de uma MEC mais resistente. Junte-se a isto a maior quantidade de fibronectina encontrada na MEC do grupo PBMT1. Estes achados nos levaram a crer que a PBMT levou à diferenciação das células das CSs que foram capazes de formar uma MEC mais madura. E esta capacidade da PBMT já havia sido observada por Pedroni et al., 2018[a], onde as CSs formadas sob a indução de VC e PBMT mostraram diferenciação funcional mais significativa que as CSs não irradiadas. Outros achados do presente estudo também corroboraram com esta hipótese de diferenciação celular, além dos arranjos das células nas CSs dos grupos PBMT observados nas eletromicrografias de varredura, a presença dos elementos característicos de apoptose e autofagia das células observados nas eletromicrografias de transmissão.

Baseados nos fatos acima descritos, acreditamos que as células das CSs dos grupos PBMT após se diferenciarem e produzirem sua MEC entraram em senescência. De fato, células que permanecem muito tempo em confluência tendem a entrar em senescência, Nas CSs induzidas e mantidas com VC este processo não acontece, e as células por manterem sua telomerase ativa, mesmo estando por muito tempo em confluência continuam vitais e com capacidade de entrar em divisão celular (Pedroni et al., 20198b). Porém, as células diferenciadas dos grupos PBMT acabaram por sofrer os efeitos da confluência e entraram em senescência.

PBMT é considerada uma terapia que não induz apoptose celular (Moreira et al., 2011; Pansani et al., 2014). Portanto, não acreditamos que a apoptose observada no presente estudo tenha sido resultante de uma ação direta da PBMT, mas sim uma consequência da diferenciação das células. A PBMT foi aplicada em dias alternados durante todo o processo de formação das CSs. Talvez, se as irradiações fossem aplicadas nos períodos mais tardios da formação das CSs, poderíamos tomar vantagem da formação de uma MEC mais bem estruturada antes do transplante das CSs e poderíamos evitar a senescência de suas células. Essa hipótese deverá ser testada em estudos futuros.

Os resultados do presente estudo indicam que a PBMT pode modificar a MEC de CSs de células-tronco da polpa dentária humana. Esta MEC se torna mais rica em fibronectina que, por serem proteínas adesivas, promoveram o intimo contato célula-célula e célula-MEC. Essa CS formada sob a influência da PBMT, especialmente no parâmetro de menor energia, parece mais organizada e, portanto, poderia ser transplantada de forma facilitada, oferecendo maior proteção às suas células, o que em torno poderia favorecer o sucesso do seu uso na engenharia de tecidos ou na terapia celular. No entanto, a PBMT nos parâmetros aqui aplicados levaram as células das CSs à senescência. Portanto, novos experimentos devem ser realizados modificando-se o momento da aplicação da PBMT no sentido de tomar vantagem de seu efeito positivo na formação das CSs e evitando seu efeito colateral indesejado que é o de levar as células à apoptose.

CONCLUSÃO

A PBMT influencia a composição e ultraestrutura da MEC de CSs de células-tronco da polpa dentária humana. A presença de maior quantidade de fibronectina e a maturidade do colágeno na MEC das CSs submetidas à PBMT poderia melhorar suas características mecânicas, o que favoreceria a terapia celular, facilitando o transplante dessas células-tronco.

REFERÊNCIAS[1]

Alberts, B., Bray, D., Julian, L., Raff, M., Roberts, K., & Watson, J.. *Molecular biology of the cell* (Garland Ed. second edition ed.). New York, USA: Garland Publishing. (1989)

AlGhamdi KM, Kumar A, Moussa NA. Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. Lasers Med Sci. 2012 Jan;27(1):237-49. doi: 10.1007/s10103-011-0885-2. Epub 2011 Jan 28.

Almeida-Lopes L, Rigau J, Zângaro RA, Guidugli-Neto J, Jaeger MM. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. Lasers Surg Med. 2001;29(2):179-84.

Arany PR, Cho A, Hunt TD, Sidhu G, Shin K, Hahm E, Huang GX, Weaver J, Chen AC, Padwa BL, Hamblin MR, Barcellos-Hoff MH, Kulkarni AB, J Mooney D.Photoactivation of endogenous latent transforming growth factor-β1 directs dental stem cell differentiation for regeneration. Sci Transl Med. 2014 May 28;6(238)

Ashcroft GS, Kielty CM, Horan MA, Ferguson MW. Age-related changes in the temporal and spatial distributions of fibrillin and elastin mRNAs and proteins in acute cutaneous wounds of healthy humans. J Pathol. 1997 Sep;183(1):80-9.

Ayuk SM, Abrahamse H, Houreld NN. Photobiomodulation alters matrix protein activity in stressed fibroblast cells in vitro. J Biophotonics. 2018 Mar;11(3).

Botelho J, Cavacas MA, Machado V, Mendes JJ. Dental stem cells: recent progresses in tissue engineering and regenerative medicine. Ann Med. 2017 Dec;49(8):644-651.

Braam SR, Zeinstra L, Litjens S, Ward-van Oostwaard D, van den Brink S, van Laake L, Lebrin F, Kats P, Hochstenbach R, Passier R, Sonnenberg A, Mummery CL. Recombinant vitronectin is a functionally defined substrate that supports human embryonic stem cell self-renewal via alphavbeta5 integrin. Stem Cells. 2008 Sep;26(9):2257-65.

[1] De acordo com Estilo Vancouver.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976 May 7;72:248-54.

Cury DP, Dias FJ Miglino MA, Watanabe IS. Structural and Ultrastructural Characteristics of Bone-Tendon Junction of the Calcaneal Tendon of Adult and Elderly Wistar Rats. PLoS One. 2016 Apr 14;11(4)

D'Alimonte I, Mastrangelo F, Giuliani P, Pierdomenico L, Marchisio M, Zuccarini M, Di Iorio P, Quaresima R, Caciagli F, Ciccarelli R. Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stromal Cells: A Comparative Analysis Between Human Subcutaneous Adipose Tissue and Dental Pulp. Stem Cells Dev. 2017 Jun 1;26(11):843-855.

de Freitas LF, Hamblin MR. Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. IEEE J Sel Top Quantum Electron. 2016 May-Jun;22(3).

de Sá Silva F, Almeida PN, Rettore JV, Maranduba CP, de Souza CM, de Souza GT, Zanette Rde S, Miyagi SP, Santos Mde O, Marques MM, Maranduba CM. Toward personalized cell therapies by using stem cells: seven relevant topics for safety and success in stem cell therapy. J Biomed Biotechnol. 2012;2012:758102.

Devlin, T. *Bioquimica: libro de texto con aplicaciones clínicas* (Reverte Ed. fourth edition ed. Vol. second volume). Barcelona-España: Reverte (2008).

Ding G, Niu J, Liu Y. Dental pulp stem cells suppress the proliferation of lymphocytes via transforming growth factor-β1. Hum Cell. 2015 Apr;28(2):81-90.

Diniz IMA, Carreira ACO, Sipert CR, Uehara CM, Moreira MSN, Freire L, Pelissari C, Kossugue PM, de Araújo DR, Sogayar MC, Marques MM. Photobiomodulation of mesenchymal stem cells encapsulated in an injectable rhBMP4-loaded hydrogel directs hard tissue bioengineering. J Cell Physiol. 2018 Jun;233(6):4907-4918.

Eduardo Fde P, Bueno DF, de Freitas PM, Marques MM, Passos-Bueno MR, Eduardo Cde P, Zatz M. Stem cell proliferation under low intensity laser irradiation: a preliminary study. Lasers Surg Med. 2008 Aug;40(6):433-8.

Fernandes AP, Junqueira Mde A, Marques NC, Machado MA, Santos CF, Oliveira TM, Sakai VT. Effects of low-level laser therapy on stem cells from human exfoliated deciduous teeth. J Appl Oral Sci. 2016 Jul-Aug;24(4):332-7.

Friedmann H, Lubart R, Laulicht I, Rochkind S. A possible explanation of laser-induced stimulation and damage of cell cultures. J Photochem Photobiol B. 1991 Oct;11(1):87-91.

Frozanfar A, Ramezani M, Rahpeyma A, Khajehahmadi S, Arbab HR. The Effects of Low Level Laser Therapy on the Expression of Collagen Type I Gene and Proliferation of Human Gingival Fibroblasts (Hgf3-Pi 53): in vitro Study. Iran J Basic Med Sci. 2013 Oct;16(10):1071-4.

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

Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Dec 5;97(25):13625-30.

Harumi Miyagi SP, Kerkis I, da Costa Maranduba CM, Gomes CM, Martins MD, Marques MM. Expression of extracellular matrix proteins in human dental pulp stem cells depends on the donor tooth conditions. J Endod. 2010 May;36(5):826-31.

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

Hwang MH, Son HG, Lee JW, Yoo CM, Shin JH, Nam HG, Lim HJ, Baek SM, Park JH, Kim JH, Choi H. Photobiomodulation of extracellular matrix enzymes in human nucleus pulposus cells as a potential treatment for intervertebral disk degeneration. Sci Rep. 2018 Aug 3;8(1):11654.

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

Karu TI. Multiple roles of cytochrome c oxidase in mammalian cells under action of red and IR-A radiation. IUBMB Life. 2010 Aug;62(8):607-10.

Kaufman G, Skrtic D. Spatial development of gingival fibroblasts and dental pulp cells: Effect of extracellular matrix. Tissue Cell. 2017 Jun;49(3):401-409.

Langer, R., & Vacanti, J. P. Tissue engineering. *Science, 260*(5110), 920-926. (1993)

Liao HT, Chen CT. Osteogenic potential: Comparison between bone marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells. World J Stem Cells. 2014 Jul 26;6(3):288-95.

Marques MM, Diniz IM, de Cara SP, Pedroni AC, Abe GL, D'Almeida-Couto RS, Lima PL, Tedesco TK, Moreira MS. Photobiomodulation of Dental Derived Mesenchymal Stem Cells: A Systematic Review. Photomed Laser Surg. 2016 Nov;34(11):500-508.

McGuff PE, Deterling RA Jr, Gottlieb LS. Tumoricidal effect of laser energy on experimental and human malignant tumors. N Engl J Med. 1965 Aug 26;273(9)

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

Oliveira DA, De Oliveira RF, Magini M, Zangaro RA, Soares CP. Assessment of cytoskeleton and endoplasmic reticulum of fibroblast cells subjected to low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasound. Photomed Laser Surg. 2009 Jun;27(3):461-6.

Pedroni, A. *Efeito da laser fototerapia associada ou n ã o à vitamina C na i ndução de membranas celulares (cell sheets) de células-tronco da polpa dentária humana.* (dissertação (mestrado)), Universidade de São Paulo, S ão Paulo-Brasil (2016).

Pedroni ACF, Diniz IMA, Abe GL, Moreira MS, Sipert CR, Marques MM. Photobiomodulation therapy and vitamin C on longevity of cell sheets of human dental pulp stem cells. J Cell Physiol. 2018 Oct;233(10):7026-7035.

Pedroni, A. C. F., Sarra, G., Oliveira, N. K., Moreira, M. S., Deboni, M. C. Z., & Marques, M. M. Cell sheets of human dental pulp stem cells for future application in bone replacement. In (no prelo ed.): Clinical Oral Investigations. (2018).

Pansani TN, Basso FG, Turirioni AP, Kurachi C, Hebling J, de Souza Costa CA. Effects of low-level laser therapy on the proliferation and apoptosis of gingival fibroblasts treated with zoledronic acid. Int J Oral Maxillofac Surg. 2014 Aug;43(8):1030-4.

Pereira LO, Longo JP, Azevedo RB. Laser irradiation did not increase the proliferation or the differentiation of stem cells from normal and inflamed dental pulp. Arch Oral Biol. 2012 Aug;57(8):1079-85.

Pivoriuūnas A, Surovas A, Borutinskaite V, Matuzeviccius D, Treigyte G, Savickiene J, Tunaitis V, Aldonyte R, Jarmalavicciuūte A, Suriakaite K, Liutkeviccius E, Venalis A, Navakauskas D, Navakauskiene R, Magnusson KE. Proteomic analysis of stromal cells derived from the dental pulp of human exfoliated deciduous teeth. Stem Cells Dev. 2010 Jul;19(7):1081-93.

Poyton RO, Ball KA. Therapeutic photobiomodulation: nitric oxide and a novel function of mitochondrial cytochrome c oxidase. Discov Med. 2011 Feb;11(57):154-9.

Ramos GV, Cruz A, Silva WJ, Rozanski A, Baptista IL, Silvestre JG, Moriscot AS. Thyroid hormone upregulates MDM2 in rat type I fibre: Implications for skeletal muscle mass regulation. Acta Physiol (Oxf). 2018 Apr;222(4):e13003.

Shefer G, Barash I, Oron U, Halevy O. Low-energy laser irradiation enhances de novo protein synthesis via its effects on translation-regulatory proteins in skeletal muscle myoblasts. Biochim Biophys Acta. 2003 Feb 17;1593(2-3):131-9.

Shefer G, Partridge TA, Heslop L, Gross JG, Oron U, Halevy O. Low-energy laser irradiation promotes the survival and cell cycle entry of skeletal muscle satellite cells. J Cell Sci. 2002 Apr 1;115(Pt 7):1461-9.

Tani A, Chellini F, Giannelli M, Nosi D, Zecchi-Orlandini S, Sassoli C. Red (635 nm), Near-Infrared (808 nm) and Violet-Blue (405 nm) Photobiomodulation Potentiality on Human Osteoblasts and Mesenchymal Stromal Cells: A Morphological and Molecular In Vitro Study. Int J Mol Sci. 2018 Jul 3;19(7).

van Breugel HH, Bär PR. Power density and exposure time of He-Ne laser irradiation are more important than total energy dose in photo-biomodulation of human fibroblasts in vitro. Lasers Surg Med. 1992;12(5):528-37.

Wang X, Sha XJ, Li GH, Yang FS, Ji K, Wen LY, Liu SY, Chen L, Ding Y, Xuan K. Comparative characterization of stem cells from human exfoliated deciduous teeth nd dental pulp stem cells. Arch Oral Biol. 2012 Sep;57(9):1231-40.

Wei F, Qu C, Song T, Ding G, Fan Z, Liu D, Liu Y, Zhang C, Shi S, Wang S. Vitamin C treatment promotes mesenchymal stem cell sheet formation and tissue regeneration by elevating telomerase activity. J Cell Physiol. 2012 Sep;227(9):3216-24.

Wu S, Zhou F, Wei Y, Chen WR, Chen Q, Xing D. Cancer phototherapy via selective photoinactivation of respiratory chain oxidase to trigger a fatal superoxide anion burst. Antioxid Redox Signal. 2014 Feb 10;20(5):733-46.

Yang RF, Zhao GW, Liang ST, Zhang Y, Sun LH, Chen HZ, Liu DP. Mitofilin regulates cytochrome c release during apoptosis by controlling mitochondrial cristae remodeling. Biochem Biophys Res Commun. 2012 Nov 9;428(1):93-8.