IVANA MÁRCIA ALVES DINIZ

**Diferenciação odonto/osteogênica de células-tronco mesenquimais fotomoduladas em
hidrogel com incorporação de proteína morfogenética óssea 4**

São Paulo

2015

IVANA MÁRCIA ALVES DINIZ

**Diferenciação odonto/osteogênica de células-tronco mesenquimais fotomoduladas em
hidrogel com incorporação de proteína morfogenética óssea 4**

Versão Corrigida

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

Área de Concentração: Dentística

Orientador: Prof. Dra. Márcia Martins Marques

São Paulo

2015

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

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

Diniz, Ivana Márcia Alves.

Diferenciação odonto/osteogênica de células-tronco mesenquimais fotomoduladas em hidrogel com incorporação de proteína morfogenética óssea 4 / Ivana Márcia Alves Diniz ; orientador Márcia Martins Marques. -- São Paulo, 2015.
101 p. : fig., tab., graf. ; 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. Fototerapia. 3. Laser. 4. Proteínas morfogenéticas ósseas.
I. Marques, Márcia Martins. II. Título.

Diniz IMA. Diferenciação odonto/osteogênica de células-tronco mesenquimais fotomoduladas em hidrogel com incorporação de proteína morfogenética óssea 4. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Odontologia/Dentística.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof(a).Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a).Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a).Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a).Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a).Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Este trabalho dedico aos meus pais, **Ivay e Eliana**. É pela liberdade e confiança com que aprendi a crescer que hoje encontro felicidade em tudo que faço.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço **aos meus pais**, pela abnegação de me ter mais perto de suas vidas para que este projeto (de vida) pudesse ser realizado. Aprendemos muito nestes anos que se passaram. Paciência, compreensão, apoio, e a certeza de uma fase realizada nos seus mais belos sentidos. Eu os agradeço por contribuírem tanto na construção desta história.

Ao meu melhor amigo, **Fred**. Como é incrível ter encontrado alguém como você nesta vida. Que sorte a minha! Estamos caminhando a mesma trilha há 10 anos, e parece tão menos. A vida sempre foi tão fácil e generosa conosco. Até aqui concordamos que já nos bastaria, não é mesmo? Não sei o que nos espera, mas tenho certeza de que quero estar ao seu lado para o que der e vier. Obrigada pela sua estima, pelo seu companheirismo, pelas suas repreensões, pela sua sensibilidade, por tudo meu bem! Se sou feliz assim é por tê-lo ao meu lado; por você compartilhar seus desejos comigo; por tê-lo como um grande exemplo de caráter e profissionalismo. Amo e admiro você por inteiro.

Agradeço a minha mãe científica, **Márcia**. Tantas memórias me vem à cabeça, nem sei bem a que agradecer... O meu aprendizado durante esses 4 anos de convivência é incomensurável. Você é um grande exemplo! Eu nunca me senti tão motivada diante de alguém, como de você. Se hoje minha curiosidade me propulsiona é porque, por inúmeras vezes, compartilhei da mesma energia que você. Sou uma filha mimada e teimosa, você sabe, mas se de fato sou assim, é porque nunca ouvi um não deletério de você. Eu agradeço todos os ensinamentos, a amizade, a confiança, o apoio e, especialmente, a liberdade e o respeito com que você me orientou. Você é a concretização do desejo de unir duas grandes paixões em minha vida, a arte da Dentística, e o encantamento da biologia dos tecidos. Eu nunca poderia ter estado em outro lugar. Muito obrigada do fundo do meu coração, por tudo.

Um agradecimento mais que especial aos **familiares** que contei durante todo esse período, não só pelo suporte técnico e emocional, mas pelo incentivo e amizade. Muito obrigada **Joana, Patrícia, Valéria, Elísio, Elisa, Naty, Catatau, tio Zé, tio Marcílio, tia Pitucha e Deildes**, vocês são uma mistura de sentimentos bons! Obrigada também **Juju, Vera, Celso, Odília, Renata e família, Vó Lúcia e família**, por serem tão carinhosos comigo e por acreditarem na dupla Ivana e Fred. Sem cada um de vocês, não teríamos força para ir tão longe!

AGRADECIMENTOS

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

Aos **pacientes da FOUSP**, sejam aos das clínicas da Dentística, os quais confiaram e confiam seus tratamentos odontológicos aos alunos, pós-graduandos e professores da instituição; ou àqueles que um dia concordaram em doar material biológico para pesquisa no país.

Ao **Nucel**, em nome da **Prof.^a Dra. Mari Cleide Sogayar** e suas alunas **Ana Cláudia Carreira e Patrícia Kossugue**, pela colaboração e disponibilização de infraestrutura para a condução de experimentos. Agradeço ainda o esforço da Ana Cláudia na produção do fator de crescimento utilizado na pesquisa. Agradeço também a participação intelectual de todo o grupo, a qual incrementou significativamente a qualidade do projeto executado.

À **Universidade Federal do ABC**, em nome da **Prof.^a Dra. Daniele Araújo**, na disponibilização de infraestrutura, material e suporte intelectual na execução desta pesquisa. Agradeço também à **Prof.^a Dra. Juliana Marchi**, da mesma instituição, pelas colaborações em projetos paralelos desenvolvidos durante a execução deste trabalho.

Aos **Institutos** de Biologia (IB) (Departamentos de Imunologia e Genética), Instituto de Pesquisas Energéticas (IPEN), **Biotérios** Central e da Faculdade de Medicina da USP pelo fornecimento de infraestrutura e material para realização deste e de outros projetos paralelos.

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

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

Aos professores do Departamento de Estomatologia **Fábio Nunes, Andréa Mantesso e Décio Pinto** pelo suporte técnico nesta pesquisa. Ao **Prof. Dr. Victor Arana Chavez** (Departamento de Biologia Oral) pelo auxílio na microscopia eletrônica de varredura.

À **Prof.^a Carla Renata Sipert** do Departamento de Endodontia pela colaboração intelectual e técnica nesta pesquisa.

Aos **professores do Departamento de Dentística** o meu muito obrigada por todos os ensinamentos e os ótimos períodos de convivência. As clínicas e laboratórios pré-clínicos foram sempre muito prazerosos e enriquecedores. Agradeço especialmente ao **Prof. Dr. Glauco Vieira** pela alegria e amizade durante as clínicas e pelos inúmeros momentos de descontração.

Ao **Laboratório de Pesquisa Básica** da FOUSP, em nome da **Prof.^a Dra. Márcia Martins Marques**, pelo suporte técnico e operacional no desenvolvimento da maioria dos projetos executados nos últimos 4 anos.

Aos **funcionários** da FOUSP e outros institutos, sem os quais seria impossível a execução dos trabalhos. **Aldo, Arnaldo, David, Leandro, Selminha e Soninha** (Departamento de Dentística); **Lili e Ana** (em nome do LELO); **Douglas** (em nome do Departamento de Biologia Oral); **Adriana, Elisa, Juvani e Edna** (em nome do Departamento de Patologia); **Edson** (em nome do Departamento de Cirurgia); **Glauci** (em nome da biblioteca da FOUSP); **Kátia e Alessandra** (Secretaria de Pós-Graduação); **Andréa Glatt** (Departamento de Imunologia, IB); **Márcio Valentim** (Departamento de Genética, IB). E tantos outros que não tive tanto contato, mas que são insubstituíveis em suas tarefas para o

bom andamento da instituição. Obrigada a todos pelo carinho, atenção, dedicação e ajudas preciosas.

À minha querida Dedé (**Debora**), sem a qual não seríamos tão produtivas no laboratório que ela cuida com tanto amor. Agradeço imensamente sua ajuda dentro e fora do laboratório. Todos sabem o quanto sua presença é valiosa para nós. Conviver com você torna nossos dias muito mais divertidos e cheios de gordices. Obrigada pela sua amizade, amor, carinho, cuidado – minha mãezona postíça!

Aos *labmates* **Nilton, Fernando, Sueli, Stella, Cácio, Leila, Mari, Roberta, Talita, Thaís, Renata, Paula, Gabi e Ana Clara**. Cada um despertou um sentimento especial em mim, por isso não vou personalizar os comentários. Torço muito pelo sucesso de todos vocês! Agradeço o carinho e a deliciosa convivência por todos esses anos.

Rejaninha, um agradecimento à parte a você pela sua torcida, preocupação, admiração, carinho, não apenas comigo, mas com todos os alunos do laboratório. Você é um anjinho querido sempre disposto a ajudar! Agradeço seus ensinamentos e as oportunidades que me proporcionou. Obrigada pelos seus abraços, suas histórias, suas palavras do coração.

Cindi querida, minha eterna aluna de iniciação científica! Eu agradeço por ter persistido por tanto tempo conosco, por ser tão dedicada e responsável. Você já é uma profissional brilhante; tenho certeza de que o que quer que seja que você decida fazer depois de formada, fará com louvor. Obrigada por toda sua ajuda, por cada horinha despendida no laboratório e mais ainda pela sua amizade. Estarei sempre torcendo pelo seu sucesso!

Em nome da **Cindi, Victor, Estela e Letícia** também agradeço a todos os **alunos da graduação** que porventura tenham tido contato comigo nas aulas teóricas, seminários, laboratórios ou clínicas. Aprendi muito mais do que ensinei.

Aos **colegas de pós-graduação da Dentística** pela amizade e atividades que desenvolvemos juntos, em especial à **Juliana Marques**, à **Maria Aparecida**, à **Cynthia Azevedo** e ao **Eric Mayer**.

Ci Pelissari (pós-graduação da Estomatologia) obrigada pela sua ajuda incansável! Agradeço sua disponibilidade, sua dedicação, suas dicas! Espero tê-la como amiga e colaboradora *forever*.

Agradeço à **Hilana Artese** (pós-graduação da Periodontia) pela companhia enquanto fomos representantes discentes na Comissão de Pós-Graduação, e pelos ensinamentos sobre revisão sistemática. Foi ótimo trabalhar com você, obrigada pela amizade e parceria!

Finalmente, agradeço às agências financiadoras que me suportaram nos últimos 4 anos na cidade de São Paulo. Ao **CNPq**, pela bolsa de auxílio técnico antes do meu ingresso na pós-graduação, à **CAPES**, pela bolsa de doutorado nos 8 primeiros meses do curso e à **FAPESP**, pelo bolsa de doutorado até o término do curso (2012/16552-0), pelo auxílio em pesquisa (2013/03864-6) e pela concessão da Bolsa de Estágio em Pesquisa no Exterior (BEPE) (2013/17268-8) por 12 meses.

Devido ao período de 12 meses no exterior atuando como pesquisadora visitante no Center of Craniofacial Molecular Biology (CCMB), eu não poderia deixar de agradecer mais uma vez aos meus supervisores, colegas e amigos de Los Angeles. Sendo assim, anexo aqui parte do meu relatório científico em consideração à minha experiência fora do país:

“This internship was critical to my development as a scientist. The studies I have developed at CCMB collaborated to my technical improvement and enabled the expansion of my research field. The thorough study of the mesenchymal stem cells derived

from the craniofacial tissues gave me autonomy to explore multiple facets related to tissue regeneration. I have learned that I must go beyond the dental field and contribute to the interdisciplinary research in the world. I understood the importance of expanding the knowledge, and do not stick with the unique appeals of my field of graduation. I learned that creativity is the most powerful tool that a researcher may have and that there is a constant need of self-renew to succeed. You need to motivate others and always motivate yourself; create challenges to yourself; have enthusiasm. (...)Definitely, the internship was an extremely fruitful and inspiring period in my life.

In the next paragraph I would like to record all my gratitude to Prof. Dr. Songtao Shi, who always volunteered to remedy any questions or any need I'd come to have, and especially for having enormous respect to my presence in his research group during the internship. Dr. Shi's research group is particular for having almost only Chinese fellows, but in no time I have left the feeling that I was also part of his group. Moreover, I had every incentive and plenty of freedom to work in his lab for all those months.

I'm also immensely grateful to Prof. Dr. Alireza Moshaverinia, for his motivation and encouragement. Moreover, for trusting me developing and sharing information from his research projects, which definitely will be milestones in my academic career.

Another special thank is to my dear labmate Dr. Chider Chen, which proved relentless at all times that I requested his technical and/or theoretical support during the internship.

Finally, I would like to thank all the other members of the group, the one who was a true friend (Yongchun Gu), the picky and nice bench's fellow (Xingtian Xu) and those to whom I may have exchanged only a few words, but were always pretty solicitous and friendfull (Cunye Cu, Shihong Shi, Yao Liu, Dawei Liu, Ruili Yang, Wenjing Yu, Xiaoxing Kou, Shiya, Jin Liu).

I finish saying thanks to Daniel Chee, my undergrad student at that moment, who taught me much more than he could imagine. And THANKS to my best friends over there, Carolina and Alex, partners for lunch time, work complaints, and awesome trips! Love you guys!”

“To live a creative life, we must lose our fear of being wrong”

Joseph Chilton Pearce

RESUMO

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

Este estudo avaliou a influência da fototerapia a laser (FTL) na proliferação e diferenciação de células-tronco da polpa dentária humana (DPSCs; do inglês, *Dental Pulp Stem Cells*) encapsuladas em carreador injetável e termoresponsivo (PL; Pluronic® F-127, Sigma-Aldrich, MO, EUA) com incorporação de proteína morfogenética óssea 4 recombinante humana (rhBMP4) (sistema PL/rhBMP4). O biomaterial foi caracterizado de acordo com seus perfis de embebição e dissolução, liberação de rhBMP4 e sua estrutura morfológica. DPSCs foram isoladas, caracterizadas e encapsuladas em PL para confirmar sua viabilidade e seu potencial de diferenciação (adipo e osteogênico) em comparação com células-tronco mesenquimais de medula óssea (BMMSCs; do inglês, *Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells*). Quando encapsuladas no sistema PL/rhBMP4, DPSCs foram irradiadas com duas densidades de energia diferentes utilizando laser de diodo de fosfeto de índio-gálio-alumínio (InGaAlP), modos contínuo, pontual e em contato [660 nm, 0,028 cm², 20 mW, 0,71 W/cm², 3 J/cm² (4 s) ou 5 J/cm² (7 s)]. Os ensaios de PKH26 (do inglês, *Red Fluorescent Cell Linker*), CFU-F (do inglês, *Colony Forming Units – Fibroblastic*), e MTT (do inglês, *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide*) foram utilizados para avaliar adesão/proliferação, diferenças na capacidade formadora de colônias e viabilidade das DPSCs (neste último caso sob estresse nutricional), respectivamente. Finalmente, a diferenciação odonto/osteogênica foi analisada por qRT-PCR e confirmada por ensaio de vermelho de alizarina. O biomaterial embebeu e dissolveu rapidamente; densa rede tubular e reticular com poros interconectados foi observada. DPSCs e BMMSCs apresentaram alta viabilidade celular quando encapsuladas em PL. Ambas as linhagens celulares tiveram êxito em se diferenciar em tecidos adiposo e ósseo. De acordo com o PKH26, DPSCs puderam aderir e proliferar no sistema PL/rhBMP4. DPSCs irradiadas encapsuladas tanto em PL como em PL/rhBMP4 formaram mais CFU-F que os controles não irradiados. Sob estresse nutricional, DPSCs semeadas no PL e irradiadas com 5 J/cm² exibiram maior taxa de viabilidade celular em relação aos grupos não irradiados e irradiados com 3 J/cm². Na presença de rhBMP4, os grupos irradiados tanto com 3 J/cm² quanto com 5 J/cm² apresentaram deposição mineral precoce quando comparados aos grupos

não irradiados. Ainda, após 21 dias de diferenciação odonto/osteogênica, DPSCs irradiadas produziram maior quantidade de nódulos mineralizados. A irradiação com 5 J/cm² levou ao aumento significativo da expressão de genes envolvidos na diferenciação odonto/osteogênica, como colágeno tipo I (*COL1A1*), osteocalcina (*OCN*), proteína da matriz dentinária 1 (*DMPI*), sialofosfoproteína dentinária (*DSPP*) e proteína *heat shock* 27 kDa (*HSPB1*). A associação entre rhBMP4 e FTL promove proliferação e diferenciação odonto/osteogênica de DPSCs acelerando e aumentando notavelmente a formação de tecido mineralizado, em especial quando a densidade de energia de 5 J/cm² é aplicada.

Palavras-chave: Proteína Morfogenética Óssea 4. Pluronic® F-127. Células-tronco Mesenquimais. Laser.

ABSTRACT

Diniz IMA. Odonto/osteogenic differentiation of photomodulated mesenchymal stem cells in BMP4-loaded hydrogel [thesis] São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2015. Versão Corrigida.

This study evaluated the influence of laser phototherapy (LPT) on dental pulp stem cells (DPSCs) proliferation and differentiation upon encapsulation in an injectable and thermo-responsive cell carrier (PL; Pluronic® F-127, Sigma-Aldrich, MO, USA) loaded with human recombinant bone morphogenetic protein 4 (rhBMP4)(PL/rhBMP4 system). The biomaterial was characterized according to its swelling and dissolution profiles, release of rhBMP4 and morphological structure. DPSCs were isolated, characterized and encapsulated in PL to confirm their viability and multilineage differentiation potential (adipo and osteogenic) in comparison to bone marrow mesenchymal stem cells (BMMSCs). When encapsulated in the PL/rhBMP4 system, DPSCs were irradiated with two different energy densities using a continuous-wave indium-gallium-aluminum-phosphide (InGaAlP) diode laser [660 nm, 0.028 cm², 20 mW, 0.71 W/cm², 3 J/cm² (4 s) or 5 J/cm² (7 s)] in punctual and contact modes. The PKH26 (Red Fluorescent Cell Linker), the CFU-F (Colony Forming Units – Fibroblastic), and the MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide] assays were used to assess differences in cell adhesion/proliferation, colony forming units formation ability, and cell viability of DPSCs (in this case under nutritional stress), respectively. Then, alizarin red and qRT-PCR analyzes were used to evaluate odonto/osteogenic differentiation. The biomaterial swelled and dissolved rapidly; dense tubular and reticular network morphology with well-interconnected pores was observed. DPSCs and BMMSCs presented high cell viability when encapsulated in PL. Both cell lineages successfully differentiated into bone or adipose tissues. According to PKH26, DPSCs were able to adhere and proliferate in the PL/rhBMP4 system. Irradiated DPSCs encapsulated in either PL or PL/rhBMP4 system formed more CFU-F than non-irradiated controls. Under nutritional stress, DPSCs encapsulated in the hydrogels with no rhBMP4 and irradiated at 5 J/cm² exhibited higher cell viability than the other groups. In the presence of rhBMP4, the groups irradiated both at 3 and 5 J/cm² energy densities displayed earlier mineral deposition than the non-irradiated groups. Moreover, after 21 days of odonto/osteogenic differentiation, irradiated DPSCs produced greater nodule formation than the control groups. At the energy density of 5 J/cm², there were

significant upregulation of genes involved in odonto/osteoblast differentiation, such as type I collagen (*COL1A1*), osteocalcin (*OCN*), dentin matrix protein 1 (*DMP1*), dentin sialophosphoprotein (*DSPP*) and heat shock protein 27 kDa (*HSPB1*). The association between rhBMP4 and LPT promotes cell proliferation and odonto/osteogenic differentiation of DPSCs accelerating and increasing the formation of mineralized tissue, in particular when the energy density of 5 J/cm² is applied.

Keywords: Bone Morphogenetic Protein 4. Pluronic[®] F-127. Mesenchymal Stem Cell. Laser.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Akt/mTOR/EIF4E	Do inglês <i>protein kinase B/mammalian target of rapamycin/eukaryotic translation initiation factor 4E</i>
ADP	Do inglês <i>adenosine diphosphate</i>
ANOVA	Do inglês <i>Analysis of Variance</i> (Análise de Variância)
α -MEM	Do inglês <i>α- Minimal Essential Medium</i> (Meio Mínimo Essencial α)
APC	Do inglês <i>allophycocyanin</i>
ATP	Do inglês <i>adenosine triphosphate</i> (trifosfato de adenosina)
bFGF	Do inglês <i>b fibroblast growth factor</i>
BAX	Do inglês <i>BCL2-associated X protein</i>
BCL-2	Do inglês <i>B-cell lymphoma 2</i>
BGLAP	Do inglês <i>bone gamma-carboxyglutamate (gla) protein</i> (osteocalcina)
BMMSCs	Do inglês <i>Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells</i> (células-tronco mesenquimais da medula óssea)
BMP	Do inglês <i>bone morphogenetic protein</i>
BMP1	Do inglês <i>bone matrix protein 1</i> (proteína da matriz óssea 1)
BSP	Do inglês <i>bone sialoprotein</i> (sialoproteína óssea)
BSA	Do inglês <i>bovine serum albumine</i> (albumina de soro bovino)
CA	Estado da Califórnia, EUA
CCMB	Do inglês <i>Center for Craniofacial Molecular Biology</i>
cDNA	Do inglês <i>complementary deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico complementar)
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CFU-F	Do inglês <i>Colony Forming Units - Fibroblastic</i> (unidades formadoras de colônia – fibroblástica)
Cit c	Citocromo c oxidase
COL1A1	Do inglês <i>collagen, type I, alpha 1</i> (colágeno tipo I)
DE	Estado do Delaware, EUA
DFSCs	Do inglês <i>Dental Follicle Stem Cells</i> (células-tronco do folículo dental)
DMP1	Do inglês <i>dentin matrix protein 1</i> (proteína da matriz dentinária 1)

DMSO	Do inglês <i>dimethyl sulfoxide</i> (dimetilsulfóxido)
DNA	Do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucléico)
DPP	Do inglês <i>dentin phosphoprotein</i> (fosfoproteína dentinária)
DPSCs	Do inglês <i>Dental Pulp Stem Cells</i> (células-tronco da polpa dentária)
DSP	Do inglês <i>dentin sialoprotein</i> (sialoproteína dentinária)
DSPP	Do inglês <i>dentin sialophosphoprotein</i> (sialofosfoproteína dentinária)
EDTA	Do inglês <i>ethylenediaminetetracetic acid</i> (ácido etileno diamino tetracético)
ESCs	Do inglês <i>Embryonic Stem Cells</i> (células-tronco embrionárias)
EUA	Estados Unidos da América
FDA	Do inglês <i>Food and Drug Administration</i>
FGFs	Do inglês <i>fibroblast growth factors</i>
FITC	Do inglês <i>fluorescein isothiocyanate</i>
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
FTL	Fototerapia a Laser
GADPH	Do inglês <i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GAGs	Glicosaminoglicanas
HA	Hidroxiapatita
HA/TCP	Hidroxiapatita/Tricálciofosfato
HEPES	Do inglês <i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
H1F1 α	Do inglês <i>hipoxia inducible fator 1α</i>
Hhs	Do inglês <i>Hedgehog proteins</i>
HSCs	Do inglês <i>Hematopoietic Stem Cell</i> (células-tronco hematopoiéticas)
HSPB1	Do inglês <i>heat shock 27 kDa protein 1</i> (HSP27)
IgG1 κ	Imunoglobulina G 1 kappa
IgG2 κ	Imunoglobulina G 2 kappa
InGaAlP	Do inglês <i>Indium Gallium Aluminum Phosphide</i> (Fosfeto de índio-gálio-alumínio)
iPSCs	Do inglês <i>induced Pluripotent Stem Cells</i> (células-tronco pluripotentes induzidas)
LANGFR/p75	Do inglês <i>low affinity nerve growth factor receptor p75</i>
Laser	Do inglês <i>light amplification by stimulated emission of radiation</i> (amplificação da luz por emissão estimulada de radiação)

LPL	Do inglês <i>lipoprotein lipase</i>
MA	Estado de Massachusetts, EUA
MAPK/ERK	Do inglês <i>mitogen activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase</i>
MD	Estado de Maryland, EUA
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MN	Estado de Minnesota, EUA
MO	Estado do Missouri, EUA
MSCs	Do inglês <i>Mesenchymal Stem Cells</i> (células-tronco mesenquimais)
MTT	Do inglês <i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i> (3-(brometo de 4,5-dimetiltiazol -2-yl)-2,5-difeniltetrazólio)
NADH	Do inglês <i>nicotinamide adenine dinucleotide</i>
NADPH	Do inglês <i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
NF-κB	Do inglês <i>nuclear factor kappa B</i>
NIH	Do inglês <i>National Institutes of Health</i>
NO	Do inglês <i>nitric oxide</i> (óxido nítrico)
NOS	Do inglês <i>nitric oxide synthase</i>
iNOS	Do inglês <i>inducible nitric oxide synthase</i>
Notch-1	Do inglês <i>translocation-associated Notch homolog 1</i>
NY	Estado de Nova York, EUA
OCN	Osteocalcina
ONN	Osteonectina
OPN	Osteopontina
OR	Estado do Oregon, EUA
pb	Pares de base
PBS	Do inglês <i>phosphate buffered saline</i> (tampão fosfato-salina)
PBSA	Do inglês <i>phosphate buffered saline without calcium and magnesium</i> (tampão fosfato-salina sem cálcio e sem magnésio)
PCR	Do inglês <i>polimerase chain reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
PDGF	Do inglês <i>platelet derived growth factor</i>
PDLSCs	Do inglês <i>Periodontal Ligament Stem Cells</i> (células-tronco do ligamento periodontal)

PE	Do inglês <i>phycoerythrin</i>
PEO	Do inglês <i>polyethylene oxide</i> (óxido de polietileno)
PFA	Paraformaldeído
PKH26	Do inglês <i>red fluorescent cell linker kit for general cell membrane labeling</i>
PL	Pluronic® F-127
PL/rhBMP4	Hidrogel com incorporação de rhBMP4
PPAR γ 2	Do inglês <i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2</i>
PPO	Do inglês <i>polypropylene oxide</i> (óxido de polipropileno)
RNA	Do inglês <i>ribonucleic acid</i> (ácido ribonucleico)
RT-PCR	Do inglês <i>reverse transcriptase-polymerase chain reaction</i> (transcriptase reversa – reação em cadeia da polimerase)
qRT-PCR	Do inglês <i>quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction</i> (reação quantitativa da transcriptase reversa – reação em cadeia da polimerase)
rhBMP4	Do inglês <i>recombinant human Bone Morphogenetic Protein 4</i> (proteína morfogenética óssea 4 recombinante humana)
rhBMP2	Do inglês <i>recombinant human Bone Morphogenetic Protein 2</i> (proteína morfogenética óssea 2 recombinante humana)
ROS	Do inglês <i>reactive oxygen species</i> (espécies reativas de oxigênio)
RUNX2	Do inglês <i>runt-related transcription factor 2</i>
SCAPs	Do inglês <i>Stem Cells from the Apical Papilla</i> (células-tronco da papila apical)
Scr	Do inglês <i>non-receptor tyrosine kinases</i>
SHEDs	Do inglês <i>Stem cells from Human Exfoliated Deciduous teeth</i> (células-tronco de dentes decíduos esfoliados humanos)
Smads	Do inglês <i>small mother against decapentaplegic</i>
SP	São Paulo
TGF- β	Do inglês <i>transforming growth factor-β</i> (fator de crescimento transformador β)
TGF- β 1	Do inglês <i>transforming growth factor-β1</i> (fator de crescimento transformador β 1)
DSPP ^{Cre} TGF β RII ^{fl/fl}	Do inglês <i>TGF-β receptor II conditional knockout</i>

TPKR	Do inglês <i>tyrosine protein kynase receptors</i>
UFABC	Universidade Federal do ABC
UT	Estado de Utah, EUA
VEGF	Do inglês <i>vascular endothelial growth factor</i>
Wnts	Do inglês <i>Wingless and interrelated proteins</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
Ca ²⁺	Íon cálcio
CO ₂	Dióxido de carbono
C _t	Do inglês <i>threshold cycle</i>
cm	Centímetro
cm ²	Centímetro quadrado
Δ	Delta
g	Força G
h	Hora
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
J	Joule
J/cm ²	Joule por centímetro quadrado
K	Kelvin
kDa	Quilodalton
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potássio
λ	Lambda (comprimento de onda)
M	Molar
mA	Miliampère
µg/ml	Micrograma por mililitro
µl	Microlitro
µm	Micrômetro
µM	Micromolar
mg/ml	Miligramma por mililitro
min	Minuto
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
mW	Miliwatt
NaCl	Cloreto de sódio
ng	Nanograma

ng/ml	Nanograma por mililitro
nm	Nanograma
$O^{\bullet-}$	Superóxido
1O_2	Oxigênio singleto
OH^-	Radical hidroxila
$ONOO^-$	Peroxinitrito
p/p	Peso por peso
pg/ml	Picograma por mililitro
rpm	Rotações por minuto
s	Segundo
U/ml	Unidades por mililitro
V	Volt
v/v	Volume por volume
x	Vezes
W	Watt
W/cm ²	Watt por centímetro quadrado

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	27
2 REVISÃO DA LITERATURA	30
2.1 Células-tronco	30
2.2 Fatores de crescimento e regeneração dental	31
2.3 Biomateriais	33
2.4 Fototerapia a laser (FTL)	36
2.4.1 Mecanismos de ação da FTL	36
2.4.1.1 Fotoceptores mitocondriais	37
2.4.1.2 Espécies reativas de oxigênio	39
2.4.1.3 FTL interfere no balanço de óxido nítrico (NO) para produção de energia com geração de radicais livres de oxigênio	40
2.4.2 Eventos moleculares e celulares decorrentes da FTL	43
2.4.3 FTL influencia positivamente células-tronco	45
3 PROPOSIÇÃO	47
4 MATERIAL E MÉTODOS	48
4.1 Pluronic® F-127	48
4.1.1 Preparo do hidrogel	48
4.1.2 Ensaio de dissolução	48
4.1.3 Ensaio de embebição (<i>Swelling</i>)	49
4.1.4 Análise morfológica	49
4.1.5 Produção, purificação e incorporação de rhBMP4 no hidrogel	50
4.1.6 Ensaio de liberação de rhBMP4	50
4.2 Isolamento e caracterização celular	51
4.2.1 Isolamento	51
4.2.2 Imunofenotipagem por citometria de fluxo	54
4.3 Comparação da viabilidade e potencial de diferenciação em múltiplos tecidos de DPSCs e BMMSCs encapsuladas em Pluronic® F-127	55
4.3.1 Encapsulamento celular	56
4.3.2 Viabilidade celular no PL	56
4.3.3 Diferenciação odonto/osteogênica no PL	57
4.3.4 Diferenciação adipogênica no PL	58

4.4 Aplicação da FTL	59
4.5 Encapsulamento no sistema PL/rhBMP4 e fotomodulação.....	59
4.5.1 Grupos experimentais	60
4.5.1.1 <i>Ensaio de adesão e proliferação</i>	60
4.5.1.2 <i>Ensaio de diferenciação odonto/osteogênica</i>	60
4.5.2 Adesão e proliferação celular	61
4.5.2.1 <i>PKH26</i>	61
4.5.2.2 <i>Contagem de unidades formadoras de colônia (CFU-F)</i>	61
4.5.2.3 <i>MTT</i>	62
4.5.3 Diferenciação celular.....	62
4.5.3.1 <i>Vermelho de alizarina</i>	62
4.5.3.2 <i>Transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase</i>	63
4.6 Análise Estatística.....	63
5 RESULTADOS	65
6 DISCUSSÃO	79
7 CONCLUSÃO.....	86
REFERÊNCIAS	87
ANEXOS	100

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de materiais restauradores que possam satisfazer as necessidades funcionais e estéticas de dentes acometidos por lesões de cárie ou traumatizados ou ainda que se prestam à substituição de tecidos craniofaciais perdidos é uma das áreas mais desafiadoras da Odontologia. Após anos de intensa investigação biológica, pode-se afirmar que materiais sintéticos como amálgamas de prata, resinas compostas e cerâmicas, assim como implantes dentários tem qualidade e durabilidade satisfatórias para a prática clínica. De fato, esses materiais foram coadjuvantes no êxito do processo restaurador e, certamente, alguns deles ainda serão, por décadas, responsáveis pelo alto poder reabilitador da profissão odontológica. Por outro lado, terapias cada vez menos invasivas estão em constante aprimoramento e, naturalmente, tendem a substituir materiais sintéticos por materiais bioativos, capazes de induzir endogenamente o processo de reparação/regeneração tecidual. Dessa forma, não somente aspectos mecânico-estruturais, estéticos e fonéticos estarão sendo recuperados, mas também toda a homeostase tecidual a que se refere o tecido original.

Particularmente na Odontologia, neoformação de tecido pulpar, dentina e esmalte já foi observada em uma série de estudos que utilizaram transplantes ectópicos (1–4). No entanto, no que concerne à regeneração *in loco*, ainda há que se avançar. Devido ao baixo potencial remodelador da polpa, particularmente em dentes maduros, tratamentos conservadores tendem a falhar, especialmente quando realizados em dentes acometidos por lesões de cárie. O tratamento endodôntico radical, contudo, baseia-se na remoção total da polpa dentária e na sua substituição por materiais inertes, tornando o remanescente dental desvitalizado e friável. À frente da terapia com hidróxido de cálcio e outros materiais sintéticos que induzem a formação de apenas pequena quantidade de dentina reparativa no local em que houve exposição ou amputação do tecido pulpar, a terapia celular vem demonstrando grande potencial para promover a formação de novo tecido dental *in vitro* e *in vivo* (1,5). Isso levaria à redução no emprego de materiais restauradores que necessitam de trocas periódicas e que são desprovidos de aspectos fisiológicos intrínsecos do dente.

Frente à identificação e isolamento de células-tronco mesenquimais (MSCs; do inglês, *Mesenchymal Stem Cells*) nos tecidos orofaciais, a habilidade de criar instrumentos que programem e promovam diferenciação funcional dessas células está se tornando uma realidade. Estudos que utilizam MSCs derivadas dos tecidos dentais aumentam exponencialmente ano a ano (6), especialmente no que tange o afã de reconstituir tecidos

craniofaciais perdidos em todas as suas dimensões. Nesse sentido, há esforços notáveis no desenvolvimento de materiais biomimetizadores dirigidos à criação de microambiente íntimo à diferenciação dessas células e, ainda, no entendimento da complexa rede de moléculas sinalizadoras que são de fato essenciais na regeneração de um tecido alvo. Todavia, se por um lado o sucesso da engenharia tecidual em regenerar múltiplos tecidos seja evidente, há ainda a dependência de muitas variáveis – biomateriais, fatores de crescimento e utilização de células-tronco cultivadas em laboratório. Materiais exógenos, por suas vezes, devem ser distribuídos pelo organismo com ação temporal e espacial controladas, o que impõe barreiras técnicas, regulatórias e até biológicas (7). Mais ainda, a terapia pode se tornar onerosa, inviabilizando a maioria dos tratamentos em seres humanos. Nesse sentido, apesar do sucesso palpável já obtido até aqui com as terapias celulares, outros eventos ou elementos-chave ainda precisam ser desvendados e explorados, visando-se principalmente maior simplificação da técnica.

Recentemente, uma publicação no periódico *Science Translational Medicine* colocou em destaque os efeitos da fototerapia a laser (FTL) na regeneração dos tecidos dentais (8). Os resultados deste estudo indicam que, por meio da produção de radicais livres de oxigênio (ROS; do inglês, *reactive oxygen species*), a FTL ativaria TGF- β 1 (do inglês, *Transforming Growth Factor β 1*) endógeno, que por sua vez mediará a diferenciação de células-tronco do hospedeiro (*cell-homing*) para promover formação de tecido dental mineralizado. De fato, a capacidade bioestimuladora da FTL na polpa dental sem utilização de células-tronco exógenas, *scaffolds* ou fatores de crescimento recombinantes já havia sido reportada na literatura em estudo anterior (9). No entanto, pela primeira vez, um mecanismo de ação foi apresentado para explicar a singularidade do estímulo da FTL no recrutamento de células-tronco residuais do hospedeiro levando à formação de dentina terciária. Nosso grupo de pesquisa vem desenvolvendo estudos nessa linha de pesquisa já há alguns anos e, a bem da verdade, já conhecíamos o potencial da FTL em regenerar os tecidos dentais. Estudos *in vitro* utilizando FTL e fatores de crescimento exógenos (rhBMP2, do inglês *recombinant human Bone Morphogenetic Protein 2*) mostraram aumento considerável da capacidade dentinogênica de células-tronco da polpa dental de dentes decíduos (SHEDs; do inglês, *Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous teeth*) irradiadas com baixas densidades de energia (3 ou 5 J/cm²) (10). *In vivo*, a formação de novo tecido pulpar *in loco* por *cell-homing* foi observada em ratos que sofreram tratamento endodôntico e tiveram estimulação por FTL (11).

Conceitualmente, as vias dos TGF- β e das BMPs (do inglês, *Bone Morphogenetic Proteins*) se intercomunicam em uma miríade de eventos celulares, tendo inclusive receptores celulares comuns (12). Considerando o papel estratégico da BMP4 na odontogênese e ainda

seu potencial em estimular a produção de radicais livres de oxigênio, este estudo investigou a associação deste fator de crescimento com a FTL na proliferação e odonto/osteodiferenciação de células-tronco da polpa dentária humana (DPSCs; do inglês, *Dental Pulp Stem Cells*). Nossa hipótese é de que, *in vivo*, a FTL poderia agir sinergisticamente com a BMP4 endógena presente no tecido dentinário ou ósseo favorecendo a reparação/neoformação tecidual. *In vitro*, utilizamos um carreador de BMP4 recombinante humana (rhBMP4; do inglês *recombinant human Bone Morphogenetic Protein 4*) para encapsulamento de DPSCs a fim de se obter um modelo preliminar para avaliação dos efeitos da FTL quando associada a este fator de crescimento.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Células-tronco

Células-tronco são capazes de auto-renovação e possuem a habilidade de se diferenciarem em pelo menos dois tipos celulares (13–15). São células que sofrem divisão celular assimétrica, em que uma das células-filha se diferencia em uma célula especializada e a outra permanece se replicando (13). A divisão simétrica também pode ocorrer, sendo definida como a geração de células-filhas que adquirem o mesmo destino, ou seja, duas células diferenciadas ou duas novas células-tronco (14). Esta última é estratégica na expansão numérica de células multipotentes, mas ambos os tipos de divisão podem acontecer simultânea ou isoladamente (14).

Três categorias de células-tronco são descritas até então: células-tronco embrionárias (ESCs; do inglês, *Embryonic Stem Cells*), obtidas do embrião na fase de blastocisto; adultas, que podem ser encontradas em uma grande variedade de tecidos somáticos, como as MSCs; e as pluripotentes induzidas (iPSCs; *induced Pluripotent Stem Cells*), obtidas a partir de células adultas diferenciadas (16). As MSCs não possuem capacidade de se diferenciar em qualquer tipo celular, mas são facilmente obtidas de múltiplas fontes; além de não despertarem questões éticas de manipulação como as células-tronco embrionárias (17). Além disso, até então, não há relatos na literatura de que MSCs possam expressar genes relacionados à carcinogênese, ao contrário de ESCs e iPSCs, as quais já demonstraram capacidade de se diferenciar em células tumorais (18–20). Dessa forma, MSCs são alternativas viáveis e práticas no estudo de células-tronco. Como tais, MSCs podem se diferenciar em linhagens mesodérmicas formando tecidos nervoso, adiposo, cartilaginoso, ósseo, músculo-esquelético, estroma de tecidos conjuntivos, entre outros (18,21) e, portanto, possuem aplicações clínicas variadas em engenharia tecidual.

Nos tecidos dentários já foi possível identificar e isolar células-tronco adultas de várias fontes, embora de caráter heterogêneo. A polpa dentária de dentes permanentes (DPSCs) (1) e de dentes decíduos (SHEDs) (2), assim como o ligamento periodontal (PDLSCs; do inglês, *Periodontal Ligament Stem Cells*) (22), papila apical (SCAPs; do inglês, *Stem Cells from the Apical Papilla*) (3), e folículo dental (DFPCs; do inglês, *Dental Follicle Stem Cells*) (23) são alguns exemplos. Uma das grandes vantagens do uso de células-tronco derivadas de tecidos

dentais é que são células facilmente obtidas de material biológico frequentemente descartado nas clínicas odontológicas.

DPSCs, em particular, são células positivas ao marcador perivascular (STRO-1) (1). DPSCs STRO-1 positivas expressam actina de músculo liso α , CD146 (marcador mesenquimal) e antígeno associado a pericito (3G5), além de serem negativas para fator von Willebrand (marcador endotelial), indicando o fenótipo sugestivo de pericitos e seu possível nicho perivascular (24). Outros nichos de DPSCs também já foram sugeridos, como o *loop* cervical (25). Todavia, a localização exata e as moléculas regulatórias envolvidas nestes possíveis nichos ainda não estão claros. Recentemente foi reportada a identificação de duas subpopulações de DPSCs – células-tronco mesenquimais/progenitoras (integrina β 1 positiva) e células da crista neural mais embrionárias (LANGFR/p75 positivas; do inglês, *low affinity nerve growth factor receptor p75*), indicando a possibilidade de origens distintas das populações celulares na polpa dentária (26).

Em comparação às células-tronco derivadas de medula óssea (BMMSCs, do inglês *Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells*), DPSCs apresentam taxas de proliferação 30 a 50% mais elevadas e maior número de duplicações populacionais (1). DPSCs apresentam ainda alta atividade imunossupressora na prevenção à aloreatividade de células T (27). De fato, análises por microarranjo revelaram padrões de expressão gênica distintos entre DPSCs e BMMSCs (28). Após transplante *in vivo*, DPSCs foram capazes de formar estruturas complexas como dentina e tecido conjuntivo semelhante à polpa dental (1). Além do seu potencial odontogênico, DPSCs podem ainda se diferenciar em outras linhagens celulares, como adipócitos, osteoblastos e células neuronais (29,30). Dessa forma, fica evidente a importância de se explorar as potencialidades desse tipo celular em estudos de engenharia tecidual.

2.2 Fatores de crescimento celular e regeneração dental

Morfogenes, ou fatores de crescimento celular, são sinais extracelulares secretados que governam a morfogênese durante as interações entre epitélio-mesênquima, como aquelas que ocorrem durante a odontogênese. Quatro famílias dessas proteínas são descritas: BMPs, FGFs (do inglês, *Fibroblast Growth Factors*), Hhs (do inglês, *Hedgehog proteins*) e Wnts (do inglês, *Wingless and interrelated proteins*). Essas famílias exibem sinais redundantes e

reiterativos, cada uma com expressão temporal e espacial distintas durante a morfogênese. Por outro lado, para regeneração de tecidos dentais em adultos, as BMPs isoladas parecem ser suficientes no direcionamento e manutenção da odontogênese (31).

As BMPs 2, 4 e 7 tem um papel importante nas interações entre epitélio-mesênquima, e conseqüentemente, na indução da formação dental nas fases iniciais da odontogênese (31). Em termos de regeneração, elas podem ser utilizadas como um substituto do epitélio dental na estimulação da diferenciação mesenquimal (31). Dentre essas, a BMP4 é apontada no início da odontogênese como indutora da diferenciação de ameloblastos (32) e odontoblastos (33). No nó do esmalte (centro de sinalização entre morfogênese dentária e diferenciação de odontoblastos – onde as células da camada ectodérmica dividem-se e migram por entre o ectoderma e o endoderma), este mesmo morfogene é determinante no estabelecimento da identidade dental, ou seja, da morfologia do dente (incisivo, canino, pré-molar ou molar) (34). Além disso, a BMP4 parece exibir o mesmo padrão de interação entre epitélio e mesênquima durante a formação da raiz (35), sendo expressa no mesênquima circundante funcionando como um sinal para as células epiteliais desenvolverem a bainha radicular epitelial de Hertwig (36).

A BMP2 também tem sido apontada como promotora da diferenciação de células-tronco em células odontoblasto-símile em uma série de estudos (10,37–40). Este fator de crescimento e o TGF- β 1 exibem propriedades biológicas que estimulam a secreção de matriz e, quando combinados com proteínas dentinárias ativadas por EDTA (do inglês, *ethylenediaminetetracetic acid*), podem promover a diferenciação citológica e funcional de células indiferenciadas em células odontoblasto-símile (37). Um exemplo disso ocorre sob condições patológicas como o processo carioso, em que a atividade secretora de odontoblastos é estimulada devido à desmineralização dentinária e conseqüente liberação de moléculas sinalizadoras que ficaram aprisionadas na matriz de dentina mineralizada durante a odontogênese (38,41,42). Essas moléculas estão relacionadas com a formação de dentina reparativa após injúrias dentais (39).

Na literatura, muitos estudos buscam reproduzir as propriedades das BMPs *in vitro*, de forma a determinar os efeitos de concentrações em escalas nano e até mesmo femtométricas desses morfogenes. Ligeiras alterações na concentração dessas substâncias podem levar desde um simples efeito quimiotático, à mitose ou até à completa diferenciação celular (31). Além disso, como as BMPs estão envolvidas em outros tecidos mineralizados do organismo, como o osso, há um tênue limite entre a estimulação celular para produção de osso ou de dentina. Dois microgramas de BMP2 encapsulada em esponjas de colágeno implantadas em polpas

amputadas de cachorro levou à formação de tecido mineralizado semelhante à osteodentina, a qual continha osteodentinócitos embebidos na matriz após 70 dias de observação (39). Com baixas doses (660 a 220 ng), apenas fibras não mineralizadas e tecido pulpar foram notados (39).

Modelos para o estudo do efeito de proteínas derivadas da dentina na diferenciação de células-tronco da polpa em células odontoblasto-símile foram obtidos utilizando-se ácido poli-L-lático adaptados em cavidades pulpares de fatias dentinárias (43). A presença da fatia de dentina proveu elementos que possibilitaram a diferenciação destas células, enquanto que na ausência desse tecido não puderam ser observadas alterações celulares. Em outro estudo semelhante, o efeito da desmineralização prévia da fatia dentinária com solução de EDTA a 10% também influenciou na mobilização de fatores indutores da diferenciação odontoblástica, inclusive proteínas morfogenéticas ósseas, na dentina (39). Srisuwan et al. (44), ao estudar um modelo *in vivo* para avaliar o potencial de DPSCs em regenerar o tecido pulpar, analisaram a interação entre uma matriz de colágeno associada ou não aos fatores de crescimento celular FGF2 e BMP4. Os autores observaram que, na presença de vascularização apropriada, DPSCs transplantadas foram capazes de sobreviver e se diferenciar em linhagens de células odontoblásticas quando os morfogenes estavam presentes.

2.3 Biomateriais

A matriz extracelular (MEC) é uma trama interligada de proteínas fibrosas e glicosaminoglicanas (GAGs) que provê ancoragem para as células, mas também regula o comportamento e a comunicação celular via sinais químicos e estruturais. As células se ligam e movem-se através da MEC, que por sua vez degrada-se, remodela-se e se refaz pela síntese de seus componentes (45). Os *scaffolds*, sejam eles fabricados de biomateriais naturais, sintéticos ou híbridos são arcabouços responsáveis pela manutenção celular, os quais mimetizarão as funções de GAGs e proteínas colagenosas e não-colagenosas da matriz extracelular quando células são encapsuladas em sua estrutura. Portanto, *scaffolds* devem ser tridimensionais e capazes de suportar a adesão, o crescimento e a nutrição celular (46). Os *scaffolds* devem ainda apresentar microporosidades capazes de abrigar as células e permitir o desenvolvimento vascular dentro do novo tecido que será formado. No entanto, essas e várias outras respostas celulares são reguladas por sinais químicos (fatores de crescimento) e físicos

(como rigidez e aspectos topográficos) complexos dos tecidos circunjacentes, cujos mecanismos ainda não estão bem esclarecidos (46–48). De fato, as células encapsuladas devem ser instruídas a se posicionarem e a se diferenciarem e ainda, a sintetizarem as moléculas apropriadas na matriz extracelular obedecendo o formato e as dimensões do tecido perdido (49). Muitas vezes, mesmo na ausência de sinais bioquímicos, a rigidez da MEC ou do *scaffold*, é capaz de determinar o fenótipo de diferenciação de células-tronco (50). Outras vezes, a indução de diferenciação com fatores de crescimento solúveis é capaz de reprogramar a especificação de determinada linhagem nos estágios iniciais de cultura levando a múltiplos fenótipos (50). A incorporação de funções avançadas em *scaffolds* biomiméticos, como controle-espaco-temporal preciso de sinais físicos e químicos é uma tarefa desafiadora, mas parece ser essencial para manter células-tronco em seu estado indiferenciado ou diferenciado em um tecido específico de acordo com a demanda (46).

Hidrogéis são biomateriais complacentes e permeáveis, os quais se assemelham à MEC natural, e portanto, tem sido amplamente empregados como *scaffolds* em engenharia tecidual. Possuem redes poliméricas hidrofílicas tridimensionais capazes de absorver grande quantidade de água ou fluidos biológicos (51). Podem ser obtidos de polímeros sintéticos ou naturais (presentes na MEC, como colágeno, fibronectina, fibrinogênio; ou com estrutura química similar às GAGs, como alginato, ácido hialurônico, quitosana) (52). Suas características mecânicas e bioquímicas podem ser modificadas por ligações cruzadas com outros polímeros ou por modificações físico-químicas estruturais (53–55). Os hidrogéis tem também como vantagem a injetabilidade, devendo, para tanto, apresentar: (1) baixa viscosidade durante a administração; (2) início de geleificação logo após a injeção; (3) biocompatibilidade e (4) biodegradação (16).

Poloxamers são exemplos de hidrogéis sintéticos capazes de se adaptar ao local em que são aplicados especialmente por mudanças de temperatura; e tem sido objetos de estudo por possuírem o potencial de liberação controlada de drogas. São fluidos injetáveis que podem ser introduzidos de forma pouco invasiva no organismo antes que se solidifiquem ou geleifiquem no formato do tecido, órgão ou cavidade (56). Os poloxamers são copolímeros anfifílicos formados por unidades de óxido de etileno (PEO; do inglês, *polyethylene oxide*) e óxido de propileno (PPO; do inglês, *polypropylene oxide*). Dentre esses, o Pluronic® F-127 (Sigma-Aldrich, MO, EUA) tem sido muito utilizado para incorporação de diferentes substâncias com atividade farmacológica e, por isso, um número considerável de patentes utilizando este polímero tem sido registrado nos Estados Unidos da América (EUA) (57).

O mecanismo de geleificação do Pluronic® F-127 é termorreversível, caracterizado por uma temperatura de transição entre os estados sol-gel. Na temperatura ambiente a solução se comporta como um líquido viscoso, o qual é transformado num gel transparente semi-sólido na temperatura corpórea (37 °C) (56). Nessa temperatura, os monômeros do copolímero se agregam em estruturas micelares (com organização estrutural direcionada pela hidrofobicidade das unidades de óxido de propileno), as quais conferem ao material viscosidade e rigidez. Essas propriedades proporcionam a incorporação de substâncias hidrofílicas e hidrofóbicas dentro do material (Figura 2.1).

Figura 2.1 - A liberação do fármaco ocorre a partir de uma micela polimérica termossensível em consequência do aumento da temperatura. (Fonte: Nakayama et al. (58))

No presente estudo, o Pluronic® F-127 foi utilizado como carreador de rhBMP4 e como veículo para DPSCs. Estudos sobre a biocompatibilidade do polímero indicam sua baixa toxicidade e propriedades imunogênicas fracas (57). Clokie e Urist (59) observaram que o Pluronic® F-127 mostrou-se melhor carreador de BMPs para regeneração de osso que outros biomateriais, como colágeno, hidroxiapatita e matriz óssea desmineralizada. O uso do

Pluronic® F-127 em engenharia tecidual, como por exemplo na regeneração de tecido pulmonar, apresentou resultados promissores de crescimento tecidual com baixa resposta inflamatória (60). Também já foi demonstrado que o hidrogel pode ser um excelente substrato para células-tronco hematopoiéticas (HSCs; do inglês, *Hematopoietic Stem Cells*), suportando de maneira apropriada o crescimento celular (61). Em um estudo recente, células-tronco da polpa dentária cultivadas em hidrogel (Puramatrix®; 3-D Matrix, Ltd., Japão) semelhante ao Pluronic® F-127, associado a fragmento de tecido dental, também foram capazes de proliferar e se diferenciar em células odontoblasto-símile *in vitro*, indicando que esta classe de biomateriais é uma alternativa promissora para a bioengenharia do tecido dental (62).

2.4 Fototerapia a laser (FTL)

2.4.1 Mecanismos de ação da FTL

A laser fototerapia, também conhecida como LLLT (do inglês, *Low Level Laser Therapy*), é a aplicação de luz com comprimento de onda nas regiões do vermelho ou infravermelho próximo (600 nm – 1100 nm) (Figura 2.2) com potências que variam entre 1 mW a 500 mW e densidades de energia que variam entre 1 e 20 J/cm² (63–65). A fotoestimulação de células e tecidos tem como objetivo a modulação de processos inflamatório e cicatricial, alívio de dor e mais recentemente, a promoção de regeneração tecidual. A FTL não possui efeito térmico perceptível, mas sim fotoquímico (66). Sendo assim, a luz absorvida é capaz de causar alterações químicas, assim como ocorre no processo de fotossíntese nas plantas (64).

Os efeitos da FTL foram inicialmente descritos por Endre Mester, em 1967. Mester e colaboradores conduziram um experimento para testar se a irradiação com laser poderia causar câncer em camundongos (67). Os pesquisadores aplicaram um laser de rubi (694 nm) em baixa intensidade em sítios no dorso de camundongos após raspagem dos pelos. Os autores não só observaram a não formação de tumores, como também detectaram que os pelos dos sítios irradiados cresceram mais rápido do que os dos controles não irradiados.

Algumas teorias tentam explicar os fenômenos da fotomodulação. Tiina Karu foi pioneira nesta tarefa mostrando que fotoceptores intracelulares estariam envolvidos na

absorção da luz (68). De acordo com a teoria da fotodissociação – a mais aceita atualmente para explicar os mecanismos da FTL – a luz ativaria fotoceptores mitocondriais desligando componentes reguladores da cadeia respiratória e reestabelecendo o fluxo de elétrons com produção de ATP (do inglês, *adenosine triphosphate*) (64,66). Moléculas sinalizadoras produzidas nesse processo poderiam ainda desencadear ou participar de eventos moleculares e celulares bioestimulatórios.

2.4.1.1 Fotoceptores mitocondriais

Uma reação fotobiológica envolve a absorção de luz em um comprimento de onda específico por uma molécula fotorreceptora (fotoceptora) nativa (69). Moléculas fotorreceptoras especializadas, como rodopsina e clorofila, tem funções dependentes da estimulação por luz. Moléculas fotorreceptoras não especializadas, por sua vez, são ditas fotoceptoras e podem, eventualmente, assumir um estado eletronicamente excitado em decorrência da absorção de luz (69). Suas funções primárias, portanto, estão ligadas ao metabolismo celular e não diretamente conectadas à fotoestimulação. Esse é o caso da citocromo c oxidase (cit c) – uma porfirina endógena – e de algumas flavinas (i.e. NADH-desidrogenase) presentes em organelas citoplasmáticas de células eucarióticas (70).

Múltiplas evidências apontam que mitocôndrias, através da cit c, são sensíveis à irradiação na região do vermelho ou do infravermelho próximo (64,68,69,71,72).

Figura 2.2 - Espectro eletromagnético, com ênfase na região visível de luz. (Fonte: www.bigshotcamera.com)

A cit c é uma enzima terminal (complexo IV) da cadeia respiratória, a qual medeia a transferência de elétrons das moléculas de citocromo c ao oxigênio molecular (Figura 2.3).

Figura 2.3 - Estrutura da cadeia transportadora de elétrons na membrana mitocondrial interna (Fonte: Hamblin (73))

A cit c é formada por duas cadeias (heme a e heme a3), as quais apresentam dois sítios reativos de cobre de valência mista (CuA and CuB) – onde, possivelmente, são absorvidos os fótons de luz (71) (Figura 2.4). No entanto, nos eventos de respiração celular, a cit c pode assumir múltiplas configurações moleculares, ou estados redox – ou seja, oxidação total ou parcial; redução total ou parcial. A cit c em suas formas intermediárias, ou seja, enzima parcialmente reduzida ou com valência mista, são consideradas fotoceptores primários da FTL (69,74). Quando excitada, a cit c provê maior taxa de bombeamento de prótons de hidrogênio para o espaço interno mitocondrial (75). Parte dessa energia liberada é usada para gerar um gradiente de prótons que é então utilizado para a síntese de ATP. Em consequência, maior quantidade de elétrons transitam pela cadeia respiratória levando à produção aumentada de radicais livres de oxigênio (ROS; do inglês, *Reactive Oxygen Species*).

Figura 2.4 - Estrutura e modo de ação da citocromo c oxidase (Fonte: <https://www.studyblue.com/#flashcard/flip/6196952>). No ciclo catalítico da citocromo c oxidase, elétrons são transferidos sequencialmente de cit c para CuA, depois para heme a e para o centro binuclear a₃-CuB, onde o oxigênio é reduzido à água

2.4.1.2 Espécies reativas de oxigênio

A principal fonte de espécies reativas de oxigênio no organismo são as mitocôndrias, as quais produzem ROS continuamente como produto da fosforilação oxidativa. Espécies reativas de oxigênio compreendem o superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($OH^{\bullet}$), oxigênio singleto (1O_2) e óxido nítrico (NO) (76). Grandes quantidades de ROS podem ser danosas aos tecidos, levando à senescência celular, apoptose e carcinogênese (77). MSCs, todavia, demonstram capacidade de eliminação eficaz de ROS por apresentarem enzimas constitutivas (superóxido dismutases e catalases) e altos níveis de glutathiona, as quais conferem a estas células maior resistência à morte induzida por estresse oxidativo (78). Adicionalmente, MSCs expressam altos níveis de sulfóxido de metionina redutase A, a qual é uma enzima importante no reparo de proteínas oxidadas e para a recuperação de resíduos de metionina que agem como eliminadores de ROS (79).

Baixos níveis de ROS podem, contudo, atuar como sinalizadores celulares (76), tendo papel inclusive na manutenção da indiferenciação e na diferenciação de células-tronco. Estudos recentes indicam que a participação de NADPH, Nox (do inglês, *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced oxidase*) produzida por ROS é importante para

despertar a diferenciação de ESCs em cardiomiócitos (80). Baixos níveis de ROS também parecem ter papel na auto-renovação de HSCs (do inglês, *Hematopoietic Stem Cells*) (76).

A seguir será descrito o papel da LFT na produção de ROS na cadeia respiratória mitocondrial.

2.4.1.3 FTL interfere no balanço de óxido nítrico (NO) para produção de energia com geração de radicais livres de oxigênio

Em condições canônicas, no ciclo catalítico da cit c, elétrons são transferidos sequencialmente de cit c para CuA, depois para heme a e para o centro binuclear a₃-CuB, onde o oxigênio é reduzido à água (69) (Figura 2.4). Em resumo, na matriz mitocondrial a molécula ferrocitocromo c é oxidada, oxigênio é reduzido (ganho de 4 elétrons), e prótons de hidrogênio são bombeados para o citosol. A energia resultante de reações de oxi-redução é então convertida em um potencial eletroquímico ao longo da membrana interna mitocondrial, a qual finalmente dirige a produção de ATP através da ATP sintase (Complexo V) (Figura 2.3).

No entanto, a cadeia transportadora de elétrons não é 100% eficiente (Chance; Williams, 1956¹ apud Tata e Waynant (81)). Em estados metabólicos normais, cerca de 1 a 2% dos elétrons em trânsito são captados pelo oxigênio molecular, comumente no sítio do carreador transmembrana ubiquinona (transportador de elétrons dos complexos I e II para complexo III) (Chance; Williams, 1956¹ apud Tata e Waynant (81)). Dessa forma, quando o oxigênio molecular ganha apenas 1 ou 2 elétrons são gerados radicais de OH[•] ou O₂^{•-} (82,83). O aumento na concentração O₂^{•-}, e sua conversão em seu produto mais estável – H₂O₂ – pela Cu e Zn-superóxido dismutase altera estados energéticos na mitocôndria (69,84–86). Uma parte dessas espécies reativas de oxigênio pode ser reaproveitada pela própria mitocôndria, mas outra parte pode atravessar a membrana mitocondrial externa e interagir, por exemplo, com fatores celulares presentes no citosol. O peróxido de hidrogênio, particularmente, é capaz de se difundir pelos tecidos atuando como sinalizador parácrino (87,88). No citoplasma, H₂O₂ regula metabolismo, atividade de fosfatases e transcrição gênica

¹ Chance B, Williams GR. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. Adv Enzymol Relat Subj Biochem. 1956;17:65-134.

(89). Alterações no potencial da membrana mitocondrial, aumento de cálcio transiente e alcalinização do meio são alguns dos eventos atribuídos ao aumento nos níveis de ROS, despertando assim cascatas de sinalização que macroscopicamente se traduzem em efeitos estimulatórios (90,91).

O óxido nítrico, por sua vez, é uma molécula reguladora do fluxo de elétrons na cadeia mitocondrial. Variações no influxo de elétrons na cadeia respiratória, portanto, ditarão a produção de maior ou menor quantidade de ATP. A redução das atividades metabólicas celulares em situações adversas, por exemplo, é um mecanismo protetor de sobrevivência celular, e em consequência, há diminuição dos ciclos respiratórios (81). Isso se dá pela ligação de NO, ao invés de oxigênio, em sítios dentro do complexo IV (CuB/a3), reduzindo-se assim a taxa de conversão de ADP (do inglês, *adenosine diphosphate*) em ATP pela ATP sintase (fosforilação oxidativa). Outros derivados do NO, como o peroxinitrito (ONOO-), também podem atuar no complexo I e bloquear o ciclo respiratório (92). A desaceleração do fluxo de elétrons pode fazer com que certas regiões da cadeia respiratória fiquem mais vulneráveis ao ataque do O₂ livre levando ao aumento na produção de superóxido, o qual é rapidamente convertido em peróxido de hidrogênio (81). Por outro lado, o desligamento de NO dos sítios do complexo IV implica em reestabelecimento do ciclo de elétrons normal na cadeia respiratória.

Há evidências de que fótons de luz possam desfazer a ligação do NO nos sítios metálicos do complexo IV (64,93) (Figura 2.5). Dessa forma, a FTL tem a habilidade de reverter a inibição da respiração celular induzida pelo NO e, como já mencionado, aumentar a atividade de bombeamento de prótons de hidrogênio pela cit c. O aumento de ciclos respiratórios com a remoção do NO gera energia, mas também maior disponibilidade de elétrons para captura pelo oxigênio molecular, levando à produção de O₂^{•-} e H₂O₂. Contudo, o balanço dos níveis de radicais livres dentro das células é crítico e compõe um intrincado sistema regulatório. Como mencionado anteriormente, uma resposta decorrente de níveis aumentados de radicais livres no metabolismo celular é o aumento na mobilização de cálcio, o qual se dá pela oxidação de grupos tiol nos canais de Ca²⁺ (81,92,94–96). O aumento no nível basal de cálcio dentro da matriz mitocondrial retroalimenta o ciclo respiratório, resultando em aumento da atividade metabólica com maior produção de ATP. Em contrapartida, o nível basal de cálcio aumentado é controlado pela enzima mitocondrial NOS (do inglês, *Nitric Oxide Synthase*), a qual gera novamente NO ou seus derivados para regular o fluxo de elétrons na cadeia respiratória.

Figura 2.5 – Após a liberação de NO dos centros de ferro e cobre na citocromo c oxidase pela ação da luz, o oxigênio pode novamente se ligar a estes locais e a respiração celular é restaurada (Fonte: Huang et al. (66))

De maneira simplificada, radicais livres de oxigênio podem ser gerados tanto pelo congestionamento de elétrons na cadeia respiratória devido à regulação pelo NO e seus derivados, como pelo fluxo normal de elétrons na cadeia respiratória. Em ambas as situações, ROS são gerados a partir do ataque de O₂ (molécula ávida por elétrons) em diferentes complexos transmembrana da cadeia respiratória. A FTL, entretanto, estimula a produção de energia enquanto leva à produção de ROS (Figura 2.6). Por fim, níveis ótimos de ROS atuam em sinergia com níveis aumentados de ATP para o desencadeamento de eventos celulares importantes. Para uma explicação interessante e detalhada sobre mitocôndrias, respiração celular e FTL, verificar a referência Hamblin (73).

Figura 2.6 - Vias de sinalização celulares desencadeadas pela FTL. Após a absorção de fótons por cromóforos na mitocôndria, a respiração celular e produção de ATP são aumentados. Em adição, moléculas sinalizadoras, tais como espécies reativas de oxigênio e nitrogênio também são produzidas (Fonte: Huang et al. (64)).

2.4.2 Eventos moleculares e celulares decorrentes da FTL

Em consequência da FTL são observados aumentos na síntese de DNA e RNA, por exemplo, com produção de proteínas constituintes da matriz celular (fibronectina e colágeno), aumento na proliferação e migração celular, propriedades imunomodulatórias melhoradas, angiogênese, efeitos neurotróficos, entre outros (97–107).

Mecanismos envolvidos na resposta à fotoativação para indução de proliferação celular tem sido bastante explorados. Dentre eles, estão descritas a fosforilação de TPKR (do inglês, *tyrosine protein kinase receptors*), ativando as vias de sinalização MAPK/ERK (do inglês, *mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated protein kinase*) ou Akt/mTOR/eIF4E (do inglês, *protein kinase B/mammalian target of rapamycin/eukaryotic translation initiation factor 4E*), as quais podem ser, ao menos parcialmente, responsáveis pela promoção na proliferação celular induzida pela FTL (108–110). ROS também parecem ser mensageiros na ativação de várias quinases, como por exemplo as Scr (do inglês, *non-receptor tyrosine kinases*), as quais tem papel na regulação da adesão, proliferação, migração e sobrevivência celular (111). Adicionalmente, o aumento na expressão de membros da família BCL-2 (do inglês, *B-cell lymphoma 2*; fatores regulatórios do processo apoptótico) já foram detectados em células irradiadas em situações de privação energética de soro fetal bovino (estresse nutricional). Sendo assim, níveis elevados de BCL-2 (fator anti-apoptótico) e níveis reduzidos de BAX (do inglês, *BCL2-associated X protein*; pró-apoptótico) foram observados após estimulação com laser (112). De acordo, a FTL foi capaz de prolongar a vida de células infectadas por vírus da herpes simples tipo I (113), assim como de células sob ação de substâncias tóxicas, como géis de clareamento dental (114) ou adesivos dentinários (115).

Em decorrência da produção de ROS, há evidência de que morfogenes importantes possam eventualmente ser ligados ou desligados por meio da FTL. Em 2007, Arany et al. (116) reportaram a habilidade da FTL em ativar TGF- β em processos cicatriciais de feridas. TGF- β s são uma superfamília de fatores de crescimento, na qual incluem-se as BMPs, conhecidas por modular a pluripotência e diferenciação de células-tronco (117–120). O TGF-

β é secretado na forma latente e sua ativação é necessária para que o mesmo seja funcional (121). Os autores demonstraram que a FTL é capaz de ativar TGF- β *in vitro* por alterações conformacionais, tanto na sua forma secretada como em formas complexas no soro, as quais estão presentes em abundância no microambiente da ferida. Essa correlação foi confirmada *in vivo*, sugerindo que a ativação imediata do TGF- β por FTL seja um mecanismo molecular predominante no processo de cicatrização, o qual é notavelmente acelerado após irradiação. Outros fatores de crescimento como PDGF (do inglês, *Platelet Derived Growth Factor*), bFGF (do inglês, *b Fibroblast Growth Factor*) e VEGF (do inglês, *Vascular Endothelial Growth Factor*) também são ativados após FTL, mas seus níveis aumentados são detectados apenas muitas horas ou dias após a irradiação, sendo possivelmente eventos secundários (*downstream effects*), não diretamente induzidos pela FTL (122).

O aumento nos níveis de H_2O_2 também pode ativar fatores de transcrição sensíveis à variação nos estados redox, com o NF- κ B (do inglês, *Nuclear Factor κ B*) (123,124). Chen et al. (125) demonstraram que baixos níveis de irradiação (0,03, 3 ou 30 J/cm²) na região do vermelho próximo podem ativar NF- κ B em fibroblastos embrionários de camundongo. A ativação é mediada por ROS e inibida na presença de ácido ascórbico (antioxidante). Tanto o laser como inibidores mitocondriais – bloqueadores do fluxo normal de elétrons – produzem ROS e ativam NF- κ B, mas a laser terapia aumenta os níveis de ATP, enquanto os inibidores reduzem a produção de energia. NF- κ B, por sua vez, é capaz de regular a expressão de múltiplos genes (126) e ainda governar funções celulares relacionadas à inflamação e à produção de proteínas ligadas à proliferação, migração e aumento na síntese de colágeno, ou respostas induzidas por estresse (127). Curiosamente, a ativação de NF- κ B verificada no estudo é de cunho pró-inflamatório, enquanto alguns estudos reportam que a FTL tem ação anti-inflamatória (128,129). Os autores discutem que a produção de eicosanóides pode ser evento secundário mediado da estimulação pró-inflamatória da terapia levando à cessação da inflamação. De fato, o intervalo de observação dos efeitos da FTL parece ser crítico na determinação dos efeitos imediatos e mediatos da terapia. E esse é, possivelmente, um importante fator responsável pelo número relativamente alto de publicações na literatura com resultados contraditórios sobre a FTL.

O NO livre também atua como molécula mensageira, sendo um potente regulador da circulação atuando como vasodilatador endógeno e neurotransmissor (73). A presença de NO é crítica, especialmente no estágio inflamatório da cicatrização de feridas, onde atua no relaxamento de músculo liso e, conseqüentemente, na dilatação de veias, artérias e vasos linfáticos favorecendo o suprimento sanguíneo para a área injuriada (73). A ligação do NO em

metaloproteínas pode provocar mudanças conformacionais que podem ativar ou inibir enzimas. Sob condições de hipóxia, a queda na tensão de oxigênio através da inibição da cit c por ligação competitiva do NO ativa vias apoptóticas (130). A FTL é capaz de inibir esses sinais, protegendo as células da morte induzida por NO (inibição de HIF1 α (do inglês, *hipóxia inducible fator 1 α*)) e também reduz os níveis de NO pela inibição de iNOS (do inglês, *inducible nitric oxide synthase*) (131).

2.4.3 FTL influencia positivamente células-tronco

O estudo da FTL utilizando células-tronco pode ser elucidativo, uma vez que estas células possuem potencial e plasticidade para seguirem múltiplos destinos de acordo com o estímulo recebido. A FTL é capaz de estimular a proliferação de MSCs via Notch-1, o qual é um fator chave na regulação da auto-renovação, ou seja, na capacidade de gerar uma célula-filha multipotente como a célula-mãe. Em 2013, Gianelli et al. (132) observaram altos níveis de Notch-1 e seu receptor no citoplasma e núcleo 72 h após a irradiação das células. Alguns estudos observacionais sobre a diferenciação celular de células-tronco induzida por FTL também já foram reportados (133–139). Células-tronco derivadas de tecido adiposo irradiadas tem maior capacidade de promover cicatrização óssea devido à indução precoce da liberação de fatores de crescimento, como BMPs (138). Matsui et al. (137) avaliaram o efeito da irradiação de células da polpa dental (não caracterizadas para marcadores de células-tronco, mas possivelmente contendo populações de células progenitoras mais ou menos comprometidas) na produção de matriz mineralizada. Os autores verificaram níveis aumentados de Smads 1, 6 e 7 e consequente aumento na atividade de BMP2 e BMP4 após irradiação.

Recentemente, os efeitos da FTL e seu mecanismo de ação na ativação de TGF- β latente para promoção de diferenciação de células-tronco da polpa dental e formação de dentina terciária *in vivo* foram reportados na literatura (8). Os autores utilizaram um modelo acelular com soluções de soro para testar o microambiente pós-cicatrização hemostática de feridas, o qual poderia estar presente durante o tratamento com a FTL, e o qual conteria quantidades abundantes de TGF- β latente derivado de soro ou plaquetas. Utilizando um corante fluorescente ligado a cisteínas livres, os autores observaram aumento de fluorescência após estimulação da FTL, indicando que a terapia induz alterações conformacionais em

constituintes complexos do soro, e que um desses constituintes seria o TGF- β 1. Em seguida, utilizando células normais ou mutadas no resíduo metionina (posição 253) da molécula do TGF- β 1, o qual é conhecidamente sensível à sensibilização por ROS, os autores confirmaram que a presença de superóxido, peróxido de hidrogênio ou radicais hidroxila é necessária para que haja ativação do TGF- β por meio da FTL. Em testes em células-tronco da polpa dental, os efeitos da FTL provocaram diminuição na expressão de marcadores de células-tronco, como STRO-1, CD90, CD117 e CD44, sugerindo que a transição celular induzida pela FTL é voltada para diferenciação, ou seja, longe do estado multipotente inicial. Dessa forma, células tratadas com FTL apresentaram maior expressão de marcadores odontoblásticos, como DMP1, DSP e OPN do que os controles não-irradiados. *In vivo*, utilizando modelo *knockout* condicional (DSPP^{Cre}TGF β RII^{fl/fl}), os autores verificaram que a FTL induziu quantidades de dentina terciária similares ao grupo controle. Células da polpa dental não-irradiadas derivadas desse modelo foram capazes de produzir tecido mineralizado quando induzidas por BMP4, mas não foram responsivas à estimulação por TGF- β 1. Dessa forma, os autores constatarem o papel do eixo ROS-TGF- β 1 em mediar os efeitos regenerativos da FTL na indução de dentina terciária. Considerando que as vias do TGF- β e das BMPs tem receptores e moléculas efetoras comuns e, ainda, que podem interagir durante uma miríade de eventos celulares, é possível que ROS também sejam capazes de estimular molecularmente BMPs. Diante do exposto, ainda há muito que se estudar para o entendimento dos efeitos biológicos da FTL e, em especial, na regeneração tecidual, o que finalmente nos levou a realizar este estudo.

3 PROPOSIÇÃO

Este estudo teve como objetivo avaliar a influência da fototerapia a laser na proliferação e diferenciação de células-tronco de polpa dentária humana encapsuladas em hidrogel com incorporação de rhBMP4.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Pluronic® F127

4.1.1 Preparo do hidrogel

As formulações de biomaterial usadas neste estudo foram preparadas no Laboratório de Prospeção e Caracterização de Bioativos do Centro de Ciências Naturais e Humanas – área de Farmacologia da Universidade Federal do ABC (UFABC), sob coordenação da Prof.^a Dra. Daniele Araújo.

O Pluronic® F-127 (Sigma-Aldrich, MO, EUA) foi preparado a 20% (p/p) pelo método frio de acordo com Schmolka (140). O biomaterial foi dissolvido em tampão HEPES (do inglês, *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*) a 20 mM contendo NaCl a 154 mM, pH 7,4. Os hidrogéis foram mantidos à 4 °C, sob agitação, por no mínimo 12 h. Após a preparação, as amostras foram esterilizadas em autoclave (121 °C, 20 min) e armazenadas à 4 °C. Devido ao aumento da viscosidade do biomaterial em temperaturas maiores que 4 °C, os experimentos foram conduzidos mantendo o biomaterial constantemente refrigerado em raspas de gelo.

4.1.2 Ensaio de dissolução

Para o ensaio de dissolução, 500 µl de Pluronic® F-127 foram incubados em triplicata em microtubos de 1,5 ml em banho termostático *overnight*. Os microtubos foram preenchidos com 1 ml de meio de cultura e a perda de peso após centrifugação das amostras (5.000 x g, 5 min, temperatura ambiente) foi medida em diferentes intervalos de tempo. A cada tempo experimental, após centrifugação, as amostras foram secas com papel filtro e pesadas. Em seguida, 1 ml de meio de cultura foi novamente adicionado ao tubo, o qual foi armazenado à 37 °C. O perfil de dissolução foi medido pela porcentagem de perda de peso a cada intervalo de tempo utilizando-se a seguinte fórmula:

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

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

4.1.3 Ensaio de embebição (*Swelling*)

Para medição do conteúdo de água embebida pelo Pluronic[®] F-127, amostras do hidrogel (500 µl) foram incubadas em 1 ml de PBS à 37 °C. A cinética de embebição do hidrogel foi analisada por até 5 h. A cada intervalo de tempo, o peso dos espécimes embebidos foi medido após remoção do excesso de água da superfície do biomaterial com papel filtro. A taxa de embebição foi calculada de acordo com a fórmula:

$$TE = \frac{P_t - P_0}{P_0}$$

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

4.1.4 Análise morfológica

Com o intuito de visualizar a arquitetura do biomaterial, amostras foram preparadas para microscopia eletrônica de varredura (MEV). O hidrogel geleificado em moldes medindo 3 x 3 x 1 cm foi congelado em nitrogênio líquido para possibilitar a obtenção de superfícies mecanicamente fraturadas (141). As amostras fraturadas crioscopicamente foram então liofilizadas por 24 h para manter abertas as microporosidades do hidrogel. As amostras liofilizadas foram montadas em bases metálicas sobre fitas adesivas condutoras, metalizadas com ouro (30 mA, 30 s, vácuo de 10^{-2}) (SCD 050, BAL-TEC, Liechtenstein) e visualizadas

em microscópio eletrônico de varredura (JEOL 5300, MA, EUA) no Laboratório de Biologia Oral da Faculdade de Odontologia da USP.

4.1.5 Produção, purificação e incorporação da rhBMP4 no hidrogel

A rhBMP4 foi sintetizada no laboratório Nucel – Universidade de São Paulo, sob coordenação da Prof.^a Dra. Mari Cleide Sogayar e de acordo com publicação anterior (142). A rhBMP4 foi incorporada ao hidrogel na concentração de 100 ng/ml por agitação por barra magnética à 4 °C. O sistema PL/rhBMP4 foi armazenado à 4 °C.

4.1.6 Ensaio de liberação de rhBMP4

A quantificação de rhBMP4 em pg/ml foi realizada nos intervalos 1, 2, 4, 6, 24 e 48 h utilizando o kit *human BMP4 Quantikine Elisa Kit* (R&D Systems, MN, EUA). Para este ensaio, 500 µl do sistema PL/rhBMP4 foram colocados no compartimento superior de câmaras *transwell* de 12-poços (0,4 µm-*pore size* policarbonato; Corning Life Sciences, NY, EUA). No compartimento inferior da câmara, em contato com o biomaterial, foram adicionados 1 ml de meio de cultura. A cada intervalo de tempo, uma amostra de 200 µl de meio de cultura foi coletada e utilizada na quantificação de rhBMP4 de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, 200 µl de meio de cultura fresco foi reposto às culturas de forma a manter o contato do compartimento superior com o compartimento inferior da câmara. Resumidamente, 100 µl de diluente foi adicionado a cada poço da placa do *kit Elisa*, e em seguida, foram adicionados 50 µl de cada concentração do padrão (rhBMP4 em concentrações de 2000, 1000, 500, 250, 125 e 62,5 pg/ml) e 50 µl de cada amostra diluída 1x em diluente, em duplicata. A placa foi então incubada por 4 h à temperatura ambiente, aspirada e lavada por 4x. Em seguida, 200 µl de conjugado foram adicionados e a placa foi incubada por mais 2 h à temperatura ambiente e protegida da luz. Após 4 lavagens, 200 µl de substrato foi adicionado a cada poço e a placa incubada por 30 min, como nas condições anteriores. Finalmente, 50 µl de solução de parada foram adicionados a cada poço e a placa foi lida em espectrofotômetro com filtros de 450 nm com correção a 540 nm.

4.2 Isolamento e caracterização celular

4.2.1 Isolamento

Este estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP), tendo sido aprovado sob parecer CAAE: 09731212.2.0000.0075 (ANEXO A). Parte complementar do estudo foi conduzida no Center for Craniofacial Molecular Biology (CCMB), Ostrow Herman School of Dentistry – University of Southern California, nos Estados Unidos. Alíquotas de DPSCs e de células-tronco mesenquimais da medula óssea (BMMSCs) utilizadas no CCMB foram obtidas e caracterizadas de acordo com Diniz et al. (143), não tendo havido transporte de células entre Brasil e EUA e vice-versa.

Os procedimentos de isolamento e caracterização de células-tronco da polpa dentária humana utilizadas na FOUSP foram realizados de acordo com Gronthos et al. (1), como se segue: células oriundas da polpa dentária humana foram obtidas de dentes (n=5) de pacientes saudáveis (idade entre 15-27 anos), os quais necessitaram extração de terceiros molares por razões ortodônticas. Os dentes foram coletados em Meio Mínimo Essencial α [α -MEM; do inglês, *α -Minimum Essential Medium*; (GIBCO/Life Technologies, NY, EUA)], suplementado com 15% de soro fetal bovino (Hyclone, UT, EUA), 100 μ M ácido ascórbico (Sigma-Aldrich), 2 mM L-glutamina e 100 U/ml penicilina e 100 μ g/ml estreptomicina (todos GIBCO) e mantidos à 4 °C, por período máximo de 24 h. Em seguida, os dentes foram desinfetados com álcool a 70% e seccionados, sob refrigeração, na junção amelodentinária utilizando-se alta rotação e ponta diamantada 3216 (KG Sorensen, SP, Brasil), contudo sem atingir a câmara pulpar (Figura 4.1).

Figura 4.1 - Procedimentos de abertura dental para coleta de células oriundas da polpa dentária. Secção na junção cemento-esmalte (A-B) e clivagem do dente para exposição do tecido pulpar (C-D).

Em câmara de fluxo laminar, os dentes foram clivados com o auxílio de fórceps e pinça goiva de modo que houvesse a completa separação entre coroa e raiz. Dessa forma, o tecido pulpar foi removido com colher de dentina (Figura 4.2A), limas endodônticas, e/ou pinças (Figura 4.2B). Os tecidos pulpare de cada dente foram então reservados numa placa de Petri com suprimento de algumas gotas de meio de cultura. Subsequentemente, a polpa foi fragmentada utilizando-se lâminas de bisturi e tesoura. Num tubo de centrifugação, os fragmentos foram imersos em solução de dispase (3 mg/ml) e collagenase tipo I (4 mg/ml) (ambas GIBCO), e mantidos em estufa à 37 °C por até 60 min (Figura 4.2C). A cada 15 min foi feita agitação em vórtex do tubo contendo os fragmentos para acelerar o processo de extração celular. Em seguida, o conteúdo do tubo foi filtrado em filtro com poros de 70 µm para obtenção de suspensão de células individualizadas. A suspensão de células foi então centrifugada a 550 x g por 5 min e o sobrenadante descartado. As células foram ressuspensas em meio de cultura, transferidas para frascos de cultivo celular (Figura 4.2D) e incubadas à 37 °C, em atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% de dióxido de carbono.

Figura 4.2 - Procedimento de isolamento de células oriundas da polpa dentária. Coleta do tecido pulpar (A-B), extração celular por digestão enzimática (C) e cultivo em garrafas de cultura celular (D)

A monitorização do crescimento celular foi realizada diariamente em microscópio invertido de fase e o meio de cultura trocado a cada 2 ou 3 dias. Após 7 dias, já era possível observar a formação de colônias (Figura 4.3A). As células levaram aproximadamente 10 dias até atingirem a subconfluência de 80-90% em placa de Petri de 100 mm (Figura 4.3B).

Figura 4.3 - Fotomicrografias de fase da linhagem de células oriundas da polpa dentária onde observa-se colônia celular após 1 semana do isolamento (A). As células ainda apresentam morfologias diversas (aumento original 100x) (A). Fotomicrografia de fase da linhagem após 10 dias em cultivo. A imagem mostra subconfluência de 80-90%. As células apresentam aspecto fusiforme e ainda são observadas células em divisão (setas) (aumento original 100x) (B)

O subcultivo foi feito na proporção de 1:3, ou seja, células de cada garrafa de 75 cm² foram subcultivadas em 3 garrafas de 75 cm². Para o subcultivo, foi utilizada solução de tripsina a 0,25% e EDTA a 0,1% (Sigma-Aldrich), por 2 min, à 37 °C. A primeira passagem celular foi denominada P0. Os subcultivos subsequentes foram feitos até P3, sendo que a cada passagem foram congeladas alíquotas de 1-2 x 10⁶ células cada. Essas alíquotas foram estocadas em freezer de nitrogênio líquido à -196 °C (77 K) para utilização em todas as fases do estudo. As células utilizadas nos experimentos foram expandidas até, no máximo, P4.

4.2.2 Imunofenotipagem por citometria de fluxo

Alíquotas de células oriundas da polpa dentária humana foram subcultivadas até a obtenção de no mínimo 1 x 10⁶ células por marcador de superfície. Todo protocolo de citometria foi realizado à 4 °C e as centrifugações realizadas a 550 x g por 5 min. Células em P4 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 h. 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 ressuspensas em PBS (3% BSA) e marcadas com anticorpos primários (200:1) 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 colocada em tubos para o citômetro de fluxo. Para identificar e caracterizar imunofenotipicamente a progenia das populações celulares de polpa dentária foi utilizado um painel de anticorpos primários [conjugados com fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) ou alofococianina (APC)], contra moléculas de superfície celular humanas, a saber: CD29-PE, CD44-APC (BD Biosciences, CA, EUA), CD146-APC, e STRO-1- FITC (Biolegend, CA, EUA), CD14-FITC, CD34-PE, CD45- APC e CD31-FITC (BD Biosciences) e os seus controles isotípicos IgG1k e IgG2k (BD Biosciences) (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 - Marcadores imunofenotípicos testados nas células oriundas da polpa dentária

Marcadores Positivos (intensidade)		Marcadores Negativos	
<i>Células indiferenciadas/nicho perivascular</i>	<i>Células mesenquimais</i>	<i>Células endoteliais</i>	<i>Células hematopoiéticas</i>
CD146 (+++); STRO-1 (+) 5-10% das DPSCs	CD29; CD44	CD31; CD34; CD14	CD45

A população celular foi então contada e classificada por citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson, CA, EUA) no Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP. Os marcadores foram analisados como descrito na Tabela 4.1, de acordo com Huang et al. (144). Foram adquiridos 50.000 eventos dentro do *gate*. Os dados foram analisados pelo programa 9.6.2 *FlowJo Software Version* (Tree Star, OR, EUA).

4.3 Comparação da viabilidade celular e potencial de diferenciação em múltiplos tecidos de DPSCs e BMMSCs encapsuladas no Pluronic® F-127

Esta parte do estudo foi realizada no CCMB, EUA.

4.3.1 Encapsulamento celular

Células das linhagens de DPSCs e BMMSCs foram resuspendidas à 4 °C em Pluronic® F-127 (PL) à densidade de 1×10^6 células/ml e plaqueados em microplacas de acordo com o experimento (6-poços, 1200 µl/poço; 24-poços, 400 µl/poço; 48-poços, 200 µl/poço; ou 96-poços, 100 µl/poço). As células foram então incubadas à 37 °C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ por 20 min para permitir a geleificação do biomaterial. O encapsulamento homogêneo foi confirmado por microscopia de luz. Em seguida, os mesmos volumes de meio de cultura completo foram adicionados aos poços.

4.3.2 Viabilidade celular no PL

O *kit Live/Dead* (Molecular Probes/Life Technologies, NY, EUA) foi utilizado para avaliar a viabilidade das células-tronco encapsuladas no PL após 2, 4, 6 e 8 dias de cultura. Em resumo, após lavagem com PBS, 10 µl de etídio-homodímero-1 (2 µM) e 5 µl de calceína (2 µM) em 10 ml de meio de cultura sem soro fetal bovino foram adicionados às células por 45 min à 37 °C. Um microscópio de fluorescência (Olympus IX71; Olympus, Tóquio, Japão) foi utilizado para observar as células. Cinco imagens de pontos equidistantes previamente determinados foram examinadas por grupo e o número de células vivas (verdes) e mortas (vermelhas) foram contadas em cada poço. O percentual de células vivas foi determinado para cada linhagem celular utilizando o programa *Image-J* (Versão 1.64, NIH, MD, EUA), aplicando-se a fórmula abaixo:

$$V = \frac{C_v \times 100}{(C_v + C_m)}$$

Onde V é a viabilidade, C_v o número de células vivas e C_m o número de células mortas.

4.3.3 Diferenciação odonto/osteogênica no PL

Para estudar a capacidade de odonto/osteodiferenciação de DPSCs e BMMSCs encapsuladas em PL, as células foram plaqueadas em quadriplicata e cultivadas em meio regular (descrito anteriormente no procedimento de isolamento celular) ou odonto/osteogênico contendo α -MEM, 15% de soro fetal bovino, 100 U/ml penicilina e 100 μ g/ml estreptomicina, 2 mM L-glutamina (Todos GIBCO), 100 μ M ácido ascórbico, 1,8 mM fosfato de potássio (KH_2PO_4) e dexametasona (10 μ M) (todos Sigma-Aldrich). O meio foi trocado 2-3x por semana.

Após 2 semanas de indução, a diferenciação odonto/osteogênica de DPSCs e BMMSCs foi verificada por RT-PCR convencional. Brevemente, o RNA total foi extraído por trizol de acordo com as instruções do fabricante. A concentração do RNA foi determinada em espectrofotômetro (Nanodrop 2000, Thermo Fisher Scientific, DE, EUA) e a integridade e a pureza do RNA total avaliados pela razão das absorbâncias 260/280 nm ($A_{260/280}$) e 230/260 nm ($A_{230/260}$), respectivamente. Previamente à transcrição reversa, as amostras de RNA total foram tratadas com DNase I a fim de se eliminar possíveis traços de DNA genômico. As amostras de RNA foram armazenadas em freezer -80 °C até sua utilização. O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado utilizando o *kit Superscript III* (Invitrogen/Life Technologies) a partir de 100 ng de RNA total de acordo com as instruções do fabricante. A eficiência dos *primers* foi confirmada antes dos experimentos. A diferenciação odonto/osteogênica foi verificada pela expressão de osteocalcina (*OCN* ou *BGLAP*; do inglês, *bone gamma-carboxyglutamate (gla) protein*) [senso: 5'-CATGAGAGCCCTCACA; antisenso: AGAGCGACACCCTAGAC-3'; 292 pares de base (pb)] e *RUNX2* (do inglês *Runt related transcription fator 2*) [(senso: 5'-CAGTTCCCAAGCATTTTCATCC-3'; antisenso: 5'-TCAATATGGTCGCCAAACAG-3'); 289 pb] em relação à expressão do gene constitutivo *GADPH* (do inglês, *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) [(senso: 5'-AGCCGCATCTTCTTTTTCGTC-3'); (antisenso: 5'-TCATATTTGGCAGGTTTTTCT-3'); 418 pb]. Após a PCR, as amostras foram corridas por eletroforese em gel de agarose 1% marcado com brometo de etídio. As bandas foram visualizadas por iluminação ultravioleta.

Após 4 semanas de indução, nódulos mineralizados foram corados pelo ensaio de vermelho de alizarina (Sigma-Aldrich). As culturas foram lavadas duas vezes em PBS, fixadas com isopropanol a 60%, reidratadas em água destilada e coradas com solução de

vermelho de alizarina a 1% (pH 4,2), por 5 min. As culturas foram então lavadas 4x em PBS e deixadas secar. Os poços foram fotografados utilizando microscopia de fase. No mínimo 5 imagens por poço foram obtidas de pontos equidistantes pré-determinados. Para a análise quantitativa, a área mineralizada em relação à área total de cada imagem foi calculada para cada linhagem celular utilizando o programa *Image J* (NIH).

4.3.4 Diferenciação adipogênica no PL

Para estudar a capacidade de diferenciação adipogênica, as células foram encapsuladas no hidrogel e cultivadas em meio regular ou adipogênico contendo α -MEM, 15% de soro fetal bovino, 100 U/ml penicilina e 100 μ g/ml estreptomicina, 2 mM L-glutamina, 100 μ M ácido ascórbico, 0,5 mM de hidroclotisona, 10 mg/ml de insulina, 50 mM de isobutilmetilxantina e 6 mM de indometacina.

Após 2 semanas de indução, a diferenciação adipogênica de DPSCs e BMMSCs foi analisada por RT-PCR convencional e a expressão de *LPL* (do inglês, *lipoprotein lipase*) [(senso: 5'-ATGGAGAGCAAAGCCCTGCTC-3'); (antisenso: 5'-GTTAGGTCCAGCTGGATCGAG-3'); 198 pb] e *PPAR γ 2* (do inglês, *peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2*) [(senso: 5'-CTCCTATTGACCCAGAAAGC-3'); (antisenso: 5'-GTAGAGCTGAGTCTTCTCAG-3'); 351 pb] foram comparadas à expressão de *GADPH*, como mencionado anteriormente.

Após 4 semanas de indução, as células foram coradas com óleo vermelho O (Sigma-Aldrich) para detecção de produção de gotículas lipídicas nas culturas celulares. As culturas de DPSCs e BMMSCs foram lavadas duas vezes em PBS, fixadas em PFA a 4% por 10 min e novamente lavadas duas vezes em PBS. Em seguida, as culturas foram lavadas com isopropanol a 60%. Óleo vermelho O a 0,3% preparado em isopropanol e diluído em água destilada na proporção 4:6 (água:solução) foi então adicionado às culturas por 20 min. Isopropanol a 60% foi novamente adicionado e em seguida as culturas foram lavadas duas vezes em PBS. Os poços foram então visualizados em microscópio de fase (Olympus IX71) e fotografados. Todos os dados referentes à diferenciação adipogênica foram analisados quali e semi-qualitativamente.

Os experimentos que se seguem foram realizados no Brasil.

4.4 Aplicação da FTL

A fototerapia a laser foi aplicada utilizando um equipamento de laser de diodo de fosfeto de índio-gálio-alumínio (InGaAlP) (DMC, SP, Brasil) utilizando o comprimento de onda de 660 nm. Os seguintes parâmetros de irradiação foram utilizados, em modos contínuo, pontual e em contato: potência 20 mW, densidade de potência $0,71 \text{ W/cm}^2$, densidade de energia de 3 J/cm^2 (4s) ou 5 J/cm^2 (7s) e energia de 0,08 J ou 0,14 J por ponto, respectivamente.

Figura 4.4 - Placa de 48-poços (3 pontos de irradiação) (A); placa de 24-poços (5 pontos de irradiação) (B)

Para evitar sobre-irradiações dos grupos experimentais nas microplacas, os poços adjacentes ao poço teste foram mantidos vazios (Figura 4.4). Em todos os experimentos, as microplacas foram irradiadas a cada 48 h durante 7 dias (totalizando 3 sessões). Para experimentos montados em placas de 96-poços, cada poço foi irradiado em um único ponto em cada sessão; para placas de 48-poços, cada poço foi irradiado em 3 pontos equidistantes (Figura 4.4A) em cada sessão; e em placas de 24-poços cada poço foi irradiado em 5 pontos equidistantes (Figura 4.4B) em cada sessão. Nessas duas últimas situações, foi utilizada uma matriz metálica para garantir o posicionamento correto da placa de cultura e padronizar as irradiações sempre nos mesmos pontos.

4.5 Encapsulamento celular no sistema PL/rhBMP4 e fotomodulação

4.5.1 Grupos experimentais

4.5.1.1 Ensaios de adesão e proliferação

Tabela 4.2 - Grupos experimentais de adesão e proliferação

	Meio Regular	Densidade de Energia
Células semeadas diretamente em microplacas	Redução de soro (2%) (MTT) Soro 15% (MTT)	0 J/cm ²
Células encapsuladas em Pluronic® F-127	Redução de soro (MTT) Soro 15% (CFU-F)	0 J/cm ²
		3 J/cm ²
		5 J/cm ²
Células encapsuladas em Pluronic® F-127 com incorporação de rhBMP4	Redução de soro (MTT) Soro 15% (CFU-F)	0 J/cm ²
		3 J/cm ²
		5 J/cm ²

MTT = teste de viabilidade; CFU-F = contagem de unidades formadoras de colônia – fibroblástica

4.5.1.2 Ensaios de diferenciação odonto/osteogênica

Tabela 4.3 - Grupos experimentais da diferenciação odonto/osteogênica

	Meio Regular	Meio Indutor	Densidade de Energia
Células semeadas diretamente em microplacas	Controle Negativo	Controle Positivo	0 J/cm ²
Células encapsuladas em Pluronic® F-127	PL (-)	PL (+)	0 J/cm ²
	PL (-)	PL (+)	3 J/cm ²
	PL (-)	PL (+)	5 J/cm ²
Células encapsuladas em Pluronic® F-127 com incorporação de rhBMP4	PL/rhBMP4 (-)	PL/rhBMP4 (+)	0 J/cm ²
	PL/rhBMP4 (-)	PL/rhBMP4 (+)	3 J/cm ²
	PL/rhBMP4 (-)	PL/rhBMP4 (+)	5 J/cm ²

4.5.2 Adesão e proliferação celular

4.5.2.1 PKH26

Primeiramente, a adesão e proliferação celular foram avaliadas em células encapsuladas no PL ou no sistema PL/rhBMP4 utilizando um *kit* fluorescente (PKH26 assay kit; Life Technologies) que marca membrana plasmática, sem contudo causar morte celular. Desta forma, as mesmas células puderam ser acompanhadas em múltiplos tempos experimentais. As células foram semeadas em placas de 96-poços, em quadriplicata. As células foram cultivadas por 3, 5 e 7 dias e em nenhum momento foram irradiadas. Um microscópio de fluorescência [Ti S Nikon Inverted Microscope, NY, EUA (obtido com projeto FAPESP 2013/03864-6)] foi utilizado para observar as células encapsuladas no biomaterial.

4.5.2.2 Contagem de unidades formadoras de colônias

Diferenças no número de CFU-F (do inglês, *Colony Forming Units – Fibroblastic*), ou seja, na capacidade de uma única célula se auto-renovar formando colônias, nos grupos irradiados e não irradiados foram avaliadas em células plaqueadas à densidade de 1×10^4 células/ml encapsuladas em PL ou no sistema PL/rhBMP4 cultivadas por 12 dias. Ao fim do período, as placas foram fixadas em paraformaldeído (PFA) 4% e coradas com azul de toluidina 0,1% (Sigma-Aldrich) em 1% de PFA em PBS. A partir das fotografias dos poços da placa de cultura, o número de CFU-F foi determinado para cada grupo utilizando o programa *Image-J* (NIH). Contagem maior que 50 células por colônia foi considerada como positiva (1 unidade).

4.5.2.3 MTT

A viabilidade celular nos grupos irradiados e não irradiados foi medida por MTT (do inglês, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl- tetrazolium bromide) (Molecular Probes/Life Technologies) em microplacas de 96-poços. Para este teste, a quantidade de soro fetal bovino no meio de cultura foi reduzida para 2% induzindo-se estresse nutricional. Após 2, 4 e 6 dias de cultura, 10 µl de MTT e 90 µl α -MEM foi adicionado às culturas, as quais foram incubadas à 37 °C por 4 h. Em seguida, os cristais de formazan foram dissolvidos utilizando 100 µl de dimetil sulfoxido (DMSO) (Sigma-Aldrich). Após 15 min, a absorbância foi medida em espectrofotômetro (Biotek II Biochrom Ltd., Eugendorf, Austria) utilizando o filtro de 562 nm.

4.5.3 Diferenciação celular

4.5.3.1 Vermelho de alizarina

A formação de nódulos mineralizados após cultivo em meio odonto/osteogênico (descrito anteriormente) por 7 ou 21 dias foi detectada utilizando o ensaio de vermelho de alizarina. As células foram semeadas em placas de 24-poços, em quadriplicata. Após o período de indução, as culturas foram lavadas duas vezes em PBS, fixadas com isopropanol a 60%, reidratadas em água destilada e coradas com vermelho de alizarina (Sigma-Aldrich) a 1% (pH 4,2), por 5 min. As culturas foram então lavadas várias vezes em PBS e deixadas secar. Os poços foram fotografados utilizando microscopia de fase. Para a análise quantitativa, solução de 10% de ácido acético e metanol (4:1 v/v) foi adicionada aos poços por 30 min, sob agitação, para dissolução dos nódulos mineralizados. A absorbância foi lida em espectrofotômetro (Biotek) utilizando o filtro de 490 nm.

4.5.4.2 Transcrição Reversa Quantitativa e Reação em Cadeia da Polimerase (qRT-PCR)

Os níveis de expressão gênica de marcadores de odonto/osteodiferenciação foram avaliados após 14 dias de indução apenas nos grupos tratados com rhBMP4. O RNA total foi extraído do homogeneizado celular utilizando colunas (*silica-membrane spin columns*; RNeasy Mini Kit, Qiagen, CA, EUA) e tratado com Dnase I de acordo com as instruções do fabricante. A concentração do RNA foi determinada em espectrofotômetro como mencionado anteriormente. As amostras foram então armazenadas em freezer -80 °C.

Para a transcrição reversa foi utilizado o *kit Super Script® III* (Invitrogen/Life Technologies) a partir de 250 ng de RNA total seguindo as instruções do fabricante. Marcadores relacionados à diferenciação odonto/osteogênica foram avaliados (Tabela 4.4). A eficiência dos primers foi confirmada antes dos experimentos. Os dados foram normalizados de acordo com a expressão relativa do gene constitutivo GAPDH e pela análise comparativa Ct (*cycle threshold*), tendo como referência amostras do grupo controle – calibradoras (não irradiado e não diferenciado), de acordo com a fórmula que se segue:

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

Os *primers* foram desenhados no *software* GeneTool 2.0 (<https://www.dna20.com/resources/genedesigner>) ou obtidos pelo banco público de *primers* para PCR (Primer Bank - <http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>). O *kit SYBR®Green master mix* (Applied Biosystems/Life Technologies) foi utilizado para a qPCR utilizando os parâmetros cíclicos: 50 °C por 2 min, 95 °C por 10 min e 40 ciclos de 95 °C por 15 s e 60 °C por 60 s.

4.6 Análise Estatística

Todos os experimentos foram repetidos no mínimo 3 vezes. Após verificação da normalidade dos dados por Kolmogorov-Smirnov, a comparação entre as médias dos

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

Tabela 4.4 - Sequência dos *primers* utilizados no qRT-PCR e o tamanho dos fragmentos amplificados (amplicon)

Gene	Senso	Antisenso	Amplicon (pb)
<i>COL1A1</i> (Colágeno Tipo I)	5'-GATTCCCTGGACCTAAAGGTGC-3'	5'-AGCCTCTCCATCTTTGCCAGCA-3'	107
<i>BGLAP</i> (Osteocalcina)	5'-CGCTACCTGTATCAATGGCTGG-3'	5'-CTCCTGAAAGCCGATGTGGTCA-3'	123
<i>DMP1</i> (Proteína da matriz dentinária 1)	5'-GAACTATGAAGATCAGCATCC-3'	5'-CTTCCATTCTTCAGAATCCTC-3'	107
<i>DSPP</i> (Sialofosfoproteína dentinária)	5'-GGGAATAGAAATCAAGGGTC-3'	5'-CAAGATCATTCCATGTTGTCC-3'	106
<i>HSPB1</i> (Proteína Heat Shock 27 kDa)	5'-ACGGTCAAGACCAAGGAT-3'	5'-AGCGTGTATTTCCGCGTG-3'	104
<i>GAPDH</i>	5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'	5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3'	226

5 RESULTADOS

Pluronic® F-127 possui características de biomaterial de baixa estabilidade in vitro

A caracterização do Pluronic® F-127 mostrou que o material dissolve rápida e completamente em meio de cultura nas primeiras 24 h (Figura 5.1). A taxa de embebição foi crescente até as primeiras 5 h de análise (Figura 5.2).

Figura 5.1 - Ilustração gráfica da porcentagem de dissolução do Pluronic® F-127 em meio de cultura em função do tempo (horas)

Figura 5.2 - Ilustração gráfica da taxa de embebição do Pluronic® F-127, ou seja, quantidade de água absorvida pelo biomaterial, em função do tempo (minutos)

Pluronic® F-127 possui estrutura morfológica que favorece rápida dissolução

A estrutura morfológica de amostras de Pluronic® F-127 criofraturadas quando visualizadas em microscópio de varredura mostrou-se caracterizada por estrutura tubular e reticular com poros interconectados (Figura 5.3).

Figura 5.3 - Eletromicrografias de varredura ilustrativas da estrutura morfológica do Pluronic® F-127 [Aumentos de 1000x (A) e 2000x (B)]

rhBMP4 foi detectada em meio de cultura por pelo menos 48 h

A liberação de rhBMP4 do biomaterial em cultura foi analisada nas primeiras horas até 48 h. Um pico de liberação foi observado em 24 h. Até 48 h ainda foi possível detectar a presença do fator de crescimento difundido no meio de cultura em níveis similares aos observados em 4 h e 6 h (Figura 5.4).

Figura 5.4 - Representação gráfica da liberação de rhBMP4 incorporada em Pluronic® F-127 (pg/ml) após sua

difusão para o meio de cultura em função do tempo (horas) em 25 µl de amostra

DPSCs expressam níveis típicos de marcadores de superfície de células-tronco mesenquimais

Os histogramas de DPSCs obtidos por citometria de fluxo mostraram positividade para marcadores de superfície de células-tronco mesenquimais, tais como CD29, CD44, CD146 e o marcador de indiferenciação STRO-1. As células também apresentam ausência ou mínima expressão de marcadores de células hematopoiéticas (CD45) ou endoteliais (CD31, CD14 e CD34) (Figura 5.5).

Figura 5.5 - Ilustração gráfica da imunofenotipagem das células oriundas da polpa dentária (DPSCs). Os números dentro dos gráficos indicam porcentagem (%) de células positivas ao anticorpo primário para o marcador de superfície em questão. Os picos cinza-claro representam os controles isotípicos de cada marcador. Os picos cinza-escuro representam a população celular marcada com o anticorpo

Pluronic® F-127 mostrou-se não-citotóxico às DPSCs e às BMMSCs

Figura 5.6 - Fotomicrografias de fluorescência de DPSCs (A-C) e BMMSCs (D-E) após 4 dias de cultivo no PL. Células marcadas em verde apresentam-se viáveis e pontos marcados em vermelho representam células mortas (aumentos originais 100x). Etídio-homodímero-1 (A, D); calceína (B, E); sobreposições (C, F)

Os resultados do teste de viabilidade *Live/Dead* mostraram que as células sobreviveram no biomaterial por no mínimo 8 dias (Figura 5.6). DPSCs apresentaram taxa de viabilidade significativamente maior que BMMSCs (Figura 5.7).

Figura 5.7 - Representação gráfica da porcentagem média de DPSCs e BMMSCs viáveis encapsuladas no PL em função do tempo (dias). Asteriscos representam diferença significativa entre a viabilidade das duas linhagens celulares estudadas ($p < 0,05$). Barras indicam desvio-padrão

DPSCs e BMMSCs foram capazes de se diferenciar em pelo menos duas linhagens celulares

Diferenciação odonto/osteogênica

Após 2-4 semanas em cultura em meio odonto/osteogênico, DPSCs e BMMSCs mostraram positividade para a coloração vermelho de alizarina (Figura 5.8A). Mais ainda, genes relacionados à diferenciação osteogênica, como *RUNX2* e *OCN* estavam altamente expressos após o período de indução nos grupos tratados (Figura 5.8B).

Figura 5.8 - Representação gráfica da porcentagem de área mineralizada corada por vermelho de alizarina nas duas linhagens estudadas. NS = diferença não significativa. (-) = grupos tratados com meio regular. Asteriscos significam diferenças significativas entre os grupos induzidos e controles ($p < 0.05$) (A). RT-PCR de genes relacionados à diferenciação odonto/osteogênica (+) (*OCN* e *RUNX2*) em relação ao gene constitutivo (*GAPDH*) expressos pelas duas linhagens estudadas (B)

Diferenciação adipogênica

Após 2-4 semanas de indução, a coloração com óleo vermelho O mostrou que tanto DPSCs quanto BMMSCs formaram gotículas lipídicas sugestivas de diferenciação adipogênica (Figura 5.9A-B). Genes relacionados à adipogênese, como *PPAR γ 2* e *LPL*, foram expressos por ambas as linhagens de células (Figura 5.9C).

Figura 5.9 - Fotomicrografias de fase de culturas de dois tipos celulares mostrando gotículas lipídicas (setas) sugestivas de diferenciação adipogênica de DPSCs (A) e BMMSCs (B) (aumentos originais de 400x). RT-PCR de genes relacionados à diferenciação adipogênica (+), como o *PPARγ2* e *LPL* em relação ao gene constitutivo (*GAPDH*), expressos pelas duas linhagens estudadas (C)

DPSCs encapsuladas no sistema PL/rhBMP4 aderiram e proliferaram no biomaterial

Dentro do sistema PL/rhBMP4, DPSCs apresentaram distribuição homogênea após encapsulamento (Figura 5.10A). O hidrogel geleificou adequadamente após incubação à 37 °C (Figura 5.10B). O ensaio de fluorescência PKH26 mostrou que DPSCs foram capazes de aderir, inicialmente formando pequenos agregados celulares, e proliferar no PL ou no sistema PL/rhBMP4 (Figura 5.11).

Figura 5.10 - Fotomicrografia de fase de DPSCs encapsuladas em PL/rhBMP4 (aumento original de 100x) (A); hidrogel geleificado após incubação à 37 °C (B)

Figura 5.11 - Fotomicrografias de fluorescência de DPSCs não irradiadas encapsuladas em PL (A-C) ou no sistema PL/rhBMP4 (D-F) em 3 (A, D), 5 (B, E) e 7 (C, F) dias após plaqueamento evidenciadas por PKH26 (aumento original 100x)

DPSCs encapsuladas no PL ou no sistema PL/rhBMP4 e irradiadas com 3 ou 5 J/cm² geram maior quantidade de CFU-F

CFU-F formadas por DPSCs encapsuladas no PL ou no sistema PL/rhBMP4 foram visualizadas por coloração com azul de toluidina (Figuras 5.12 e 5.13). Tanto no PL como no sistema PL/rhBMP4, DPSCs irradiadas apresentaram maior número de CFU-F que os controles não irradiados (Figuras 5.12A e 5.13A). Não houve diferença significativa entre os dados obtidos das culturas submetidas a ambas as densidades de energia. Quando irradiadas à densidade de 5 J/cm², maior número de CFU-F foi observado quando DPSCs foram encapsuladas em hidrogel sem adição de rhBMP4, em comparação com DPSCs encapsuladas no sistema PL/rhBMP4 ($53,7 \pm 1,2$ e $43,7 \pm 1,8$), respectivamente; $p=0,0094$). Não houve diferenças significativas entre o número de CFU-F formadas por DPSCs encapsuladas no PL ou no sistema PL/rhBMP4 quando os demais grupos experimentais foram comparados entre si.

Figura 5.12 - Representação gráfica da contagem de unidades formadoras de colônia – fibroblástica (CFU-F) de DPSCs encapsuladas em PL, irradiadas e não. NS= diferença não significativa. Asteriscos representam diferenças significativas entre os grupos (* = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$) (A). Fotografias dos poços evidenciando CFU-F formadas por DPSCs encapsuladas no PL, irradiadas ou não, e coradas com azul de toluidina [0 J/cm² (B); 3 J/cm² (C); 5 J/cm² (D)]

Figura 5.13 - Representação gráfica da contagem de unidades formadoras de colônia – fibroblástica (CFU-F) de DPSCs encapsuladas no sistema PL/rhBMP4, irradiadas e não. NS= diferença não significativa. Asteriscos representam diferenças significativas entre os grupos (* = $p < 0,05$) (A). Fotografias dos poços evidenciando CFU-F formadas por DPSCs encapsuladas no sistema PL/rhBMP4, irradiadas ou não, e coradas com azul de toluidina [(0 J/cm² (B); 3 J/cm² (C); 5 J/cm² (D)]

DPSCs irradiadas com 5 J/cm² apresentaram maior taxa de sobrevivência

O ensaio de redução de MTT foi realizado para quantificar a viabilidade de DPSCs encapsuladas nos hidrogéis sob o efeito (ou não) da FTL (Figura 5.14). Durante todo o tempo experimental, células do controle positivo crescidas em condições nutricionais ideais apresentaram maior número de células viáveis do que as células do controle negativo, cultivadas sob estresse nutricional ($p < 0,05$). Em geral, DPSCs encapsuladas nos hidrogéis

tiveram taxas de viabilidade mais baixas do que os controles que cresceram no fundo dos poços, independentemente da incorporação (ou não) de rhBMP4 (Figuras 5.14A-C).

Figura 5.14 - Ilustração gráfica da proliferação de DPSCs encapsuladas em PL ou no sistema PL/rhBMP4, irradiadas ou não, sob estresse nutricional, nos períodos de 2 (A), 4 (B) e 6 (C) dias após o plaqueamento. Os dados foram obtidos pelo teste de redução do MTT. Estrelas mostram diferenças significativas entre os controles positivo (condições ideais com soro fetal bovino a 15%) e negativo (condições de estresse nutricional com soro fetal bovino a 2%). Asteriscos mostram diferenças significativas na proliferação celular entre os grupos de DPSCs encapsuladas nos hidrogéis em estresse nutricional ($p < 0,05$)

DPSCs irradiadas com a densidade de energia de 3 J/cm^2 apresentaram número de células significativamente maior do que células não irradiadas encapsuladas no PL no intervalo de 2 dias após plaqueamento ($p < 0,05$) (Figura 5.14A). Esta diferença não foi observada nos outros tempos experimentais ($p > 0,05$). Além disso, essa densidade de energia não foi capaz de aumentar o crescimento de DPSCs encapsuladas no sistema PL/rhBMP4 durante todos os tempos experimentais. Por outro lado, DPSCs irradiadas com a densidade de energia de 5 J/cm^2 apresentaram número de células significativamente maior do que o grupo não irradiado quando encapsuladas em PL após 2 (Figura 5.14A) e 6 (Figura 5.14C) dias do plaqueamento. Este mesmo efeito só foi observado após 6 (Figura 5.14C) dias do plaqueamento quando as células foram encapsuladas no sistema PL/rhBMP4.

DPSCs irradiadas com 3 ou 5 J/cm² produzem matriz mineralizada precocemente acompanhada de intensa produção de nódulos mineralizados

O meio odonto/osteogênico foi adicionado por 7 a 21 dias às culturas. Após 7 dias, quando DPSCs foram plaqueadas diretamente na placa ou encapsuladas no hidrogel, nem os grupos tratados com meio indutor, nem os grupos tratados com meio regular exibiram nódulos mineralizados (Figuras 5.15A-L).

Por outro lado, nos grupos em que as DPSCs foram encapsuladas no sistema PL/rhBMP4 e irradiadas com 3 J/cm^2 ou 5 J/cm^2 foi observada deposição mineral, embora escassa (Figura 5.15H, L). A análise quantitativa confirmou que a mineralização foi significativamente maior nos grupos de DPSCs encapsuladas em PL/rhBMP4 e irradiadas quando comparado à mineralização dos outros grupos após 7 dias (Figura 5.16A).

Figura 5.15 - Fotomicrografias de fase da avaliação histoquímica da deposição de matriz mineralizada pela coloração de vermelho de alizarina. DPSCs encapsuladas em PL (A, B, E, F, I, J) ou no sistema PL/rhBMP4 (C, D, G, H, K, L) após 7 dias de cultura em meio odonto/osteogênico (+) (B, D, F, H, J, L) ou regular (-) (A, C, E, G, I, K), irradiadas com 0 J/cm² (A-D); 3 J/cm² (E-H); ou 5 J/cm² (I-L). Cabeça de setas mostram depósitos minerais (nódulos) (aumentos originais 100x)

Figura 5.16 - Representação gráfica da coloração por Vermelho de Alizarina após solubilização dos nódulos mineralizados. Após 7 dias de indução (A). Asteriscos mostram diferença significativa dos grupos com incorporação de rhBMP4 e irradiados em relação aos demais (* = $p < 0,05$). Após 21 dias de indução (B). Asteriscos mostram diferenças significativas entre os grupos com incorporação de rhBMP4 (* = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$) (B)

Após 21 dias de cultura em meio odonto/osteogênico, todos os grupos foram intensamente corados por vermelho de alizarina em comparação com os grupos homólogos mantidos em meio regular (Figura 5.17D,H,L). DPSCs encapsuladas no sistema PL/rhBMP4 irradiados (ou não) apresentaram deposição mineral significativamente mais elevada ($p < 0,05$) (Figura 5.16B). Dentre esses grupos, DPSCs irradiadas com 5 J/cm^2 exibiram quase 3 vezes mais produção de matriz mineralizada que o grupo não irradiado (Figura 5.16B).

Figura 5.17 - Fotomicrografias de fase da avaliação histoquímica da deposição de matriz mineralizada pela coloração de vermelho de alizarina. DPSCs encapsuladas em PL (A, B, E, F, I, J) ou no sistema PL/rhBMP4 (C, D, G, H, K, L) após 21 dias de cultura em meio odonto/osteogênico (+) (B, D, F, H, J, L) ou regular (A, C, E, G, I, K), irradiadas com 0 J/cm² (A-D); 3 J/cm² (E-H); ou 5 J/cm² (I-L) (aumentos originais 100x)

DPSCs irradiadas com 5 J/cm² apresentam expressão aumentada de genes relacionados à odonto/osteogênese

Genes relacionados com à diferenciação odonto/osteogênica, tais como colágeno tipo I (*COL1A1*), osteocalcina (*BGLAP/OCN*), sialofosfoproteína dentinária (*DSPP*), proteína da matriz dentinária I (*DMP1*) e proteína *heat shock* 27 kDa (*HSPB1*), foram altamente expressos no grupo irradiado com 5 J/cm² em comparação ao controle (não irradiado) (Figura 5.18). À densidade de energia de 3 J/cm², as células expressaram significativamente maior quantidade de *COL1A1*, *OCN* e *HSPB1*, mas não de *DSPP*. Nesta densidade de energia, os níveis de expressão relativos de *DMP1* foram inferiores ao do grupo controle ($p<0,05$) (Figura 5.18).

Figura 5.18 - Representação gráfica da expressão relativa de genes marcadores de diferenciação odonto/osteogênica (A) colágeno tipo I (*COL1A1*); (B) osteocalcina (*BGLAP*); (C) proteína da matriz dentinária 1 (*DMP1*); (D) sialofosfoproteína dentinária (*DSPP*); e (E) proteína *heat shock* 27 kDa (*HSPB1*). Asteriscos mostram diferenças significativas entre os grupos irradiados e não irradiado com incorporação de rhBMP4 (* = $p<0,05$; *** = $p<0,001$)

6 DISCUSSÃO

Nosso grupo de pesquisa vem há vários anos estudando os efeitos da fototerapia a laser sobre células e tecidos (11,103–106,115,145,146). Estes estudos mostraram a capacidade da FTL em incrementar tanto viabilidade e proliferação celulares, quanto de promover migração e diferenciação celulares na dependência dos parâmetros empregados. Neste sentido, os estudos mais recentes apontaram para a possibilidade desta terapia poder ser aplicada na engenharia tecidual com o objetivo de melhorar as respostas de células-tronco favorecendo a regeneração de tecidos. Assim sendo, a proposição deste estudo foi verificar a proliferação e a diferenciação odonto/osteogênica de células-tronco da polpa dentária encapsuladas em hidrogel (Pluronic® F-127) incorporado com rhBMP4 em resposta à FTL. Primeiramente, o biomaterial foi caracterizado em relação à sua taxa de dissolução, embebição, morfologia e cinética de liberação de rhBMP4. Em seguida, a viabilidade e a capacidade de diferenciação em múltiplas linhagens de DPSCs foi testada no biomaterial e comparada às BMMSCs. Confirmando a hipótese deste estudo de que a FTL poderia agir sinergisticamente com a rhBMP4, observamos que a FTL aplicada sobre DPSCs encapsuladas no sistema PL/rhBMP4, em especial à densidade de energia de 5 J/cm², acelerou e melhorou a eficiência de diferenciação odonto/osteogênica de DPSCs.

O Pluronic® F-127 é um hidrogel sintético já aprovado para uso clínico pela *Food and Drug Administration* (FDA). O biomaterial tem aplicações clínicas variadas, como tratamento de queimaduras, veículos para anestésicos ou carreadores de drogas terapêuticas com liberação controlada (56). Uma característica especial deste tipo de hidrogel é a sua termorreversibilidade, o que permite manter células encapsuladas na sua estrutura (147). Os resultados da caracterização, como perfil de dissolução e de embebição, mostraram que o Pluronic® F-127 dissolve rapidamente e completamente em curto espaço de tempo. Outros estudos confirmam que o hidrogel embebe rapidamente em PBS e atinge o equilíbrio dentro das primeiras 5 h de incubação (143). Além disso, graças às propriedades termorreversíveis do hidrogel, a embebição do biomaterial é inversamente proporcional ao aumento da temperatura, ou seja, quanto maior a temperatura, menor a taxa de embebição (143). Na verdade, o grau de embebição e a morfologia do hidrogel estão relacionados ao aumento ou à diminuição da velocidade de difusão e da permeação dos biomateriais (148). Morfologias tubulares, como a observada para o hidrogel neste estudo, parecem conduzir a maiores taxas de difusão e permeabilidade de drogas do que morfologias esferoidais (141). O aspecto

morfológico tubular e reticular observado no Pluronic® F-127 contribui para sua alta permeabilidade e pouca estabilidade em cultura. Por outro lado, a densa rede de poros e canais orientados e interconectados é também desejável para o provimento de nutrientes e oxigênio às células encapsuladas (46,141,143). De fato, apesar da perda da estrutura tridimensional do Pluronic® F-127 a 20% após poucos dias em cultura, o biomaterial mostrou efetividade no encapsulamento e na manutenção da viabilidade celular.

Considerando as características físicas do biomaterial, o Pluronic® F-127 pode ser um biomaterial adequado para a liberação rápida de células e outras moléculas bioativas sensíveis *in vivo* (60). Embora a presença de fluidos corporais diminua a concentração do hidrogel *in vivo* (57), esta propriedade pode ser de importância para a regeneração/reparação de tecidos que possuem pouca vascularização ou *turnover* mais lento, tais como cartilagem e tecidos conjuntivos densos (tendões, ligamentos) (143), ou de tecidos com vascularização terminal, como a polpa dentária. A falta de microvasculatura poderia retardar a dissolução/desintegração do biomaterial, mas não tanto que prejudicasse a neogênese do tecido devido à persistência de materiais não-degradáveis no local do defeito (147,149–152). Considerando a necessidade de uso a longo prazo, a conjugação do Pluronic® F-127 com outros polímeros, como quitosana e alginato (153–155), ou minerais, como hidroxiapatita (147), parece ser mais apropriada. Modificações como cura em ultravioleta permitem aumento considerável da estabilidade do hidrogel, sem no entanto levar à perda de sua injetabilidade (150). Essas e outras modificações, além da inclusão de aditivos, podem favorecer o propósito de um enxerto específico, como por exemplo, visando propriedades mecânicas melhoradas e longos períodos de liberação controlada de drogas (153–155). Neste estudo, o Pluronic® F-127 foi utilizado para liberação de rhBMP4 a fim de se visualizar os efeitos da associação deste fator de crescimento com a FTL por período mais prolongado. De fato, a disponibilidade de fatores de crescimento solúveis no meio de cultura aos receptores de superfície celulares é restrita à difusão, e a ausência de sinalização pode comprometer vias de sinalização intracelulares (46). Neste estudo, o biomaterial manteve algum nível de liberação da rhBMP4 por todo período avaliado (48 h), apresentando um pico de liberação no intervalo de 24 h. Possivelmente, a estrutura micelar do Pluronic® F-127 tenha contribuído para a imobilização e liberação controlada da rhBMP4 no meio de cultura favorecendo os resultados observados.

Antes de verificar os efeitos da FTL em associação com o fator de crescimento rhBMP4, o Pluronic® F-127 isolado foi avaliado segundo sua citotoxicidade para encapsulamento de células-tronco mesenquimais (MSCs). A fins comparativos, foram

utilizadas duas linhagens celulares distintas, DPSCs e BMMSCs. À 4 °C, o hidrogel apresentou boas condições de manuseamento. A avaliação microscópica das MSCs encapsuladas à 37 °C mostrou que, no início da cultura em 3D, uma suspensão homogênea de células individualizadas pôde ser observada. No entanto, durante os dias seguintes, aglomerados celulares de baixa densidade, os quais se distribuíram ao longo de toda a cultura, também puderam ser notados. De fato, o biomaterial estudado parece contribuir para a polarização adequada das MSCs, as quais devem apresentar morfologia estrelária em MECs tridimensionais (156).

Os resultados do teste de viabilidade mostraram que tanto DPSCs como BMMSCs aderiram e proliferaram na presença do biomaterial. Estes resultados concordam com estudos anteriores disponíveis na literatura, os quais relatam a resposta de crescimento celular favorável mediante encapsulamento no hidrogel (60,157,158). Além disso, o presente estudo confirmou que DPSCs tem propriedades proliferativas superiores em relação às BMMSCs. De acordo, DPSCs apresentaram maior viabilidade celular que BMMSCs nos primeiros dias após o encapsulamento, o que pode ser atribuído a menor sensibilidade de DPSCs (em comparação às BMMSCs) aos componentes do hidrogel ou às mudanças de temperatura sofridas durante a geleificação do biomaterial (143).

Além da viabilidade celular, a capacidade de diferenciação de DPSCs e BMMSCs em múltiplas linhagens também foi testada. Ambas as linhagens tiveram êxito em se diferenciar em células de tecidos ósseo e adiposo. As análises histoquímicas, como o vermelho de alizarina e o óleo vermelho O, evidenciaram a formação de matriz mineralizada e gotículas lipídicas, respectivamente. A análise de PCR confirmou que DPSCs e BMMSCs expressaram genes relacionados à diferenciação odonto/osteogênica (*OCN* e *RUNX2*) e à diferenciação adipogênica (*LPL* e *PPAR γ 2*). DPSCs demonstraram ser células multipotentes com grande capacidade em se diferenciar em pelo menos dois tecidos, inclusive em maior escala que BMMSCs. Outros estudos concordam com essa afirmação (24,30,159,160), confirmando que DPSCs são fortes candidatas para aplicações em engenharia de tecidos, especialmente pela sua pronta biodisponibilidade em amostras de tecido que regularmente seriam descartadas na clínica.

Após confirmar a capacidade do Pluronic® F-127 em suportar o crescimento e a diferenciação celular, e de constatar as potencialidades de DPSCs – tais como alta proliferação celular e multipotência – o encapsulamento celular foi realizado no sistema PL/rhBMP4. Em PL/rhBMP4, DPSCs foram capazes de aderir e proliferar em cultura, sugerindo que a incorporação de rhBMP4 não afetou funções basais de DPSCs encapsuladas

no hidrogel. Subsequentemente, os efeitos da FTL também foram analisados. Inicialmente, foi verificado se o número de CFU-F para grupos com ou sem rhBMP4 e irradiados ou não, variava de acordo com o tratamento. Os resultados da coloração com azul de toluidina mostraram que DPSCs encapsuladas em hidrogel sem adição de rhBMP4 formaram maior número de colônias em comparação com o sistema PL/rhBMP4. Independentemente do tipo de hidrogel de encapsulamento, DPSCs irradiadas apresentaram maior número de CFU-F que os controles não irradiados. Resultados semelhantes foram encontrados por Li et al. (161) após irradiação de BMMSCs com densidades de energia de 1,5 J/cm² e 2,5 J/cm² por dia. A FTL foi capaz de aumentar a eficiência na formação colônias; e células com forte potencial proliferativo também exibem maior potencial de diferenciação (162).

Em seguida, foi verificado se a FTL levaria ao aumento da taxa de sobrevivência de DPSCs encapsuladas no hidrogel e sob estresse nutricional – condição que simula o *milieu* de injúrias teciduais *in vivo*. Para observar esse efeito, a porcentagem de soro fetal bovino presente nos meios de cultura foi drasticamente reduzida (145). A análise quantitativa de células vivas sob estresse nutricional mostrou maior viabilidade de DPSCs quando os grupos de PL foram irradiados com densidades de energia de 3 ou 5 J/cm², no intervalo de tempo de 24 h após a FTL. Após a terceira irradiação, a densidade de energia de 5 J/cm² ainda favoreceu a sobrevivência das DPSCs encapsuladas em PL em comparação com os grupos não-irradiados ou irradiados com 3 J/cm². Outros estudos já haviam demonstrado que a densidade de energia de 3 J/cm² é capaz de melhorar a viabilidade de células indiferenciadas e diferenciadas sob condições de déficit nutricional (103,146). Os resultados do presente estudo também estão de acordo com publicações anteriores, nas quais foram observados aumento significativo na proliferação celular, viabilidade e expressão de molécula de adesão celular integrina b1 de células-tronco derivadas de tecido adiposo humano em resposta à irradiação a 635 nm à densidade de energia de 5 J/cm² (135,163). Em geral, doses estimulatórias para células-tronco parecem se encontrar na faixa de 0,5 a 8 J/cm² (164). Em relação aos grupos com encapsulamento de DPSCs no sistema PL/rhBMP4, maior viabilidade celular só foi observada no último tempo experimental após irradiação com 5 J/cm². Considerando o possível estímulo para diferenciação e consequente diminuição do estímulo mitótico induzidos pela adição de rhBMP4 às culturas (165), a presença do fator de crescimento pode ter contribuído para diminuir a taxa de viabilidade das DPSCs sob estresse nutricional, assim como a sua capacidade proliferativa (devido ao menor número de CFU-F nos grupos encapsulados no sistema PL/rhBMP4).

A hidroxiapatita (HA) é a principal porção inorgânica da dentina, enquanto que o colágeno tipo I constitui a maior porção orgânica (166). Pequenas quantidades de outras proteínas não colagenosas também são encontradas na MEC de ossos ou da dentina, como a osteonectina (ONN), osteopontina (OPN), osteocalcina (OCN), sialoproteína óssea (BSP) e proteína da matriz óssea 1 (BMP1) (166,167). Particularmente na dentina são encontradas as sialo (DSP) e fosfoproteínas dentinárias (DPP), que são originadas da sialofosfoproteína dentinária (DSPP), a qual é um ótimo marcador de diferenciação de odontoblastos (168). A proteína da matriz dentinária 1 (DMP1) também é expressa por odontoblastos em diferenciação e está envolvida nos processos de mineralização durante o desenvolvimento (169). BMPs, por suas vezes, são identificadas como os principais mediadores da regeneração de tecido duro nos organismos (33,39,119,120,170). Dentre eles, a BMP4 é crucial no início do desenvolvimento de ossos e cartilagens e no reparo de fraturas (120,170). Além disso, em conjunto com outras moléculas bioativas, a BMP4 é ativadora de genes relacionados à amelogenese, incluindo amelogenina, ameloblastina e enamelin; também desempenhando papel na regulação de vários fatores de transcrição de odontoblastos e genes incluindo *DSPP* (171). Neste sentido, a rhBMP4 foi escolhida para ser utilizada nos propósitos do presente estudo.

Após indução odonto/osteogênica, a histoquímica com vermelho de alizarina mostrou quali e quantitativamente que os grupos tratados com rhBMP4 exibiram significativamente maior deposição de matriz mineral do que o grupo controle positivo cultivado diretamente sobre a superfície da placa de cultura. Após a aplicação da FTL, nos grupos em que DPSCs foram encapsuladas no sistema PL/rhBMP4 e irradiadas com qualquer das densidades de energia testadas neste estudo, a deposição de nódulos mineralizados pode ser prematuramente identificada nas culturas (após 7 dias de indução). Estudos preliminares mostraram que a combinação de uma biomatriz tridimensional em associação com a FTL estimula a proliferação e diferenciação óssea precoce de MSCs em osteoblastos e, posteriormente, melhora a ossificação *ex vivo* (133). No entanto, no presente estudo não foram observados nódulos mineralizados nas culturas que não foram tratadas com rhBMP4, mesmo que irradiadas (aos 7 dias de indução). Como mencionado anteriormente, a rhBMP4 apresenta um pico de liberação 24 h após o plaqueamento, o que coincide com a primeira irradiação nas culturas.

A BMP4 também tem papel na produção de ROS, os quais podem agir como moléculas sinalizadoras no meio em que estão presentes. Curiosamente, este fator de crescimento parece estimular a expressão de ICAM-1 (do inglês, *intercellular cell adhesion*

molecule-1) via ativação de NF- κ B (172) atuando como um fator pró-inflamatório. Desta forma, a BMP4 pode atuar como sinalizador autócrino, sendo que sua ligação nos receptores BMP leva à produção de quantidades significativas de ROS por ativação de componentes da NADPH oxidase (173), os quais finalmente ativam NF- κ B. Pela maior eficiência na diferenciação odonto/osteogênica das DPSCs na presença de rhBMP4, é possível que a FTL esteja potencializando as respostas celulares junto à rhBMP4 via ROS. No entanto, mais estudos devem ser realizados para investigar em que momentos a suplementação de rhBMP4 e FTL é crítica para que DPSCs apresentem esta rápida resposta à diferenciação odonto/osteogênica. Mais ainda, é necessário quantificar o nível de ROS entre os grupos tratados com rhBMP4 e FTL e seus controles.

Após 21 dias de indução, os grupos irradiados exibiram maior quantidade de deposição mineral que os grupos não-irradiados. Desta forma, à densidade de energia de 5 J/cm², as células encapsuladas no sistema PL/rhBMP4 foram capazes de produzir quase 3 vezes a quantidade de matriz mineralizada que o mesmo grupo não irradiado. Estes resultados foram confirmados pela análise de qRT-PCR, em que genes relacionados à diferenciação odonto/osteoblástica estavam altamente expressos em DPSCs encapsuladas no sistema PL/rhBMP4, especialmente os irradiados à densidade de energia de 5 J/cm². Células-tronco do ligamento periodontal humanas também mostraram alta taxa proliferativa e acelerada deposição de cálcio após irradiação com 2 ou 4 J/cm² (138). *In vivo*, foi demonstrado que tecido de polpa de ratos exposto mecanicamente pode formar quantidades expressivas de dentina terciária quando irradiado com laser (à densidade de energia de 3 J/cm²), em comparação com os controles não irradiados (8). Nossos resultados contribuem para a literatura mostrando que o fator de crescimento BMP4 atua em sinergia com a FTL, e incitam a busca de mecanismos que possam explicar os resultados aqui observados.

Os mecanismos de ação da FTL ainda são pouco conhecidos. Uma das hipóteses mais aceitáveis é de que a luz seja absorvida pelo citocromo c oxidase dentro das mitocôndrias. A sobre-energia gerada (ATP) e a produção de ROS decorrentes dessa estimulação (64,125) poderiam ser responsáveis por ativar outras moléculas sinalizadoras, como fatores de crescimento em estado latente, desencadeando eventos celulares importantes. Outros fotoceptores endógenos também podem estar envolvidos. Para nosso conhecimento, esta é a primeira demonstração de que a FTL pode modular a interação de BMP4 com células-tronco derivadas da polpa dental. Como mencionado anteriormente, a FTL pode ativar TGF- β 1 de maneira dose-dependente (8). É possível que a via de sinalização das BMPs também esteja intimamente relacionada à FTL. Apesar dos resultados positivos encontrados no presente

estudo, resultados contraditórios são constantemente reportados na literatura. Mais esforços para identificar os melhores parâmetros de dosimetria e determinar *masters regulators* da cascata despertada pela fotomodulação a laser poderiam definir a FTL como terapia legítima para a engenharia tecidual. Na Odontologia, a FTL poderia ser candidata a aumentar a probabilidade de neoformação de tecidos como polpa e dentina, especialmente por aumentar a viabilidade celular e acelerar o processo de mineralização tecidual.

Neste estudo, pela primeira vez, a proliferação e a atividade odonto/osteogênica de DPSCs foram avaliadas quando estas células foram encapsuladas em um veículo injetável e termoresponsivo para liberação controlada de rhBMP4. Além disso, pela primeira vez, a FTL foi avaliada em associação com um sistema carreador de rhBMP4. Nossos resultados mostraram que o Pluronic® F-127 é adequado para a proliferação de células-tronco e não prejudica a sua diferenciação em múltiplas linhagens. Ainda, a associação entre rhBMP4 e FTL acelerou e aumentou notavelmente a formação de tecido mineralizado. Este estudo concluiu que o sistema PL/rhBMP4 pode ser um biomaterial promissor para fins de engenharia tecidual e que a FTL melhora a resposta de DPSCs em direção à proliferação e à formação de tecido mineralizado semelhante à dentina.

Novos direcionamentos no sentido de entender os mecanismos pelos quais a FTL associada à rhBMP4 modula positivamente DPSCs se fazem necessários. Mais ainda, a condução de estudos *in vivo* que confirmem os resultados encontrados *in vitro* poderiam fortalecer ainda mais os dados aqui reportados. Neste sentido, o grupo de pesquisa buscou responder mais algumas perguntas relacionadas à associação da FTL e rhBMP4, tais como: 1) detectar se haveria diferenças na quantidade de produção de ROS nos grupos experimentais avaliados; 2) detectar se haveria diferenças na expressão de proteínas relacionadas a níveis aumentados de ROS, caso pertinente; e, finalmente, 3) verificar o potencial de formação de tecido mineralizado *in vivo* de DPSCs encapsuladas no sistema PL/rhBMP4, irradiadas ou não, e transplantadas em defeitos ósseos de tamanho crítico produzidos em calvárias de camundongos imunocomprometidos. Os resultados dos ensaios realizados posteriormente ao fechamento desta tese estão descritos na forma de artigo científico juntamente com os dados aqui reportados.

7 CONCLUSÃO

A associação entre rhBMP4 e FTL promove proliferação e diferenciação odonto/osteogênica de DPSCs *in vitro* acelerando e aumentando notavelmente a formação de tecido mineralizado, em especial quando a densidade de energia de 5 J/cm² é aplicada.

REFERÊNCIAS¹

1. Gronthos S, Mankani M, Brahimi 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;97(25):13625–30.
2. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, et al. SHED : Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(10):5807–12.
3. Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S, et al. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J Endod*. 2008;34(2):166–71.
4. Mantesso A, Sharpe P. Dental stem cells for tooth regeneration and repair. *Expert Opin Biol Ther*. 2009;9(9):1143–54.
5. Iohara K, Nakashima M, Ito M, Ishikawa M, Nakasima A, Akamine A. Dentin regeneration by dental pulp stem cell therapy with recombinant human bone morphogenetic protein 2. *J Dent Res*. 2004;83(8):590–5.
6. Silva FDS, Almeida PN, Rettore JVP, Maranduba CP, Souza CM De, Souza GT De, et al. Toward personalized cell therapies by using stem cells: Seven relevant topics for safety and success in stem cell therapy. *J Biomed Biotechnol*. 2012:758102.
7. Discher DE, Mooney DJ, Zandstra PW. Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. *Science*. 2009;324(5935):1673–7.
8. Arany PR, Cho A, Hunt TD, Sidhu G, Shin K, Hahm E, et al. Photoactivation of endogenous latent transforming growth factor- β 1 directs dental stem cell differentiation for regeneration. *Sci Transl Med*. 2014;6(238):238ra69.
9. Tate Y, Yoshida K, Yoshida N, Iwaku M, Okiji T, Ohshima H. Odontoblast responses to GaAlAs laser irradiation in rat molars: An experimental study using heat-shock protein-25 immunohistochemistry. *Eur J Oral Sci*. 2006;114(1):50–7.
10. Ferreira L, Cai S, Barros J, Patel S, Chen W, Marques M. Effects of laser phototherapy and growth factors PDGF and BMP-2 on the odontogenic differentiation of dental pulp stem cells. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2012. p. S101. Resumo
11. Moreira MS, Carvalho RA, Diniz IMA, Neves II, Almeida F, Gavini G, et al. Laser phototherapy improves dentin pulp complex regeneration in vivo. *Pulp Regeneration – Translational Opportunities*. 2013. Resumo
12. Guo X, Wang X-F. Signaling cross-talk between TGF- β /BMP and other pathways. *Cell Res*. 2009;19(1):71–88.

13. Mao JJ, Giannobile WV, Helms JA, Hollister SJ, Krebsbach PH, Longaker MT, et al. Craniofacial Tissue Engineering by Stem Cells. *J Dent Res.* 2006;85(11):966–79.
14. Morrison SJ, Kimble J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature.* 2006;441(7097):1068–74.
15. Parker GC, Anastassova-Kristeva M, Broxmeyer HE, Dodge WH, Eisenberg LM, Gehling UM, et al. Stem cells: shibboleths of development. *Stem Cells Dev.* 2004;13(6):579–84.
16. Bidarra SJ, Barrias CC, Granja PL. Injectable alginate hydrogels for cell delivery in tissue engineering. *Acta Biomater.* 2014;10(4):1646–62.
17. Morsczeck C, Schmalz G, Reichert TE, Völlner F, Galler K, Driemel O. Somatic stem cells for regenerative dentistry. *Clin Oral Investig.* 2008;12(2):113–8.
18. Pittenger MF, Mackay a M, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284(5411):143–7.
19. Knoepfler PS. Deconstructing stem cell tumorigenicity: a roadmap to safe regenerative medicine. *Stem Cells.* 2009;27(5):1050–6.
20. Wagers AJ. The stem cell niche in regenerative medicine. *Cell Stem Cell.* 2012;10(4):362–9.
21. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science.* 1997;276(5309):71–4.
22. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahimi J, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet.* 2004;364(9429):149–55.
23. Morsczeck C, Götz W, Schierholz J, Zeilhofer F, Kühn U, Möhl C, et al. Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol.* 2005;24(2):155–65.
24. Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res.* 2003;18(4):696–704.
25. Harada H, Kettunen P, Jung HS, Mustonen T, Wang YA, Thesleff I. Localization of putative stem cells in dental epithelium and their association with Notch and FGF signaling. *J Cell Biol.* 1999;147(1):105–20.
26. Waddington RJ, Youde SJ, Lee CP, Sloan AJ. Isolation of distinct progenitor stem cell populations from dental pulp. *Cells Tissues Organs.* 2008;189(1-4):268–74.24.
27. Zhao Y, Wang L, Jin Y, Shi S. Fas ligand regulates the immunomodulatory properties of dental pulp stem cells. *J Dent Res.* 2012;91(10):948–54.

28. Shi S, Robey PG, Gronthos S. Comparison of human dental pulp and bone marrow stromal stem cells by cDNA microarray analysis. *Bone*. 2001;29: 532–539.
29. Nakashima M, Iohara K, Sugiyama M. Human dental pulp stem cells with highly angiogenic and neurogenic potential for possible use in pulp regeneration. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2009;20(5-6):435–40.
30. Gronthos S, Brahimi J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res*. 2002;81(8):531-5.
31. Nakashima M, Reddi AH. The application of bone morphogenetic proteins to dental tissue engineering. *Nat Biotechnol*. 2003;21(9):1025–32.
32. Tabata MJ, Fujii T, Liu JG, Ohmori T, Abe M, Wakisaka S, et al. Bone morphogenetic protein 4 is involved in cusp formation in molar tooth germ of mice. *Eur J Oral Sci*. 2002;110(2):114–20.
33. Ohazama A, Tucker A, Sharpe PT. Organized tooth-specific cellular differentiation stimulated by BMP4. *J Dent Res*. 2005;84(7):603–6.
34. Tucker AS, Matthews KL, Sharpe PT. Transformation of tooth type induced by inhibition of BMP signaling. *Science*. 1998;282(5391):1136–8.
35. Hosoya A, Kim JY, Cho SW, Jung HS. BMP4 signaling regulates formation of Hertwig's epithelial root sheath during tooth root development. *Cell Tissue Res*. 2008;333(3):503–9.
36. Yamashiro T, Tummers M, Thesleff I. Expression of bone morphogenetic proteins and *Msx* genes during root formation. *J Dent Res*. 2003;82(3):172–6.
37. Bègue-Kirn C, Smith AJ, Ruch JV, Wozney JM, Purchio A, Hartmann D, et al. Effects of dentin proteins, transforming growth factor beta 1 (TGF beta 1) and bone morphogenetic protein 2 (BMP2) on the differentiation of odontoblast in vitro. *Int J Dev Biol*. 1992;36(4):491–503.
38. Bègue-kirn C, Smith AJ, Lorient M, Kupferle C, Ruch JV, Lesot H. Comparative analysis of TGF beta s, BMPs, IGF1, *msxs*, fibronectin, osteonectin and bone sialoprotein gene expression during normal and in vitro-induced odontoblast differentiation. *Int J Dev Biol*. 1994;420:405–20.
39. Nakashima M. Induction of dentine in amputated pulp of dogs by recombinant human bone morphogenetic proteins-2 and -4 with collagen matrix. *Arch Oral Biol*. 1994;39:1085–9.
40. Casagrande L, Demarco FF, Zhang Z, Araujo FB, Shi S, Nör JE. Dentin-derived BMP-2 and odontoblast differentiation. *J Dent Res*. 2010;89(6):603–8.
41. Ferracane JL, Cooper PR, Smith AJ. Can interaction of materials with the dentin-pulp complex contribute to dentin regeneration? *Odontology*. 2010;98(1):2–14.

42. Smith AJ, Scheven BA, Takahashi Y, Ferracane JL, Shelton RM, Cooper PR. Dentine as a bioactive extracellular matrix. *Arch Oral Biol*. 2012;57(2):109–21.
43. Demarco FF, Casagrande L, Zhang Z, Dong Z, Tarquinio SB, Zeitlin BD, et al. Effects of morphogen and scaffold porogen on the differentiation of dental pulp stem cells. *J Endod*. 2010;36(11):1805–11.
44. Srisuwan T, Tilkorn DJ, Al-Benna S, Vashi A, Penington A, Messer HH, et al. Survival of rat functional dental pulp cells in vascularized tissue engineering chambers. *Tissue Cell*. 2012;44(2):111–21.
45. Galler KM, D’Souza RN. Tissue engineering approaches for regenerative dentistry. *Regen Med*. 2011;6(1):111–24.
46. Das RK, Zouani OF. A review of the effects of the cell environment physicochemical nanoarchitecture on stem cell commitment. *Biomaterials*. 2014;35(20):5278–93.
47. Guvendiren M, Burdick JA. The control of stem cell morphology and differentiation by hydrogel surface wrinkles. *Biomaterials*. 2010;31(25):6511–8.
48. Hu X, Park SH, Gil ES, Xia XX, Weiss AS, Kaplan DL. The influence of elasticity and surface roughness on myogenic and osteogenic-differentiation of cells on silk-elastin biomaterials. *Biomaterials*. 2011;32(34):8979–89.
49. Mao JJ, Giannobile W V, Helms J a, Hollister SJ, Krebsbach PH, Longaker MT, et al. Craniofacial tissue engineering by stem cells. *J Dent Res*. 2006;85(11):966–79.
50. Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*. 2006;126(4):677–89.
51. Ratner BR, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE. *Biomaterials science, an introduction to materials in medicine*. 2nd ed. San Diego, CA: Elsevier Academic Press; 2004.
52. DeVolder RKH-J. Hydrogels for in vivo-like three-dimensional cellular studies. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2012;4:351–65.
53. Lutolf MP, Lauer-Fields JL, Schmoekel HG, Metters AT, Weber FE, Fields GB, et al. Synthetic matrix metalloproteinase-sensitive hydrogels for the conduction of tissue regeneration: engineering cell-invasion characteristics. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(9):5413–8.
54. Fonseca KB, Bidarra SJ, Oliveira MJ, Granja PL, Barrias CC. Molecularly designed alginate hydrogels susceptible to local proteolysis as three-dimensional cellular microenvironments. *Acta Biomater*. 2011;7(4):1674–82.
55. Nakaoka R, Hirano Y, Mooney DJ, Tsuchiya T, Matsuoka A. Study on the potential of RGD- and PHSRN-modified alginates as artificial extracellular matrices for engineering bone. *J Artif Organs*. 2013;16(3):284–93.

56. Ruel-Gariépy E, Leroux JC. In situ-forming hydrogels - Review of temperature-sensitive systems. *Eur J Pharm Biopharm.* 2004;58(2):409–26.
57. Dumortier G, Grossiord JL, Agnely F, Chaumeil JC. A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. *Pharm Res.* 2006;23(12):2709–28.
58. Nakayama M, Okano T, Miyazaki T, Kohori F, Sakai K, Yokoyama M. Molecular design of biodegradable polymeric micelles for temperature-responsive drug release. *J Control Release.* 2006;115(1):46–56.
59. Clokie CM, Urist MR. Bone morphogenetic protein excipients, comparative observations on poloxamer. *Plast Reconstr Surg.* 2000;105(2):628–37.
60. Cortiella J, Nichols JE, Ph D, Kojima K, Bonassar LJ. Tissue-engineered lung: an in vivo and in vitro comparison of polyglycolic acid and pluronic F-127 hydrogel/somatic lung progenitor cell constructs to support tissue growth. *Tissue Eng.* 2006; 12(5):1213–25.
61. Higuchi A, Aoki N, Yamamoto T, Gomei Y, Egashira S, Matsuoka Y, et al. Bioinert surface of Pluronic-immobilized flask for preservation of hematopoietic stem cells. *Biomacromolecules.* 2006;7(4):1083–9.
62. Cavalcanti BN, Zeitlin BD, Nör JE. A hydrogel scaffold that maintains viability and supports differentiation of dental pulp stem cells. *Dent Mater.* 2013;29(1):97–102.
63. Karu TI, Afanas'eva NI. Cytochrome c oxidase as the primary photoacceptor upon laser exposure of cultured cells to visible and near IR-range light. *Dokl Akad Nauk.* 1995;342:693–5.
64. Huang Y-Y, Sharma SK, Carroll J, Hamblin MR. Biphasic Dose Response in Low Level Light Therapy - An Update. *Dose-Response.* 2011;9(4):602–18.
65. Alghamdi KM, Kumar A, Moussa NA. Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. *Lasers Med Sci.* 2012;27:237–249.
66. Huang YY, Chen ACH, Carroll JD, Hamblin MR. Biphasic dose response in low level light therapy. *Dose Response.* 2009;7(4):358–83.
67. Mester E, Szende B, Tota JG. Effect of laser on hair growth of mice. *Kiserl Orvostud.* 1967;19:628–631.
68. Karu T. Photobiology of low-power laser effects. *Health Phys.* 1989;56(5):691–704.
69. Karu T. Primary and secondary mechanisms of action of visible-to-near IR radiation on cells. *J. Photochem Photobiol B Biol.* 1999;49:1–17.
70. Gao X, Xing D. Molecular mechanisms of cell proliferation induced by low power laser irradiation. *J Biomed Sci.* 2009;16:4.

71. Karu T, Pyatibrat L, Kalendo G. Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro. *J Photochem Photobiol B Biol.* 1995;27(3):219–23.
72. Wong-Riley MTT, Liang HL, Eells JT, Chance B, Henry MM, Buchmann E, et al. Photobiomodulation directly benefits primary neurons functionally inactivated by toxins: Role of cytochrome c oxidase. *J Biol Chem.* 2005;280(6):4761–71.
73. Hamblin MR. The role of nitric oxide in low level light therapy. *Proc SPIE.* 2008;6846:684602–684602–14.
74. Szundi I, Liao GL, Einarsdóttir O. Near-infrared time-resolved optical absorption studies of the reaction of fully reduced cytochrome c oxidase with dioxygen. *Biochemistry.* 2001;40(8):2332–9.
75. Pastore D, Laus MN, Di Fonzo N, Passarella S. Reactive oxygen species inhibit the succinate oxidation-supported generation of membrane potential in wheat mitochondria. *FEBS Lett.* 2002;516(1-3):15–9.
76. Chaudhari P, Ye Z, Jang YY. Roles of reactive oxygen species in the fate of stem cells. *Antioxid Redox Signal.* 2012;20(12):1881–90.
77. Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell.* 2005;120(4):483–95.
78. Valle-Prieto A, Conget P a. Human mesenchymal stem cells efficiently manage oxidative stress. *Stem Cells Dev.* 2010;19(12):1885–93.
79. Salmon AB, Pérez VI, Bokov A, Jernigan A, Kim G, Zhao H, et al. Lack of methionine sulfoxide reductase A in mice increases sensitivity to oxidative stress but does not diminish life span. *FASEB J.* 2009;23(10):3601–8.
80. Ateghang B, Wartenberg M, Gassmann M, Sauer H. Regulation of cardiotrophin-1 expression in mouse embryonic stem cells by HIF-1 α and intracellular reactive oxygen species. *J Cell Sci.* 2006;119(Pt 6):1043–52.
81. Tata DB, Waynant RW. Laser therapy: A review of its mechanism of action and potential medical applications. *Laser Photon Rev.* 2011;5(1):1–12.
82. Babcock GT, Wikström M. Oxygen activation and the conservation of energy in cell respiration. *Nature.* 1992;356(6367):301–9.
83. Verkhovsky MI, Morgan JE, Wikström M. Redox transitions between oxygen intermediates in cytochrome-c oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(22):12235–9.
84. Lubart R, Eichler M, Lavi R, Friedman H, Shainberg A. Low-energy laser irradiation promotes cellular redox activity. *Photomed Laser Surg.* 2005;23(1):3–9.
85. Eichler M, Lavi R, Friedmann H, Shainberg A, Lubart R. Red light-induced redox reactions in cells observed with TEMPO. *Photomed Laser Surg.* 2007;25(3):170–4.

86. Pal G, Dutta A, Mitra K, Grace MS, Amat A, Romanczyk TB, et al. Effect of low intensity laser interaction with human skin fibroblast cells using fiber-optic nano-probes. *J Photochem Photobiol B Biol.* 2007;86(3):252–61.
87. Bienert GP, Schjoerring JK, Jahn TP. Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1758(8):994–1003.
88. Niethammer P, Grabher C, Look AT, Mitchison TJ. A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. *Nature.* 459(7249):996-9.
89. Oktyabrsky ON, Smirnova G V. Redox regulation of cellular functions. *Biochemistry (Mosc).* 2007;72(2):132–45.
90. Shibnuma M, Kuroki T, Nose K. Superoxide as a signal for increase in intracellular pH. *J Cell Physiol.* 1988;136(2):379–83.
91. Butow RA, Avadhani NG. Mitochondrial SignalingThe Retrograde Response. *Mol Cell.* 2004;14(1):1–15.
92. Borutaite V, Budriunaite A, Brown GC. Reversal of nitric oxide-, peroxynitrite- and S-nitrosothiol-induced inhibition of mitochondrial respiration or complex I activity by light and thiols. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg.* 2000;1459(2-3):405–12.
93. Karu TI, Pyatibrat L V, Afanasyeva NI. Cellular effects of low power laser therapy can be mediated by nitric oxide. *Lasers Surg Med.* 2005;36(4):307–14.
94. Granados MP, Salido GM, González A, Pariente J a. Dose-dependent effect of hydrogen peroxide on calcium mobilization in mouse pancreatic acinar cells. *Biochem Cell Biol.* 2006;84(1):39–48.
95. Giambelluca MS, Gende OA. Hydrogen peroxide activates calcium influx in human neutrophils. *Mol Cell Biochem.* 2008;309(1-2):151–6.
96. Marazzi M, López-Delgado A, Fernández-González MA, Castaño O, Frutos LM, Temprado M. Modulating nitric oxide release by S-nitrosothiol photocleavage: Mechanism and substituent effects. *J Phys Chem A.* 2012;116(26):7039–49.
97. Pourreau-Schneider N, Ahmed A, Soudry M, Jacquemier J, Kopp F, Franquin JC, et al. Helium-neon laser treatment transforms fibroblasts into myofibroblasts. *Am J Pathol.* 1990;137(1):171–8.
98. Chalazonitis a, Kalberg J, Twardzik DR, Morrison RS, Kessler JA. Transforming growth factor beta has neurotrophic actions on sensory neurons in vitro and is synergistic with nerve growth factor. *Dev Biol.* 1992;152(1):121–32.
99. Tadakuma T. Possible Application of the laser in immunobiology. *Keio J Med.* 1993;42(4):180–2.

100. Letterio JJ. Murine models define the role of TGF-beta as a master regulator of immune cell function. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2000;11(1-2):81–7.
101. Souil E, Capon A, Mordon S, Dinh-Xuan AT, Polla BS, Bachelet M. Treatment with 815-nm diode laser induces long-lasting expression of 72-kDa heat shock protein in normal rat skin. *Br J Dermatol.* 2001;144(2):260–6.
102. Garavello I, Baranauskas V, Da Cruz-Höfling MA. The effects of low laser irradiation on angiogenesis in injured rat tibiae. *Histol Histopathol.* 2004;19(1):43–8.
103. Eduardo FDP, Bueno DF, de Freitas PM, Marques MM, Passos-Bueno MR, Eduardo CDP, et al. Stem cell proliferation under low intensity laser irradiation: a preliminary study. *Lasers Surg Med.* 2008;40(6):433–8.
104. Damante CA, De Micheli G, Miyagi SPH, Feist IS, Marques MM. Effect of laser phototherapy on the release of fibroblast growth factors by human gingival fibroblasts. *Lasers Med Sci.* 2009;24(6):885–91.
105. Sousa LR, Cavalcanti BN, Marques MM. Effect of laser phototherapy on the release of TNF-alpha and MMP-1 by endodontic sealer-stimulated macrophages. *Photomed Laser Surg.* 2009;27(1):37–42.
106. Moreira MS, Velasco IT, Ferreira LS, Ariga SKK, Abatepaulo F, Grinberg LT, et al. Effect of laser phototherapy on wound healing following cerebral ischemia by cryogenic injury. *J Photochem Photobiol B Biol.* 2011;105(3):207–15.
107. Pereira LO, Longo JPF, 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;57(8):1079–85.
108. Shefer G, Oron U, Irintchev A, Wernig A, Halevy O. Skeletal muscle cell activation by low-energy laser irradiation: a role for the MAPK/ERK pathway. *J Cell Physiol.* 2001;187(1):73–80.
109. 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 - Mol Cell Res.* 2003;1593(2-3):131–9.
110. Pellicoli ACA, Martins MD, Dillenburg CS, Marques MM, Squarize CH, Castilho RM. Laser phototherapy accelerates oral keratinocyte migration through the modulation of the mammalian target of rapamycin signaling pathway. *J Biomed Opt.* 2014;19(2):28002.
111. Zhang C, Chang J, Sonoyama W, Shi S, Wang C-Y. Inhibition of human dental pulp stem cell differentiation by Notch signaling. *J Dent Res.* 2008;87(3):250–5.
112. Shefer G, Partridge T a, 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;115(Pt 7):1461–9.

113. Eduardo, FP. Análise in vitro da fototerapia com lasers em baixa intensidade (660 e 780nm) sobre a ação do vírus herpes simples tipo I em células epiteliais de macaco (Vero). 2006. Tese
114. Dantas CM, Vivan CL, Ferreira LS, Freitas PM, Marques MM. In vitro effect of low intensity laser on the cytotoxicity produced by substances released by bleaching gel. *Braz Oral Res.* 2010;24(4):460-6.
115. Diniz IMA, Matos AB, Marques MM. Laser phototherapy enhances mesenchymal stem cells survival in response to the dental adhesives. *Sci World J.* 2015a:671789.
116. Arany PR, Nayak RS, Hallikerimath S, Limaye AM, Kale AD, Kondaiah P. Activation of latent TGF-beta1 by low-power laser in vitro correlates with increased TGF-beta1 levels in laser-enhanced oral wound healing. *Wound Repair Regen.* 2007;15(6):866–74.
117. Mullen AC, Orlando DA, Newman JJ, Lovén J, Kumar RM, Bilodeau S, et al. Master transcription factors determine cell-type-specific responses to TGF- β signaling. *Cell.* 2011;147(3):565–76.
118. Xi Q, Wang Z, Zaromytidou AI, Zhang XHF, Chow-Tsang LF, Liu JX, et al. A poised chromatin platform for TGF- β access to master regulators. *Cell.* 2011;147(7):1511–24.
119. Carreira AC, Lojudice FH, Halesik E, Navarro RD, Sogayar MC, Granjeiro JM. Bone Morphogenetic Proteins: Facts, Challenges, and Future Perspectives. *J Dent Res.* 2014a;93(4):335–45.
120. Carreira AC, Alves GG, Zambuzzi WF, Sogayar MC, Granjeiro JM. Bone Morphogenetic Proteins: Structure, biological function and therapeutic applications. *Arch Biochem Biophys.* 2014b;561:64–73.
121. Yang Z, Mu Z, Dabovic B, Jurukovski V, Yu D, Sung J, et al. Absence of integrin-mediated TGFB1 activation in vivo recapitulates the phenotype of TGFB1-null mice. *J Cell Biol.* 2007;176(6):787–93.
122. Arany PR. Photobiomodulation: Poised from the Fringes. *Photomed Laser Surg.* 2012;30(9):507–9.
123. Li N, Karin M. Is NF-kappaB the sensor of oxidative stress? *FASEB J.* 1999;13(10):1137–43.
124. D'Angio CT, Finkelstein JN. Oxygen regulation of gene expression: a study in opposites. *Mol Genet Metab.* 2000;71(1-2):371–80.
125. Chen ACH, Arany PR, Huang YY, Tomkinson EM, Sharma SK, Kharkwal GB, et al. Low-level laser therapy activates NF-kB via generation of reactive oxygen species in mouse embryonic fibroblasts. *PLoS One.* 2011;6(7):e22453.
126. Wang T, Zhang X, Li JJ. The role of NF-kappaB in the regulation of cell stress responses. *Int Immunopharmacol.* 2002;2(11):1509–20.

127. Campbell KJ, Perkins ND. Regulation of NF-kappaB function. *Biochem Soc Symp.* 2006;(73):165–80.
128. Mafra de Lima F, Naves KT, Machado AH, Albertini R, Villaverde AB, Aimbire F. Lung inflammation and endothelial cell damage are decreased after treatment with phototherapy (PhT) in a model of acute lung injury induced by *Escherichia coli* lipopolysaccharide in the rat. *Cell Biol Int.* 2009;33(12):1212–21.
129. Wu JY, Chen CH, Wang CZ, Ho ML, Yeh ML, Wang YH. Low-power laser irradiation suppresses inflammatory response of human adipose-derived stem cells by modulating intracellular cyclic AMP level and NF-kappaB activity. *PLoS One.* 2013a;8(1):1–9.
130. Darley-Usmar V. The powerhouse takes control of the cell; The role of mitochondria in signal transduction. *Free Radic Biol Med.* 2004;37(6):753–4.
131. Hagen T, Taylor CT, Lam F, Moncada S. Redistribution of intracellular oxygen in hypoxia by nitric oxide: effect on HIF1alpha. *Science.* 2003;302(5652):1975–8.
132. Giannelli M, Chellini F, Sassoli C, Francini F, Pini A, Squecco R, et al. Photoactivation of bone marrow mesenchymal stromal cells with diode laser: Effects and mechanisms of action. *J Cell Physiol.* 2013;228(1):172–81.
133. Abramovitch-Gottlieb L, Gross T, Naveh D, Geresh S, Rosenwaks S, Bar I, et al. Low level laser irradiation stimulates osteogenic phenotype of mesenchymal stem cells seeded on a three-dimensional biomatrix. *Lasers Med Sci.* 2005;20(3-4):138–46.
134. Matsui S, Tsujimoto Y, Matsushima K. Stimulatory effects of hydroxyl radical generation by Ga-Al-As laser irradiation on mineralization ability of human dental pulp cells. *Biol Pharm Bull.* 2007;30(1):27–31.
135. Mvula B, Mathope T, Moore T, Abrahamse H. The effect of low level laser irradiation on adult human adipose derived stem cells. *Lasers Med Sci.* 2008;23(3):277–82.
136. Hou J, Zhang H, Yuan X, Li J, Wei Y, Hu S. In vitro effects of low-level laser irradiation for bone marrow mesenchymal stem cells: proliferation, growth factors secretion and myogenic differentiation. *Lasers Surg Med.* 2008;40(10):726–33.
137. Matsui S, Takeuchi H, Tsujimoto Y, Matsushima K. Effects of Smads and BMPs induced by Ga-Al-As laser irradiation on calcification ability of human dental pulp cells. *J Oral Sci.* 2008;50(1):75–81.
138. Wu JY, Chen CH, Yeh LY, Yeh ML, Ting CC, Wang YH. Low-power laser irradiation promotes the proliferation and osteogenic differentiation of human periodontal ligament cells via cyclic adenosine monophosphate. *Int J Oral Sci.* 2013b;5(2):85–91.
139. Arany PR, Huang GX, Gadish O, Feliz J, Weaver JC, Kim J, et al. Multi-lineage MSC Differentiation. *J Dent Res.* 2014b;93(12):1250-7.

140. Schmolka IR. Artificial skin. I. Preparation and properties of pluronic F-127 gels for treatment of burns. *J Biomed Mater Res.* 1972;6(6):571–82.
141. Silva R, Oliveira MG. Effect of the cross-linking degree on the morphology of poly (NIPA Am-co-AAc) hydrogels. *Polymers (Basel).* 2007;48:4114–22.
142. Carreira ACO, Halcsik E, Sá PM, Zattar F, Granjeiro JM, Sogayar MC. Recombinant human BMPs 2 and 4 expressed in mammalian cells aiming at bone tissue engineering and stem cell proliferation and differentiation. *BMC Proceedings.* 2014c;8(4):P84.
143. Diniz IMA, Chen C, Xu X, Ansari S, Zadeh HH, Marques MM, et al. Pluronic F-127 hydrogel as a promising scaffold for encapsulation of dental-derived mesenchymal stem cells. *J Mater Sci Mater Med.* 2015b; 26(3):153.
144. Huang GTJ, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res.* 2009;88(9):792–806.
145. Pereira AN, De Paula Eduardo C, Matson E, Marques MM. Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. *Lasers Surg Med.* 2002;31(4):263–7.
146. Fujihara NA, Hiraki KRN, Marques MM. Irradiation at 780 nm increases proliferation rate of osteoblasts independently of dexamethasone presence. *Lasers Surg Med.* 2006;38(4):332–6.
147. Chen WJ, Huang JW, Niu CC, Chen LH, Yuan LJ, Lai PL, et al. Use of fluorescence labeled mesenchymal stem cells in pluronic F127 and porous hydroxyapatite as a bone substitute for posterolateral spinal fusion. *J Orthop Res.* 2009;27(12):1631–6.
148. Khare AR, Peppas NA. Swelling/deswelling copolymer gels of anionic. *Biomaterials.* 1995;16(7):559–67.
149. Mylonas D, Vidal MD, De Kok IJ, Moriarity JD, Cooper LF. Investigation of a thermoplastic polymeric carrier for bone tissue engineering using allogeneic mesenchymal stem cells in granular scaffolds. *J Prosthodont.* 2007;16(6):421–30.
150. Lippens E, Vertenten G, Gironès J, Declercq H, Saunders J, Luyten J, et al. In situ polymerizable Pluronic F127 hydrogel derivative combined with autologous mesenchymal stem cells in a goat tibia defect model. *Tissue Eng Part A.* 2010;16(2):617–27 2010;16(2).
151. Jung HH, Park K, Han DK. Preparation of TGF- β 1-conjugated biodegradable pluronic F127 hydrogel and its application with adipose-derived stem cells. *J Control Release.* 2010;147(1):84–91.
152. Yu H, Yang X, Cheng J, Wang X, Shen SG. Distraction osteogenesis combined with tissue-engineered cartilage in the reconstruction of condylar osteochondral defect. *J Oral Maxillofac Surg.* 2011;69(12):e558–64.

153. Cohn D, Sosnik A, Levy A. Improved reverse thermo-responsive polymeric systems. *Biomaterials*. 2003;24(21):3707–14.
154. Sosnik A, Cohn D. Ethoxysilane-capped PEO-PPO-PEO triblocks: A new family of reverse thermo-responsive polymers. *Biomaterials*. 2004;25(14):2851–8.
155. Oh SH, Kim TH, Lee JH. Creating growth factor gradients in three dimensional porous matrix by centrifugation and surface immobilization. *Biomaterials*. 2011;32(32):8254–60.
156. Huebsch N, Arany PR, Mao AS, Shvartsman D, Ali OA, Bencherif SA, et al. Harnessing traction-mediated manipulation of the cell/matrix interface to control stem-cell fate. *Nat Mater*. 2010;9(6):518–26.
157. Vashi A V, Keramidas E, Abberton KM, Morrison W a, Wilson JL, O'Connor AJ, et al. Adipose differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells using Pluronic F-127 hydrogel in vitro. *Biomaterials*. 2008;29(5):573–9.
158. Brunet-Maheu J-M, Fernandes JC, de Lacerda C a V, Shi Q, Benderdour M, Lavigne P. Pluronic F-127 as a cell carrier for bone tissue engineering. *J Biomater Appl*. 2009;24(3):275–87.
159. Batouli S, Miura M, Brahim J, Tsutsui TW, Fisher LW, Gronthos S, et al. Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis. *J Dent Res*. 2003;82(12):976–81.
160. Shi S, Miura M, Gronthos S. The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthod Craniofac Res*. 2005;8(3):191–9.
161. Li W, Chen H, Wang C. Effect of light emitting diode irradiation on proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *J Med Biol Eng*. 2005;26(1):35–42.
162. Posten W, Wrone DA, Dover JS, Arndt KA, Silapunt S, Alam M. Low-level laser therapy for wound healing: mechanism and efficacy. *Dermatol Surg* 2005;31(3):334–40.
163. Mvula B, Moore TJ, Abrahamse H. Effect of low-level laser irradiation and epidermal growth factor on adult human adipose-derived stem cells. *Lasers Med Sci*. 2010;25(1):33–9.
164. Peplow P V, Chung T-Y, Baxter GD. Laser photobiomodulation of proliferation of cells in culture: a review of human and animal studies. *Photomed Laser Surg*. 2010;28 Suppl 1:S3–40.
165. Strehl R, Schumacher K, de Vries U, Minuth WW. Proliferating cells versus differentiated cells in tissue engineering. *Tissue Eng*. 2002;8(1):37–42.
166. Honda MJ, Shinohara Y, Sumita Y, Tonomura A, Kagami H, Ueda M. Shear stress facilitates tissue-engineered odontogenesis. *Bone*. 2006;39(1):125–33.

167. Butler WT. Dentin matrix proteins and dentinogenesis. *Connect Tissue Res.* 1995;33:59–65.
168. Ritchie HH, Pinero GJ, Hou H, Butler WT. Molecular analysis of rat dentin sialoprotein. *Connect Tissue Res.* 1995;33:73–9.
169. D’Souza RN, Cavender A, Sunavala G, Alvarez J, Ohshima T, Kulkarni AB, et al. Gene expression patterns of murine dentin matrix protein 1 (Dmp1) and dentin sialophosphoprotein (DSPP) suggest distinct developmental functions in vivo. *J Bone Miner Res.* 1997;12(12):2040–9.
170. Usas A, Ho AM, Cooper GM, Olshanski A, Peng H, Huard J. Bone regeneration mediated by BMP4-expressing muscle-derived stem cells is affected by delivery system. *Tissue Eng Part A.* 2009;15(2):285–93.
171. Jiang N, Zhou J, Chen M, Schiff MD, Lee CH, Kong K, et al. Postnatal epithelium and mesenchyme stem/progenitor cells in bioengineered amelogenesis and dentinogenesis. *Biomaterials.* 2014;35(7):2172–80.
172. Sorescu GP, Sykes M, Weiss D, Platt MO, Saha A, Hwang J, et al. Bone morphogenic protein 4 produced in endothelial cells by oscillatory shear stress stimulates an inflammatory response. *J Biol Chem.* 2003;278(33):31128–35.
173. Sorescu GP, Song H, Tressel SL, Hwang J, Dikalov S, Smith D a., et al. Bone morphogenic protein 4 produced in endothelial cells by oscillatory shear stress induces monocyte adhesion by stimulating reactive oxygen species production from a Nox1-based NADPH oxidase. *Circ Res.* 2004;95(8):773–9.

ANEXO A - Parecer Comitê de Ética em Pesquisa

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

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

Título da Pesquisa: Efeitos da fototerapia com laser em baixa intensidade associada a scaffold com incorporação de BMP4 na adesão, proliferação e diferenciação de células-tronco da polpa dentária humana. Estudo in vitro.

Pesquisador: Márcia Martins Marques

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 09731212.2.0000.0075

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 317.633

Data da Relatoria: 26/06/2013

Apresentação do Projeto:

A terapia celular vem demonstrando grande potencial em regenerar o complexo dentino-pulpar. A quantidade de dentina e de tecido pulpar formados a partir de engenharia tecidual utilizando células-tronco da polpa dental excedem, em muito, a quantidade de dentina formada in situ durante toda a vida do indivíduo. Além disso, a fototerapia com laser em baixa intensidade tem se mostrado um componente adicional promissor, capaz de modular funções celulares necessárias à reconstrução tecidual.

Esta emenda está sendo apresentada pois as pesquisadoras decidiram mudar a origem das células-tronco que serão estudadas. Na proposta original as células viriam de linhagem já estabelecida a partir de polpa de dentes decíduos. A proposta agora é obter novas linhagens a partir de dentes permanentes recém extraídos. Por este motivo, agora o TCLE é apresentado.

Objetivo da Pesquisa:

Este estudo tem como objetivo avaliar a influência da fototerapia com laser em baixa intensidade na adesão, proliferação, migração e diferenciação de células-tronco de polpas dentárias humanas crescidas em scaffold contendo BMP4 incorporada em hidrogéis de poloxamers.

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 317.633

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos e benefícios foram adequadamente avaliados.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto bem desenvolvido. A pesquisa tem potencial para gerar novo conhecimento na área em que se insere.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatórios foram apresentados.

Nesta versão foi apresentado um documento no qual consta o regulamento do biorrepositório que está sendo proposto. Todos os elementos necessários para constituição do biorrepositório foram contemplados. A pesquisadora será a responsável pelo banco.

O TCLE está adequado.

Recomendações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Recomenda-se especial atenção para a Resolução 441/11.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br