LEILA SOARES FERREIRA

Efeitos da fototerapia com laser em baixa intensidade e dos fatores de crescimento PDGF e BMP-2, isolados ou em associação, na diferenciação ósseo/odontogênica de células-tronco de polpa dentária humana

São Paulo
2011

LEILA SOARES FERREIRA

Efeitos da fototerapia com laser em baixa intensidade e dos fatores de crescimento PDGF e BMP-2, isolados ou em associação, na diferenciação ósseo/odontogênica de células-tronco de polpa dentária humana

Versão Corrigida

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

Área de Concentração: Dentística

Orientador: Profa. Dra. Márcia Martins Marques

São Paulo

2011

Ferreira LS. Efeitos da fototerapia com laser em baixa intensidade e dos fatores de crescimento PDGF e BMP-2, isolados ou em associação, na diferenciação ósseo/odontogênica de células-tronco de polpa dentária humana. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Aprovado em: / /2011

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho, em primeiro lugar, a Deus

Ao meu Anjo da Guarda, sempre de prontidão e conectado a minha intuição

*Aos meus pais, Maria e José, que sempre me ofereceram amor, apoio,
estrutura e ajuda sem limites*

As minhas irmãs Ligia e Lisiane, sempre amigas e companheiras

A minha primeira sobrinha, Isabela, que virá ao mundo em breve.

AGRADECIMENTOS

A minha querida Professora e Orientadora Márcia Martins Marques quem me acompanhou com tanto carinho e dedicação durante toda a jornada do Doutorado. Obrigada pelo exemplo de competência, força, ética, profissionalismo, determinação, respeito aos alunos e amor à pesquisa, à docência e à Odontologia. Obrigada por todos os ensinamentos que não ficaram só restritos ao âmbito científico, mas também que auxiliaram em minha vida como um todo. Obrigada pelo incentivo, pela confiança depositada e pela oportunidade dada de lutar pelo meu crescimento profissional, acadêmico, intelectual e pessoal. Obrigada por contribuir de maneira tão especial e graciosa para que o Doutorado fosse feito com muito prazer e felicidade. Obrigada por fazer parte da minha história e da minha vida! Além de uma grande Orientadora, Professora e Pesquisadora lhe considero uma grande Amiga!

Ao Prof. Dr. Shiwei Cai, pelo exemplo de humildade, respeito e grandeza de interior e de profissionalismo. Obrigada por abrir as portas de seu laboratório, por confiar no nosso trabalho em conjunto e por todo apoio e auxílio intelectual para o desenvolvimento deste.

As Professoras Juliana Barros e Shalizeh Patel, que me acompanharam, apoiaram e me deram todo o suporte durante o Doutorado Sanduíche, tornando-o muito mais rico, produtivo e divertido!!!. Obrigada pela grande amizade formada.

A querida Wei Chen, por estar lado a lado colaborando e realizando este projeto que tornou-se realidade.

A minha autêntica amiga Stella Moreira, pelos conselhos e pelas risadas, por me acompanhar e apoiar em todos os momentos de alegria e dificuldades e também por me dar broncas, quase me deixar louca e me fazer acordar às 4 da manhã!!! Você realmente é uma pessoa única nesse mundo!!!

A minha amiga e irmã de coração, Daiane Meneguzzo, por ser um exemplo a ser seguido, por todos os ensinamentos não só do laser, mas também de vida, por estar sempre ao meu lado me apoiando e desejando meu crescimento.

A minha amiga e mais nova colega Talita pelo companheirismo e força e exemplo de dedicação e determinação.

Ao meu amigo, Washington, pela colaboração no trabalho e por todos os ensinamentos de estatística.

Aos meus queridos amigos da Pós-Graduação, obrigada pelo companheirismo, colaboração e apoio.

Aos professores do LELO, em especial, o Prof. Carlos de Paula Eduardo, Alyne Simões, Ana Cecília, Luciane Azevedo, Patrícia Freitas e Ricardo Navarro por todo o trabalho em conjunto no Laboratório Especial de Laser em Odontologia e todos os ensinamentos na área do Laser.

Aos funcionários do Departamento, Aldo, Arnaldo, Ana, Cleber, Davi, Débora, Leandro, Selma e Sônia, e do LELO, Liliane, Gê, Haroldo e Elaine por todo suporte dado.

As funcionárias Cátia e Alessandra, da Comissão de Pós-graduação, o meu obrigada pela prontidão em ajudar sempre.

A CAPES, pela bolsa de Doutorado no Brasil e Doutorado Sanduíche em Houston.

A DMC-Equipamentos, por disponibilizar o equipamento laser no exterior.

A todos aqueles que moram no meu coração, que estiveram sempre ao meu lado e que não estão listados aqui, o meu muito obrigado!!!

*Nossas dúvidas são traidoras e nos fazem perder o que, com frequência,
poderíamos ganhar, por simples medo de arriscar.”*

William Shakespeare

A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.

Albert Einstein

*Penso noventa e nove vezes e nada descubro; deixo de pensar, mergulho em
profundo silêncio - e eis que a verdade se me revela.*

Albert Einstein

RESUMO

Ferreira LS. Efeitos da fototerapia com laser em baixa intensidade e dos fatores de crescimento PDGF e BMP-2, isolados ou em associação, na diferenciação ósseo/odontogênica de células-tronco de polpa dentária humana. [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2011. Versão Corrigida.

A fototerapia com laser em baixa intensidade (FTLBI) é capaz de aumentar o metabolismo celular, o que poderia influenciar na diferenciação ósseo/odontogênica das células-tronco da polpa dentária humana (hDPSCs). O PDGF e o BMP-2 são fatores de crescimento envolvidos na dentinogênese e na reparação tecidual. O PDGF tem papel importante durante o desenvolvimento embrionário, na proliferação e migração celular e na angiogênese, enquanto o BMP-2 está fortemente associado à diferenciação celular em tecidos mineralizados, como o osso e a dentina. Sendo assim, o objetivo do estudo foi analisar os efeitos da FTLBI e dos fatores de crescimento (PDGF-BB ou BMP-2), isolados ou em associação, na diferenciação ósseo/odontogênica das hDPSCs. Para o estudo hDPSCs foram cultivadas em meio regular (G1) e irradiadas (G2), meio mineralizante (G3) e irradiadas (G4), meio mineralizante contendo PDGF-BB (G5) e irradiadas (G6), meio mineralizante contendo BMP-2 (G7) e irradiadas (G8). Para os grupos irradiados, a FTLBI foi realizada no modo pontual e em contato, com um laser de diodo semi-condutor, com área de feixe de $0,028\text{cm}^2$ e comprimento de onda 660nm (InGaAlP-vermelho), utilizando-se os seguintes parâmetros: potência de 20mW, densidade de energia de $5\text{J}/\text{cm}^2$, tempo de irradiação de 7 segundos por ponto e 0,14J de energia por ponto. A expressão dos genes relacionados à diferenciação ósseo/odontogênica (*DSPP*, *DMP-1* e *OCN*) através do PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR), a atividade da fosfatase alcalina e os depósitos de cálcio foram analisados em 3, 7 e 14 dias. Os dados obtidos foram comparados pelo teste ANOVA complementado pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). As culturas tratadas com meio mineralizante contendo BMP-2 e irradiadas (G8) foram as que mostraram os maiores índices de diferenciação ósseo/odontogênica nos testes realizados. As expressões de *DSPP*, *OCN* e *DMP-1*, ao menos em 14 dias, foram significativamente maiores no G8 que nos demais grupos experimentais, exceto os grupos G3 e G7. Estes grupos apresentaram

expressões de *DSPP* e *OCN* semelhantes às do G8 em 14 dias. A maior atividade de ALP foi observada no G8 em 3 dias e a menor no mesmo grupo aos 14 dias. A maior quantidade de depósitos de cálcio também foi encontrada no G8 em 14 dias. A associação de FTLBI e BMP-2 se mostrou capaz de induzir a diferenciação ósseo/odontogênica em células-tronco de polpa dentária humana de forma mais marcante que as demais terapias isoladas ou associadas estudadas. Portanto, o uso de uma terapia associando FTLBI e BMP-2 poderia ser de relevância para o restabelecimento da fisiologia pulpar quando aplicada em casos de exposição deste tecido, uma vez que poderia favorecer a diferenciação das células indiferenciadas da polpa dentária.

Palavras-chave: Célula-tronco de polpa dentária. Diferenciação. Laser em baixa intensidade. Fatores de crescimento. PDGF. BMP-2. PCR em tempo Real. Vermelho de alizarina. Atividade da fosfatase alcalina.

ABSTRACT

Ferreira LS. Effects of low intensity laser therapy and growth factors PDGF and BMP-2 on the odontogenic differentiation of dental pulp stem cells [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2011. Versão Corrigida.

Laser phototherapy (LPT) is able to increase cellular metabolism, which in turn could influence the odontogenic differentiation of dental pulp stem cells (hDPSCs). PDGF and BMP-2 are growth factors involved in dentinogenesis and tissue repair. PDGF plays a role in embryonic development, cell proliferation, cell migration, and angiogenesis, whereas BMP-2 is strongly associated with cell differentiation in mineralized tissues such as bone and dentin. The aim of this study was to analyze the effects of LPT and the growth factors PDGF-BB and BMP-2 combined or not on the odontogenic differentiation of hDPSCs. These cells were grown in regular medium (G1) and irradiated (G2), mineralizing medium (G3) and irradiated (G4), mineralizing medium containing PDGF-BB (G5) and irradiated (G6), mineralizing medium containing BMP-2 (G7) and irradiated (G8). For irradiated groups, LPT was performed in punctual and contact mode with a semiconductor diode laser, with a beam spot area of 0.028 cm^2 and wavelength of 660nm (InGaAlP-visible red), using the following parameters: power of 20mW, energy density of 5 J/cm^2 and irradiation time of 7 seconds per point (0,14 J per point). Differentiation was assessed by the following analysis: expression of genes related to odontogenic differentiation (*DSPP*, *DMP-1* and *OCN*) using quantitative real time PCR (qRT-PCR); alkaline phosphatase activity and calcium deposition using alizarin red staining in 3, 7 and 14 days. Data were compared by ANOVA and Tukey's test ($p < 0.05$). The cultures treated with mineralizing medium containing BMP-2 and irradiated (G8) showed the highest rate of odontogenic differentiation. The expressions of *DSPP*, *DMP-1* and *OCN* genes, at least in 14 days, were significantly higher in G8 compared to all other groups, except for the groups G3 and G7. These groups showed similar expressions of *DSPP* and *OCN* than G8 in 14 days. G8 showed the highest ALP activity in 3 days and the lowest in 14 days compared to all other groups. The largest amount of calcium

deposits was observed in G8 in 14 days. The most striking feature on induction of odontogenic differentiation of hDPSCs was observed when LPT was applied in association with BMP-2. Therefore, the use of a combined LPT and BMP-2 therapy could be of relevance for the re-establishment of pulp physiology when applied in cases of dental pulp exposure by promoting the differentiation of hDPSCs.

Keywords: Dental pulp stem cell. Differentiation. Low intensity laser therapy. Growth factors. PDGF. BMP-2. Real-time PCR. Alizarin red staining. Alkaline phosphatase activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 2.1 - Formação do complexo dentina-polpa para aplicação clínica na área da terapia regenerativa. As células-tronco são transfectadas com o gene *BMP-2* e semeadas em um *scaffold* definido para diferenciarem em células formadoras de matriz dentinária. O complexo dentina-polpa pode então ser transplantado para a cavidade onde a polpa foi exposta (adaptado de Nakashima et al., 2005)18
- Figura 2.2 - O nicho de células-tronco consiste de células-tronco adultas “verdadeiras” cercadas pelas células progenitoras em processo de amplificação. A célula-tronco adulta “verdadeira” tem capacidade pouco frequente, mas quase ilimitada de auto-renovação, enquanto as células-filhas são altamente proliferativas e capazes de se diferenciarem em diversas linhagens de células de acordo com o estímulo recebido (adaptado de Sloan; Waddington, 2009).....21
- Figura 2.3 - Mecanismo de ação dos receptores da BMP e transdução de sinal para o núcleo através das Smads (adaptado de Kawabata et al., 1998)26
- Figura 4.1 - Irradiação da FTLBI nas placas de cultura. Em contato com o fundo da placa (A). Esquema dos pontos de irradiação da FTLBI para as placas de 6 poços, 5 pontos (B) e 48 poços, 1 ponto (C)35
- Gráfico 4.1 - Curva de normalização do PNPP e obtenção dos valores de *slope* e *intercept*42
- Gráfico 4.2 - Curva de normalização do μ BCA e obtenção dos valores de *slope* e *intercept*44
- Figura 5.1 - Fotografia aos 14 dias do experimento para detecção dos depósitos de cálcio evidenciados pela reação de vermelho de alizarina para células cultivadas em meio regular (A), meio regular e tratadas com FTLBI (B), meio mineralizante (C), meio mineralizante e tratadas com FTLBI (D), meio mineralizante contendo PDGF-BB (E), meio mineralizante contendo PDGF-BB e tratadas com FTLBI (F), meio mineralizante contendo BMP-2 (G), meio mineralizante contendo BMP-2 e tratadas com FTLBI (H). (Microscopia de fase, aumento original de 40x).....59

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Parâmetros de irradiação para FTLBI.....	36
Tabela 4.2 - Reagentes para a confecção da fita de cDNA.....	38
Tabela 4.3 - Sequência dos <i>primers</i> e propriedades das reações.....	39
Tabela 4.4 - Reagentes para a reação de qRT-PCR utilizando fluoróforo SYBR Green	39
Tabela 4.5 - Série de diluições das soluções padrão de PNPP	41
Tabela 4.6 - Concentração das amostras da curva padrão de PNP e respectivos valores das médias das absorbâncias	42
Tabela 4.7 - Diluições das soluções-padrão para μ BCA	43
Tabela 4.8 - Concentração das amostras da curva padrão do μ BCA e respectivos valores das médias das absorbâncias	44
Tabela 5.1 - Expressão relativa do gene <i>DSPP</i> nos diferentes grupos e tempos experimentais	47
Tabela 5.2 - Expressão relativa do gene <i>DMP-1</i> nos diferentes grupos e tempos experimentais	50
Tabela 5.3 - Expressão relativa do gene <i>OCN</i> nos diferentes grupos e tempos experimentais	52
Tabela 5.4 - Atividade da fosfatase alcalina nos diferentes grupos e tempos experimentais	55
Tabela 5.5 - Resultados numéricos de densidade óptica da coloração com vermelho de alizarina nos diferentes grupos e tempos experimentais. nos diferentes grupos e tempos experimentais	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADSC	células-tronco derivadas de gordura (<i>adipose derived stem cells</i>)
ALP	fosfatase alcalina
2AMIP	2-aminometilpropanol (<i>2-Amino-2-methyl-1-propanol</i>)
ATP	adenosina trifosfato (adenosine triphosphate)
BMMSCs	células-tronco mesenquimais da medula-óssea (<i>bone marrow mesenchymal stem cells</i>)
BMP-2	proteína morfogenética do osso (<i>bone morphogenetic protein</i>)
BSP	sialoproteína óssea (<i>bone sialoprotein</i>)
Ca ⁺²	cálcio
cDNA	DNA complementar
DFPCs	células precursoras do folículo dentário (<i>dental follicle progenitor cells</i>)
DMP-1	proteína da matriz de dentina-1 (<i>dentin matrix protein-1</i>)
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic Acid)
Co-Smads	Smads co-fatoras (<i>commom partner Smads</i>)
DPP	fosfoproteína dentinária (<i>dentin phosphoprotein</i>)
hDPSCs	células-tronco polpa dentária humana
DPSCs	células-tronco polpa dentária pós natal (<i>dental pulp stem cells</i>)
DSP	sialoproteína dentinária (<i>dentin sialoprotein</i>)
DSPP	fosfosialoproteína dentinária (<i>dentin sialophosphoprotein</i>)
bFGF	fator de crescimento de fibroblastos básico (<i>basic fibroblast growth factor</i>)
EGF	fator de crescimento epidermal (<i>epidermal growth factor</i>)

FGF	fator de crescimento de fibroblastos (fibroblast growth factor)
<i>FTLBI</i>	<i>Fototerapia com Laser em Baixa Intensidade</i>
g/ml	gramas por mililitro
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
IGF	fator de crescimento insulínico (<i>insulin growth factor</i>)
J/cm ²	Joules por centímetro quadrado
k-DMEM	<i>knockout Dulbeco's modified Eagle medium</i>
KSR	<i>knockout serum replacement</i>
<i>LASER</i>	amplificação da luz por emissão estimulada de radiação (<i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i>)
LEDs	diodos emissores de luz (<i>Light Emitting Diodes</i>)
LILT	terapia com laser em baixa intensidade (<i>Low Intensity Laser Therapy</i>)
LLLT	terapia com laser em baixa intensidade (<i>Low Level Laser Therapy</i>)
LPLT	terapia com laser de baixa potência (<i>Low Power Laser Therapy</i>)
MgCl ₂	cloreto de magnésio
mg/ml	miligrama por mililitro
mM	milimolar
MTA	agregado de trióxido mineral (<i>Mineral Trioxide Aggregate</i>)
mW	miliwatts
NaOH	hiido de sódio
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NEAA	aminoácidos não essenciais (<i>non essential aminoacids</i>)
NGF	fator de crescimento neuronal (<i>nerve growth factor</i>)
nM	nanomolar
nm	nanometros
NO	óxido nítrico

OCN	osteocalcina
OPN	osteopontina
P3K	3 fosfatidilinositol quinase
pb	número de pares de base do produto.
PCR	reação em cadeia da polimerase (<i>polimerase chain reaction</i>)
PDGF	fator de crescimento derivado de plaquetas (<i>platelet derived growth factor</i>)
PDLSCs	células-tronco do ligamento periodontal (<i>periodontal ligament stem cells</i>)
PDGFR α	receptor α do fator de crescimento derivado de plaquetas (<i>platelet derived growth factor receptor α</i>)
PDGFR β	receptor β do fator de crescimento derivado de plaquetas (<i>platelet derived growth factor receptor β</i>)
PLC γ	fosfolipase C γ
PLGA	ácido poliglicólico
PNPP	para-nitrofenilfosfato (p-Nitrophenylphosphate)
PSG	penicilina-estreptomicina-glutamina
RNA	ácido ribonucléico (<i>ribonucleic acid</i>)
R-Smads	Smads reguladas por receptores (<i>receptor regulated Smads</i>)
qRT-PCR	reação quantitativa da transcriptase reversa - reação em cadeia da polimerase (<i>quantitative Reverse Transcriptase-Polimerase Chain Reaction</i>)
SFB	soro fetal bovino
SHEDs	células-tronco de dentes decíduos esfoliados (<i>stem cells from human exfoliated deciduous teeth</i>)
SCAP	células-tronco oriundas da papila apical (<i>stem cells from apical papilla</i>)

TGF- β	fator de crescimento transformador- β (<i>transforming growth factor-β</i>)
VEGF	fator de crescimento vascular endotelial (<i>vascular endothelial growth factor</i>)
μg	micrograma
$\mu\text{g/ml}$	micrograma por mililitro
μl	microlitro
μM	micromolar
μm	micrometros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 Constituintes da dentina e capeamento pulpar	20
2.2 Odontologia regenerativa	22
2.2.1 Células-tronco da polpa dentária humana	23
2.2.2 Moléculas de sinalização e a diferenciação das células-tronco de polpa dentária	27
2.2.3 Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF)	28
2.2.4 Proteína morfogenética do osso (BMP)	30
2.3 Fototerapia com laser em baixa intensidade (FTLBI)	32
3 PROPOSIÇÃO	37
3.1 Objetivos Gerais	37
3.2 Objetivos Específicos	37
4 MATERIAL E MÉTODO	38
4.1 Cultura Celular	38
4.2 Indução da Diferenciação	39
4.2.2 Meio mineralizante	39
4.2.1 Fototerapia com laser em baixa intensidade (FTLBI)	39
4.2.3 Fatores de crescimento	41
4.3 Grupos Experimentais	41
4.4 Análise da Expressão Gênica por qRT-PCR	41
4.4.1 Extração do RNA total	42
4.4.2 Confeção da fita de DNA complementar (cDNA)	42
4.4.3 PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)	43
4.5 Análise da atividade da fosfatase alcalina (ALP)	45
4.6 Análise qualitativa e quantitativa do depósito de cálcio	50
5 RESULTADOS	52
5.1 Análise da expressão dos genes <i>DSPP</i>, <i>DMP-1</i> e <i>OCN</i>	52
5.1.1 <i>DSPP</i>	52
5.1.2 <i>DMP-1</i>	54
5.1.3 <i>OCN</i>	57
5.2 Atividade da fosfatase alcalina	59
5.3 Análise do depósito de cálcio	62
5.3.1 Análise qualitativa do depósito de cálcio	62
5.3.2 Análise quantitativa do depósito de cálcio	65
6 DISCUSSÃO	67
7 CONCLUSÃO	75
REFERÊNCIAS	76
ANEXOS	89

1 INTRODUÇÃO

Na Dentística minimamente invasiva, que é baseada nos conceitos de prevenção de cárie dentária e de manutenção da maior quantidade possível de tecidos dentais durante os procedimentos restauradores, a busca por métodos biológicos capazes de estimular as células pulpares vem tomando grandes proporções. Neste sentido, quando há perdas de tecidos dentais e exposição pulpar, os profissionais da Odontologia buscam a regeneração do complexo dentina-polpa, em geral, lançando mão dos procedimentos de capeamento pulpar direto. Além dos procedimentos de rotina para capeamento direto, hoje existem terapias complementares que podem auxiliar na resposta regenerativa da polpa dentária, como a fototerapia com laser em baixa intensidade (FTLBI) ou o uso de proteínas, como fatores de crescimento e citocinas.

Sabe-se que quando da exposição pulpar, os odontoblastos da região há muito foram perdidos e a regeneração do complexo dentina-polpa vai ocorrer na forma de formação de ponte de dentina e, para tanto, as células indiferenciadas da polpa existentes no tecido pulpar é que participarão ativamente deste processo. Para que haja a formação de ponte de dentina, as células indiferenciadas da polpa devem proliferar e diferenciar. Para favorecer essa diferenciação, procedimentos clínicos clássicos, como o capeamento pulpar direto com hidróxido de cálcio, além de terapias com fatores de crescimento e fototerapia com laser em baixa intensidade (FTLBI) podem ser aplicados como coadjuvantes para favorecer a diferenciação das células-tronco de polpa dentária. Entretanto, o efeito destas terapias, associadas ou isoladas, sobre a diferenciação de células indiferenciadas da polpa dentária humana ainda é pouco conhecido.

Neste contexto, este trabalho tem como objetivo estudar o efeito isolado ou associado da FTLBI com moléculas de sinalização e diferenciação das células-tronco de polpa dentária humana, enfocando, em especial, o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e a proteína morfogenética do osso (BMP). Serão analisados os efeitos destas terapias sobre a expressão de genes que codificam proteínas dentinárias específicas como: a proteína da matriz de dentina-1 (DMP-1) que é codificada pelo gene *DMP-1*, a sialoproteína dentinária (DSP) e a fosfoproteína dentinária (DPP) que são codificadas pelo gene fosfosialoproteína

dentinária (*DSPP*) e a osteocalcina (*OCN*) que é codificada pelo gene *OCN*. Serão também analisados outros parâmetros de diferenciação, tais como atividade da fosfatase alcalina (*ALP*) e depósito de cálcio nas culturas de células-tronco de polpa dentária humana.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Esta revista da literatura abordará assuntos relacionados à regeneração do complexo dentina-polpa, como se segue: constituintes do tecido dentinário e capeamento pulpar, odontologia regenerativa, células-tronco de polpas dentárias humanas, moléculas de sinalização e a diferenciação destas células, enfocando, em especial, o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), a proteína morfogenética do osso (BMP) e, finalmente, a fototerapia com laser em baixa intensidade (FTLBI).

2.1 Constituintes da dentina e capeamento pulpar

A hidroxiapatita constitui o principal componente inorgânico da dentina, enquanto o colágeno tipo 1 representa o maior constituinte orgânico da matriz extracelular dentinária (Lesot et al., 1981). Em menor quantidade estão as proteínas não colagenosas como a decorina (Steinfort et al., 1994), a osteonectina (Reichert et al., 1992), a osteopontina (OPN), a osteocalcina (OCN), a sialoproteína óssea (*bone sialoprotein* – BSP) e a proteína da matriz de dentina-1 (*dentin matrix protein-1* – DMP-1), que são encontradas tanto na matriz extracelular do osso como também da dentina (Butler, 1987; Butler et al., 1992; Linde; Goldberg, 1993; Butler; Ritchie, 1995).

Duas proteínas da matriz extracelular são específicas da matriz da dentina, a saber: sialoproteína dentinária (*dentin sialoprotein* – DSP) e a fosfoproteína dentinária (*dentin phosphoprotein* – DPP) (Butler, 1987; Butler et al., 1992; Butler; Ritchie, 1995). Essas duas proteínas são codificadas por um único gene chamado fosfosialoproteína dentinária (*dentin sialophosphoprotein* – DSPP) (Feng et al., 1998; Ritchie et al., 1997; MacDougall et al., 1997). Além das proteínas da matriz extracelular, algumas moléculas bioativas como o fator de crescimento transformador- β (*transforming growth factor*- β – TGF- β), proteínas morfogenéticas do osso (*bone morphogenetic proteins* – BMPs) e o fator de crescimento de fibroblastos (*fibroblast growth factor* – FGF) estão presentes na dentina (Finkelman

et al., 1990).

As proteínas colagenosas e não colagenosas da matriz extracelular dentinária são produzidas e secretadas pelos odontoblastos. Os odontoblastos são células pós-mitóticas altamente diferenciadas, localizadas na periferia da polpa e que estão envolvidos na formação de dentina primária durante o desenvolvimento dentário, e dentina secundária e reacional após a erupção dentária (Ruch et al., 1995; Sasaki; Garant, 1996; Butler et al., 2002).

Em condições patológicas, como nas lesões de cárie, os odontoblastos são estimulados a produzir e secretar matriz dentinária a partir do estímulo dos fatores de crescimento, a exemplo TGF- β e BMP-2, liberados da dentina durante sua desmineralização (Bègue-Kirn et al., 1994).

Entretanto, quando a camada de odontoblastos da dentina é danificada, a exemplo do que ocorre quando do preparo de cavidades profundas, nas lesões de cárie extensas e na exposição pulpar, células indiferenciadas da polpa dentária são recrutadas para o local lesado antes de se diferenciarem em células formadoras de matriz dentinária e iniciar a produção de dentina reparativa. (Shi; Gronthos, 2003; Carlile et al., 2000)

A formação de dentina reparativa ou terciária constitui uma barreira de proteção para a polpa dentária e é caracterizada por uma matriz menos organizada e mineralizada, quando comparada à dentina primária e secundária (Butler et al., 2002; Tziafas, 2004). A deposição de dentina reparativa pode ser estimulada por materiais ou substâncias utilizados para proteção pulpar direta ou indireta, durante os procedimentos restauradores.

As proteções pulpares indiretas representam a aplicação de agentes seladores, forradores e/ou bases protetoras nas paredes cavitárias quando não há exposição pulpar, com o objetivo de proteger e manter a vitalidade pulpar além de estimular a formação de dentina reparativa (Schröder, 1985).

As proteções pulpares diretas, conhecidas também como capeamento pulpar direto, caracterizam-se pela aplicação de um agente protetor diretamente sobre o tecido pulpar exposto na tentativa de manter a vitalidade pulpar e estimular a formação de dentina reparativa, protegendo a polpa de irritações futuras (Schröder, 1985).

A formação de dentina reparativa pode ocorrer sob uma série de materiais para capeamento pulpar. O hidróxido de cálcio tem sido amplamente estudado e utilizado

em situações clínicas como capeador pulpar direto (Schröder, 1985) por ser biocompatível (Cavalcanti et al., 2005), induzir a formação de pontes de dentina (Demarco et al., 2001; Accorinte et al., 2008) e inibir o crescimento bacteriano em função do seu alto pH. Entretanto, o hidróxido de cálcio apresenta algumas desvantagens como a produção de pontes de dentina com porosidades (Holland et al., 2001), baixa adesão à dentina (Pitt Ford, 1980) e incapacidade de fornecer uma vedação adequada contra micro-infiltração a longo prazo (Goldberg et al., 1984)

Além do hidróxido de cálcio, outras opções para capeamento pulpar direto foram propostas, tais como o uso do agregado de trióxido mineral (*mineral trioxide aggregate* – MTA) (Aeinehchi et al., 2003; Briso et al., 2006; Min et al., 2008), de fatores de crescimento como o TGF-1 (Hu et al., 1998) e o BMP-7 (Nakashima, 1992; Goldberg et al., 2003), e materiais sintéticos à base de hidroxiapatita, fosfato de cálcio e ácido poliglicólico (PLGA) (Zhang et al., 2008; Gala-Garcia et al., 2010).

Apesar de o capeamento pulpar ser amplamente praticado, a formação de tecido duro muitas vezes não progride satisfatoriamente em direção à cura, necessitando que se proceda a pulpectomia. Como a conservação da polpa dentária no canal radicular é considerada o melhor resultado em longo prazo e, uma vez que a pulpectomia tem um grande impacto sobre a vida do dente afetado, outros tratamentos de conservação da polpa estão sendo procurados (Peters et al., 2005; Baume; Holz., 1981). Adicionalmente, a restauração da dentina perdida ainda está restrita aos tratamentos convencionais, como obturações e restaurações de coroas (Baum; Mooney, 2000, Kaigler; Mooney, 2001). Assim, a regeneração de dentes vivos ou suas partes é considerada uma nova estratégia terapêutica promissora.

2.2 Odontologia regenerativa

A Odontologia está entrando em uma nova era em que muitos dos avanços em biotecnologia proporcionam oportunidades para a exploração de terapias mais eficazes. A terapia com células-tronco vem sendo estudada como uma nova alternativa ao tratamento conservador da polpa através da formação de dentina a partir da engenharia tecidual.

A Engenharia Tecidual é uma área multidisciplinar que aplica os princípios da

Engenharia e da Biologia com vistas ao desenvolvimento de substitutos biológicos que possam restaurar, manter ou melhorar a função dos tecidos.

Os três ingredientes principais utilizados na engenharia tecidual são: as células, que devem ter o potencial de regenerar o tecido desejado; os arcabouços (*scaffolds*) que vão fornecer o microambiente ideal para as células e, os fatores de crescimento que vão modular o crescimento e diferenciação celular (Figura 2.1).

Figura 2.1 – Formação do complexo dentina-polpa para aplicação clínica na área da terapia regenerativa. As células-tronco são transfectadas com o gene *BMP-2* e semeadas em um *scaffold* definido para diferenciarem em células formadoras de matriz dentinária. O complexo dentina-polpa pode então ser transplantado para a cavidade onde a polpa foi exposta (adaptado de Nakashima et al., 2005)

2.2.1 Células-tronco da polpa dentária humana

Na engenharia tecidual, a biologia das células-tronco tornou-se um campo importante para a compreensão da regeneração dos tecidos e sua aplicação com vistas à regeneração dos tecidos. Essas células podem ser classificadas de acordo

com sua origem em: embrionária, germinativa ou somática (adulta) (Gronthos et al., 2000; Gronthos et al., 2002; Seo et al., 2004; Miura et al., 2003).

As células-tronco embrionárias estão presentes em embriões e podem ser classificadas de acordo com a sua capacidade de se diferenciar em outros tecidos. As células-tronco embrionárias totipotentes podem se diferenciar em qualquer tipo celular e estão presentes em embriões de 1 a 3 dias de vida que apresentam de 16 a 32 células. Já as células-tronco embrionárias pluripotentes tem a capacidade de se diferenciar em mais de 200 tipos celulares e podem ser isoladas de embriões de 5 a 14 dias na fase de blastocisto, antes de sua implantação na parede uterina e que apresentam de 32 a 64 células. As possibilidades de utilização das células-tronco embrionárias para a engenharia tecidual são inúmeras. Entretanto, o aspecto legal e religioso acerca de sua obtenção, o alto custo de manutenção e manipulação dos embriões e o potencial de gerar teratomas são fatores que têm limitado o uso dessas células. Nesse sentido, fontes de células-tronco adultas têm sido procuradas para a utilização na engenharia tecidual (Gronthos et al., 2000; Gronthos et al., 2002; Seo et al., 2004; Miura et al., 2003).

As células-tronco adultas são células indiferenciadas localizadas em tecidos especializados e são responsáveis pela regeneração desses tecidos ao longo da vida. Em geral, elas são consideradas multipotentes, tendo a capacidade de se diferenciar em diversos tipos celulares, no entanto, somente àqueles restritos ao tipo do folheto germinativo de origem: mesoderma, ectoderma e endoderma.

Nas últimas décadas, a busca por células-tronco mesenquimais em tecidos especializados levou à descoberta de uma variedade de células-tronco em diversos órgãos e tecidos do corpo (Gronthos et al., 2000; Gronthos et al., 2002; Seo et al., 2004; Miura et al., 2003; Baksh et al., 2004; Porada et al., 2006; Kolf et al., 2007).

Desde a descoberta e caracterização de células-tronco mesenquimais da medula-óssea (*bone marrow mesenchymal stem cells* - BMMSCs), populações de células-tronco mesenquimais de outros tecidos foram caracterizadas com base em critérios de "padrão ouro" estabelecidos para BMMSCs (Friedenstein et al., 1976; Caplan, 1991; Prockop, 1997; Pittenger et al., 1999; Gronthos et al., 2003).

Devido a algumas desvantagens na obtenção do BMMSCs como dor, morbidade e número reduzido de células na extração, fontes alternativas de células-tronco mesenquimais tem sido buscadas, a exemplo das derivadas de tecido adiposo (*adipose derived stem cells* – ADSCs) obtidas através da lipectomia

assistida por sucção (lipo-aspiração) (Zuk et al., 2001; Mizuno et al., 2002) e das populações de células-tronco-símile provenientes do sangue do cordão umbilical (Mareschi et al., 2001).

Populações de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido dentário estão entre muitas outras populações de células indiferenciadas que residem nos tecidos especializados e que foram isoladas e caracterizadas (Gronthos et al., 2000; Gronthos et al., 2002). A primeira delas foi isolada do tecido pulpar humano e denominada células-tronco da polpa dentária (*dental pulp stem cells* - DPSCs) (Gronthos et al., 2000) pós-natal.

Posteriormente, mais três tipos de populações de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido dentário foram isoladas e caracterizadas, a saber: células-tronco de dentes decíduos esfoliados (*stem cells from human exfoliated deciduous teeth* - SHEDs), as células-tronco do ligamento periodontal (*periodontal ligament stem cells* - PDLSCs) (Seo et al., 2004; Miura et al., 2003) e as células-tronco oriundas da papila apical (*stem cells from apical papilla* - SCAP) (Sonoyama et al., 2006; Sonoyama et al., 2008). Estudos recentes identificaram uma quinta população de células-tronco mesenquimais derivada do tecido dentário, conhecida como células precursoras do folículo dentário (*dental follicle progenitor cells* - DFPCs) (Morsczeck et al., 2005). No entanto, a relação precisa entre essas diferentes populações de células-tronco ainda não está clara.

Durante a caracterização das DPSCs recém-identificadas, certos aspectos de suas propriedades foram comparados com os da BMMSCs. Diferenças foram observadas entre as populações de DPSCs e BMMSCs, onde as DPSCs parecem ser mais comprometidas no desenvolvimento odontogênico e não no osteogênico (Huang et al., 2009). Os tecidos dentários são tecidos especializados e não sofrem remodelação contínua, como acontece no tecido ósseo (Murray et al., 2000; About et al., 2001). Portanto, as DPSCs podem ser mais comprometidas ou limitadas no seu potencial de diferenciação, em comparação às BMMSCs. Além disso, o mesênquima dentário é denominado ectomesênquima devido à sua interação prévia com a crista neural (Jernvall; Thesleff 2000). Sob essa perspectiva, as células-tronco derivadas do ectomesênquima dentário podem possuir características distintas das BMMSCs e semelhantes às das células da crista neural.

Uma característica importante das células-tronco é o seu potencial de auto-renovação (Figura 2.2) e diferenciação para outros tecidos da mesma origem (Iohara

et al., 2006; Sloan; Waddington, 2009). As DPSCs, por exemplo, tem a capacidade de sofrerem diferenciação osteogênica, condrogênica e miogênica *in vitro* (Laino et al., 2005; Zhang et al., 2006; d'Aquino et al., 2007; Koyama et al., 2009), bem como diferenciação adipogênica e neurogênica exibindo morfologia semelhante aos adipócitos e às células neuronais (Gronthos et al., 2002; Koyama et al., 2009),

Figura 2.2 – O nicho de células-tronco consiste de células-tronco adultas “verdadeiras” cercadas pelas células progenitoras em processo de amplificação. A célula-tronco adulta “verdadeira” tem capacidade pouco frequente, mas quase ilimitada de auto-renovação, enquanto as células-filhas são altamente proliferativas e capazes de se diferenciarem em diversas linhagens de células de acordo com o estímulo recebido (adaptado de Sloan; Waddington, 2009)

As DPSCs também possuem capacidade de diferenciação odontoblástica *in vitro* e *in vivo*. Yu et al. (2007) mostraram a capacidade de diferenciação odontogênica *in vitro*, caracterizada pela formação acelerada de matriz mineralizada, aumento da atividade da fosfatase alcalina (ALP) e expressão de gene *DSPP*, e *in vivo*, quando as DPSCs produziram estruturas similares à osteodentina. Em outro estudo, a diferenciação odontoblástica das DPSCs *in vitro* foi verificada por altos níveis de expressão dos genes *DSPP* e *ALP*, aumento da expressão das proteínas DSP e OCN, atividade de ALP elevada, maior deposição de cálcio nos meios de indução de mineralização e formação de matriz mineralizada acelerada (Lei et al., 2011).

O processo de diferenciação das DPSCs é dinâmico e envolve uma série de eventos como o aumento da expressão de genes relacionados à produção de proteínas da matriz extracelular dentinária e o aumento da atividade de enzimas

envolvidas do mecanismo de mineralização da matriz produzida, a exemplo da ALP. Como consequência desses eventos tem-se, *in vitro*, a formação de nódulos de matriz mineralizada caracterizada por alto conteúdo de cálcio.

A compreensão da biologia dessas populações de células-tronco dentais, a exemplo de como elas podem se diferenciar e formar tecidos mineralizados, e dos fatores que possam interferir nessa diferenciação é fundamental para a sua utilização na Odontologia regenerativa. Além disso, controlar e fornecer esses sinais artificialmente em uma etapa específica pode facilitar a regeneração do tecido desejado (Kolf et al., 2007).

2.2.2 Moléculas de sinalização e a diferenciação das células-tronco de polpa dentária

Os fatores de crescimento e os fatores morfogênicos são proteínas que se ligam a receptores de membrana específicos e desencadeiam uma série de vias de sinalização que coordenam todas as funções celulares. Estas moléculas desempenham papel crítico durante o desenvolvimento dos tecidos, orientando os processos que determinam o destino de células-tronco e regulam a formação de todos os tecidos e órgãos do embrião em desenvolvimento. Da mesma forma, essas moléculas desempenham papel fundamental em processos fisiológicos de regeneração de tecidos, a exemplo da cicatrização de feridas na pele, ou da resposta pulpar frente à lesão de cárie dentária. Os mesmos fatores de crescimento que guiam a embriogênese e a regeneração fisiológica do tecido também podem ser utilizados terapeuticamente para guiar a diferenciação de células-tronco e coordenar os processos celulares que resultam na geração de um novo tecido ou órgão através de engenharia de tecidos. Mais especificamente, existem muitas semelhanças entre os fatores morfogênicos que regulam a dentinogênese e os fatores que regulam a formação de dentina reparadora (Smith; Lesot, 2001).

Os fatores de crescimento desempenham papel importante na sinalização dos processos de reparação na polpa e na dentina (Smith; Lesot, 2001; Smith et al., 2001). De fato, sabe-se que moléculas como o fator de crescimento transformador- β (*transforming growth factor* – TGF- β), as proteínas morfogênicas do osso (BMPs),

fator de crescimento derivado de plaquetas (*platelet derived growth factor* – PDGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF), e o fator de crescimento vascular endotelial (*vascular endothelial growth factor* – VEGF) são incorporados na matriz de dentina durante a dentinogênese e são mantidos nestes locais como moléculas "fossilizadas" (Finkelman et al., 1990; Ruch et al., 1995; Roberts-Clark; Smith, 2000).

Curiosamente, quando essas moléculas são liberadas a partir da dentina, elas são capazes de induzir respostas celulares, como por exemplo as que levam à geração de dentina terciária e reparação da polpa dentária (Smith et al., 2001; Tziafas, 1995). O próprio arranjo tubular da dentina facilita o movimento de fatores de crescimento liberados da matriz dentinária desmineralizada por cáries, agentes condicionadores ácidos ou materiais de capeamento pulpar. Tais eventos resultam no recrutamento de DPSCs, sua diferenciação em células produtoras de matriz dentinária e na secreção de matriz mineralizável (Fitzgerald et al., 1990; Smith et al., 1995; Murray; Smith, 2002).

A área da engenharia de tecidos dentários pode se beneficiar enormemente a partir de estudos focados na diferenciação das DPSCs reguladas por fatores de crescimento. Sendo assim, será abordado, a seguir, o papel dos fatores de crescimento PDGF e BMP-2 na diferenciação das DPSCs.

2.2.3 Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF)

Durante a proliferação, diferenciação e migração celular, vários hormônios, citocinas e fatores de crescimento podem agir isolados ou em conjunto estimulando estes processos. Um dos fatores de crescimento que desempenha papel importante na embriogênese e na regeneração tecidual é o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) (Heldin; Westermarck, 1999).

O PDGF é um importante polipeptídeo mitógeno para células mesenquimais incluindo fibroblastos, miofibroblastos e células musculares lisas (Escobedo; Williams, 1988; Ross et al., 1990), e pode ser produzido por células do estroma fornecendo um sinal de maneira a inibir a apoptose e promover a proliferação celular (Heldin; Westermarck, 1999).

O PDGF existe como dois polipeptídeos diferentes, mas altamente homólogos: PDGF A e B (Heldin; Westermark, 1999). Essas cadeias PDGF se combinam para formar dímeros de PDGF dando origem a suas isoformas: PDGF-AA, PDGF-AB e PDGF-BB. A sinalização do PDGF é mediada através de sua ligação aos receptores PDGFR α e PDGFR β localizados na membrana celular e que possuem propriedades de tirosina quinase. O PDGFR α tem afinidade para ligar-se às cadeias de polipeptídeos A e B do PDGF, enquanto o PDGFR β tem afinidade para as cadeias B (Heldin et al., 1988). A fosforilação de receptor PDGF desencadeia vias de sinalização intracelular, composta por uma série de enzimas, incluindo Src, 3 fosfatidilinositol quinase (P3K), fosfolipase C γ (PLC γ) e Ras (Tallquist; Kazlauskas, 2004) que vão estimular a proliferação celular.

Além de sua propriedade mitogênica, a isoforma PDGF-BB promove a motilidade celular e funciona como um quimiotático para células de origem mesenquimal (Rönnstrand; Heldin, 2001). Outra importante ação do PDGF diz respeito à sua propriedade angiogênica (Tran-Hung et al., 2008).

Estudos demonstraram que o PDGF é capaz de regular a proliferação celular e a produção de proteínas da matriz dentinária em culturas de células de polpa dentária e propuseram a existência de uma estreita associação entre PDGF e diferenciação odontoblástica durante o processo de reparação e desenvolvimento do tecido de polpa dentária (Nakashima, 1992; Rutherford et al., 1992; Denholm et al., 1998). De fato, embriões de camundongos com a mutação que determina a ausência do receptor para o PDGF mostraram retardo e deficiências no crescimento tanto dos tecidos do ectomesênquima quanto do mesoderma (Stephenson et al., 1991, Morrison-Grahan et al., 1992).

Mais tarde, Yokose et al. (2004) relataram os primeiros efeitos de dímeros de PDGF na diferenciação terminal das células odontoblásticas representados pela formação da matriz mineralizada de dentina *in vitro*. Os resultados morfológicos mostraram que a formação de nódulos de mineralização foi inibida pelo contínuo tratamento com qualquer um dos dímeros de PDGF (AA, BB e AB). Para os dímeros PDGF-AB e PDGF-BB, o número de nódulos formados foi significativamente reduzido e estes eram muito menores do que aqueles encontrados no tratamento PDGF-AA e nos grupos controle sem PDGF. Os resultados do conteúdo de cálcio, da quantidade de produção de OCN e da atividade da enzima (ALP) refletiram os efeitos dos dímeros de PDGF sobre a formação de nódulos. Os valores obtidos para

os tratamentos com PDGF-AB e PDGF-BB foram significativamente inferiores aos do grupo controle e o grupo tratado com PDGF-AA. No entanto, os dímeros PDGF AB e PDGF-BB aumentaram a expressão de DSP, embora a mineralização da matriz tenha sido inibida (Yokose et al., 2004).

O PDGF pode contribuir para a engenharia tecidual em função suas propriedades mitogênica (Escobedo; Williams, 1988; Ross et al., 1990), quimiotática (Rönnstrand; Heldin, 2001), angiogênica (Tran-Hung et al., 2008) e reguladora da mineralização dos tecidos (Yokose et al., 2004). Ele estaria indicado em casos onde se deseja um incremento da regeneração pulpar e ao mesmo tempo o controle da formação do tecido mineralizado.

2.2.4 Proteína morfogenética do osso (BMP)

As proteínas morfogenéticas do osso (BMPs) são fatores de crescimento que pertencem à superfamília dos fatores de crescimento tumoral TGF- β cujos membros exercem seus efeitos ligando-se a dois tipos de receptores serina/treonina quinase, ambos sendo essenciais para a transdução do sinal intracelular (Kawabata et al., 1998; Massagué, 1998). Os receptores do Tipo II são quinases constitutivas ativas que transfosforilam receptores do Tipo I quando acontece a ligação com o fator de crescimento. Por sua vez, os receptores do Tipo I ativam substratos intracelulares tais como as proteínas Smads e determinam a especificidade dos sinais intracelulares. Foram identificadas oito diferentes proteínas Smads em mamíferos, e estas são classificadas em três subgrupos: Smads reguladas por receptores (*receptor regulated Smads* – R-Smads), Smads co-fadoras (*common partner Smads* – Co-Smads) e Smads inibidoras. As R-Smads são ativadas diretamente pelos receptores do Tipo I, formam complexos com Co-Smads e são translocadas para o núcleo, onde vão atuar com outros fatores de transcrição proporcionando a ativação de alguns genes. Smad1, Smad5 e Smad8 são ativadas pelas BMPs, enquanto a Smad2 e Smad3 são ativadas por TGF- β e activina. A Smad4 funciona como uma co-Smad e as Smad6 e 7 atuam como Smads inibidoras (Figura 2.3).

Figura 2.3 – Mecanismo de ação dos receptores da BMP e transdução de sinal para o núcleo através das Smads (adaptado de Kawabata et al., 1998)

As BMPs foram originalmente identificadas como proteínas reguladoras da formação do osso e da cartilagem, além de participarem na embriogênese e morfogênese de vários órgãos e tecidos, incluindo os dentes (Thesleff; Sharpe, 1997; Ike; Urist, 1998). Tornou-se cada vez mais evidente que as BMPs desempenham um papel importante na dentinogênese e na regeneração dentinária (Bessho et al., 1991; Rutherford et al., 1993; Nakashima, 1994; Yamashiro et al., 2003).

A BMP-2 pode regular a diferenciação das células de polpa dentária humana para odontoblastos e estimular a formação de dentina (Nakashima, 1994; Nakashima; Reddi, 2003). Um estudo *in vitro* demonstrou que a BMP-2 foi capaz de estimular a expressão dos genes *DSPP* e *enamelisina* em culturas de células indiferenciadas de polpa. Iohara et al. (2004) demonstraram uma maior quantidade de formação de dentina reparativa quando o canal radicular de incisivos de cães foram preenchidos com células-tronco de polpa dentária previamente semeadas em matriz de colágeno tratada com BMP-2 em comparação ao respectivo grupo controle sem tratamento com BMP-2. Segundo os autores, a própria matriz extracelular de colágeno funcionou como um *scaffold* natural, que retém e libera BMPs. Mais tarde,

o mesmo grupo mostrou a BMP-2 foi capaz de estimular a expressão dos genes *DSPP* e *enamelisina* em culturas de células indiferenciadas de polpa que células-tronco de polpa suplementadas com BMP-2 (Iohara et al., 2006). Adicionalmente, a BMP-2 é capaz de acelerar essa diferenciação aumentando a atividade de ALP (Saito et al., 2004) e induzindo a formação de dentina.

A vantagem da terapia celular *ex-vivo* é que as culturas de células-tronco/progenitoras podem ser implantadas após sua diferenciação em odontoblastos resultando em grandes quantidades de formação de dentina reparadora (Iohara et al., 2004).

Técnicas para se isolar células-tronco humanas de polpa e manipular o seu crescimento e diferenciação em determinadas condições *in vitro* têm de ser estabelecidas e otimizadas antes da terapia celular com BMP-2 possa se tornar uma realidade clínica para o tratamento odontológico restaurador (Iohara et al., 2004)

2.3 Fototerapia com laser em baixa intensidade (FTLBI)

A proliferação, diferenciação e migração celular também podem ser influenciadas por outros estímulos a exemplo da fototerapia com laser em baixa intensidade (FTLBI),

A FTLBI também apresenta outras denominações tais como: terapia com laser de baixa potência (*Low Power Laser Therapy* - LPLT), terapia com laser em baixa intensidade (*Low Intensity Laser Therapy* – LILT, ou *Low Level Laser Therapy*- LLLT) e, mais atualmente, laser fototerapia (*Laser Phototherapy* – LPT).

A FTLBI consiste na utilização de uma fonte de luz laser com intensidade baixa, para que não haja nenhum dano térmico aos tecidos, com o objetivo de se conseguir efeitos terapêuticos a exemplo da modulação da inflamação, aceleração na reparação tecidual e analgesia.

O laser (do acrônimo *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, ou seja, Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação) é uma radiação eletromagnética com características especiais como monocromaticidade (possui comprimento de onda bem definido), colimação (propaga-se como um feixe de ondas praticamente paralelas) e coerência temporal e espacial (todas as ondas dos

fótons que compõe o feixe estão em fase no tempo e no espaço). Essas características especiais diferem o laser dos demais tipos de luz existentes no universo, a exemplo da luz branca e dos diodos emissores de luz (Light emitting diodes - LEDs).

A luz laser é composta por fótons, que correspondem a partículas de energia que se propagam no espaço com comportamento oscilatório (onda) e são desprovidas de massa e carga.

A absorção da luz laser pelos tecidos e, mais especificamente, pelas células é necessária para que haja a transformação da energia luminosa da luz laser em energia química para a célula. Isso é possível, uma vez que as células possuem fotorreceptores, denominados cromóforos, capazes de captar os fótons que compõem o feixe laser. A faixa de emissão espectral ideal para que haja estimulação celular está entre o vermelho visível e o infra-vermelho próximo (660 a 830nm).

Algumas hipóteses sobre os mecanismos de ação primários da FTLBI foram propostas na literatura (Karu, 1988; Smith, 1991; Karu, 1996; Karu, 1999; Vladmirov et al., 2004; Hamblin; Demidova-Rice, 2007). Em todas elas, o papel dominante dos fotorreceptores é assumido. Segundo essa visão, os efeitos biológicos são observados devido à absorção da radiação laser de certas moléculas (Keblanov et al., 2001; Vladmirov et al., 2004), e correspondem às reações celulares primárias, ou seja, reações induzidas pela luz.

Em relação aos mecanismos moleculares envolvidos nas reações primárias, a primeira teoria foi postulada por Karu (1989) que propôs que a absorção da luz por flavinas e citocromos da cadeia respiratória mitocondrial intensifica a formação do gradiente de prótons na membrana das mitocôndrias, resultando em maior produção de ATP intracelular. Smith (1991) modificando o modelo de Karu, propôs que a radiação infravermelha, em um caminho adicional, pode ativar diretamente os canais de cálcio (Ca^{+2}) da membrana celular através de modificações foto-físicas, portanto induzindo a entrada de Ca^{+2} e a proliferação celular.

Muito provavelmente, dois ou mais destes modelos podem ocorrer simultaneamente no tecido irradiado contribuindo para os efeitos biológicos observados (Schindl et al., 2000; Marques et al., 2010).

Na mitocôndria, a citocromo c oxidase parece ser a enzima envolvida no processo (Karu, 1989; Karu, 1999; Vladmirov et al., 2004; Hamblin; Demidova-Rice

2007). De fato, essa enzima tem picos de absorção nas regiões do espectro eletromagnético do vermelho e do infravermelho que são comuns ao espectro de ação dos efeitos da FTLBI. A descoberta de que as células empregam o óxido nítrico (NO) sintetizado na mitocôndria para regular a respiração através de ligação competitiva à ligação do oxigênio à citocromo c oxidase, poderia explicar como a FTLBI pode afetar o metabolismo celular. É possível que a FTLBI fotodissocie a ligação inibitória do NO à citocromo c oxidase, que ocorre quando as células encontram-se, por exemplo, em situações de estresse. Isso explicaria o aumento de produção de ATP e demais efeitos dessa terapia (Hamblin; Demidova-Rice, 2007).

As reações secundárias que ocorrem na ausência de luz sinalizam a transdução e amplificação dos sinais produzidos nas reações primárias (Karu, 1999; Schindl et al., 2000). As alterações do pH intracelular, relacionadas com a ativação das ATPases e seguidas por alterações nos níveis de Ca^{+2} intracelular, parecem ser um caminho comum para a transdução do sinal e amplificação da maioria das fotoreações primárias. A mudança do estado redox para oxidação acarreta um aumento intracelular de Ca^{+2} e estimula o metabolismo celular. Altos níveis de Ca^{+2} intracelular por sua vez, estimulam vários processos biológicos, como síntese de RNA e DNA, mitose celular e secreção protéica. Mesmo assim, altos níveis de Ca^{+2} intracelular podem levar à inibição do metabolismo celular (Smith, 1991; Friedman; Lubard, 1996). De fato, tanto a estimulação quanto a inibição da entrada de Ca^{+2} nas células de mamíferos podem ser induzidos por luz vermelha monocromática dependendo da dosagem aplicada (Karu, 1996).

As reações primárias e secundárias celulares produzidas pelo laser vão resultar nos efeitos modulação da inflamação, aceleração na reparação tecidual e analgesia vistos na FTLBI (Marques et al., 2010).

Em relação aos efeitos biomoduladores dos processos de reparação tecidual, estudos *in vitro*, utilizando cultura de células, tem demonstrado que a FTLBI pode acelerar o crescimento de tipos celulares como fibroblastos, osteoblastos e células endoteliais (Almeida-Lopes et al., 2001; Pereira et al., 2002; Azevedo et al., 2006; Fujihara et al., 2006; Eduardo et al., 2007), além de estimular a produção e secreção de proteínas e fatores de crescimento por estas células (Marques et al., 2004; Damante et al., 2009)

Alguns desses efeitos da FTLBI já foram vistos em células-tronco de origem mesenquimal, a exemplo das BMMSCs e das ADSCs. Nas ADSCs, a FTLBI foi

capaz de aumentar a viabilidade e a proliferação celular e a expressão de integrina β -1, um marcador expresso na superfície de células-tronco derivadas de tecido adiposo (Mvula et al., 2008). Ainda em estudos com ADSCs, a FTLBI associada ao fator de crescimento epidermal (*epidermal growth factor* – EGF), também demonstrou melhorar a proliferação e a manutenção destas células *in vitro* (Mvula et al., 2010). Vale ressaltar que o aumento da viabilidade celular passa a ser um aspecto importante para as células-tronco, principalmente quando o objetivo do cultivo das mesmas é sua implantação em órgãos humanos durante as terapias celulares.

Em outro estudo, avaliando os efeitos da FTLBI em BMMSCs, foi observado estímulo à proliferação, facilitação para diferenciação miogênica e aumento na secreção de fatores de crescimento como o VEGF e o fator de crescimento neural (*nerve growth factor* – NGF) nas células correspondentes aos grupos irradiados. Nesse sentido, a FTLBI poderia ser utilizada como uma ferramenta para o pré-condicionamento das BMMSCs *in vitro*, que antecede o transplante dessas células durante a terapia celular (Hou et al., 2008).

Efeitos da FTLBI sobre a diferenciação e mineralização das células da polpa dentária humana também já foram explorados. Quando células da polpa dentária humana cultivadas *in vitro* são expostas ao laser há um aumento na formação de nódulos de calcificação a longo prazo e na atividade da ALP (Ohbayashi et al., 1999; Matsui et al., 2007). Já estudos *in vivo* relatam que ocorre a formação de ponte de dentina na superfície de polpas dentárias expostas de cães uma semana após a irradiação com a FTLBI, comparando-se ao grupo controle não irradiado (Utsunomiya, 1998).

Mecanismos de ação que expliquem os efeitos a FTLBI sobre a diferenciação das células de polpa dentária humana já foram levantados. Acredita-se que o laser atue nos receptores de BMP-2 e possa modular a transdução do sinal desencadeado. Matsui et al. (2008) mostraram que a irradiação laser aumenta a expressão do RNA mensageiro (mRNA) das Smads, resultando em aumento da produção do fator de crescimento BMP-2 e da calcificação nas células de polpa dentária.

Poucos são os estudos que observaram os efeitos da FTLBI no comportamento biológico das células-tronco de polpa humana (hDPSCs). Um estudo preliminar mostrou que a FTLBI é capaz de influenciar o crescimento das hDPSCs

(Eduardo et al., 2008). Os autores concluíram que a FTLBI foi capaz de aumentar significativamente a proliferação das hDPSCs utilizando-se um laser no comprimento de onda vermelho (660nm) e densidade de energia de 3J/cm².

A FTLBI deve ser explorada uma vez que ela tem demonstrado efeitos moduladores no crescimento e na produção protéica de células mesenquimais e epiteliais. O entendimento de como estimular o crescimento das hDPSCs, bem como a síntese, produção e secreção das proteínas da matriz extracelular possibilitará futuramente estudos da regeneração de tecidos dentais.

Vale ressaltar que no campo da regeneração tecidual, fatores de crescimento, a exemplo do PDGF e do BMP-2, são utilizados para modular o crescimento e diferenciação das células utilizadas. Entretanto, não há estudos comparando os efeitos dos fatores de crescimento com a FTLBI, ou ainda, analisando os possíveis efeitos da associação desses fatores à FTLBI.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Objetivos Gerais

- Estudar os efeitos da fototerapia com laser em baixa intensidade (FTLBI) no processo de diferenciação ósseo/odontogênica de células-tronco da polpa dentária humana (hDPSCs).

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito da FTLBI sobre hDPSCs crescidas nas condições ideais.
- Avaliar o efeito da FTLBI sobre hDPSCs crescidas em meio mineralizante contendo ou não fatores de crescimento, a saber: PDGF-BB e BMP-2.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Cultura Celular

Para o estudo foram utilizadas células-tronco de polpa dentária humana (hDPSCs) positivas para o receptor do fator derivado de plaquetas-BB (PDGF-BB), gentilmente cedidas pelo Professor Shiwei Cai (Departamento de Endodontia, *The University of Texas Health Science Center at Houston*). Essa linhagem celular foi obtida a partir de culturas primárias de fragmentos de polpa de dente decíduo humano. As células que expressavam positivamente PDGFR β e o marcador de célula-tronco mesenquimal *c-kit* foram separadas por citometria de fluxo (informação verbal)¹.

As hDPSCs foram crescidas em meio *knockout Dulbecco's modified Eagle medium* (k-DMEM, Gibco, Grand Island, NY, EUA) suplementado com 2,5% de soro fetal bovino (SFB, Hyclone, Thermo Scientific, Logan, UT, EUA), 15% de *knockout serum replacement* (KSR, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, EUA), 1mM aminoácidos não essenciais (NEAA, Sigma Chemical, St Louis, MO, EUA), 0,1mM β -mercaptoetanol (Sigma), 1mM L-glutamina (Invitrogen), 10 μ g/ml *insulin growth factor* (IGF, MP Biomedicals LLC, Irvine, CA, EUA), 10 μ g/ml *human recombinant basic fibroblast growth factor* (bFGF, Invitrogen), 50mg/ml penicilina-estreptomicina-glutamina (PSG, Invitrogen). As células foram incubadas a 37°C em atmosfera de ar umidificado a 5% de CO₂.

As culturas foram mantidas em semi-confluência até serem utilizadas na experimentação ou serem crio-preservadas, visando-se ter um estoque de células para trabalho. Para o congelamento, as células foram re-suspendidas em meio de cultura contendo k-DMEM suplementado com 20% de SFB e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma). As células congeladas foram armazenadas em freezer de nitrogênio líquido.

¹ Informação fornecida por Prof. Dr. Shiwei Cai em Houston, Texas, EUA.

Para os experimentos, alíquotas das hDPSCs foram descongeladas em banho de água a 37°C por 1 minuto. Após a remoção do meio contendo DMSO, as células cresceram em meio de cultivo previamente descrito.

Todos os procedimentos de cultivo celular foram realizados sob capela de fluxo laminar, seguindo os protocolos de manutenção de esterilidade de materiais e soluções utilizadas (Freshney, 2010). Vale ressaltar que o crescimento das células foi monitorado diariamente em microscópio de fase invertido e que o meio de cultura foi trocado a cada 2 ou 3 dias, de acordo com o metabolismo celular.

4.2 Indução de Diferenciação

Para a indução ósseo/odontogênica foi utilizado o meio mineralizante descrito a seguir. A indução teve duração de 14 dias sendo o meio mineralizante trocado a cada 72 horas. A FTLBI e os fatores de crescimento foram associados ao meio mineralizante de acordo com os grupos experimentais para análise de seus efeitos sobre o processo de diferenciação das hDPSCs.

4.2.2 Meio mineralizante

O meio mineralizante foi preparado com meio de cultura α -MEM (Gibco), suplementado com, 10% SFB (Hyclone), 50mg/ml PSG (Invitrogen), 50 μ g ácido ascórbico (Sigma), 1mM β -glicerofosfato (Sigma), 10nM dexametasona (Sigma).

4.2.1 Fototerapia com Laser em Baixa Intensidade (FTLBI)

Para a realização da FTLBI foi utilizado um equipamento laser de diodo semi-condutor (Photon Lase III, DMC-Equipamentos, São Carlos, SP, Brasil), com comprimento de onda de 660nm, com potência de 20mW e diâmetro do feixe laser

de $0,028\text{cm}^2$. Para verificar a saída de potência do equipamento, antes e após as irradiações, foi utilizado um medidor de potência (PM500D Laser Power Meter, Molectron Detector Inc, Portland, OR, EUA). O valor da emissão foi ajustado para os valores desejados por meio do medidor de potência e não pelo valor apresentado no painel de controle do equipamento. Todos os procedimentos com o equipamento laser foram realizados seguindo todas as normas de segurança NBR/IEC 601.2.22 e IEC 60825-1/2001-8.

A irradiação com a FTLBI foi realizada no modo pontual e em contato, posicionando-se a peça de mão do equipamento laser em contato com o fundo das placas de cultura celular. Para os experimentos onde as células eram plaqueadas em placas de 6 poços foram irradiados cinco pontos no fundo de cada poço, enquanto para experimentos que utilizaram placas de 48 poços, somente um ponto por poço foi irradiado (Figura 4.1)

Figura 4.1 – Irradiação da FTLBI nas placas de cultura. Em contato com o fundo da placa (A); esquema dos pontos de irradiação da FTLBI para as placas de 6 poços, 5 pontos (B) e 48 poços, 1 ponto (C)

Para todos os experimentos, foram realizadas cinco sessões de FTLBI com intervalo de 72h sempre após a troca de meio segundo os grupos experimentais. Os parâmetros da FTLBI utilizados estão descritos na Tabela 4.1:

Tabela 4.1 – Parâmetros de irradiação para FTLBI

Densidade de energia (J/cm ²)	Tempo de irradiação por ponto (s)	Energia por ponto (J)	Potência (mW)	Densidade de Potência (W/cm ²)
5	7	0,14	20	0,714

4.2.3 Fatores de crescimento

Os fatores de crescimento utilizados no estudo foram: proteína morfogenética do osso-2 (BMP-2, Invitrogen) e o fator de crescimento derivados de plaquetas-BB (PDGF-BB, Invitrogen). Para os experimentos, o BMP-2 e o PDGF-BB foram adicionados ao meio mineralizante de acordo com os grupos experimentais, na concentração final de 10ng/ml.

4.3 Grupos Experimentais

G1: células crescidas em meio regular

G2: células crescidas em meio regular + FTLBI

G3: células crescidas em meio mineralizante

G4: células crescidas em meio mineralizante + FTLBI

G5: células crescidas em meio mineralizante + PDGF-BB

G6: células crescidas em meio mineralizante + PDGF-BB + FTLBI

G7: células crescidas em meio mineralizante + BMP-2

G8: células crescidas em meio mineralizante + BMP-2 + FTLBI

4.4 Análise da Expressão Gênica por qRT-PCR

Para o experimento, 5×10^4 células foram plaqueadas em placas de cultura de 6 poços, em triplicata, utilizando-se o meio regular de cultivo celular descrito

anteriormente. Após 24 horas do plaqueamento, o meio de cultura foi trocado segundo os grupos experimentais e a FTLBI foi realizada. Sendo assim, consideramos que o início da indução ósseo/odontogênica ocorreu após 24h do plaqueamento

4.4.1 Extração do RNA total

O RNA total foi extraído das culturas celulares em 3, 7 e 14 dias após o início da indução, utilizando-se o kit de extração RNeasy Mini Kit (Qiagen, Cat#74104, Valencia, CA, EUA) seguindo as recomendações do fabricante. Brevemente, as células plaqueadas em placas de 6 poços foram lavadas 2 vezes com solução salina tamponada (PBS) gelada e, em seguida, foram adicionados 350µl de solução tampão de lise RLT (do RNeasy Mini Kit, Qiagen) em cada poço. A reação foi interrompida utilizando-se 350µl etanol 70%. Em seguida, a purificação do RNA foi realizada através de lavagens sucessivas com os tampões RW1 e RPE (do RNeasy Mini Kit), em colunas para centrifugação contendo uma membrana de sílica no interior (RNeasy spin column, Qiagen). A concentração do RNA foi determinada por espectrofotômetro (Eppendorf North America, New York, NY, EUA) com comprimento de onda de 260nm a 280nm. O RNA foi armazenado em freezer a -80°C até o momento de sua utilização.

4.4.2 Confecção da fita de DNA complementar (cDNA)

O cDNA de cada grupo experimental foi obtido a partir de 10µg de RNA total utilizando-se o kit *iScript cDNA Synthesis* (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Califórnia, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. O mix da reação foi preparado em tubos tipo Eppendorf, de acordo com a Tabela 4.2. O volume de água foi ajustado de acordo com o volume de amostra de RNA que variou de acordo com a concentração obtida em cada grupo experimental.

Tabela 4.2 – Reagentes para a confecção da fita de cDNA

Reagente	Volume (μl)
<i>5x iScript reaction Mix</i> (mistura de Oligo-dT e <i>random primers</i>)	4
<i>Nuclease free water</i>	x
<i>RNase H⁺ iScript reverse transcriptase</i> (enzima)	1
Amostra de RNA	y
Volume Total	20

A reação foi incubada em termociclador (MJ Mini™ Personal Thermal Cycler, Bio-Rad), com os seguintes parâmetros: 25°C por 5 minutos, a 42°C por 30 minutos e posteriormente 85°C por 5 min. As amostras de cDNA foram armazenadas em freezer a -20°C.

4.4.3 PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

O protocolo utilizado para a realização do presente trabalho descreve o procedimento experimental detalhado para qPCR utilizando-se o fluoróforo SYBR® Green I (SYBR Green ix®, Bio-Rad). Os *primers* foram desenhados pelo Prof. Dr. Shiwei Cai, utilizando-se o programa Beacon Designer Probe/Primer Design Software (Bio Rad), de forma que essas sequências estivessem presentes em *exons* diferentes, apresentassem uma temperatura de *melting* entre 50°C e 60°C e gerassem produtos de tamanho entre 100pb e 400pb. Os genes avaliados, as sequências dos *primers* desenhados e as características da reação estão apresentadas na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 – Sequência dos *primers* e propriedades das reações

Gene	NCBI	Sequência <i>primer</i> senso Sequência <i>primer</i> anti-senso	Fragmento (pb)	Temperatura de Anelamento (°C)
<i>DSPP</i>	NM 014208.3	GGAATGGAGAGAGGACTGCT AGGTGTTGTCTCCGTCAGTG	292	55
<i>DMP-1</i>	NM 004407.3	TGGGGATTATCCTGTGCTCT GCTGTCACTGGGGTCTTCAT	176	55
<i>OCN</i>	NM 199173.3	CATGAGAGCCCTCACA CCGTCACGTTGTTTCCT	314	55

* *DSPP* – sialofosfoproteína da dentina, *DMP-1* – fosfoproteína da matriz dentinária-1, *OCN* – osteonectina, NCBI- *National Center for Biotechnology Information*, pb – número de pares de base do produto.

Os cDNAs de cada grupo experimental produzidos na etapa anterior serviram de molde para a amplificação dos genes de estudo por qRT-PCR. Todas as reações foram realizadas em tubos tipo Eppendorf em um volume final de 25µl contendo os seguintes reagentes. A concentração do *primer* utilizada para todos os genes foi de 10µM e as quantidades de cada reagente seguiram as recomendações dadas pelo fabricante (Tabela 4.4):

Tabela 4.4 – Reagentes para a reação de qRT-PCR utilizando o fluoróforo SYBR Green

Componentes do Mix	Volume (µl)
iQ SYBR Green Supermix	12,5
<i>Primer forward</i>	1,0
<i>Primer reverse</i>	1,0
Amostra de cDNA	1,0
Água estéril	9,5
Volume Total	25,0

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

de *primers* foi realizada uma reação sem a amostra de cDNA (*branco*), como controle, para avaliação de sua possível contaminação.

Além das curvas de amplificação, foram realizadas as curvas de dissociação para verificar a especificidade da amplificação, confirmando a ausência da formação de dímeros de *primer* ou qualquer outro produto inespecífico e garantindo a confiabilidade dos resultados. Os dados foram normalizados com base na expressão do gene constitutivo *GAPDH* (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) e analisados levando-se em consideração a eficiência da reação em cada uma das triplicatas, pela determinação da inclinação da reta obtida pelo gráfico de amplificação.

Análise estatística

Os valores da expressão relativa de cada gene em estudo foram submetidos à análise de variância complementada pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.5 Análise da atividade da fosfatase alcalina (ALP)

A atividade da fosfatase alcalina (ALP) foi avaliada pela conversão do fosfato do substrato incolor *p*-nitrofenilfosfato (PNPP) pela enzima ALP para o produto *p*-nitrofenol de cor amarela, onde a taxa de mudança de cor corresponde à quantidade de enzima presente em solução.

Para o experimento 1×10^4 células foram plaqueadas em placas de cultura de 48 poços, em triplicata. Após 24 horas do plaqueamento, o meio de cultura foi trocado e a FTLBI realizada de acordo com os grupos experimentais.

Para o ensaio da atividade da ALP nos tempos experimentais 3, 7 e 14 dias, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas com PBS e imediatamente levadas ao freezer a -80°C por 30 minutos. Em seguida foram incubadas em estufa a 37°C por mais 30 minutos. Esse processo foi repetido por mais duas vezes. Após a última incubação em estufa, foram adicionados 250 μl de 0,2% Triton X-100 (Sigma) por 30 minutos a temperatura ambiente.

Normas de PNPP em concentrações que variaram de 0 a 800 nmol/ml foram preparadas a partir de diluições de uma solução de 10mM. Diluições de PNPP em

Triton X-100 a 0,2%, em concentrações que variaram de 0 a 800 nmol/ml foram preparadas de acordo com a Tabela 4.5, para obtenção da curva de normalização.

Tabela 4.5 – Série de diluições das soluções padrão de PNPP

	Volume de Triton X-100 (μl)	Volume de solução de PNPP a 10mM (μl)	Concentração da solução padrão (nmol/ml)	Concentração da solução padrão no poço* (nmol/ml)
A	1380	120	800	200
B	600	900 de A	480	120
C	600	900 de B	288	72
D	600	900 de C	173	43
E	600	900 de D	104	26
F	600	900 de E	62	15,6
G	600	905 de F	37,3	9,3
H	600	0	0	0

* Concentração final das soluções padrão após a adição da solução reagente e a solução de bloqueio da reação.

Para o ensaio, 50 μl de amostra e 50 μl de cada solução padrão foram transferidos para placas de 96 poços onde foram misturados com 50 μl de solução contendo 20mM de PNPP (Pierce, Rockford, IL, EUA), 1,5M 2-Amino-2-methyl-1-propanol (2AMIP, Fluka Biochemika, Buchs, Suíça) e 1mM cloreto de magnésio (MgCl₂, Sigma) e incubadas por 30 minutos a 37°C. As placas foram removidas da estufa e colocadas em gelo quando a reação foi interrompida pela adição de 100 μl de solução de NaOH.

A absorbância final foi medida em 410nm em espectrofotômetro (Flx800 Fluorescence Microplate Reader, BioTek, Winooski, VT, EUA). Todas as amostras foram realizadas em triplicata e a concentração da ALP foi calculada a partir da curva padrão.

A partir dos valores em absorbância da curva padrão de PNPP foram obtidos os valores do *slope* e *intercept*.

Tabela 4.6 – Concentração das amostras da curva padrão de PNPP e respectivos valores das médias das absorvâncias

Amostra padrão	Concentração do PNPP (nmol/ml)	Média das absorvâncias
A	800	2,04
B	480	1,13
C	288	0,74
D	173	0,49
E	104	0,32
F	62	0,24
G	37,3	0,19
H	0	0,13

Os valores *slope* e *intercept* foram utilizados para o cálculo dos valores da concentração da fosfatase alcalina a partir da fórmula abaixo:

$$\begin{aligned} \text{Concentração ALP} &= (\text{slope} \times \text{valor de absorvância da amostra}) + \text{intercept} \\ &= \\ \text{Concentração ALP} &= (412,32 \times \text{valor de absorvância da amostra}) - 36,88 \end{aligned}$$

Para a normalização dos dados da concentração da ALP, foi feita a análise do conteúdo de proteína total determinada pelo método μ BCA (Micro BCA™ Protein Assay Kit, Pierce)

As soluções padrão foram preparadas com diluições em série de μ BCA em solução de Triton X-100 a 0,2%, obtendo-se concentrações que variaram de 0 a 200 μ g/ml como mostra a Tabela 4.7:

Tabela 4.7 – Diluições das soluções padrão para μ BCA

	Volume de diluente (ml)	Volume de μBCA (ml)	Concentração final de BSA (μg/ml)
A	4,5	0,5 ml μ BSA (solução estoque)	200
B	8,0	2,0 de A	40
C	4,0	4,0 de B	20
D	4,0	4,0 de C	10
E	4,0	4,0 de D	5
F	4,0	4,0 de E	2,5
G	4,0	3,2 de F	1
H	8,0	0	0

Para o ensaio, 130 μ l de amostra ou de solução padrão foram adicionados a 130 μ l de solução de reação em placas de 96 poços, de acordo com as recomendações do fabricante. As placas permaneceram por 30 minutos sob leve agitação e, em seguida, foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 2 horas. A absorbância final foi medida a 562nm em espectrofotômetro (Flx800, BioTek). Todas as amostras foram realizadas em triplicata. O conteúdo de proteína total de cada grupo experimental foi calculado de acordo com a curva padrão e os valores dados em micrograma (μ g) de proteína (Tabela 4.8 e Gráfico 4.2).

Tabela 4.8 – Concentração das amostras da curva padrão do μ BCA e respectivos valores das médias das absorvâncias

Amostra padrão	Concentração de BCA ($\mu\text{g/ml}$)	Média das absorvâncias
A	200	1,69
B	40	0,48
C	20	0,36
D	10	0,23
E	5	0,18
F	2,5	0,15
G	1,25	0,12
H	0	0,13

Gráfico 4.2 – Curva de normalização do μ BCA e obtenção dos valores de *slope* e *intercept*

Os valores *slope* e *intercept* foram utilizados para o cálculo dos valores da concentração da proteína total a partir da fórmula abaixo:

$$\begin{aligned}
 () \text{ Proteína Total} &= (\text{slope} \times \text{valor de absorvância da amostra}) + \text{intercept} \\
 &= \\
 () \text{ Proteína Total} &= (128,13 \times \text{valor de absorvância da amostra}) - 19,26
 \end{aligned}$$

Os valores obtidos de concentração de proteína total pela fórmula foram expressos em $\mu\text{g/ml}$.

A atividade da ALP foi determinada a partir da concentração de ALP (nmol/ml), concentração da proteína total (µg/ml) e tempo de incubação (min) seguindo a fórmula abaixo.

$$\text{Atividade de ALP} = \frac{\text{quantidade da enzima/ proteína total}}{\text{tempo de incubação}}$$

Os valores da atividade de ALP expressos em nmol/g proteína/min foram submetidos à análise estatística.

Análise Estatística

Os valores da atividade de ALP expressos em nmol/ µg proteína/ min foram submetidos a análise de variância complementada pelo Teste de Tukey (p<0,05).

4.6 Análise qualitativa e quantitativa do depósito de cálcio

Para a detecção e quantificação dos depósitos de cálcio foi utilizado o corante vermelho de alizarina (Sigma). Os poços foram lavados com água destilada e as células fixadas com álcool a 50% por 15 minutos a 4°C. Após esse período, as células foram novamente lavadas com água destilada e as placas mantidas semi-abertas até a secagem total. Uma vez secos, os poços foram preenchidos com uma solução de vermelho de alizarina a 1% e hidróxido de amônia a 1% (10:1) e mantidos em temperatura ambiente por 45 minutos sob leve agitação.

Em seguida, o excesso de corante foi removido, as células foram lavadas três vezes com água destilada e as placas novamente foram mantidas semi-abertas até a secagem, quando então foram realizadas imagens de cada grupo experimental em máquina fotográfica acoplada ao microscópio, com aumento de 40x.

Para a quantificação da coloração, foram adicionados 250µl da solução de extração feita com ácido acético a 10% e metanol (4:1) em cada poço previamente corado com vermelho de alizarina e, em seguida, as placas foram levadas ao agitador por 30 minutos em temperatura ambiente.

O conteúdo de cada poço foi transferido para placas de 96 poços. A absorbância foi medida em espectrofotômetro (Flx800, BioTek), em comprimento de onda de 495 nm.

Análise estatística

Os dados obtidos em absorbância foram submetidos à análise de variância complementada pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Análise da expressão dos genes *DSPP*, *DMP-1* e *OCN*

5.1.1 *DSPP*

O gene *DSPP* foi expresso em todos os grupos experimentais durante todo o tempo de cultivo.

A Tabela 5.1 apresenta os resultados numéricos de expressão relativa do gene *DSPP* nos diferentes grupos e tempos experimentais.

Tabela 5.1 – Expressão relativa do gene *DSPP* nos diferentes grupos e tempos experimentais

Grupos Experimentais		3 DIAS	7 DIAS	14 DIAS
G1	Meio regular	3,74 ± 0,26 ^{A,a}	2,34 ± 0,13 ^{B,ac}	1,16 ± 0,16 ^{C,a}
G2	Meio regular + laser	6,89 ± 0,62 ^{A,b}	4,53 ± 0,09 ^{B,b}	1,92 ± 0,03 ^{C,ac}
G3	Meio mineralizante	3,22 ± 0,23 ^{A,ac}	1,57 ± 0,04 ^{B,a}	6,30 ± 0,19 ^{C,b}
G4	Meio mineralizante + laser	3,96 ± 0,04 ^{A,a}	3,61 ± 0,52 ^{A,bc}	3,40 ± 0,22 ^{A,cd}
G5	Meio mineralizante + PDGF	1,78 ± 0,65 ^{A,c}	2,16 ± 0,16 ^{A,a}	2,14 ± 0,19 ^{A,ac}
G6	Meio mineralizante + PDGF + laser	4,01 ± 0,80 ^{A,a}	3,62 ± 0,16 ^{A,bc}	3,07 ± 0,00 ^{A,cd}
G7	Meio mineralizante + BMP-2	4,76 ± 0,94 ^{A,a}	1,99 ± 0,12 ^{B,a}	4,63 ± 0,87 ^{A,bd}
G8	Meio mineralizante + BMP-2 + laser	12,32 ± 0,93 ^{A,d}	8,05 ± 1,32 ^{B,d}	9,40 ± 1,60 ^{AB,b}

* letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tempos no mesmo grupo experimental

* letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos no mesmo tempo experimental

DSPP - Meio regular

A expressão do *DSPP* diminuiu significativamente ao longo do tempo ($p=0,0002$ entre 3 e 7 dias, $p=7,81E-06$ entre 3 e 14 dias, $p=0,0006$ entre 7 e 14 dias) tanto nas células cultivadas em meio regular (G1) quanto naquelas que foram

irradiadas (G2) ($p=0,001$ entre 3 e 7 dias, $p=7,38E-06$ entre 3 e 14 dias e $p=0,0003$ entre 7 e 14 dias).

Quando comparadas ao grupo tratado com meio mineralizante (G3), as células do grupo G1 expressaram *DSPP* em níveis similares aos 3 ($p=0,970$) e 7 dias ($p=0,067$) e significativamente menores em 14 dias ($p=1,19E-06$).

Quando as células cultivadas em meio regular foram irradiadas (G2), a expressão do gene *DSPP* foi significativamente maior em comparação às células crescidas no mesmo meio e não irradiadas (G1) e às células crescidas em meio mineralizante (G3) em 3 dias ($p=0,0004$) e 7 dias ($p=0,002$).

DSPP - Meio mineralizante

Nas culturas tratadas com o meio mineralizante (G3) houve uma diminuição significativa do terceiro para o sétimo dia ($p=6,91E-05$) e aumento significativo do sétimo para o 14^o dia dos níveis de expressão do *DSSP* ($p=3,35E-07$). Vale ressaltar que aos 14 dias a expressão de *DSPP* foi significativamente maior que aos 3 dias ($p=1,90E-06$). As células cultivadas no mesmo meio e irradiadas (G4) expressaram *DSPP* em quantidades similares durante todo o tempo experimental ($p=0,460$ entre 3 e 7 dias, $p=0,179$ entre 3 e 14 dias e $p=0,723$ entre 7 e 14 dias).

As células tratadas com meio mineralizante (G3) expressaram *DSPP* em níveis significativamente maiores em relação às células crescidas no meio regular (G1) apenas em 14 dias ($p=1,19E-06$).

Quando as culturas tratadas com meio mineralizante foram irradiadas (G4), a expressão do *DSPP* foi significativamente maior em 7 dias ($p=0,003$) e menor em 14 dias ($p=0,001$) em relação às mesmas células não irradiadas (G3).

DSPP - Meio mineralizante + PDGF-BB

Tanto as culturas tratadas com meio mineralizante contendo PDGF (G5) quanto as crescidas no mesmo meio e irradiadas (G6) expressaram *DSPP* de maneira similar durante todo o tempo experimental. (para G5: $p=0,520$ entre 3 e 7 dias, $p=0,552$ entre 3 e 14 dias e $p=0,998$ entre 7 e 14 dias; para G6: $p=0,592$ entre 3 e 7 dias, $p=0,112$ entre 3 e 14 dias e $p=0,394$ entre 7 e 14 dias).

A adição de PDGF-BB ao meio mineralizante (G5) levou a uma expressão do *DSPP* significativamente menor somente em 14 dias quando comparada ao grupo tratado com meio mineralizante sem PDGF-BB (G3) ($p=1,90E-05$).

Quando as células crescidas em meio mineralizante contendo PDGF-BB foram irradiadas (G6), a expressão do *DSPP* foi significativamente maior em 3 dias ($p=0,011$) e 7 dias ($p=0,003$) quando comparada com células crescidas no mesmo meio e não irradiadas (G5).

DSPP - Meio mineralizante + BMP-2

Tanto nas células crescidas em meio mineralizante contendo BMP-2 (G7) quanto nas células crescidas neste mesmo meio e irradiadas (G8) houve uma diminuição nos níveis de expressão de *DSPP* do terceiro para o sétimo dia ($p=0,009$). A expressão de *DSPP* nas células nestes grupos aos 14 dias foi similar àquelas observadas aos 3 dias ($p=0,976$).

Adicionalmente, as culturas do grupo G7 apresentaram níveis de expressão de *DSPP* similares às culturas tratadas somente com meio mineralizante (G3) durante todo o tempo experimental.

Quando a FTLBI foi associada a células crescidas em meio mineralizante contendo BMP-2 (G8) a expressão de *DSPP* foi significativamente maior na comparação com as células crescidas no mesmo meio e não irradiadas (G7) aos 3, 7 e 14 dias ($p=3,35E-09$, $p=3,5E-09$ e $p=3,25E-06$, respectivamente).

5.1.2 *DMP-1*

O gene *DMP-1* foi expresso em todos os grupos experimentais durante todo o tempo de cultivo.

A Tabela 5.2 apresenta os resultados numéricos de expressão relativa do gene *DMP-1* nos diferentes grupos e tempos experimentais.

Tabela 5.2 – Expressão relativa do gene *DMP-1* nos diferentes grupos e tempos experimentais

Grupos Experimentais		3 DIAS	7 DIAS	14 DIAS
G1	Meio regular	3,25 ± 0,48 ^{A,a}	7,99 ± 0,94 ^{B,ab}	1,12 ± 0,13 ^{C,a}
G2	Meio regular + laser	5,97 ± 0,62 ^{A,b}	9,32 ± 0,32 ^{B,be}	1,30 ± 0,27 ^{C,a}
G3	Meio mineralizante	1,58 ± 0,04 ^{A,cd}	5,33 ± 0,44 ^{B,c}	6,00 ± 0,50 ^{B,b}
G4	Meio mineralizante + laser	3,36 ± 0,35 ^{A,a}	7,53 ± 0,86 ^{B,ab}	3,42 ± 0,26 ^{A,c}
G5	Meio mineralizante + PDGF	1,98 ± 0,29 ^{A,cd}	5,42 ± 1,18 ^{B,c}	1,74 ± 0,06 ^{A,a}
G6	Meio mineralizante + PDGF + laser	2,30 ± 0,02 ^{A,d}	2,88 ± 0,48 ^{A,d}	4,08 ± 0,32 ^{B,c}
G7	Meio mineralizante + BMP-2	1,25 ± 0,07 ^{A,c}	6,17 ± 0,70 ^{B,cd}	6,14 ± 0,68 ^{B,b}
G8	Meio mineralizante + BMP-2 + laser	1,98 ± 0,06 ^{A,cd}	10,17 ± 0,39 ^{B,e}	8,54 ± 0,09 ^{C,d}

* letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tempos no mesmo grupo experimental

* letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos no mesmo tempo experimental

DMP-1 - Meio Regular

A expressão do gene *DMP-1* tanto nas células crescidas em meio regular (G1) quanto nas células crescidas neste mesmo meio e irradiadas (G2) aumentou significativamente ao longo do tempo experimental (para G1: $p=0,0002$ entre 3 e 7 dias, $p=0,013$ entre 3 e 14 dias e $p=2,45E-05$ entre 7 e 14 dias; para G2: $p=0,0001$ entre 3 e 7 dias, $p=2,86E-05$ entre 3 e 14 dias e $p=1,32E-06$ entre 7 e 14 dias).

Quando comparadas ao grupo tratado com meio mineralizante (G3), as células do grupo G1 expressaram *DMP-1* em níveis significativamente maiores em 3 e 7 dias ($p=0,0002$ e $p=0,07$, respectivamente) e menores em 14 dias ($p=2,74E-10$).

As células cultivadas em meio regular e irradiadas (G2) apresentaram níveis de expressão do gene *DMP-1* significativamente maiores que aqueles das células crescidas no mesmo meio e não irradiadas (G1) apenas em 3 dias ($p=3,91E-07$). Adicionalmente, as células do grupo G2 apresentaram níveis do *DMP-1* significativamente maiores em 3 e 7 dias ($p=3,57E-10$ e $p=0,0001$) e menores aos 14 dias ($p=4,64E-10$) em relação às células tratadas com meio mineralizante (G3)

DMP-1 - Meio mineralizante

A expressão do gene *DMP-1* nas células crescidas em meio mineralizante (G3), aumentou significativamente do terceiro para o sétimo dia ($p=5,22E-05$) e esse aumento se manteve estável aos 14 dias ($p=0,165$). Já as células crescidas no

mesmo meio e irradiadas (G4) apresentaram aumento significativo na expressão aos 7 dias ($p=0,0002$) e diminuição significativa aos 14 dias ($p=0,0002$) atingindo os mesmos níveis observados aos 3 dias.

As células tratadas com meio mineralizante (G3), expressaram o gene *DMP-1* em níveis significativamente menores em 3 e 7 dias ($p=0,0002$ e $p=0,007$) e maiores em 14 dias ($p=2,74E-10$) em relação às células crescidas no meio regular (G1).

Quando as culturas tratadas com meio mineralizante foram irradiadas (G4), a expressão do gene *DMP-1* foi significativamente maior do que a observada nas células crescidas no mesmo meio e não irradiadas (G3) em 3 e 7 dias ($p=9,74E-05$ e $p=0,031$) e menor em 14 dias ($p=2,63E-06$).

DMP-1 - Meio mineralizante + PDGF-BB

As células crescidas em meio mineralizante contendo PDGF-BB (G5) apresentaram aumento significativo de expressão do gene *DMP-1* de 3 para 7 dias ($p<0,01$) e diminuição aos 14 dias ($p<0,01$), quando estes níveis se igualaram àqueles observados aos 3 dias ($p=0,05$). As células que foram tratadas com o mesmo meio e irradiadas (G6) apresentaram níveis de expressão do gene *DMP-1* estáveis de 3 para 7 dias ($p>0,05$) com aumento significativo aos 14 dias ($p<0,01$).

A adição de PDGF-BB ao meio mineralizante (G5) levou a uma expressão significativamente menor do *DMP-1* quando comparada com o grupo de meio mineralizante (G3) somente aos 14 dias ($p=2,12E-09$).

As células crescidas em meio mineralizante contendo PDGF e irradiadas (G6), apresentaram níveis de expressão de *DMP-1* significativamente menores aos 7 dias ($p=0,01$) e maiores aos 14 dias ($p=9,78E-06$) quando comparadas às células do mesmo grupo não irradiadas.

A expressão do *DMP-1* no grupo G5 foi significativamente menor que aquelas de todos os demais grupos experimentais aos 14 dias, exceto os dois grupos tratados com meio regular.

DMP-1 - Meio mineralizante + BMP-2

A expressão do *DMP-1* nas células crescidas em meio mineralizante contendo BMP-2 (G7) aumentou significativamente do terceiro para o sétimo dia ($p=9,91E-05$) e se manteve estável aos 14 dias nos mesmos níveis observados em 7 dias ($p=0,998$). As células cultivadas no mesmo meio e irradiadas (G8) apresentaram

aumento significativo de expressão de DMP-1 do terceiro para o sétimo dia ($p=2,55E-07$) e diminuição significativa de 7 para 14 dias ($p=0,0003$), quando expressaram níveis maiores que aqueles observados aos 3 dias ($p=3,01E-07$).

As culturas do grupo G7 apresentaram níveis de expressão do *DMP-1* similares às culturas tratadas com meio mineralizante (G3) durante todo o tempo experimental.

Quando a FTLBI foi aplicada às células crescidas me meio mineralizante contendo BMP-2 (G8) os níveis de expressão do *DMP-1* foram significativamente maiores aos 7 e 14 dias que os das células crescidas no mesmo meio e não irradiadas (G7) ($p=9,44E-06$ e $p=3,15E-06$, respectivamente) e os das células crescidas em meio mineralizante (G3) ($p=0,00009$ e $p=6,75E-06$, respectivamente)

5.1.3 OCN

O gene *OCN* foi expresso em todos os grupos experimentais durante todo o tempo experimental.

A Tabela 5.3 apresenta os resultados numéricos de expressão relativa do gene *OCN* nos diferentes grupos e tempos experimentais.

Tabela 5.3 – Expressão relativa do gene *OCN* nos diferentes grupos e tempos experimentais

Grupos Experimentais		3 DIAS	7 DIAS	14 DIAS
G1	Meio regular	$3,57 \pm 0,16^{A,ab}$	$2,11 \pm 0,44^{B,abc}$	$1,71 \pm 0,43^{B,a}$
G2	Meio regular + laser	$4,95 \pm 0,78^{A,bc}$	$3,53 \pm 0,47^{B,be}$	$1,99 \pm 0,36^{C,ab}$
G3	Meio mineralizante	$2,81 \pm 0,26^{A,a}$	$1,82 \pm 0,19^{A,ac}$	$4,94 \pm 0,83^{B,cd}$
G4	Meio mineralizante + laser	$5,67 \pm 0,65^{A,c}$	$4,08 \pm 1,42^{A,d}$	$4,44 \pm 0,03^{A,c}$
G5	Meio mineralizante + PDGF	$2,15 \pm 0,02^{A,a}$	$1,15 \pm 0,008^{B,a}$	$1,67 \pm 0,67^{B,a}$
G6	Meio mineralizante + PDGF + laser	$2,48 \pm 0,18^{A,a}$	$1,94 \pm 0,15^{A,abc}$	$3,86 \pm 0,67^{B,bc}$
G7	Meio mineralizante + BMP-2	$3,03 \pm 0,88^{A,a}$	$3,50 \pm 0,30^{A,be}$	$5,64 \pm 0,95^{B,cd}$
G8	Meio mineralizante + BMP-2 + laser	$5,31 \pm 1,14^{A,bc}$	$3,16 \pm 0,15^{B,bce}$	$6,94 \pm 1,39^{C,d}$

* letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tempos no mesmo grupo experimental

* letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos no mesmo tempo experimental

OCN - Meio Regular

A expressão do gene *OCN* diminuiu significativamente nas células crescidas em meio regular (G1) de 3 para 7 dias ($p=0,007$) e estabilizou aos 14 dias nos mesmos níveis observados aos 7 dias ($p=0,431$). As células crescidas em meio regular e irradiadas (G2) apresentaram diminuição significativa do gene *OCN* durante todo o tempo experimental ($p=0,049$ entre 3 e 7 dias, $p=0,002$ entre 3 e 14 dias e $p=0,038$ entre 7 e 14 dias);

As células cultivadas em meio regular (G1) expressaram níveis do *OCN* similares em 3 e 7 dias ($p=0,815$ e $p=0,998$, respectivamente) e significativamente menores que aquelas das células tratadas com meio mineralizante (G3) somente aos 14 dias ($p=0,002$).

Níveis similares de expressão do *OCN* foram observados nas células do grupo G1 quando comparadas às células crescidas no mesmo meio e irradiadas (G2) aos 3, 7 e 14 dias de experimento ($p=0,203$, $p=0,109$ e $p=1,00$, respectivamente).

OCN - Meio mineralizante

Nas culturas tratadas com o meio mineralizante (G3) houve aumento significativo da expressão de *OCN* apenas em 14 dias ($p=0,006$ entre 3 e 14 dias e $p=0,001$ entre 7 e 14 dias). As células crescidas no mesmo meio e irradiadas (G4) apresentaram níveis de expressão de *OCN* similares durante todo o tempo experimental ($p=0,156$ entre 3 e 7 dias, $p=0,013$ entre 3 e 14 dias e $p=0,001$ entre 7 e 14 dias).

As células tratadas com meio mineralizante (G3) expressaram níveis do *OCN* similares em 3 e 7 dias ($p=0,815$ e $p=0,998$, respectivamente) e significativamente maiores em 14 dias ($p=0,02$) em relação às células crescidas no meio regular (G1)

As culturas tratadas com meio mineralizante e irradiadas (G4) apresentaram níveis de expressão do *OCN* significativamente maiores que os das células crescidas no mesmo meio e não irradiadas (G3) em 3 e 7 dias ($p=0,001$ e $p=0,003$, respectivamente). Aos 14 dias, células de ambos os grupos apresentaram níveis de expressão de *OCN* similares ($p=0,99$).

OCN - Meio mineralizante + PDGF-BB

Nas culturas tratadas com o meio mineralizante e PDGF-BB (G5) houve diminuição significativa da expressão do OCN do terceiro para o sétimo dia ($p=0,045$) e aos 14 dias esta expressão estabilizou nos mesmos níveis observados em 7 dias ($p=0,297$). Quando a FTLBI foi realizada nas células crescidas no mesmo meio (G6) houve um aumento significativo na expressão do OCN somente em 14 dias ($p<0,015$ entre 3 e 14 dias e $p=0,003$ entre 7 e 14 dias).

Os níveis de expressão do OCN nas células crescidas em meio mineralizante contendo PDGF-BB (G5) foi significativamente menor que aqueles das células crescidas no mesmo meio e irradiadas (G6) e das cultivadas em meio mineralizante (G3) somente em 14 dias ($p=0,045$ e $p=0,002$).

OCN - Meio mineralizante + BMP-2

Nas culturas tratadas com o meio mineralizante e BMP-2 (G7) os níveis de expressão do OCN foram similares em 3 e 7 dias ($p=0,735$) e aumentaram significativamente em 14 dias ($p=0,014$ entre 3 e 14 dias e $p=0,033$ entre 7 e 14 dias). As células crescidas no mesmo meio e submetidas à FTLBI (G8) apresentaram diminuição significativa dos níveis de expressão do OCN do terceiro para o sétimo dia ($p=0,033$). Aos 14 dias houve um aumento significativo desta expressão ($p=0,024$ entre 3 e 14 dias e $p=0,01$ entre 7 e 14 dias).

A expressão do OCN em células crescidas em meio mineralizante contendo BMP-2 (G7) foi significativamente maior que aquela observada nas células cultivadas em meio mineralizante (G3) somente em 7 dias ($p=0,038$).

Quando a FTLBI foi realizada nas células crescidas em meio mineralizante contendo BMP-2 (G8) a expressão do OCN foi significativamente maior em relação à expressão observada nas células crescidas no mesmo meio e não irradiadas (G7) somente em 3 dias ($p=0,08$).

5.2 Atividade da fosfatase alcalina

A Tabela 5.4 apresenta os resultados numéricos da atividade de fosfatase alcalina (ALP) nos diferentes grupos e tempos experimentais.

Tabela 5.4 – Atividade da fosfatase alcalina nos diferentes grupos e tempos experimentais

Grupos Experimentais		3 DIAS	7 DIAS	14 DIAS
G1	Meio regular	119,92 ± 3,10 ^{A,ac}	42,43 ± 3,38 ^{B,a}	64,97 ± 3,09 ^{B,a}
G2	Meio regular + laser	22,42 ± 2,97 ^{A,b}	16,31 ± 5,73 ^{A,b}	64,81 ± 1,31 ^{B,a}
G3	Meio mineralizante	80,40 ± 18,35 ^{A,ac}	21,29 ± 1,08 ^{B,bc}	6,46 ± 0,85 ^{B,b}
G4	Meio mineralizante + laser	125,46 ± 2,54 ^{A,ad}	16,25 ± 4,22 ^{B,b}	5,81 ± 0,13 ^{C,b}
G5	Meio mineralizante + PDGF	49,33 ± 8,84 ^{A,bc}	5,75 ± 2,14 ^{B,d}	2,21 ± 1,63 ^{B,b}
G6	Meio mineralizante + PDGF + laser	135,42 ± 21,21 ^{A,d}	6,01 ± 1,93 ^{B,d}	3,13 ± 0,88 ^{B,b}
G7	Meio mineralizante + BMP-2	158,19 ± 20,97 ^{A,d}	26,16 ± 0,19 ^{B,c}	4,58 ± 1,11 ^{B,b}
G8	Meio mineralizante + BMP-2 + laser	232,48 ± 35,96 ^{A,e}	25,84 ± 1,86 ^{B,c}	-7,65 ± 1,40 ^{B,c}

* letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tempos no mesmo grupo experimental

* letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos no mesmo tempo experimental

Atividade ALP - Meio regular

Nas células crescidas em meio regular (G1) a atividade de ALP diminuiu significativamente em 7 dias ($p=4,22E-07$) e essa atividade se manteve estável em 14 dias nos mesmos níveis observados aos 7 dias. As células tratadas com o mesmo meio e irradiadas (G2) apresentaram níveis de atividade de ALP similarmente baixos em 3 e 7 dias ($p=0,202$), que aumentaram significativamente em 14 dias ($p=2,37E-05$ e $p=0,0003$).

Quando comparadas ao grupo tratado com meio mineralizante (G3) as células do grupo G1 apresentaram níveis de atividade de ALP similares em 3 dias ($p=0,20$) e significativamente maiores em 7 dias ($p=6,07E-06$) e 14 dias ($p=1,23E-12$).

As células cultivadas em meio regular e irradiadas (G2) apresentaram menor atividade de ALP em 3 dias ($p=0,0001$) e 7 dias ($p=3,47E-07$) e similar aos 14 dias ($p>0,05$) em comparação às células crescidas no mesmo meio e não irradiadas (G1).

Atividade ALP - Meio mineralizante

Nas células crescidas em meio mineralizante (G3) a atividade de ALP diminuiu significativamente em 7 dias ($p<0,01$) mantendo-se estável aos 14 dias nos mesmos valores de 7 dias ($p=0,27$). Já nas células do mesmo grupo e irradiadas (G4) essa diminuição aconteceu progressivamente ao longo do tempo experimental

($p=2,52E-07$ entre 3 e 7 dias, $p=2,49E-07$ entre 3 e 14 dias e $p=0,01$ entre 7 e 14 dias).

Em relação às células crescidas no meio regular (G1), as células tratadas com meio mineralizante (G3), apresentaram níveis de atividade de ALP similares aos 3 dias ($p=0,20$) e significativamente menores aos 7 dias ($p=6,07E-06$) e aos 14 dias ($p=1,2E-12$).

Quando as células tratadas com meio mineralizante foram irradiadas (G4), não houve diferença nos níveis de atividade de ALP em relação às mesmas células não irradiadas (G3) durante todo o tempo experimental ($p=0,10$ em 3 dias, $p=0,50$ em 7 dias e $p=0,99$ em 14 dias).

Atividade de ALP - Meio mineralizante + PDGF-BB

As células crescidas em meio mineralizante contendo PDGF-BB (G5) e irradiadas (G6) apresentaram a maior atividade de ALP aos 3 dias. Aos 7 dias houve diminuição significativa ($p=0,0001$ e $p=3,34E-05$, respectivamente), quando houve estabilização aos 14 dias nos mesmos valores de 7 dias ($p=0,710$ e $p=0,956$).

A adição de PDGF-BB ao meio mineralizante (G5) levou a níveis de atividade de ALP significativamente menores quando comparado com o grupo tratado com meio mineralizante sem PDGF (G3) somente em 7 dias ($p=0,0002$). Nos demais períodos, ou seja, 3 e 14 dias os valores foram similares ($p=0,45$ e $p=0,56$, respectivamente).

Quando as células crescidas em meio mineralizante contendo PDGF-BB foram irradiadas (G6) a atividade de ALP foi significativamente maior que as do grupo não irradiado (G5) apenas em 3 dias ($p=0,01$). Nos demais períodos 7 e 14 dias os valores foram similares ($p=1,00$ e $p=0,99$, respectivamente).

Atividade de ALP – Meio mineralizante + BMP-2

Tanto as células crescidas em meio mineralizante contendo BMP-2 (G7) quanto as crescidas no mesmo meio e irradiadas (G8) apresentaram a maior atividade de ALP em 3 dias havendo diminuição significativa em 7 dias ($p=2,72E-05$ e $p=4,64E-05$). Para ambos os grupos, os valores obtidos em 7 dias se mantiveram aos 14 dias.

As culturas tratadas com meio mineralizante contendo BMP-2 apresentaram níveis de atividade de ALP significativamente maiores em relação às culturas tratadas desprovidas de BMP-2 (G3) em 3 dias ($p=0,002$).

Quando a FTLBI foi realizada nas células crescidas em meio mineralizante contendo BMP-2 (G8) os níveis de atividade de ALP foram significativamente maiores aos 3 dias ($p=0,002$), similares aos 7 dias ($p=1,00$) e significativamente menores aos 14 dias ($p=8,39E-07$) em relação às células do mesmo grupo não irradiadas (G7).

Vale ressaltar que os valores de atividade de ALP no G8 foi significativamente maiores em 3 dias e menores em 14 dias que os de todos os demais grupos experimentais.

5.3 Análise do depósito de cálcio

5.3.1 Análise qualitativa do depósito de cálcio

A distribuição e morfologia dos depósitos de cálcio corados pelo vermelho de alizarina, quando presentes, nas culturas de todos os grupos experimentais aos 14 dias do experimento estão ilustradas na Figura 5.1.

A análise qualitativa da formação dos depósitos de cálcio realizadas no 3º, 7º e no 14º dia mostrou diferenças na quantidade e na forma dos depósitos de cálcio formados entre os grupos experimentais.

As culturas crescidas em meio regular irradiadas ou não (G2 e G1, respectivamente) não apresentaram áreas de formação de depósitos de cálcio visíveis ao microscópio de luz durante todo o tempo experimental, inclusive aos 14 dias (Figuras 5.1A e 5.1B, respectivamente).

As culturas tratadas com meio mineralizante irradiadas ou não (G4 e G3, respectivamente) apresentaram, em especial em 14 dias (Figuras 5.1C e 5.1D), depósitos de cálcio bem definidos e mais fáceis de serem detectados nas imagens de microscopia de luz do que nos grupos tratados com meio mineralizante e PDGF-BB (G5 e G6) e aquele contendo BMP-2 e não irradiado (G7). Nestes grupos (G5,

G6 e G7) era possível se evidenciar depósitos de cálcio especialmente aos 14 dias (Figuras 5.1E, 5.1F e 5.1G, respectivamente).

As culturas crescidas em meio mineralizante contendo BMP-2 e irradiadas (G8) se destacaram em maior quantidade de depósitos de cálcio observados nas imagens de microscopia de luz. Em geral, esses depósitos eram bem menores e menos definidos, quando comparados aos outros grupos onde o meio mineralizante foi utilizado (G3 a G7), e apareciam dispersos por quase que toda a superfície da cultura (Figura 5.1H).

Figura 5.1 – Fotografia aos 14 dias do experimento para detecção dos depósitos de cálcio evidenciados pela reação de vermelho de alizarina para células cultivadas em meio regular (A), meio regular e tratadas com FTLBI (B), meio mineralizante (C), meio mineralizante e tratadas com FTLBI (D), meio mineralizante contendo PDGF-BB (E), meio mineralizante contendo PDGF-BB e tratadas com FTLBI (F), meio mineralizante contendo BMP-2 (G), meio mineralizante contendo BMP-2 e tratadas com FTLBI (H). (Microscopia de fase, coloração vermelho de alizarina, aumento original de 40x)

5.3.2 Análise quantitativa do depósito de cálcio

A Tabela 5.5 apresenta os resultados numéricos de densidade óptica da coloração com vermelho de alizarina nos diferentes grupos e tempos experimentais.

Tabela 5.5 – Resultados numéricos de densidade óptica da coloração com vermelho de alizarina nos diferentes grupos e tempos experimentais. nos diferentes grupos e tempos experimentais

Grupos Experimentais		3 DIAS	7 DIAS	14 DIAS
G1	Meio regular	0,049±0,012 ^{A,a}	0,076±0,002 ^{B,ab}	0,067±0,004 ^{AB,a}
G2	Meio regular + laser	0,042±0,007 ^{A,a}	0,077±0,004 ^{B,ab}	0,069±0,002 ^{B,a}
G3	Meio mineralizante	0,050±0,000 ^{A,a}	0,067±0,003 ^{A,ac}	0,419±0,088 ^{B,b}
G4	Meio mineralizante + laser	0,104±0,069 ^{A,a}	0,080±0,000 ^{A,b}	0,510±0,084 ^{B,b}
G5	Meio mineralizante + PDGF	0,043±0,007 ^{A,a}	0,074±0,001 ^{B,abc}	0,213±0,014 ^{C,c}
G6	Meio mineralizante + PDGF + laser	0,112±0,084 ^{A,a}	0,063±0,005 ^{A,cd}	0,280±0,045 ^{B,c}
G7	Meio mineralizante + BMP-2	0,043±0,007 ^{A,a}	0,061±0,007 ^{A,cd}	0,226±0,031 ^{B,c}
G8	Meio mineralizante + BMP-2 +laser	0,042±0,007 ^{A,a}	0,053±0,007 ^{A,d}	0,996±0,007 ^{B,d}

* letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tempos no mesmo grupo experimental

* letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos no mesmo tempo experimental

14 Dias

As 14 dias, os depósitos de cálcio foram mais evidentes nos grupos onde o meio mineralizante foi utilizado, ou seja, onde foi realizada a indução ósseo/odontogênica. As culturas crescidas em meio regular e irradiadas (G2) ou não (G1) apresentaram níveis de depósitos de cálcio significativamente menores que todos os outros grupos ().

Os grupos crescidos em meio mineralizante (G3 e G4) apresentaram valores de densidade óptica que representaram os níveis de depósitos de cálcio superiores às de todos os outros grupos experimentais, exceto o grupo tratado com meio mineralizante contendo BMP-2 e irradiado (G8).

As culturas crescidas em meio mineralizante contendo PDGF-BB irradiados ou não (G6 e G5, respectivamente) e as culturas crescidas em meio mineralizante contendo BMP-2 e não irradiado (G7) apresentaram quantidades similares de depósitos de cálcio entre si e significativamente menores que aquelas dos grupos crescidos com meio mineralizante (G3 e G4) e do grupo G8, onde as células foram crescidas em meio mineralizante contendo BMP-2 e foram irradiadas. Os valores de densidade óptica destes grupos G5, G6 e G7 só foram maiores que aquelas dos grupos crescidos em meio regular (G1 e G2).

Os maiores níveis de depósitos de cálcio foram observados nas culturas celulares crescidas em meio mineralizante contendo BMP-2 e irradiadas (G8), sendo significativamente superiores a de todos os outros grupos experimentais em 7 e 14 dias.

6 DISCUSSÃO

O processo de diferenciação das células pulpares indiferenciadas é assunto de extrema relevância na Dentística, especialidade da Odontologia que visa primordialmente manter a vitalidade pulpar. A agressão aos odontoblastos, quer seja por cárie ou pelos procedimentos operatórios sobre os tecidos dentais, leva à morte destas células e a diferenciação de células-tronco residentes na polpa dentária passa a ser um processo vital para a manutenção da fisiologia pulpar. Além dos procedimentos clínicos clássicos que visam favorecer esta diferenciação, existem outras terapias que podem ser aplicadas como coadjuvante para favorecer a diferenciação das células-tronco de polpa dentária, como a fototerapia com laser em baixa intensidade (FTLBI) e fatores de crescimento. No entanto, pouco se sabe sobre o efeito destas terapias, associadas ou isoladas, sobre a diferenciação de células indiferenciadas da polpa dentária humana. Assim sendo, este estudo se propôs a estudar o efeito da FTLBI em associação ou não a fatores de crescimento (BMP-2 e PDGF-BB) no processo de diferenciação das células-tronco de polpa dentária humana. Sabe-se que a FTLBI é capaz de aumentar o metabolismo celular incrementando a síntese de proteínas e ativação de enzimas e, portanto, poderia favorecer ou até mesmo acelerar a diferenciação ósseo/odontogênica das células-tronco de polpa dentária. Adicionalmente, é sabido que o PDGF-BB é um fator de crescimento presente na polpa dental que está envolvido na dentinogênese e na reparação tecidual atuando principalmente no crescimento e na migração celular. Por outro lado, o fator de crescimento BMP-2 está fortemente associado à diferenciação celular em tecidos mineralizados como o osso e a dentina. No presente estudo foi demonstrado que a FTLBI foi capaz de modular a ação de ambos os fatores de crescimento estudados favorecendo o processo de diferenciação, em especial, quando associada ao BMP-2.

As células utilizadas no estudo foram extraídas de polpa de dente decíduo e mantidas em meio de cultura adequado para obtenção, manutenção e expansão de células em estágio indiferenciado. Esse meio continha soro Hyclone cuja principal característica é a presença de fatores de crescimento definidos, ao contrário do soro fetal bovino comum que apresenta fatores de crescimento variáveis de acordo com o lote. O controle de todos os componentes do meio de cultura, principalmente do soro

que contém os fatores de crescimento, permite um maior controle do estágio indiferenciado das células durante o cultivo. Por este motivo, a utilização deste soro foi mantida em todas as fases deste estudo.

As células utilizadas neste estudo foram c-kit positivas. O c-kit é um marcador de superfície de membrana de células-tronco mesenquimais (Laino et al., 2005). Na polpa dental existem nichos de células com diferentes graus de diferenciação a exemplo das células-tronco adultas verdadeiras que tem propriedade de auto-renovação e alta capacidade de diferenciação, as células-tronco adultas progenitores com alta capacidade proliferativa, porém já mais comprometidas com determinado destino de diferenciação, e as células pulpares já diferenciadas (Sloan; Waddington, 2009). Sendo assim, a marcação com c-kit foi necessária para demonstrar um estágio mais indiferenciado das células utilizadas no estudo.

O termo diferenciação ósseo/odontogênica foi escolhido em função da propriedade das células-tronco de polpas dentárias humanas (*human dental pulp stem cells*- hDPSCs) de se diferenciarem tanto em osteoblastos (Yokose et al., 2004; Park et al., 2009; Laino et al., 2005) quanto odontoblastos *in vitro*. Adicionalmente, estas células são capazes de formarem tecido ósseo (Batouli et al., 2003; d'Aquino et al., 2007), dentina tubular (Gronthos et al., 2000; Gronthos et al., 2002) e dentina reparativa (Yu et al., 2007; Sloan; Waddington, 2009) *in vivo*. Além disso, o meio de diferenciação utilizado no estudo continha de dexametasona, β -glicerofosfato e ácido ascórbico, substâncias classicamente utilizadas em estudos para diferenciação osteogênica (Park et al., 2009; Li et al., 2010). Entretanto, os mesmos componentes são também utilizados para diferenciação odontogênica (Min et al., 2011; Wei et al., 2007).

Para a análise de diferenciação optamos por fazer três tipos de testes, um molecular, um enzimático e um morfológico. De fato lançamos mão de uma técnica de biologia molecular que é a do PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) para detectar e quantificar a expressão de 3 genes ligados à diferenciação ósseo/odontogênica, a saber: o *DSPP*, o *DMP-1* e o *OCN* (Iohara et al., 2004; Iohara 2006; Wei et al., 2007; Casagrande et al., 2011; Lei et al., 2011), e um teste de atividade de fosfatase alcalina (ALP), que foi complementado com a evidênciação de formação de depósitos de cálcio.

O aumento da expressão dos genes que codificam proteínas da matriz dentinária (*DSPP*, *DMP-1* e *OCN*) pelas células utilizadas na engenharia de tecidos

com vistas à produção de dentina poderia contribuir muito para o sucesso dessa terapia. Isso porque, assim como os fatores de crescimento que são incorporados na matriz dentinária durante a dentinogênese (Smith et al., 2001; Tziafas, 1995), essas proteínas da matriz são liberadas da matriz dentinária desmineralizada por cáries, agentes condicionadores ácidos ou materiais de capeamento pulpar e podem contribuir para diferenciação das hDPSCs, que já estão no próprio tecido, em células produtoras de matriz dentinária e na secreção de matriz mineralizável (Ferracane et al., 2010).

A ALP é uma enzima que atua na mineralização da matriz orgânica e, portanto, sua atividade está relacionada com alta atividade celular mineralizante (Balcerzak et al., 2003). Os resultados da análise de atividade da ALP, da detecção de depósitos de cálcio e dos padrões de expressão dos genes que codificam as proteínas da matriz extracelular da dentina dos diversos grupos experimentais foram de importância para confirmar o impacto dos diferentes tratamentos sobre as hDPSCs.

As hDPSCs crescidas em meio regular expressaram diferentes níveis dos genes relacionados às proteínas constitutivas estudadas tanto da matriz óssea (*OCN*) como da matriz de dentina (*OCN*, *DSPP* e *DMP-1*). Isso significa que, quando cultivadas em meio regular, ou seja, sem nenhum tipo de indução e diferenciação, naturalmente essas células produzem RNA mensageiro para secreção de proteínas constitutivas da matriz óssea e dentinária. Esse resultado poderia ser um indicativo que as células-tronco utilizadas neste estudo devem ser células-tronco mesenquimais já comprometidas com a diferenciação ósseo/odontogênica. No entanto, em 14 dias, os níveis de expressão dos genes que codificam estas proteínas constitutivas diminuíram. Provavelmente, isto ocorreu em função da ausência dos nutrientes necessários no meio de cultura para que ocorra a maturação e mineralização dessas proteínas. Tal fato pode estar contribuindo para inibição (*downregulation*) da expressão desses genes, já que quando crescidas em meio mineralizante, onde estes suplementos são oferecidos às células, os níveis de expressão desses genes aumentaram com o tempo.

Interessantemente, a FTLBI foi capaz de aumentar os níveis de expressão dos genes estudados, em alguns momentos do tempo experimental, exceto para o gene *OCN*. Nas células cultivadas em meio regular e irradiadas, a expressão do *DSPP* foi maior em 3 e 7 dias, enquanto para o gene *DMP-1* o aumento aconteceu

em 3 dias. Embora a FTLBI possa ter influenciado a expressão dos genes de estudo de maneira a favorecer a diferenciação hDPSCs, não houve produção de nódulos de mineralização como demonstrado no experimento de análise de depósitos de cálcio. Isso porque, diferentemente do meio mineralizante, o meio regular não contém os elementos necessários para a mineralização da matriz.

O meio mineralizante utilizado no estudo foi capaz de induzir diferenciação ósseo/odontogênica completa das hDPSCs, ou seja, não só os genes estudados tiveram aumento de expressão no decorrer do tempo experimental, como também houve formação de depósitos minerais. As células crescidas em meio mineralizante apresentaram níveis de expressão dos genes estudados diferentes das células crescidas em meio regular em função do tempo. Em geral, nas culturas tratadas com meio mineralizante, os níveis de expressão dos genes *DSPP*, *DMP-1* e *OCN* aumentaram ao longo do tempo e apresentaram expressão máxima aos 14 dias. Tais resultados concordam com os estudos de Wei et al. (2007) e Min et al. (2011) realizados em culturas de células de polpa humana adulta induzidas à diferenciação odontogênica com os mesmos componentes utilizados no nosso estudo, ou seja, dexametasona, β -glicerofosfato e ácido ascórbico.

No presente estudo, a FTLBI influenciou de forma positiva a diferenciação ósseo/odontogênica das hDPSCs quando tratadas em meio mineralizante. A FTLBI foi capaz de adiantar essa diferenciação já que a maior expressão dos genes *DMP-1*, *DSPP* e *OCN* em relação às células crescidas em meio mineralizante e não irradiadas já ocorreu no 3º e no 7º dia. Sendo assim, o meio mineralizante levou a uma diferenciação óssea/odontogênica mais evidente aos 14 dias e, quando essas células foram irradiadas, essa diferenciação ocorreu mais cedo.

Os efeitos produzidos pela FTLBI dependem tanto dos parâmetros utilizados (Pereira et al., 2002) e do tipo celular irradiado, quanto do estado fisiológico da célula no momento da irradiação (Marques et al., 2010) e, portanto, padronizamos para este estudo a FTLBI com o comprimento de onda vermelho (660nm) e densidade de energia de 5J/cm². Na verdade, em estudo anterior foi sugerido que esta densidade de energia poderia ser mais relacionada com diferenciação celular do que com proliferação (Pereira et al., 2002). Adicionalmente, essa densidade de energia foi capaz de facilitar a diferenciação miogênica das células-tronco mesenquimais da medula-óssea (BMMSCs) *in vitro* (Hou et al., 2008) e de aumentar a expressão de β -integrina em células-tronco adiposas (ADSCs) (Mvula et al., 2008).

Provavelmente, essa também seja uma janela de bioestimulação para as DPSCs. daquelas encontradas para outros tipos de células-tronco mesenquimais. Não há nenhum relato na literatura mostrando os efeitos da FTLBI na diferenciação das hDPSCs células *in vitro*, sob indução de meio de diferenciação. Entretanto, os efeitos positivos da FTLBI sobre a diferenciação ósseo/odontogênica já foram vistos em outros tipos celulares (Fujimoto et al., 2010; Hirata et al., 2010).

O PDGF pode contribuir na engenharia tecidual em função suas propriedades mitogênica (Escobedo; Williams, 1988; Ross et al., 1990), quimiotática (Rönstrand; Heldin, 2001), angiogênica (Tran-Hung et al., 2008) e reguladora da mineralização dos tecidos (Yokose et al., 2004). Este estudo confirmou o papel de uma isoforma deste fator de crescimento, o PDGF-BB, na modulação da expressão de genes relacionados à diferenciação odontogênica, bem como na formação de depósito de cálcio. Quando o PDGF-BB foi adicionado ao meio mineralizante os níveis de expressão dos genes que codificam proteínas indicadoras de diferenciação (*DSPP*, *DMP-1* e *OCN*) foram menores aos 14 dias quando comparados aos níveis de expressão nas células crescidas em meio mineralizante desprovido de PDGF-BB. Além disso, a adição de PDGF-BB ao meio mineralizante diminui a atividade da ALP em 3 dias e inibiu a formação de depósitos de cálcio. Esses resultados concordam com o estudo de Yokose et al., 2004 que mostraram diminuição da expressão do gene *OCN* e de atividade da ALP, além de inibir a formação de nódulos de mineralização (Yokose et al., 2004). Sendo assim, o uso de PDGF-BB poderia ser indicado quando se quer um incremento da regeneração pulpar e, ao mesmo tempo, o controle da formação do tecido mineralizado.

Alguns efeitos da FTLBI foram observados quando associada às células crescidas em meio mineralizante contendo PDGF-BB. A FTLBI, em alguns momentos, foi capaz de reverter o efeito supressor do PDGF-BB na expressão dos genes estudados, a exemplo do gene *DSPP* em 3 dias, dos genes *DMP-1* e *OCN* em 14 dias, e na atividade da ALP em 3 dias, embora esse aumento da atividade da ALP não tenha influenciado na deposição de cálcio em 14 dias. Provavelmente, o laser possa estar agindo em outras vias de sinalização celular que contribuem para a diferenciação, como demonstrado pelo estudo realizado por Matsui et al. (2008) quando o laser foi capaz de ativar a via de sinalização dos receptores da BMP-2, favorecendo a diferenciação das hDPSCs.

A BMP-2 pode regular a diferenciação das células de polpa dentária humana para odontoblastos e estimular a formação de dentina (Nakashima, 1994, Nakashima; Reddi, 2003). O papel desta proteína na diferenciação odontoblástica já foi reportado em estudos anteriores, onde este fator de crescimento foi capaz não só de aumentar a expressão gênica do *DSPP* e do *DMP-1* (Iohara et al., 2004), mais também aumentou a ALP e formação de matriz mineralizada (Casagrande et al., 2011). Mais ainda, o BMP-2 mostrou ser determinante para a diferenciação das DPSCs com vistas à produção de dentina, mesmo quando adicionado a meio regular, sem elementos de indução para diferenciação (Casagrande et al., 2011). Surpreendentemente, neste estudo, a adição do BMP-2 ao meio mineralizante não foi capaz de modificar a expressão do *DMP-1* e do *DSPP* das células crescidas em meio mineralizante, uma vez que os níveis de expressão desses genes foram similares às do grupo que não recebeu BMP-2 durante todo o tempo experimental. Apenas aumentou significativamente a expressão de *OCN* em 7 dias em relação às células crescidas em meio mineralizante desprovidas de BMP-2. Isto poderia estar relacionado aos tipos celulares estudados ou às concentrações do BMP-2 presentes nos meios de cultivo dessas células. Como as hDPSCs já demonstraram estar comprometidas com a diferenciação ósseo/odontogênica, talvez a adição do BMP-2 não tenha sido fator primordial para que esta diferenciação ocorresse, como o foi nos demais estudos da literatura. Além disso, pode ter havido discrepâncias nas concentrações de BMP-2 usadas nos diferentes estudos e essas hipóteses deverão ser investigadas no futuro.

Os resultados mais expressivos de diferenciação das hDPSCs encontrados neste estudo foram observados quando da realização da FTLBI nas células crescidas em meio mineralizante contendo BMP-2. De fato, essas células foram as que apresentam os maiores níveis de expressão dos genes *DSPP* e *DMP-1*, de atividade da ALP e de formação de depósitos de cálcio do que todos os demais grupos experimentais.

A irradiação de células crescidas em meio mineralizante e BMP-2 levou a um aumento na expressão de genes específicos da diferenciação odontogênica, o *DMP-1* e o *DSPP*, em relação às células crescidas em BMP-2 e não irradiadas. Considerando que o BMP-2 de forma isolada não foi capaz de induzir mudanças na expressão desses genes e que quando associado à FTLBI houve aumento da expressão de *DMP-1* e *DSPP*, haveria evidências de que a FTLBI seria o fator

determinante para o incremento na diferenciação dessas células sem a interferência do BMP-2. No entanto, quando comparados os resultados das células tratadas com meio mineralizante contendo BMP-2 e irradiadas com aqueles das células crescidas em meio mineralizante sem BMP-2 e irradiadas também foi observado aumento significativo da diferenciação ósseo/odontogênica no grupo com BMP-2. Isso indica que este aumento está intimamente relacionado à associação do BMP-2 à FTLBI, ou seja, o BMP-2 potencializou o efeito da irradiação. Interessantemente, o laser atua na via de sinalização dos receptores da BMP-2. Um estudo mostrou que a irradiação laser é capaz de aumentar a fosforilação da Smads 1, 5 e 8 e expressão de BMP-2, mas não aumenta a expressão de Smads 6 e 7 (Matsui et al, 2008). Adicionalmente, o laser é capaz de aumentar a expressão dos fatores de transcrição que respondem à via de sinalização BMP/Smad aumentando a expressão dos marcadores de diferenciação celular relacionadas ao BMP-2, a exemplo da osteocalcina (Hirata et al., 2010).

Em geral, a FTLBI foi capaz de aumentar a atividade de ALP aos 3 dias, exceto nas células cultivadas em meio regular. A enzima ALP pode funcionar como um cromóforo do laser. Isso porque a ALP é uma enzima homo-dimérica e cada sítio catalítico contém três íons metálicos, dois íons zinco (Zn) e um de magnésio (MG), necessários para atividade enzimática (Millán et al., 2008). De acordo com Levine (2001), cromóforos são moléculas ou elementos que mudam sua energia eletrônica após a absorção de luz. Ainda, os cromóforos para a luz vermelha, em geral são moléculas que contém íons metálicos em sua composição. Sendo assim, a luz laser irradiada durante a FTLBI poderia mudar a conformação molecular da ALP aumentando sua atividade catalítica.

Como mostraram os resultados do vermelho de alizarina, a formação de nódulos de mineralização ocorreu aos 14 dias, bem como foram observadas as maiores quantidades de depósito de cálcio. Considerando-se que a ALP está relacionada ao processo de mineralização (Balcerzak et al., 2003), a maior quantidade de depósito de cálcio ao final do experimento (14 dias) aconteceram nos grupos que apresentaram maiores níveis de ALP no início do tempo experimental (3 dias). Novamente, os resultados mais expressivos ocorreram nas células tratadas com meio mineralizante contendo BMP-2 e irradiadas que apresentou resultados significativamente superiores a todos os outros grupos de atividade de ALP em 3 dias e depósito de cálcio marcadamente maiores aos 14 dias.

Baseados nos resultados deste estudo *in vitro* sugerimos que a utilização de BMP-2 associado à FTLBI poderá constituir terapia coadjuvante promissora não só na engenharia de tecidos, mas também no tratamento de exposições pulpares. Ainda, os resultados apresentados podem ser aplicados futuramente, quer seja em trabalhos onde as hDPSCs semeadas em *scaffolds* e implantadas no organismo possam ser estimuladas *in vivo* a se diferenciarem ou em trabalhos em que as cultura de hDPSCs possam ser implantadas após sua diferenciação *ex vivo* em odontoblastos resultando em grandes quantidades de formação de dentina reparadora.

7 CONCLUSÃO

Nas condições experimentais deste estudo pode-se concluir que:

- A FTLBI foi capaz de influenciar nos níveis de diferenciação de células-tronco de polpa dentária humana. Os níveis de expressão de genes relacionados a proteínas da matriz extracelular da polpa foram aumentados, porém não houve diferenciação funcional destas células quando cultivadas em meio regular.
- Quando a FTLBI foi aplicada às hDPSCs crescidas em meio mineralizante houve influência positiva na diferenciação ósseo/odontogênica dessas células, em especial, quando a FTLBI foi associada ao fator de crescimento BMP-2. Nestas condições houve diferenciação tanto no nível molecular quanto no funcional.

REFERÊNCIAS¹

About I, Murray PE, Franquin JC, Remusat M, Smith AJ. Pulpal inflammatory responses following non-carious class V restorations. *Oper Dent*. 2001 Jul-Aug;26(4):336-42.

Accorinte Mde L, Holland R, Reis A, Bortoluzzi MC, Murata SS, Dezan E Jr, Souza V, Alessandro LD. Evaluation of mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide cement as pulp-capping agents in human teeth. *J Endod*. 2008 Jan;34(1):1-6.

Aeinehchi M, Eslami B, Ghanbariha M, Saffar AS. Mineral trioxide aggregate (MTA) and calcium hydroxide as pulp-capping agents in human teeth: a preliminary report. *Int Endod J*. 2003 Mar;36(3):225-31.

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

Azevedo LH, de Paula Eduardo F, Moreira MS, de Paula Eduardo C, Marques MM. Influence of different power densities of LILT on cultured human fibroblast growth : a pilot study. *Lasers Med Sci*. 2006 Jul;21(2):86-9.

Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med*. 2004 Jul-Sep;8(3):301-16.

Balcerzak M, Hamade E, Zhang L, Pikula S, Azzar G, Radisson J, Bendorowicz-Pikula J, Buchet R. The roles of annexins and alkaline phosphatase in mineralization process. *Acta Biochim Pol*. 2003;50(4):1019-38.

Batouli S, Miura M, Brahim J, Tsutsui TW, Fisher LW, Gronthos S, Robey PG, Shi S. Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis. *J Dent Res*. 2003 Dec;82(12):976-81.

Baum BJ, Mooney DJ. The impact of tissue engineering on dentistry. *J Am Dent Assoc*. 2000 Mar;131(3):309-18.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Baume LJ, Holz J. Long term clinical assessment of direct pulp capping. *Int Dent J*. 1981 Dec;31(4):251-60.

Bègue-Kirn C, Smith AJ, Lorient M, Kupferle C, Ruch JV, Lesot H. Comparative analysis of TGF beta, BMPs, IGF1, msxs, fibronectin, osteonectin and bone sialoprotein gene expression during normal and in vitro-induced odontoblast differentiation. *Int J Dev Biol*. 1994 Sep;38(3):405-20.

Bessho K, Tanaka N, Matsumoto J, Tagawa T, Murata M. Human dentin-matrix-derived bone morphogenetic protein. *J Dent Res*. 1991 Mar;70(3):171-5.

Briso AL, Rahal V, Mestreneur SR, Dezan Junior E. Biological response of pulps submitted to different capping materials. *Braz Oral Res*. 2006 Jul-Sep;20(3):219-25.

Butler WT. Dentin-specific proteins. *Methods Enzymol*. 1987;145:290-303.

Butler WT, D'Souza RN, Bronckers AL, Happonen RP, Somerman MJ. Recent investigations on dentin specific proteins. *Proc Finn Dent Soc*. 1992;88 Suppl 1:369-76.

Butler WT, Ritchie H. The nature and functional significance of dentin extracellular matrix proteins. *Int J Dev Biol*. 1995 Feb;39(1):169-79.

Butler WT, Brunn JC, Qin C, McKee MD. Extracellular matrix proteins and the dynamics of dentin formation. *Connect Tissue Res*. 2002;43(2-3):301-7.

Caplan AL. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1991 Sep;9(5):641-50.

Carlile MJ, Sturrock MG, Chisholm DM, Ogden GR, Schor AM. The presence of pericytes and transitional cells in the vasculature of the human dental pulp: an ultrastructural study. *Histochem J*. 2000 Apr;32(4):239-45.

Casagrande L, Cordeiro MM, Nör SA, Nör JE. Dental pulp stem cells in regenerative dentistry. *Odontology*. 2011 Jan;99(1):1-7.

Cavalcanti BN, Rode SM, Marques MM. Cytotoxicity of substances leached or dissolved from pulp capping materials. *Int Endod J*. 2005;38:505-9.

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

d'Aquino R, Graziano A, Sampaolesi M, Laino G, Pirozzi G, De Rosa A, Papaccio G. Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endotheliocytes: a pivotal synergy leading to adult bone tissue formation. *Cell Death Differ*. 2007 Jun;14(6):1162-71.

Demarco FF, Tarquinio SBC, Jaeger MMM, Araújo VC, Matson E. Pulp response and cytotoxicity evaluation of 2 dentin bonding agents. *Quintessence Int*. 2001;32(3):211-20.

Denholm IA, Moule AJ, Bartold PM. The behaviour and proliferation of human dental pulp cell strains in vitro, and their response to the application of platelet-derived growth factor-BB and insulin-like growth factor-1. *Int Endod J*. 1998 Jul;31(4):251-8.

Eduardo FP, Mehnert DU, Monezi TA, Zezell DM, Schubert MM, Eduardo CP, Marques MM. Cultured epithelial cells response to phototherapy with low intensity laser. *Lasers Surg Med* 2007;39(4):365-72.

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

Escobedo JA, Williams LT. A PDGF receptor domain essential for mitogenesis but not for many other responses to PDGF. *Nature*. 1988 Sep 1;335(6185):85-7.

Feng JQ, Luan X, Wallace J, Jing D, Ohshima T, Kulkarni AB, D'Souza RN, Kozak CA, MacDougall M. Genomic organization, chromosomal mapping, and promoter analysis of the mouse dentin sialophosphoprotein (Dspp) gene, which codes for both dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein. *J Biol Chem*. 1998 Apr 17;273(16):9457-64.

Finkelman RD, Mohan S, Jennings JC, Taylor AK, Jepsen S, Baylink DJ. Quantitation of growth factors IGF-I, SGF/IGF-II, and TGF-beta in human dentin. *J Bone Miner Res*. 1990 Jul;5(7):717-23.

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

Fitzgerald M, Chiego DJ Jr, Heys DR. Autoradiographic analysis of odontoblast replacement following pulp exposure in primate teeth. *Arch Oral Biol*. 1990;35(9):707-15.

Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*. 1976 Sep;4(5):267-74.

Freshney RI. Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications. 6th ed. Hoboken, NJ:Wiley-Blackwell; 2010.

Friedman H, Lubard R. Photostimulation by light-induced cytosolic calcium oscillations. *Laser Ther* 1996;8:137-142.

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

Fujimoto K, Kiyosaki T, Mitsui N, Mayahara K, Omasa S, Suzuki N, Shimizu N. Low-intensity laser irradiation stimulates mineralization via increased BMPs in MC3T3-E1 cells. *Lasers Surg Med*. 2010 Aug;42(6):519-26.

Gala-Garcia A, Teixeira KI, Wykrota FH, Sinisterra RD, Cortés ME. Bioceramic/poly (glycolic)-poly (lactic acid) composite induces mineralized barrier after direct capping of rat tooth pulp tissue. *Braz Oral Res*. 2010 Jan-Mar;24(1):8-14.

Goldberg F, Massone EJ, Spielberg C. Evaluation of the dentinal bridge after pulpotomy and calcium hydroxide dressing. *J Endod*. 1984;10(7):318-20.

Goldberg M, Six N, Decup F, Lasfargues JJ, Salih E, Tompkins K, Veis A. Bioactive molecules and the future of pulp therapy. *Am J Dent*. 2003 Feb;16(1):66-76.

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 Dec 5;97(25):13625-30.

Gronthos S, Brahimi J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, DenBesten P, Robey PG, Shi S. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res*. 2002 Aug;81(8):531-5.

Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, Shi S, Graves SE, Kortessidis A, Simmons PJ. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci.* 2003 May 1;116(Pt 9):1827-35.

Hamblin MR, Demidova-Rice T. Cellular chromophores and signaling in low level light therapy. *SPIE* 2007;6428:1-14.

Heldin CH, Bäckström G, Ostman A, Hammacher A, Rönstrand L, Rubin K, Nistér M, Westermark B. Binding of different dimeric forms of PDGF to human fibroblasts: evidence for two separate receptor types. *EMBO J.* 1988 May;7(5):1387-93.

Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev.* 1999 Oct;79(4):1283-316.

Hirata S, Kitamura C, Fukushima H, Nakamichi I, Abiko Y, Terashita M, Jimi E. Low-level laser irradiation enhances BMP-induced osteoblast differentiation by stimulating the BMP/Smad signaling pathway. *J Cell Biochem.* 2010 Dec 15;111(6):1445-52).

Holland R, Filho JA, de Souza V, Nery MJ, Bernabé PF, Junior ED. Mineral trioxide aggregate repair of lateral root perforations. *J Endod.* 2001 Apr;27(4):281-4.

Hou JF, Zhang H, Yuan X, Li J, Wei YJ, Hu SS. 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 Dec;40(10):726-33.

Hu CC, Zhang C, Qian Q, Tatum NB. Reparative dentin formation in rat molars after direct pulp capping with growth factors. *J Endod.* 1998 Nov;24(11):744-51.

Huang GT, 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 Sep;88(9):792-806.

Ike M, Urist MR. Recycled dentin root matrix for a carrier of recombinant human bone morphogenetic protein. *J Oral Implantol.* 1998;24(3):124-32.

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 Aug;83(8):590-5.

Iohara K, Zheng L, Ito M, Tomokiyo A, Matsushita K, Nakashima M. Side population cells isolated from porcine dental pulp tissue with self-renewal and multipotency for dentinogenesis, chondrogenesis, adipogenesis, and neurogenesis. *Stem Cells*. 2006 Nov;24(11):2493-503.

Jernvall J, Thesleff I. Reiterative signaling and patterning during mammalian tooth morphogenesis. *Mech Dev*. 2000 Mar 15;92(1):19-29.

Kaigler D, Mooney D. Tissue engineering's impact on dentistry. *J Dent Educ*. 2001 May;65(5):456-62.

Karu TI. Molecular mechanisms of therapeutic effect of low-intensity laser radiation. *Laser Life Sci* 1988; 2:53-74.

Karu T. Photobiology of low-power laser effects. *Health Phys*. 1989 May;56(5):691-704.

Karu T. Mechanisms of interaction of monochromatic light with cells. In: Karu T, Young AR, eds. *Effects of low power light on biological systems*. Washington, DC: Proceedings of the European Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers 1996;2630:2-9.

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

Kawabata M, Imamura T, Miyazono K. Signal transduction by bone morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev*. 1998 Mar;9(1):49-61.

Klebanov GI, Kreinina MV, Poltanov EA, Khristoforova TV, Vladimirov YA. Mechanism of therapeutic effect of low-intensity infrared laser radiation. *Bull Exp Biol Med*. 2001 Mar;131(3):239-41.

Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther*. 2007;9(1):204.

Koyama N, Okubo Y, Nakao K, Bessho K. Evaluation of pluripotency in human dental pulp cells. *J Oral Maxillofac Surg*. 2009 Mar;67(3):501-6.

Laino G, d'Aquino R, Graziano A, Lanza V, Carinci F, Naro F, Pirozzi G, Papaccio G. A new population of human adult dental pulp stem cells: a useful source of living autologous fibrous bone tissue (LAB). *J Bone Miner Res*. 2005 Aug;20(8):1394-402.

Laino G, Carinci F, Graziano A, d'Aquino R, Lanza V, De Rosa A, Gombos F, Caruso F, Guida L, Rullo R, Menditti D, Papaccio G. In vitro bone production using stem cells derived from human dental pulp. *J Craniofac Surg*. 2006 May;17(3):511-5.

Lei G, Yan M, Wang Z, Yu Y, Tang C, Wang Z, Yu J, Zhang G. Dentinogenic capacity: immature root papilla stem cells versus mature root pulp stem cells. *Biol Cell*. 2011 Apr 1;103(4):185-96.

Lesot H, Osman M, Ruch JV. Immunofluorescent localization of collagens, fibronectin, and laminin during terminal differentiation of odontoblasts. *Dev Biol*. 1981 Mar;82(2):371-81.

Levine IN. *Physical Chemistry*. 5th ed. New York: McGraw-Hill Inc.; 2001 (Chapter 18).

Li WT, Leu YC, Wu JL. Red-light light-emitting diode irradiation increases the proliferation and osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Photomed Laser Surg*. 2010 Aug;28 Suppl 1:S157-65.

Linde A, Goldberg M. Dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1993;4(5):679-728.

MacDougall M, Simmons D, Luan X, Nydegger J, Feng J, Gu TT. Dentin phosphoprotein and dentin sialoprotein are cleavage products expressed from a single transcript coded by a gene on human chromosome 4. Dentin phosphoprotein DNA sequence determination. *J Biol Chem*. 1997 Jan 10;272(2):835-42.

Mareschi K, Biasin E, Piacibello W, Aglietta M, Madon E, Fagioli F. Isolation of human mesenchymal stem cells: bone marrow versus umbilical cord blood. *Haematologica*. 2001 Oct;86(10):1099-100.

Marques MM, Pereira AN, Fujihara NA, Nogueira FN, Eduardo CP. Effect of low-power laser irradiation on protein synthesis and ultrastructure of human gingival fibroblasts. *Lasers Surg Med*. 2004;34(3):260-5.

Marques MM, Meneguzzo DT, Simões A, Ramalho KM. Mecanismo de ação da fototerapia com laser em baixa intensidade (FTLBI). In: Eduardo CP. *Lasers em Odontologia*. 1ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2010.

Massagué J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:753-91.

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 Jan;30(1):27-31.

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 Mar;50(1):75-81.

Millán JL. Alkaline Phosphatases: Structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes. *J Oral Sci.* 2008 Mar;50(1):75-81.

Min KS, Park HJ, Lee SK, Park SH, Hong CU, Kim HW, Lee HH, Kim EC. Effect of mineral trioxide aggregate on dentin bridge formation and expression of dentin sialoprotein and heme oxygenase-1 in human dental pulp. *J Endod.* 2008 Jun;34(6):666-70.

Min JH, Ko SY, Cho YB, Ryu CJ, Jang YJ. Dentinogenic potential of human adult dental pulp cells during the extended primary culture. *Hum Cell.* 2011 Mar;24(1):43-50.

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

Mizuno H, Zuk PA, Zhu M, Lorenz HP, Benhaim P, Hedrick MH. Myogenic differentiation by human processed lipoaspirate cells. *Plast Reconstr Surg.* 2002 Jan;109(1):199-209.

Morrison-Graham K, Schatteman GC, Bork T, Bowen-Pope DF, Weston JA. A PDGF receptor mutation in the mouse (Patch) perturbs the development of a non-neuronal subset of neural crest-derived cells. *Development.* 1992 May;115(1):133-42.

Morsczeck C, Götz W, Schierholz J, Zeilhofer F, Kühn U, Möhl C, Sippel C, Hoffmann KH. Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol.* 2005 Apr;24(2):155-65.

Murray PE, About I, Lumley PJ, Smith G, Franquin JC, Smith AJ. Postoperative pulpal and repair responses. *J Am Dent Assoc.* 2000 Mar;131(3):321-9.

Murray PE, Smith AJ. Saving pulps--a biological basis. An overview. *Prim Dent Care.* 2002 Jan;9(1):21-6.

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 Jul;23(3):277-82.

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 Jan;25(1):33-9.

Nakashima M. The effects of growth factors on DNA synthesis, proteoglycan synthesis and alkaline phosphatase activity in bovine dental pulp cells. *Arch Oral Biol.* 1992 Mar;37(3):231-6.

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 Dec;39(12):1085-9.

Nakashima M, Reddi AH. The application of bone morphogenetic proteins to dental tissue engineering. *Nat Biotechnol.* 2003 Sep;21(9):1025-32.

Nakashima M, Akamine A. The application of tissue engineering to regeneration of pulp and dentin in endodontics. *J Endod.* 2005 Oct;31(10):711-8.

Ohbayashi E, Matsushima K, Hosoya S, Abiko Y, Yamazaki M. Stimulatory effect of laser irradiation on calcified nodule formation in human dental pulp fibroblasts. *J Endod.* 1999 Jan;25(1):30-3.

Park BW, Hah YS, Choi MJ, Ryu YM, Lee SG, Kim DR, Kim JR, Byun JH. In vitro osteogenic differentiation of cultured human dental papilla-derived cells. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009 Mar;67(3):507-14.

Pereira AN, Eduardo Cde P, 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.

Peters CI, Koka RS, Highsmith S, Peters OA. Calcium hydroxide dressings using different preparation and application modes: density and dissolution by simulated tissue pressure. *Int Endod J*. 2005 Dec;38(12):889-95.

Pitt Ford TR. Pulpal response to MPC for capping exposures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1980 Jul;50(1):81-8.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999 Apr 2;284(5411):143-7.

Porada CD, Zanjani ED, Almeida-Porad G. Adult mesenchymal stem cells: a pluripotent population with multiple applications. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2006 Sep;1(3):365-9.

Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*. 1997 Apr 4;276(5309):71-4.

Reichert T, Störkel S, Becker K, Fisher LW. The role of osteonectin in human tooth development: an immunohistological study. *Calcif Tissue Int*. 1992 May;50(5):468-72.

Ritchie HH, Berry JE, Somerman MJ, Hanks CT, Bronckers AL, Hotton D, Papagerakis P, Berdal A, Butler WT. Dentin sialoprotein (DSP) transcripts: developmentally-sustained expression in odontoblasts and transient expression in pre-ameloblasts. *Eur J Oral Sci*. 1997 Oct;105:405-13.

Roberts-Clark DJ, Smith AJ.31-33. Angiogenic growth factors in human dentine matrix. *Arch Oral Biol*. 2000 Nov;45(11):1013-6.

Rönstrand L, Heldin CH. Mechanisms of platelet-derived growth factor-induced chemotaxis. *Int J Cancer*. 2001 Mar 15;91(6):757-62.

Ross R, Bowen-Pope DF, Raines EW. Platelet-derived growth factor and its role in health and disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1990 Mar 12;327(1239):155-69.

Ruch JV, Lesot H, Bègue-Kirn C. Odontoblast differentiation. *Int J Dev Biol*. 1995 Feb;39(1):51-68.

Rutherford RB, TrailSmith MD, Ryan ME, Charette MF. Synergistic effects of dexamethasone on platelet-derived growth factor mitogenesis in vitro. *Arch Oral Biol.* 1992 Feb;37(2):139-45.

Rutherford RB, Wahle J, Tucker M, Rueger D, Charette M. Induction of reparative dentine formation in monkeys by recombinant human osteogenic protein-1. *Arch Oral Biol.* 1993 Jul;38(7):571-6.

Rutherford B, Spångberg L, Tucker M, Charette M. Transdental stimulation of reparative dentine formation by osteogenic protein-1 in monkeys. *Arch Oral Biol.* 1995 Jul;40(7):681-3.

Saito T, Ogawa M, Hata Y, Bessho K. Acceleration effect of human recombinant bone morphogenetic protein-2 on differentiation of human pulp cells into odontoblasts. *J Endod.* 2004 Apr;30(4):205-8.

Sasaki T, Garant PR. Structure and organization of odontoblasts. *Anat Rec.* 1996 Jun;245(2):235-49.

Schindl A, Schindl M, Pernerstorfer-Schön H, Schindl L. Low-intensity laser therapy: a review. *J Investig Med.* 2000 Sep;48(5):312-26.

Schröder U. Effects of calcium hydroxide-containing pulp-capping agents on pulp cell migration, proliferation, and differentiation. *J Dent Res.* 1985 Apr;64 Spec No:541-8.

Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahimi J, Young M, Robey PG, Wang CY, Shi S. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet.* 2004 Jul 10-16;364(9429):149-55.

Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res.* 2003 Apr;18(4):696-704.

Sloan AJ, Waddington RJ. Dental pulp stem cells: what, where, how? *Int J Paediatr Dent.* 2009 Jan;19(1):61-70.

Smith KC. The photobiological basis of low level laser irradiation therapy. *Laser Ther* 1991;3:19-24.

Smith AJ, Cassidy N, Perry H, Bègue-Kirn C, Ruch JV, Lesot H. Reactionary dentinogenesis. *Int J Dev Biol.* 1995 Feb;39(1):273-80.

Smith AJ, Lesot H. Induction and regulation of crown dentinogenesis: embryonic events as a template for dental tissue repair? *Crit Rev Oral Biol Med*. 2001;12(5):425-37.

Smith AJ, Murray PE, Sloan AJ, Matthews JB, Zhao S. Transdental stimulation of tertiary dentinogenesis. *Adv Dent Res*. 2001 Aug;15:51-4.

Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo BM, Zhang C, Liu H, Gronthos S, Wang CY, Wang S, Shi S. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS One*. 2006 Dec 20;1:e79.

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

Stephenson DA, Mercola M, Anderson E, Wang C, Stiles CD, Bowen-Pope DF, Chapman VM. Platelet-derived growth factor receptor alpha-subunit gene (*Pdgfra*) is deleted in the mouse patch (Ph) mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Jan 1;88(1):6-10.

Steinfert J, van de Stadt R, Beertsen W. Identification of new rat dentin proteoglycans utilizing C18 chromatography. *J Biol Chem*. 1994 Sep 2;269(35):22397-404.

Tallquist M, Kazlauskas A. PDGF signaling in cells and mice. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2004 Aug;15(4):205-13.

Thesleff I, Sharpe P. Signalling networks regulating dental development. *Mech Dev*. 1997 Oct;67(2):111-23.

Tran-Hung L, Laurent P, Camps J, About I. Quantification of angiogenic growth factors released by human dental cells after injury. *Arch Oral Biol*. 2008 Jan;53(1):9-13.

Tziafas D. Basic mechanisms of cytodifferentiation and dentinogenesis during dental pulp repair. *Int J Dev Biol*. 1995 Feb;39(1):281-90).

Tziafas D. The future role of a molecular approach to pulp-dentinal regeneration. *Caries Res*. 2004 May-Jun;38(3):314-20.

Utsunomiya T. A histopathological study of the effects of low-power laser irradiation on wound healing of exposed dental pulp tissues in dogs, with special reference to lectins and collagens. *J Endod*. 1998 Mar;24(3):187-93.

Vladimirov YA, Osipov AN, Klebanov GI. Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation. *Biochemistry (Mosc)*. 2004 Jan;69(1):81-90.

Wei X, Ling J, Wu L, Liu L, Xiao Y. Expression of mineralization markers in dental pulp cells. *J Endod*. 2007 Jun;33(6):703-8.

Yamashiro T, Tummers M, Thesleff I. Expression of bone morphogenetic proteins and Msx genes during root formation. *J Dent Res*. 2003 Mar;82(3):172-6. Yokose S, Kadokura H, Tajima N, Hasegawa A, Sakagami H, Fujieda K, Katayama T. Platelet-derived growth factor exerts disparate effects on odontoblast differentiation depending on the dimers in rat dental pulp cells. *Cell Tissue Res*. 2004 Mar;315(3):375-84.

Yu J, Wang Y, Deng Z, Tang L, Li Y, Shi J, Jin Y. Odontogenic capability: bone marrow stromal stem cells versus dental pulp stem cells. *Biol Cell*. 2007 Aug;99(8):465-74.

Zhang W, Walboomers XF, Shi S, Fan M, Jansen JA. Multilineage differentiation potential of stem cells derived from human dental pulp after cryopreservation. *Tissue Eng*. 2006 Oct;12(10):2813-23.

Zhang W, Walboomers XF, Jansen JA. The formation of tertiary dentin after pulp capping with a calcium phosphate cement, loaded with PLGA microparticles containing TGF-beta1. *J Biomed Mater Res A*. 2008 May;85(2):439-44.

Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001 Apr;7(2):211-28.

Anexo A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da FOUSP

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia
Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER DE APROVAÇÃO
FR 303206
Protocolo 166/2009

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa **APROVOU** o protocolo de pesquisa **“Estudo do efeito da fototerapia com laser em baixa intensidade sobre células-tronco obtidas de polpa de dentes decíduos”**, de responsabilidade do(a) Pesquisador(a) Leila Soares Ferreira, sob orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a.) Márcia Martins Marques.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em “cd”. Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 08 de dezembro de 2009.

Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz
Coordenador do CEP-FOUSP

Anexo B – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da The University of Texas Health Science Center at Houston.

The Committee for the Protection of Human Subjects
Office of Research Support Committees

7000 Fannin, Suite 750
Houston, TX 77030

Dr. Shiwei Cai
UT-H - DB - Endodontics

January 12, 2007

HSC-DB-06-0618 - The PDGF-B/PDGF receptor-beta signaling pathway regulates dental pulp and dentin formation by PDGFR-beta positive stem cells.

The above named project is determined to qualify for exempt status according to 45 CFR 46.101(b)

CATEGORY #4 : *Research, involving the collection or study of existing data, documents, records, pathological specimens, or diagnostic specimens, if these sources are publicly available or if the information is recorded by the investigator in such a manner that subjects cannot be identified directly or through identifiers linked to the subjects.*

CHANGES: Should you choose to make any changes to the protocol that would involve the inclusion of human subjects or identified data from humans, please submit the change via iRIS to the Committee for the Protection of Human Subjects for review.

Should you have any questions, please contact the Office of Research Support Committees at 713-500-3985.

Thank you for submitting your protocol for review.

Cynthia Edmonds
IRB Manager