NATÁLIA PIERETTI BUENO

Efeito da terapia de fotobiomodulação na diferenciação osteoblástica de células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea de ratos diabéticos

São Paulo

2020

NATÁLIA PIERETTI BUENO

Efeito da terapia de fotobiomodulação na diferenciação osteoblástica de células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea de ratos diabéticos

Versão Corrigida

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

Área de concentração: Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial

Orientadora: Prof^a. Dra. Emanuela Prado Ferraz

São Paulo

2020

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

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

Bueno, Natália Pieretti.

Efeito da terapia de fotobiomodulação na diferenciação osteoblástica de células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea de ratos diabéticos / Natália Pieretti Bueno; orientadora Emanuela Prado Ferraz. -- São Paulo, 2020.

103 p. : fig., tab. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de concentração: Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida.

1. Terapia de fotobiomodulação. 2. Diabetes Mellitus. 3. Osso e ossos. 4. Células-tronco mesenquimais. 5. Osteoblasto. I. Ferraz, Emanuela Prado. II. Título.

Bueno NP. Efeito da terapia de fotobiomodulação na diferenciação osteoblástica de células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea de ratos diabéticos. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovada em: 04/12/2020

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). Adalberto Luiz Rosa

Instituição: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo

Julgamento: Aprovada

Prof(a). Dr(a). Márcia Martins Marques

Instituição: Faculdade de Odontologia – Universidade de São Paulo

Julgamento: Aprovada

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

Instituição: Faculdade de Odontologia – Universidade de São Paulo

Julgamento: Aprovada

Aos meus pais Rita e Edmilson, pelo apoio incondicional.

*À minha avó Lourdes, que idealizou meu sucesso pessoal e profissional antes
mesmo que eu pudesse entender do que se tratava.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Rita e Edmilson, que sempre colocaram meus estudos como prioridade em suas vidas. Agradeço às concessões realizadas para que eu pudesse me formar em outra cidade e por todo o apoio em minhas decisões. Mãe, não há nada que eu possa escrever que resuma fielmente tudo o que você fez e faz por mim. Obrigada por não medir esforços para tornar a minha vida melhor em todos os sentidos. Pai, se eu estou aqui hoje é pela inspiração que me traz, por fazer parecer divertido corrigir provas em um domingo ensolarado. Hoje eu vejo o esforço que era tudo isso e me espelho em você para alcançar os meus objetivos.

À minha família em geral por entenderem minhas ausências em momentos importantes. Em especial, três pessoas que são meu ponto de equilíbrio: vó Lourdes (*in memoriam*), meu exemplo de força, determinação e bondade. Obrigada por colocar na cabecinha daquela criança a ideia de uma mulher independente e realizada com as suas escolhas, tudo o que lhe foi podado. Nas poucas vezes em que questioneei o caminho percorrido até aqui, você foi a resposta. Maria Luiza e Matheus, dois pequenos para onde eu fujo sempre que a cabeça padece. Não fazem ideia do que seja uma faculdade, residência ou pós-graduação ainda, mas são os que me dão alegria e energia quando o desânimo chega.

Ao Júlio, pelo amor e companheirismo. Obrigada pela generosidade, paciência, risadas e palavras de incentivo diárias e por não medir esforços para me ver feliz. A vida é boa, mas é muito melhor com você.

À minha orientadora, Prof.^a Dra. Emanuela Prado Ferraz, por ter me aceitado como sua orientada e, mais do que isso, ter acreditado que eu poderia elaborar esse projeto mesmo sem ter tido qualquer experiência com a pesquisa básica antes. Agradeço a paciência infindável em explicar diversas vezes a mesma coisa e pelo tempo compartilhado. Sua dedicação em tudo o que faz é admirável e me inspira diariamente. Tudo o que eu sei hoje dentro de um laboratório, devo a você. Muito obrigada!

Agradeço aos professores do Departamento de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial pela oportunidade, pelo aprendizado constante e inúmeros cafézinhos durante essa jornada. E a todos os demais professores da FOU SP com os quais tive contato na realização dos créditos, onde aprendi muito.

Aos funcionários e técnicos da FOU SP que fazem toda a engrenagem funcionar. Em especial ao Édison, Cida, Catia, Elis, Douglas e Silvana que me ajudaram em diversos momentos.

À Lilian Espínola, amiga para todas as horas, um exemplo de perseverança, quem me incentivou e me ajudou a fazer parte do grupo de pós-graduação da FOU SP.

Ao Ricardo D'ávila, que me permite acompanhar e aprender com seus casos sempre que possível. Obrigada pela oportunidade.

A todos os meus colegas da pós-graduação em cirurgia pela ótima convivência e pelos momentos de descontração.

A todos os meus colegas de laboratório, que dividiram conhecimentos, experimentos e finais de semana. Em especial ao Marlus Pedrosa e Giovanna Sarra pela grande troca que tivemos neste período. Admiro muito vocês.

À Prof.^a Dra. Márcia Martins Marques e Prof.^a Dra. Carla Sipert pelo tempo dispensado com o projeto, seja ajudando em um experimento ou com sugestões sempre muito relevantes.

À Isabella Copete, aluna de iniciação científica que dividiu comigo os primeiros passos neste mundo de cultivo celular. Obrigada pelo grande trabalho que fez, pela disponibilidade e carisma de sempre. À Giovanna Zerbato e Cecília Kfourir, que chegaram um tempo depois, pela confiança depositada e oportunidade em trocar conhecimento.

A todos os integrantes do Bone Research Lab, da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP-USP) por ajudarem em diferentes etapas do projeto e pela paciência em me explicar cada experimento. Vocês são um exemplo como grupo.

As minhas antigas colegas de residência e hoje amigas, Amanda Lustosa e Tábatha Mello, pelo apoio e inúmeras palavras de incentivo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro de iniciação científica (18/20302-5) fundamental para a execução desse projeto.

Por fim, a todas as pessoas que colaboraram direta ou indiretamente para a realização desta etapa, seja no âmbito profissional ou pessoal. E aos pacientes e alunos de graduação da FOUSP, que nos permitem a troca de ensinamentos e a prática da docência.

“Quanto mais aumenta nosso conhecimento, mais evidente fica nossa ignorância.”

John F. Kennedy

RESUMO

Bueno NP. Efeito da terapia de fotobiomodulação na diferenciação osteoblástica de células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea de ratos diabéticos [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2020. Versão Corrigida.

Estratégias de engenharia de tecido e de terapia celular têm sido empregadas no tratamento de defeitos ósseos com resultados promissores. Contudo, a reconstrução de defeitos ósseos em indivíduos portadores de Diabetes Mellitus (DM) continua um desafio. O DM é uma doença metabólica crônica caracterizada por hiperglicemia que, em última análise, aumenta o estresse oxidativo celular e resulta na diminuição da diferenciação e/ou atividade de células-tronco mesenquimais (CTMs), sugerindo que CTMs autólogas podem não ser uma alternativa de tratamento para esses pacientes. Assim, estratégias para recuperar seu potencial osteogênico poderiam otimizar os resultados da terapia celular. A fotobiomodulação (FBM) é um tratamento não invasivo que diminui o estresse oxidativo, sendo relacionado à diminuição do estado hiperglicêmico e aceleração do processo de reparo ósseo. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da FBM no potencial osteogênico de CTMs derivadas da medula óssea de animais diabéticos. O DM foi induzido em ratos Wistar machos pela injeção intraperitoneal de estreptozocina (60 mg/Kg). Como Controle foram utilizados animais saudáveis submetidos à injeção de solução tampão. Após 30 dias, os fêmures foram removidos para caracterização microtomográfica, morfométrica e para obtenção de células. As células foram cultivadas em meio osteogênico para diferenciação em osteoblastos derivados de animais saudáveis (OB) e diabéticos (OB-DM) e as OB-DM foram irradiadas a cada 72 horas (660 nm; 0,14 J; 20 mW; 0,714 W/cm²; 5 J/cm²) (OB-DM-FBM). A morfologia celular foi avaliada em 24 e 72 horas e a viabilidade celular aos 4, 7 e 10 dias (MTT). O potencial osteogênico foi avaliado pela atividade de fosfatase alcalina (ALP) aos 7 e 14 dias; expressão proteica dos marcadores ósseos ALP, fator de transcrição relacionado ao Runt-2 (RUNX2) e osteopontina (OPN) aos 7 dias; expressão de genes marcadores ósseos *Alp*, sialoproteína óssea (*Bsp*), *Runx2* e *Opn* aos 10 dias; e produção de matriz extracelular mineralizada aos 17 dias. Os dados foram comparados por teste t e ANOVA com um ou dois fatores seguido do *Student-Newman Keus*, quando indicado. O nível de significância adotado foi de 5%.

O DM resultou em alteração na arquitetura óssea e diminuição dos parâmetros morfométricos avaliados. OB-DM são menores e menos espreiadas quando comparadas às células saudáveis, enquanto OB-DM-FBM apresentam morfologia similar aos OBs. A viabilidade celular variou de acordo com o tempo e grupo experimental, com aumento da viabilidade em OB-DM-FBM aos 10 dias. OB-DM apresentaram menor atividade de ALP, menor expressão proteica de ALP e OPN, menor expressão dos genes *Alp*, *Runx2*, *Bsp*, *Opn* e menor produção de matriz extracelular mineralizada. Por outro lado, a terapia de FBM aplicada nas células diabéticas resultou em aumento da atividade de ALP, quantidade de OPN, expressão dos genes *Alp*, *Bsp* e *Opn* e na produção de matriz extracelular, quando comparadas às OB-DM. Nossos resultados confirmaram que o DM diminui a diferenciação osteoblástica de CTMs diabéticas e que a FBM recupera esse potencial osteogênico, contribuindo para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para o tratamento de defeitos ósseos em pacientes diabéticos.

Palavras-chave: Terapia de fotobiomodulação. Diabetes mellitus. Osso. Célula-tronco mesenquimal. Osteoblasto.

ABSTRACT

Bueno NP. The effect of photobiomodulation therapy on osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells derived from bone marrow of diabetic rats [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2020. Versão Corrigida.

Bone tissue engineering and cell-based therapy for bone regeneration might be impaired by Diabetes Mellitus (DM) due to negative effects on differentiation and activity of mesenchymal stem cells (MSCs). DM is a chronic metabolic disease characterized by hyperglycemia, which increases cellular oxidative stress and affects the activity and differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs), suggesting that autologous MSCs may not be an alternative treatment for these patients. Thus, strategies to recover their osteogenic potential could optimize the cell therapy results. Photobiomodulation (PBM) therapy is a non-invasive treatment that decreases oxidative stress and has been related to a decrease of the hyperglycemic state and acceleration of the bone repair process. This study aimed to evaluate the effect of PBM on the osteogenic potential of bone marrow MSCs (BM-MSCs) derived from diabetic animals. DM was induced in male Wistar rats using streptozotocin (60 mg/kg). Healthy animals were used as Control. After 30 days, the femurs were removed for microtomographic and morphometric characterization. BM-MSCs of healthy and diabetic rats were isolated and differentiated into osteoblasts (OB and OB-DM). OB-DM were treated with PBM every 72 h (660 nm; 0.14 J; 20 mW; 0.714 W/cm², and 5 J/cm²) (OB-DM-PBMT). These cells were evaluated for cell morphology at 24 and 72 hours and cell viability on days 4, 7 and 10 (MTT). The osteogenic potential was evaluated by alkaline phosphatase (ALP) activity on days 7 and 14; ALP, runt-related transcription factor (RUNX2) and osteopontin (OPN) protein expression on day 7; *Alp*, bone sialoprotein (*Bsp*), *Runx2* and *Opn* gene expression on day 10; and production of mineralized extracellular matrix on day 17. Data were compared by t-test and two or one-way ANOVA followed by Student-Newman Keus when appropriated. The significance level was 5%. DM resulted in changes in bone architecture and decreased all the evaluated morphometric parameters. OB-DM were smaller and less spread compared to OB, while OB-DM-PBM presented a cell morphology resembling OB. Cell viability varied according to time and experimental group, with increased viability in

OB-DM-PBM at 10 days. DM decreased the ALP activity, ALP and OPN protein expression, *Alp*, *Runx2*, *Bsp*, *Opn* gene expression, and the production of the extracellular mineralized matrix compared to OB. On the other hand, diabetic cells treated with PBM exhibited an increase in ALP activity, the amount of OPN protein, the *Alp*, *Bsp* and *Opn* gene expression and in the production of extracellular matrix, compared to OB-DM. Our results may contribute to the development of therapeutic approaches to optimize the treatment of bone defects in patients with DM.

Keywords: Photobiomodulation therapy. Diabetes. Bone. Stem cell; Osteoblast.

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Parâmetros selecionados para aplicação da FBM	49
Tabela 4.2 - Sequência de primers para cada gene usados para RT-PCR.....	52
Tabela 4.3 - Sequência de primers para cada gene usados para RT-PCR.....	56

LISTA DE FIGURAS

- Figura 5.1 - Valores médios de (A) glicemia (mg/dL) e (B) peso corporal (g) de ratos machos saudáveis (Controle) e diabéticos após 7, 14, 21 e 30 dias da injeção com solução tampão ou STZ (60mg/kg), respectivamente. Os dados estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (ANOVA dois fatores com repetição, $p \leq 0,05$)..... 59
- Figura 5.2 - Reconstruções microtomográficas tridimensionais dos fêmures de ratos do grupo controle (A) e diabético (B), 4 semanas após injeção de solução tampão ou STZ (60 mg/kg), respectivamente 60
- Figura 5.3 - Parâmetros morfométricos obtidos após reconstrução dos fêmures de ratos do grupo controle e diabético (DM), por microtomografia computadorizada. Volume ósseo (A); Densidade de superfície óssea (B), Espessura trabecular (C), Separação trabecular (D), Densidade de conectividade (E), Densidade mineral óssea (F). Os dados estão representados como média $\pm$ desvio padrão (n=3). Asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significantes (Teste t, $p \leq 0,05$) 61
- Figura 5.4 - Fotomicrografia de osteoblastos diferenciados de células-tronco mesenquimais (CTMs) derivadas da medula óssea de ratos controle (OB) (A,D), de ratos diabéticos (OB-DM) (B, E) e OB-DM expostos à terapia de fotobiomodulação (OB-DM-FBM) (C, F) cultivados em meio osteogênico por 24 (A-C) e 72 horas (D-F). Marcação por fluorescência direta do citoesqueleto de actina (faloidina, verde) e núcleo (DAPI, azul). Ampliação de 20x. Barra de escala = 100 μ m..... 62
- Figura 5.5 - Viabilidade de osteoblastos diferenciados de células-tronco mesenquimais (CTMs) derivadas da medula óssea de ratos controle (OB), de ratos diabéticos (OB-DM) e OB-DM expostos à terapia de fotobiomodulação (OB-DM-FBM) aos 4, 7 e 10 dias. Os dados estão representados como média $\pm$ desvio padrão (n=5). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos; asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significantes entre os tempos experimentais (ANOVA com dois fatores, $p \leq 0,05$).....63

- Figura 5.6 - Avaliação da integridade do RNA total de osteoblastos diferenciados de células-tronco mesenquimais (CTMs) derivadas da medula óssea de ratos controle (OB), de ratos diabéticos (OB-DM) e OB-DM expostos à terapia de fotobiomodulação (OB-DM-FBM) aos 10 dias. Os picos dos eletroferogramas e as bandas mais intensas nos géis correspondem ao RNA ribossômico 18S e 28S e representam qualitativamente a integridade das amostras. Os valores de RIN (*RNA Integrity Number*) representam a qualidade das amostras de RNA total.....64
- Figura 5.7 - Expressão relativa dos genes fosfatase alcalina (Alp), sialoproteína óssea (Bsp), osteopontina (Opn) e fator de transcrição relacionado ao Runt-2 (Runx-2) de osteoblastos diferenciados de células-tronco mesenquimais (CTMs) derivadas da medula óssea de ratos controle (OB), de ratos diabéticos (OB-DM) e OB-DM expostos à terapia de fotobiomodulação (OB-DM-FBM) aos 10 dias. Os dados estão representados como média $\pm$ desvio padrão (n=4). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes (ANOVA com um fator $p \leq 0,05$).....65
- Figura 5.8 - Detecção e quantificação relativa das proteínas ALP (A), RUNX2 (B) e OPN (C) de osteoblastos diferenciados de células-tronco mesenquimais (CTMs) derivadas da medula óssea de ratos controle (OB), de ratos diabéticos (OB-DM) e OB-DM expostos à terapia de fotobiomodulação (OB-DM-FBM) aos 7 dias. As bandas superiores representam os alvos e as inferiores o constitutivo GAPDH. Os dados estão representados como média $\pm$ desvio padrão (n=3). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (ANOVA com um fator, $p \leq 0,05$).....66
- Figura 5.9 - Atividade de fosfatase alcalina (ALP) de osteoblastos diferenciados de células-tronco mesenquimais (CTMs) derivadas da medula óssea de ratos controle (OB), de ratos diabéticos (OB-DM) e OB-DM expostos à terapia de fotobiomodulação (OB-DM-FBM) aos 7 e 14 dias. Os dados estão representados como média $\pm$ desvio padrão (n=5). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes; asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significantes entre os tempos experimentais (ANOVA com dois fatores, $p \leq 0,05$) 67
- Figura 5.10 - Detecção e quantificação de matriz extracelular mineralizada de osteoblastos diferenciados de células-tronco mesenquimais (CTMs) derivadas da medula óssea de ratos controle (OB), de ratos diabéticos (OB-DM) e OB-DM expostos à terapia de fotobiomodulação (OB-DM-FBM) aos 17 dias. Os dados estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n = 5). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes (ANOVA com um fator, $p \leq 0,05$).....68

Figura 5.11 - Mensuração de óxido nítrico (NO) de osteoblastos diferenciados de células-tronco mesenquimais (CTMs) derivadas da medula óssea de ratos controle (OB), de ratos diabéticos (OB-DM) e OB-DM expostos à terapia de fotobiomodulação (OB-DM-FBM), em 48h de cultivo e 24h após aplicação de FBM. Os dados estão representados como média $\pm$ desvio padrão (n=2) (*Kruskal-Wallis*, $p \leq 0,05$).....69

Figura 5.12 - Expressão relativa dos genes fator indutor de hipóxia 1 alfa (*Hif1a*), fator nuclear kappa B (*Nf-kb*) e receptores dos produtos finais de glicação (*Rages*) de osteoblastos diferenciados de células-tronco mesenquimais (CTMs) derivadas da medula óssea de ratos controle (OB), de ratos diabéticos (OB-DM) e OB-DM expostos à terapia de fotobiomodulação (OB-DM-FBM), aos 10 dias. Os dados estão representados como média $\pm$ desvio padrão (n=4). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes (ANOVA com um fator $p \leq 0,05$).....70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALP	Fosfatase alcalina, do inglês <i>alkaline phosphatase</i>
ANOVA	Análise de variância
BSP	Sialoproteína óssea
CTM	Célula-tronco mesenquimal
DM	Diabetes Mellitus
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática, do inglês <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FBM	Fotobiomodulação
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
Hf1- α	Fator indutor de hipóxia 1 α
MTT	Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolio]
MO	Medula óssea
OB	Osteoblasto
OB-DM	Osteoblastos diferenciados de células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea de ratos diabéticos
OB-DM-FBM	Osteoblastos derivados de ratos diabéticos tratados com fotobiomodulação
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPN	Osteopontina
PBS	Solução salina balanceada, do inglês <i>phosphate-buffered saline</i>
RUNX2	Fator de transcrição relacionado ao runt, do inglês <i>Runt-related transcription factor 2</i>
STZ	Estreptozocina
α -MEM	do inglês <i>α-minimum essential medium</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

nm	Nanômetro
J/cm ²	Densidade de energia (joule por centímetro quadrado)
g	Grama
h	Hora
mg	Miligrama
mg/Kg	Miligrama por kilo
mL	Mililitro
M	Molar
pH	Potencial hidrogeniônico
mg/dL	Miligrama por decilitro
%	Por cento
Kv	Quilovolt
µm	Micrometro
mm	Milímetro
mm ²	Milímetro quadrado
g.cm ⁻³	Grama por centímetro cúbico
µg	Micrograma
µg/mL	Micrograma por mililitro
UI/mL	Unidade internacional por mililitro
min	Minutos
cm ²	Centímetro quadrado
°	Graus
°C	Graus Celsius
µL	Microlitro
mM	Milimolar
J	Joule
s	Segundos
W	Watts
W/cm ²	Densidade de potência (joule por centímetro quadrado)
mW	Miliwatts

nM	Nanomolar
mg/mL	Miligrama por mililitro
ng	Nanograma
L	Litro
kDa	Quilodalton
rpm	Rotações por minuto
p	Nível descritivo ou probabilidade de significância
<	Menor
≤	Menor ou igual

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	29
2	REVISÃO DE LITERATURA	33
2.1	TECIDO ÓSSEO	33
2.1.1	Tratamento de defeitos ósseos	34
2.2	DIABETES MELLITUS.....	37
2.3	TERAPIA DE FOTOBIMODULAÇÃO.....	39
2.3.1	FBM no reparo e regeneração do osso	41
3	PROPOSIÇÃO	43
4	MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1	INDUÇÃO DO DM.....	45
4.2	ANÁLISES MICROTOMOGRÁFICA E MORFOMÉTRICA	46
4.3	OBTENÇÃO, ISOLAMENTO E CULTURA DE CÉLULAS	47
4.4	DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	48
4.5	TERAPIA DE FOTOBIMODULAÇÃO.....	48
4.6	AVALIAÇÃO DAS RESPOSTAS CELULARES	49
4.6.1	Morfologia celular	49
4.6.2	Viabilidade celular	50
4.6.3	Expressão de genes marcadores da diferenciação osteoblástica ..	50
4.6.4	Expressão de proteínas marcadoras da diferenciação osteoblástica	52
4.6.5	Atividade de fosfatase alcalina (ALP)	54
4.6.6	Detecção e quantificação de matriz extracelular mineralizada	55
4.6.7	Análise preliminar do mecanismo de ação da FBM	55
4.6.7.1	Avaliação do estresse oxidativo pela mensuração de óxido nítrico.....	55
4.6.7.2	Análise da expressão de genes	56
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	57
5	RESULTADOS	59
5.1	INDUÇÃO DO DM.....	59
5.2	ANÁLISE MICROTOMOGRÁFICA E MORFOMÉTRICA.....	60

5.3	AVALIAÇÃO DAS RESPOSTAS CELULARES	62
5.3.1	Morfologia Celular	62
5.3.2	Viabilidade Celular.....	63
5.3.3	Expressão de genes marcadores da diferenciação osteoblástica ..	64
5.3.4	Expressão de proteínas marcadoras da diferenciação osteoblástica	65
5.3.5	Atividade de ALP	67
5.3.6	Detecção e quantificação de matriz extracelular mineralizada	68
5.3.7	Análise preliminar do mecanismo de ação da FBM.....	69
5.3.7.1	Mensuração dos níveis de NO	69
5.3.7.2	Análise da expressão de genes	69
6	DISCUSSÃO.....	71
7	CONCLUSÃO	75
	REFERÊNCIAS	77
	ANEXOS	91

1 INTRODUÇÃO

O osso é um tecido conjuntivo especializado com capacidade de reparação e remodelação em condições fisiológicas. No entanto, na presença de condições patológicas, a reconstrução da continuidade óssea é necessária para o reestabelecimento das funções teciduais e psicossociais (Bell; Gregoire, 2009; Brydone et al., 2010). Dentre as comorbidades que impactam negativamente o metabolismo ósseo está o Diabetes Mellitus (DM), considerado um problema crescente de saúde pública global com elevados índices de mortalidade e morbidade (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2019-2020; Organização Mundial da Saúde, 2019).

O DM é uma doença metabólica crônica caracterizada por hiperglicemia persistente resultante de defeito na secreção de insulina, na sua ação ou ambos. Existem diferentes tipos de DM, classificados de acordo com a etiologia, sendo os tipos mais comumente encontrados na população em geral: (1) o DM tipo 1, doença autoimune relacionada à destruição de células β -pancreáticas que corresponde em torno de 5 a 10% dos casos; e (2) o DM tipo 2, associado a fatores de risco genéticos e ambientais, em especial àqueles que levam à obesidade, que corresponde a 90-95% dos casos (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2019-2020). A manutenção do estado hiperglicêmico tem sido associada a complicações micro e macro vasculares que resultam, em última análise, em impacto negativo na qualidade de vida dos pacientes (Organização Mundial da Saúde, 2016).

Dentre as complicações do DM, as alterações no metabolismo ósseo podem causar distúrbios no processo de reparo e prejudicar a regeneração, fundamental no tratamento de defeitos ósseos (Janghorbani et al., 2007; Retzepi; Donos, 2010; Jiao et al., 2015). Um dos mecanismos pelos quais o DM interfere negativamente no metabolismo ósseo relaciona-se com o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*), incluindo os produtos finais da glicação avançada (AGEs, do inglês *advanced glycation end-products*) (Hamada et al., 2009). Esses mediadores irão se ligar aos respectivos receptores de AGE (RAGE) e desencadearão uma série de eventos celulares e moleculares que culminarão no aumento da expressão do ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa (RanKL), diminuição da expressão de osteoprotegerina (OPG), com consequente aumento da sinalização da diferenciação osteoclástica (McCarthy et al., 2001; 2004; Ding et al.,

2006). Ainda, estudos evidenciaram que estados hiperglicêmicos induzem a apoptose e inibem a proliferação e diferenciação de osteoblastos, contribuindo para a diminuição da densidade mineral óssea e para um risco aumentado de fraturas (Lalla et al., 2000; Alikhani et al., 2007; Retzepi; Donos, 2010; Jiao et al., 2015; Levinger et al., 2016; Phimphilai et al., 2017).

Peças fundamentais no mecanismo de regeneração e reparo, as células-tronco mesenquimais (CTMs) têm sido o principal foco das pesquisas em medicina regenerativa. CTMs são células indiferenciadas capazes de auto renovação, com alta taxa proliferativa e capacidade de diferenciação em células de diversos tecidos, como o tecido ósseo, cartilaginoso e adiposo (Pittenger et al., 1999; Ding et al., 2011). Elas podem ser obtidas de diferentes fontes, dentre elas a medula óssea (MO), com elevado potencial de diferenciação osteoblástica (Killington et al., 2018). No entanto, os efeitos a longo prazo do estresse oxidativo causado pelo DM podem ter impacto negativo nessas células, resultando em atividade celular e potencial osteogênico reduzidos, o que sugere que CTMs obtidas de indivíduos com DM podem não representar uma alternativa adequada para o tratamento de defeitos ósseos, exceto se combinadas com fatores de crescimento específicos (Lu et al., 2003; Qian et al., 2015; Flório et al., 2017). Assim, estratégias para recuperar o potencial osteogênico das CTMs poderiam otimizar o reparo nesse grupo de pacientes.

Diversos estudos evidenciaram que a fotobiomodulação (FBM) é capaz de aumentar a proliferação e a diferenciação de CTMs (Choi et al., 2013; Arany et al., 2014; Moreira et al., 2017). A FBM é uma terapia com luz, constituída por um processo não térmico e que envolve cromóforos endógenos que, ao serem estimulados por diferentes quantidades de energia, desencadeiam fenômenos físicos e químicos no âmbito celular, envolvendo diferentes vias de sinalização (Giannelli et al., 2013; Arany et al., 2014, Anders et al., 2015). O aumento da produção de energia e a modulação das ROS em estados não fisiológicos diminuem o estresse oxidativo, resultando em uma série de eventos como a neoformação vascular e o aumento da proliferação e diferenciação osteoblástica, com consequente aceleração do processo de formação óssea (Stein et al., 2005; Pinheiro et al., 2008).

Buscando aprimorar o reparo ósseo e reduzir as complicações em pacientes com DM, estudos recentes mostraram que a FBM modula a expressão gênica de fibroblastos de animais diabéticos e tem sido empregada como coadjuvante no

controle de estados hiperglicêmicos resultantes do DM tipo 2 (KazemiKhoo; Ansari, 2015; Ayuk et al., 2016; KazemiKhoo et al., 2016; Ayuk et al., 2018).

Nesse contexto, a compreensão dos mecanismos pelos quais o DM afeta negativamente o tecido ósseo aliado ao efeito da FBM no potencial osteogênico de CTMs poderão contribuir com o desenvolvimento de abordagens terapêuticas para otimizar a regeneração óssea em pacientes diabéticos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TECIDO ÓSSEO

O osso é um tecido conjuntivo especializado constituído por células e matriz óssea, composta por uma porção orgânica e outra inorgânica. É o constituinte principal do esqueleto cujas funções principais são o suporte para os tecidos moles, apoio à musculatura esquelética permitindo mobilidade e proteção aos órgãos vitais incluindo a medula óssea, fonte de células-tronco. Além da função estrutural, atua como reserva metabólica e depósito de cálcio, fosfato e outros íons, armazenando-os ou liberando-os de maneira controlada, para manter a homeostase no organismo (Junqueira; Carneiro, 2004).

O tecido ósseo é uma estrutura altamente dinâmica, que se encontra em constante remodelação, um processo contínuo e intrínseco à biologia óssea, baseado na renovação constante do tecido a partir da neoformação e da reabsorção parcial do osso já formado, processo fundamental para manter as funções de adaptação, reparo e homeostase de cálcio no organismo (Florencio-Silva et al., 2015). Controlado por uma série de mecanismos, a remodelação resume-se na dinâmica balanceada entre diferentes tipos celulares tais como, mas não somente, os osteoblastos e os osteoclastos.

Osteoblastos são derivados de CTMs e responsáveis pela síntese e secreção de matriz orgânica e de matriz extracelular mineralizada. A medula óssea de indivíduos em crescimento produz quantidade elevada de CTMs, que se diferenciam em células osteoprogenitoras. Com o avançar da idade e na presença de condições patológicas, como o DM, o potencial osteogênico dessas células diminui (Nikita, 2017). Osteoclastos são derivados da fusão de células mononucleares a partir de células-tronco hematopoiéticas e fundamentais no processo de reabsorção óssea. Assim, a homeostase do sistema esquelético dependerá do balanço entre a proliferação e atividade dos osteoblastos e dos osteoclastos, controlado por múltiplos fatores locais e sistêmicos como a ativação do sistema RANK/RANKL/OPG (receptor ativador do fator nuclear kappa B/ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B/osteoprotegerina), o sistema imune e hormônios. Em condições fisiológicas, o RANKL induzido por células da linhagem osteoblástica se liga ao seu receptor RANK

presente na superfície dos precursores de osteoclastos e estimula a diferenciação e sobrevivência destas células, culminando na ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B), a principal força motriz da osteoclastogênese. A OPG, proteína sintetizada pelos osteoblastos, age como um receptor competitivo ao se ligar ao RANKL no início do processo, diminuindo consequentemente a diferenciação e atividade dos osteoclastos. O sistema RANK/RANKL/OPG é uma das descobertas mais importantes em biologia óssea nas últimas décadas, sendo fundamental para a manutenção da saúde esquelética (Boyce; Xing, 2007).

2.1.1 Tratamento de defeitos ósseos

O tecido ósseo possui capacidade de regenerar-se em condições fisiológicas. A regeneração é a capacidade inerente de reparo do tecido ósseo em resposta a uma lesão e é guiada por eventos biológicos de indução e condução óssea, envolvendo diferentes tipos de células e vias de sinalização molecular intra e extracelulares (Einhorn, 1998). Clinicamente, o reparo de fraturas ósseas é a forma mais comum de regeneração onde, na maioria das vezes, o osso neoformado é indistinguível do osso adjacente à lesão. No entanto, em condições clínicas locais nas quais o reestabelecimento da continuidade óssea está comprometido (grandes defeitos ósseos) ou em condições sistêmicas que afetem o metabolismo do osso, a regeneração do defeito será prejudicada. Tais situações clínicas transpõem o potencial natural de regeneração e resultam em aumento da morbidade, piora na qualidade de vida do doente e aumento dos custos para a saúde pública ou privada (Dimitriou et al., 2011).

Desse modo, a depender da extensão do defeito e/ou da presença de distúrbios que afetem o metabolismo ósseo, procedimentos cirúrgicos para a reconstrução aliados ou não a tratamentos adjuvantes, são fundamentais para o reestabelecimento das funções teciduais, psicossociais e da estética do paciente (Bell; Gregorie, 2009).

A reconstrução de defeitos ósseos é um desafio científico e clínico nas áreas da Cirurgia Bucomaxilofacial e Ortopedia há décadas. Dentre as modalidades de tratamento frequentemente empregadas, os enxertos autógenos são considerados o padrão-ouro por combinarem as propriedades de osteogênese, osteoindução e

osteocondução e apresentarem histocompatibilidade (Amini et al., 2012). Como desvantagens, destacam-se a morbidade e a disponibilidade tecidual limitada (Younger; Chapman, 1989). Os enxertos alógenos ou xenógenos tem morbidade reduzida pela ausência de área doadora e ampla disponibilidade, porém podem desencadear reações de imunogenicidade e infecções secundárias associadas (Finkemeier, 2002; Giannoudis et al., 2005).

Avanços em áreas multidisciplinares como a Medicina e Bioengenharia proporcionaram o desenvolvimento de técnicas de Medicina Regenerativa. Dentre as estratégias, a engenharia de tecido ósseo e recentemente, a terapia celular, têm apresentado resultados bastante promissores (Dai et al., 2011; Langer; Vacanti, 2016; Borciani et al., 2020).

A engenharia de tecido é uma ciência interdisciplinar fundamentada em conhecimentos da engenharia e das ciências da vida aplicada para o desenvolvimento de substitutos biológicos baseados na combinação de arcabouços, fatores de crescimento e células, para restaurar, manter e/ou melhorar as funções teciduais (Rosa et al., 2008; Langer; Vacanti, 2016). Nesse contexto, uma variedade de biomateriais, fatores de crescimento e tipos celulares em diversos estágios de diferenciação e técnicas de processamento celular têm sido estudados. A terapia celular foi definida pela *American Society of Gene and Cell Therapy* como “o transplante de células para um paciente com o objetivo de tratar uma patologia hereditária ou adquirida”, sendo que a seleção da população celular adequada é fator chave para o sucesso da terapia (Baiguera et al., 2012). Não há consenso quanto ao tipo celular ideal, mas as CTMs têm sido amplamente estudadas e empregadas por suas características intrínsecas, relacionadas à facilidade de obtenção, isolamento e expansão, ao potencial de diferenciação e à capacidade de promover a regeneração do tecido ósseo (Amini et al., 2012).

As CTM são células indiferenciadas com alta taxa proliferativa capazes de auto-renovação e diferenciação em células de diversos tecidos, como o ósseo, cartilaginoso e adiposo (Dominici et al., 2006). Segundo a *International Society for Cellular Therapy* os parâmetros mínimos para classificar uma população celular como CTMs são o imunofenótipo específico, a capacidade de adesão e crescimento sobre poliestireno e diferenciação em diversas linhagens celulares (Dominici et al., 2006).

De forma simplificada, o uso de CTMs com vistas a regeneração óssea pode ser conduzido por diferentes abordagens, como o aumento da disponibilidade de CTMs

endógenas (denominado *homing* endógeno) e sua subsequente participação no processo de imunomodulação local, considerado uma resposta natural de reparo. Além disso, às CTMs têm sido atribuído um efeito parácrino no processo de regeneração, pela capacidade de estimular outras células a partir da liberação de citocinas e fatores de crescimento, como fator de necrose tumoral- α (TNF- α), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), interleucina-1 (IL-1) e 6 (IL-6) (Wang et al., 2014; Langhans et al., 2016; Perez et al., 2018). Ainda, a obtenção das CTMs para expansão e diferenciação na célula alvo que será acomodada no defeito.

As CTMs podem ser obtidas de diferentes tecidos como a medula óssea, a polpa dental e os tecidos adiposo, epitelial e muscular e, na dependência da origem, apresentam capacidades de diferenciação distintas (Pachón-Pena et al., 2011; Killington et al., 2018). CTM derivadas da medula óssea (CTM-MO) apresentam elevado potencial de diferenciação osteoblástica e são, até o momento, consideradas o padrão-ouro nas estratégias de engenharia de tecidos ou terapia celular (Cavallo et al., 2011; Nancarrow-Lei et al., 2017), porém o uso dessas células destinadas à regeneração óssea e neovascularização pode ser impactado negativamente por fatores ou doenças pré-existentes (Wu et al., 2019). Logo, a utilização de CTM autólogas com vistas a regeneração óssea pode não ter a mesma eficácia terapêutica se estiverem expostas a microambientes patológicos, como o DM (Merlotti et al., 2010; van de Vyver, 2017; Al-Qarakhli et al., 2019). Estudos prévios evidenciaram que CTM obtidas de ratos diabéticos apresentam atividade celular e potencial osteogênico reduzidos, sugerindo que CTM obtidas de indivíduos com DM podem não representar uma alternativa como tratamento para regeneração óssea, exceto se combinadas com fatores de crescimento específicos (Lu et al., 2003; Qian et al., 2015; Flório et al., 2017).

Assim, o desenvolvimento de estratégias para recuperar o potencial osteogênico dessas células poderia minimizar as complicações a longo prazo associadas ao DM e otimizar o reparo ósseo nesse grupo de pacientes.

2.2 DIABETES MELLITUS

O DM é uma doença metabólica crônica caracterizada por hiperglicemia resultante de defeito na secreção de insulina pelo pâncreas e/ou da ação da insulina (Organização Mundial da Saúde, 2016; 2019; Sociedade Brasileira de Diabetes, 2019-2020). A insulina é o hormônio responsável pela metabolização dos açúcares em energia, logo, pelo controle da presença de glicose no sangue. De forma simplista, a etiologia e a patogênese do DM estão relacionadas à sensibilidade a este hormônio, mas os detalhes específicos são complexos e não totalmente compreendidos. Aceita-se que a característica comum a todas as formas de diabetes é a disfunção ou destruição das células pancreáticas independente dos mecanismos que causem o distúrbio, incluindo a predisposição e anormalidades genéticas, processos epigenéticos e autoimunes, resistência à insulina, doenças concomitantes, inflamação e fatores ambientais (Organização Mundial da Saúde, 2019).

A classificação de DM se baseia na sua etiologia e os tipos mais frequentes são (1) DM tipo 1, doença autoimune que corresponde em torno de 5 a 10 % de todos os casos e é relacionada à destruição de células β -pancreáticas, que resulta na diminuição da produção de insulina e (2) DM tipo 2, que corresponde a 90-95% dos casos e está associada a fatores de risco genéticos e ambientais, em especial aqueles que levam à obesidade (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2019-2020).

O DM representa um grande desafio aos sistemas de saúde público e privado devido aos altos índices de morbidade e mortalidade. Considerada uma epidemia mundial, apresentou em 2019 uma prevalência de 463 milhões (9,3%) de pacientes portadores; e estima-se que em 2045 o número de portadores cresça para 700 milhões (10,9%) (International Diabetes Federation, 2019). No Brasil, 16,8 milhões de indivíduos são portadores da doença ficando atrás apenas da China, Índia, EUA e Paquistão, e estima-se que em 2040 esse número alcance 20,3 milhões de doentes, o que resultará em um gasto para a saúde estimado em US\$ 29 bilhões (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2019-2020).

O estado hiperglicêmico pode afetar diversos órgãos e tecidos e problemas esqueléticos associados ao DM são frequentemente relatados (Merlotti et al., 2010; Weinberg et al., 2014; Jiao et al., 2015; Sundararaghavan et al., 2017). Dentre os mecanismos pelos quais o DM interfere no metabolismo e na arquitetura óssea estão

o comprometimento da vascularização e distribuição de oxigênio, o aumento do processo inflamatório, alterações funcionais e diminuição do recrutamento de células osteoprogenitoras (Vestergaard, 2007; Marin et al., 2018). Ainda, há evidências de que o estado hiperglicêmico inibe a proliferação e diferenciação de osteoblastos (Lalla et al., 2000; Ding et al., 2006; Alikhani et al., 2007; Jiao et al., 2015; Levinger et al., 2016). Essas alterações resultam, em última análise, no risco aumentado de fraturas, maior incidência de não união e atraso no reparo ósseo, além de prejudicar os procedimentos de reconstrução de defeitos ósseos em pacientes portadores de DM (Janghorbani et al., 2007; Retzepi; Donos, 2010; Jiao et al., 2015).

No aspecto molecular, o efeito da hiperglicemia no metabolismo ósseo pode estar diretamente relacionado com o acúmulo de ROS e AGES (Lalla et al., 2000; Barbosa et al., 2008; Hamada et al., 2009). ROS são moléculas reativas e instáveis, oriundas do metabolismo celular normal. Quando ocorre o desequilíbrio no processo metabólico (por exemplo, em estados hiperglicêmicos) há o aumento da geração e acúmulo de ROS no citoplasma, superando a defesa antioxidante natural da célula e resultando no aumento do estresse oxidativo (Schieber; Chandel, 2014). Ao reagir com diferentes constituintes celulares, como proteínas, carboidratos, lipídios e até mesmo o DNA, estas espécies reativas ativam fatores de transcrição pró-inflamatórios como o NF- κ B que podem causar danos celulares permanentes (Rendra et al., 2019). A manutenção do estresse oxidativo está diretamente associada a patogênese de diferentes doenças, como o DM (Giacco; Brownlee, 2010).

Os AGES são um grupo heterogêneo de compostos produzidos por reações não enzimáticas e espontâneas do grupo carbonil de carboidratos com proteínas, ácidos nucleicos ou lipídios através de uma série de reações. Assim como ocorre com ROS, o organismo possui mecanismos de defesa contra o acúmulo degenerativo de AGES. No entanto, em condições hiperglicêmicas, o acúmulo destes compostos supera os mecanismos de defesa naturais do organismo (Barbosa et al., 2008; Jiao et al., 2015; Chaudhuri et al., 2018). Os AGEs modificam estruturas intra-celulares, desregulam proteínas da matriz extracelular e aumentam a produção de citocinas inflamatórias, o que também contribui para as complicações do DM (Brownlee, 2005). A interação dos AGEs com um de seus mais conhecidos receptores, os RAGES, ativa a transcrição de NF- κ B e desencadeia alterações celulares morfofuncionais, como o aumento da expressão de mediadores inflamatórios, aumento da expressão de RanKL, diminuição da expressão de OPG e aumento da sinalização da diferenciação osteoclástica,

culminando no desequilíbrio do processo de remodelação e diminuição da densidade mineral óssea (McCarthy et al., 2001; 2004; Ding et al., 2006; Barbosa et al., 2008).

Em última análise, o estresse oxidativo causado pelo DM e seu impacto nas células, especialmente as CTMs, pode ser um dos mecanismos pelos quais esta desordem afeta a saúde do osso (Jiao et al., 2015).

2.3 TERAPIA DE FOTOBIMODULAÇÃO

A terapia de fotobiomodulação (FBM) é definida como uma terapia que emprega formas não ionizantes de luz no espectro visível (vermelho) ou invisível (infravermelho). É um processo não térmico que envolve reações fotofísicas e fotoquímicas que resultam, em um primeiro momento, na modulação da resposta inflamatória. O controle da resposta inflamatória leva à efeitos terapêuticos como alívio da dor e colabora com a cicatrização de feridas e regeneração de tecidos (Anders et al., 2015).

O mecanismo de ação da FBM não é totalmente esclarecido, mas é baseado na estimulação de fotorreceptores presentes na mitocôndria, entre eles a citocromo-C-oxidase, enzima responsável pela captação do oxigênio no metabolismo mitocondrial. Modificações induzidas pela luz no fotorreceptor aumentam a captação de oxigênio e a produção de ATP, modulando a expressão de óxido nítrico (NO) e de ROS, que contribuem para diminuir o estresse oxidativo. Este cenário favorece a neoformação vascular, o aumento da proliferação e diferenciação celular e aceleração do processo de reparo (Stein et al., 2005; Pinheiro et al., 2008).

Diversos estudos mostram os efeitos variados da FBM, dentre eles o estímulo da cicatrização de feridas cutâneas (Mester et al., 1968); redução de lesões orais (Dillenburg et al., 2014; Marín-Conde et al., 2019); melhora da condição periodontal em pacientes com periodontite crônica (Giannelli et al., 2012); formação e remodelação do tecido ósseo (Escudero et al., 2019; Fávaro-Pipi et al., 2011). Estes efeitos se baseiam pela modulação da secreção de citocinas pró-inflamatórias como a IL-6 e IL-8 (Harorli et al., 2019), de fatores de crescimento tais como o fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e da proteína morfogenética óssea

(BMP-2) (Saygun et al., 2012; Wu et al., 2012), todos eles envolvendo diferentes vias de sinalização (Arany et al., 2014; Anders et al., 2015; Hamblin, 2018).

No entanto, o efeito bioestimulador desta terapia é influenciado por diferentes parâmetros como comprimento de onda, densidade de energia, potência, frequência e duração da aplicação e distância da ponta aplicadora ao alvo (El Gammal et al., 2017). Estudos com parâmetros diferentes resultaram em efeitos distintos (Ayuk et al., 2018; Escudero et al., 2019; Garrido et al., 2019).

A luz interage com os tecidos, em maior ou menor grau, de acordo com o comprimento de onda (nm). Assim, sua escolha deve se basear no tecido a ser estudado e no tipo de estudo, *in vivo* ou *in vitro*. Do mesmo modo, a distância e o modo de contato de aplicação da FBM devem ser levados em consideração para evitar a divergência do feixe de luz e a consequente perda de energia. Comprimentos de onda iguais podem gerar resultados diferentes a depender da intensidade da irradiação, da energia aplicada e da duração da aplicação. Isso foi demonstrado por Hawkins e Abrahamse (2007), que avaliaram as respostas celulares de fibroblastos humanos da pele normal ou ferida, com laser de hélio-neon (632,8 nm), diodo (830 nm) e Nd: YAG (1064 nm) usando uma exposição de 5 J/cm² ou 16 J/cm² em 1 e 4 dias e mostraram que os efeitos modulatórios da FBM dependem da combinação dos parâmetros empregados.

Dentre estes parâmetros, a dose de energia se baseia na lei de Arndt-Schultz. Essa lei postula que os efeitos terapêuticos da FBM são observados quando a dose é empregada dentro de uma janela terapêutica; por outro lado, doses excessivas podem ter efeito inibidor ou mesmo citotóxico (van Breugel; Bär, 1992; Sommer et al., 2001). Tal resposta bifásica vem sendo demonstrada em diferentes estudos (Li et al., 2010; Huang et al., 2011; Arahbi et al., 2019). Estudos *in vitro* evidenciaram que as doses de 4 e 5 J/cm² tiveram um efeito bioestimulatório em CTMs derivadas do tecido adiposo, da medula óssea e da polpa dental (Li et al., 2010; Ferreira et al., 2019; Han et al., 2019).

2.3.1 FBM no reparo e regeneração do tecido ósseo

Diferentes modalidades de tratamentos têm sido estudadas e empregadas como terapias adjuvantes na reconstrução de defeitos ósseos. Entre eles, a terapia de FBM tem se destacado pela capacidade de modular, *in vivo*, a resposta inflamatória e a vascularização tecidual. Além disso, resultados *in vitro* e *in vivo* evidenciaram aumento da produção de diversos fatores de crescimento relacionados à osteogênese, como previamente mencionado (Pinheiro et al., 2008; Saygun et al., 2012; Hamblin, 2018). Com vistas à regeneração óssea, estudos evidenciaram que esta terapia aumenta a proliferação e a diferenciação de CTMs (Arany et al., 2014; Giannelli et al., 2013; Moreira et al., 2017).

Não há consenso na literatura quanto à seleção da maioria dos parâmetros de FBM para o tratamento de defeitos ósseos (Santinoni et al., 2017; Brassolatti et al., 2018; Escudero et al., 2019). Considerando os parâmetros de forma isolada, Brassolatti et al. (2018) consideram a escolha do comprimento de onda o fator mais relevante por estar relacionado diretamente com o tipo e a profundidade de uma lesão. Quanto maior o comprimento de onda, maior a profundidade de penetração no tecido. Assim, o comprimento de onda infravermelho (735-905 nm) mostrou ser o mais eficiente para lesões ósseas (Brassolatti et al. 2018). Isso vai ao encontro do observado por Escudero et al. (2019) que evidenciaram que, além do laser de gálio-alumínio-arseneto (GaAlAs) ser o mais utilizado, protocolos com comprimento de onda de 830nm e densidade de energia de 4 J/cm² resultaram em efeitos positivos no reparo de defeitos ósseos.

Os efeitos da FBM nas CTMs têm sido recentemente explorados e observa-se que essas células são estimuladas por diferentes vias de sinalização quando expostas à irradiação com doses na faixa entre 2 e 5 J/cm² (Garcia et al., 2014; Marques et al., 2016; Han et al., 2019;). Outro estudo recente mostrou que a FBM com dose de energia 5 J/cm² teve efeito positivo na viabilidade, *in vitro*, de CTMs e na formação óssea em defeitos de calvária em ratos (Diniz et al., 2018). Independente do protocolo utilizado, a maioria das investigações converge para o efeito positivo e estimulatório da FBM na regeneração óssea.

Já destacamos o papel do DM no metabolismo ósseo relacionado ao aumento da produção de ROS e AGES, e como estas modificam propriedades químicas e

funcionais de diferentes estruturas biológicas, culminando no aumento do estresse oxidativo (Barbosa et al., 2008). A FBM, como uma terapia cujos efeitos benéficos envolvem diretamente a modulação da ROS, resulta na diminuição deste estado de estresse (Hamblin, 2018; Kumar et al., 2019).

Neste sentido, a FBM vem demonstrando ser uma alternativa terapêutica eficaz no tratamento de defeitos ósseos em pacientes diabéticos, apesar da falta de consenso sobre o protocolo ideal a ser utilizado (Akyol; Güngörmüş, 2010; Brassolatti et al., 2018; Zare et al., 2020).

3 PROPOSIÇÃO

Avaliar o efeito da terapia de FBM no potencial osteogênico de CTMs derivadas da medula óssea de ratos diabéticos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP), registrado com o protocolo nº 027/2018 (Anexo A). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos em experimentação animal.

4.1 INDUÇÃO DO DM

O DM tipo 1 foi quimicamente induzido pela injeção intraperitoneal de estreptozocina (STZ, Sigma-Aldrich, MO, EUA), agente diabetogênico com citotoxicidade específica para as células β -pancreáticas, que resulta na diminuição da síntese e secreção de insulina com consequente hiperglicemia (Masiello et al., 1998; Szkudelski et al., 2001). Ratos machos da linhagem Wistar, pesando aproximadamente 150g, foram mantidos em jejum por 12h. Ao término do período de jejum, 60 mg/kg de STZ diluída em 0,2 mL de tampão citrato 1 M, pH 4,4 (Merck, HE, Alemanha) foram administrados em dose única por via intraperitoneal. Como Controle, ratos saudáveis receberam injeção de 0,2 mL de tampão citrato 1 M, pH 4,4 sem STZ. A verificação dos níveis de glicose circulante no sangue foi realizada a cada 7 dias, por 30 dias, utilizando o Accu-Chek Active® (Roche, Basileia, Suíça), de acordo com as instruções do fabricante. Os níveis de glicose sanguínea considerados normais para a espécie variam de 50 a 135 mg/dL (Harkness; Wagner, 1993). Foram considerados diabéticos os ratos que apresentaram níveis de glicose sanguínea igual ou superiores a 300 mg/dL a partir do 7º dia após a administração de STZ. Todas as análises foram realizadas 30 dias após a injeção de STZ ou solução tampão.

4.2 ANÁLISES MICROTOMOGRÁFICA E MORFOMÉTRICA

Para a caracterização do efeito do DM no tecido ósseo foram utilizados 03 fêmures de animais diabéticos (Grupo DM) e 03 fêmures de animais saudáveis (Grupo Controle). Após 30 dias, os animais foram eutanasiados com doses excessivas de anestésicos dissociativos (Ketamina, Agener União, SP, Brasil, 14mg/100g peso corporal) com agonistas de adrenorreceptores alfa-2 (Xilazina, Agener, 1,2 mg/100 mg de peso corporal), administrado por via intraperitoneal e seguidos de decapitação. Os fêmures foram removidos e armazenados em solução de formol tamponado 10% (pH = 7) (Merck) por, pelo menos, 48h.

O escaneamento e a reconstrução dos fêmures foram realizados no laboratório 3DBio da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP (FORP-USP) utilizando o microtomógrafo SkyScan 1172 (Bruker, Kontich, EUA) operando com fonte de raios-X de 100 kV, detectados por uma câmera de 11-megapixel com resolução de até 1 μm . As projeções tomográficas bidimensionais obtidas foram reconstruídas tridimensionalmente utilizando o software NRecon (versão 1.6.10.4, Bruker). Após a reconstrução, foi selecionada uma região de interesse (ROI, do inglês *region of interest*) e um volume de interesse (VOI, do inglês *volume of interest*) na distal dos fêmures, utilizando como referência a placa de crescimento. A segmentação para o osso trabecular distal do fêmur foi definida na escala de histograma de cinza (0-255) entre 80-255. As reconstruções foram analisadas no software *CT Analyser* (Ctan) (versão 1.15.4.0, Bruker) para obtenção dos parâmetros morfométricos: volume ósseo/volume total (%); densidade óssea (superfície óssea/volume total, mm^{-1}); espessura trabecular (mm); separação trabecular (mm); densidade de conectividade ($1/\text{mm}^2$) e densidade mineral óssea (g.cm^{-3}). Estes parâmetros, automaticamente gerados pelo software Ctan, são preconizados pela *American Society of Bone and Mineral Research* (Parfitt et al., 1987).

4.3 OBTENÇÃO, ISOLAMENTO E CULTURA DE CÉLULAS

As CTMs foram isoladas da medula óssea dos fêmures dos ratos DM (CTM-DM) e Controle (CTM) 30 dias após a injeção de STZ. Para tanto, os animais foram mortos como descrito no item 4.2. Os fêmures foram removidos e acondicionados em tubos falcon de 50 mL contendo meio de transporte composto por meio essencial mínimo modificação alfa (α -MEM) (Gibco-Life Technologies, NY, EUA) suplementado com 500 μ g/mL de gentamicina (Gibco) e 3 μ g/mL de fungisona (Gibco) e transportados para o fluxo laminar. Dentro do fluxo, os fêmures foram submetidos à antisepsia e remoção de tecidos moles remanescentes, as epífises foram removidas e a medula óssea coletada por lavagem do canal medular com irrigação com 10 mL de meio de expansão (ME) composto por α -MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 100 UI/mL de penicilina-estreptomicina (Gibco) e 0,3 μ g/mL de fungisona (Gibco). A medula óssea coletada foi mantida em frascos de poliestireno de 75 cm² (Corning Incorporated, NY, EUA) contendo 20 mL de ME. A medula óssea coletada dos animais DM foi dividida em dois frascos. Ao final de 24 h, os frascos contendo as células derivadas da medula óssea foram lavados com PBS (do inglês, *Phosphate Buffered Saline*, Gibco) para remoção de células não aderidas e seleção das CTM-DM e CTM, que permanecem aderidas ao poliestireno. As culturas foram mantidas a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico, até a subconfluência. O meio foi trocado a cada 72 h e a progressão avaliada em microscópio de fase invertido (Axiovert 25, Zeiss, Alemanha). Metade dos frascos contendo CTM-DM foram submetidos à irradiação, como descrito a seguir.

Ao atingirem a subconfluência, o meio foi removido e as garrafas lavadas com PBS aquecido. A seguir, 9,5 mL de solução de 0,25% tripsina (Gibco) e 500 μ L de EDTA 1 mM (Gibco) foram adicionados e mantidos em 37 °C por 10 min para obtenção da suspensão das células. A solução de tripsina foi inativada com metade do volume de meio e as células contadas no hemocitômetro (Thermo Fischer Scientific, MA, EUA) para determinar o volume necessário para o plaqueamento na densidade de 10⁴ células/cm² em placas de 24 ou 6 poços (Corning).

Para diferenciação em osteoblastos (OBs), as células foram cultivadas em meio osteogênico, composto de ME suplementado com 5 μ g/mL de ácido ascórbico (Gibco), beta-glicerofosfato 7 mM (Sigma-Aldrich) e dexametasona 10⁻⁷ M (Sigma-Aldrich). As

células destinadas aos ensaios de imunofluorescência foram plaqueadas em poços contendo lamínula de Thermanox® (Thermo). As culturas foram mantidas a 37 °C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico por até 17 dias. O meio foi trocado a cada 72 h e a progressão avaliada em microscópio de fase invertido (Axiovert 25, Zeiss).

4.4 DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Osteoblastos diferenciados de CTMs derivadas da medula óssea de animais saudáveis foram utilizados como Controle positivo (OB); osteoblastos diferenciados de CTMs derivadas da medula óssea de animais DM foram utilizados para avaliar o efeito do DM na diferenciação celular (OB-DM); e OB-DM foram utilizados para avaliar o efeito da terapia de FBM (OB-DM-FBM). Todas os experimentos foram realizados em triplicata, e os dados apresentados são representativos de um dos experimentos.

4.5 TERAPIA DE FOTOBIMODULAÇÃO (FBM)

Os procedimentos com equipamentos de laser foram realizados seguindo as normas de segurança NBR/IEC 601.2.22 (ABNT, 1997). As células foram irradiadas usando um laser de diodo semicondutor GaAlAs (Photon III, DMC, Brasil) em modo de operação contínua e em contato com o fundo das garrafas e placas em modo pontual (1 ponto/2 cm²) (Ferreira et al., 2019). As irradiações foram realizadas em CTM-DM 24 h após a coleta e a cada 72 h, até a subconfluência. As irradiações foram realizadas em OB-DM 24 h após o plaqueamento (t = 0) e a cada 72 h, imediatamente após a troca do meio, por períodos de até 17 dias. Os parâmetros de FBM estão descritos na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Parâmetros selecionados para aplicação da FBM

Parâmetros	Densidade de Energia (J/cm ²)	Tempo de irradiação por ponto(s)	Densidade de potência (W/cm ²)	Comprimento de onda (nm)	Potência (mW)	Energia por ponto (J)	Área do spot (cm ²)
	5	7	0,714	660	20	0,14	0,028

Fonte: O autor.

De forma simplificada, as placas foram apoiadas no fluxo laminar em suporte específico que mantém a ponta do aparelho de laser em 90° e perpendicular à base da placa. Para minimizar a reflexão da luz e a incidência desta no poço vizinho, as células foram plaqueadas em poços alternados e durante a aplicação do laser uma tela preta limitava a saída de luz da ponta do equipamento. A potência de saída foi verificada com um medidor de energia antes e após a aplicação da FBM.

4.6 AVALIAÇÃO DAS RESPOSTAS CELULARES

4.6.1 Morfologia celular

Após 24 e 72 h, a morfologia celular foi avaliada ao microscópio de epifluorescência (Zeiss). Para isso, as células foram fixadas em paraformaldeído a 4% (Merck) em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2 por 10 min à temperatura ambiente. A permeabilização foi feita com solução de Triton X-100 a 0,5% (Acros Organics, NY, EUA). O citoesqueleto de actina foi corado com Alexa Fluor 488 (fluorescência verde) conjugada com faloidina (1:200; Invitrogen, OR, EUA) e os núcleos foram corados com 4', 6-diamidino-2-fenilindol, diidrocloreto 300 nM (DAPI) (Invitrogen). As imagens foram adquiridas por uma câmera digital (Zeiss) e sobrepostas e analisadas usando o software AxionVision 4.8 (Zeiss) (n=3).

4.6.2 Viabilidade celular

Aos 4, 7 e 10 dias, a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio colorimétrico de MTT (do inglês, *Thiazolyl blue tetrazolium bromide*). Esse ensaio é dependente da redução do MTT (Sigma-Aldrich) pela desidrogenase mitocondrial de células viáveis em formazan, o qual pode ser quantificado por espectrofotometria (Mosmann, 1983). As células foram incubadas em meio de cultura contendo MTT (5 mg/mL) por 4 h (Sanyo Electric Co., OS, Japão). O meio foi removido, acrescentado 1 mL de isopropanol ácido (100 ml de isopropanol em 134 µL de ácido clorídrico a 0,04 N – Merck) e a placa de cultura foi mantida em um agitador de placas (Lab-Line Instruments, IL, EUA) por 10 min. Alíquotas de 150 µL da solução de cada poço foram transferidas para placas de 96 poços (Corning) e a densidade óptica foi lida em comprimento de onda de 570 nm em espectrofotômetro (µQuant, Biotek, NY, EUA). Os dados, obtidos em quintuplicata (n=5), foram expressos por absorbância.

4.6.3 Expressão de genes marcadores da diferenciação osteoblástica

Aos 10 dias de cultivo, foi avaliada a expressão gênica por PCR (do inglês, *polimerase chain reaction*) em tempo real (RT-PCR) dos marcadores de diferenciação osteoblástica fosfatase alcalina (*Alp*), fator de transcrição relacionado ao Runt-2 (*Runx2*), sialoproteína óssea (*Bsp*) e osteopontina (*Opn*). O meio de cultura foi removido dos poços e foi adicionado o reagente Trizol LS (Invitrogen) à temperatura ambiente, por 5 min, sob agitação por pipetagem. A extração do RNA total foi realizada utilizando o kit *SV Total RNA Isolation System* (Promega, WI, EUA), de acordo com especificações do fabricante. Em seguida, o RNA total foi quantificado em diferentes comprimentos de onda (260, 280, 230 e 320 nm) em espectrofotômetro (GE Healthcare, IL, EUA) e sua integridade avaliada por meio do aparelho *Agilent 2100 BioAnalyzer* (Agilent Technologies, CA, EUA). A integridade do RNA foi verificada a partir de 100 ng do RNA total, seguindo as instruções do fabricante, sendo que valores de RIN (*RNA Integrity Number*) superiores a 7 são considerados adequados (Schroeder et al., 2006). Em seguida, foi confeccionada a fita de cDNA a partir de

1000 ng de RNA total. Este procedimento foi feito no termociclador *Mastercycle Gradient* (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) por meio de reação com a enzima transcriptase reversa, utilizando o kit *High-capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, CA, EUA).

Para a reação por RT-PCR, foi preparado um mix contendo 7 µL do reagente *SYBR Green Fast Master Mix* (Thermo) que contém o fluoróforo *SYBR Green*, a enzima polimerase *AmpliTaq Gold*, dNTPs e o fluoróforo ROX, utilizado como referência passiva para normalização dos níveis de fluorescência, além dos demais componentes de tampão e 0,5 µL da solução contendo cada primer (*forward* e *reverse*) com as concentrações adequadas, somando 8 µL. As reações foram realizadas em quadruplicata, utilizando 8 µL do mix e 5 µL da solução de cDNA diluído 2x (11,25ng), para cada primer selecionado e para um volume final de 13 µL / reação. As reações de amplificação consistem em 2 min a 50°C, 10 min a 95°C, quarenta ciclos de 15 s a 95°C e 1 min a 60°C (desnaturação e extensão), além de um ciclo final de 20 min, com temperatura crescente de 60°C a 95°C, empregado para a obtenção de uma curva de dissociação dos produtos da reação, utilizada para a análise da especificidade de amplificação. Os *primers* foram desenhados utilizando o programa Primer Express 3.0 (Applied Biosystems) e para ter eficiência entre 95-105% (Tabela 4.2).

Os resultados foram analisados com base no valor de Ct (do inglês, *cycle threshold*) calibrados pela expressão de OB e normalizado pela expressão do gene para a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*Gapdh*), utilizando o método comparativo de 2^{-ddCt} (Livak; Schmittgen, 2001).

Tabela 4.2 – Sequência de primers para cada gene usados para RT-PCR

Gene	Forward Reverse
<i>Alp</i>	CCAACTCATTGTGCCAGAG CAGGGCATTTCCTCAAGGTCTC
<i>Runx2</i>	CACAAACAACCACAGAACCAC TTGCTGTCCTCCTGGAGAAA
<i>Opn</i>	GAAGCCTGACCCATCTCAGAA GTTGCTTGGAAGAGTTTCTTGCTT
<i>Bsp</i>	AGACTGCTTTAATCTTGCTCTGC GTAGCGTGGCCGGTACTTA
<i>Gapdh</i>	TCTCTGCTCCTCCCTGTTCTA GCCAAATCCGTTACACCG

Alp – fosfatase alcalina; *Runx2* – fator de transcrição relacionado ao runt-2; *Opn* - osteopontina; *Bsp* – sialoproteína óssea; *Gapdh* – gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

Fonte: O autor.

4.6.4 Expressão de proteínas marcadoras da diferenciação osteoblástica

Aos 7 dias de cultivo, foi avaliada a expressão proteica por Western Blot dos marcadores de diferenciação osteoblástica ALP, RUNX2 e OPN. O meio de cultura foi removido, as células foram lavadas e destacadas com PBS gelado e mantidas em freezer -80 °C. O pellet de células foi lisado em tampão RIPA (NaCl-150 mM, Sigma-Aldrich; NP40-10%, Sigma-Aldrich; C24H39O4Na-0,5%, Sigma-Aldrich; SDS-0,1%, Sigma-Aldrich e Tris base-50 mM, pH 8, Roche) e em ultrassom (Misonix, NY, EUA; 10 pulsos na intensidade 10 por 10 s). A proteína total foi quantificada pelo método descrito por Lowry et al. (1951). Foram preparados géis de acrilamida a 8,5% (para um volume final de 10 mL - 2,84 mL de acrilamida, 2,6 mL de tampão Tris a 1,5% e SDS a 0,4%, pH 8,8, 4,8 mL de água destilada, 10 µL de Temed e 75 µL de persulfato de amônio a 10%) (National Diagnostics, GA, EUA), montados em aparato próprio e adicionado tampão de corrida 1X (3,01 g de Tris base, Roche; 14,4 g de glicina, USB Corporation, OH, EUA; e 1 g de SDS, Sigma-Aldrich; para um volume final de 1 L de água destilada). Amostras contendo 50 µg de proteína em 35 µL foram misturadas com 7 µL de Dye 6X (7 mL de Tris base pH 6,8, Roche; 3 mL de glicerol, Sigma-Aldrich; 1 g de SDS, Sigma-Aldrich; 0,93 g de DTT, Sigma-Aldrich; 1,2 mg de bromofenol, Sigma-Aldrich em um volume final de 10 mL de água destilada) e

mantidas em banho com água em ebulição por 10 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 min a 10.500 rpm e aplicadas nos géis.

A separação das proteínas foi feita com o aparato em 120 Volts por aproximadamente 1 h. Para identificar o peso molecular das proteínas, foi usado um marcador (Bio-Rad, CA, EUA) que identifica bandas entre 10 e 250 kDa. As proteínas foram transferidas dos géis para membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF) (*mini transfer pack*, Bio-Rad), usando o *Trans Blot Turbo Transfer System* (Bio-Rad), com voltagem e amperagem fixas em 1.3A e 25V por 7 min. As membranas foram incubadas em solução de leite desnatado a 5% em TBS-Tween (2,43 g de Tris- Roche; 8 g de NaCl-Sigma-Aldrich e 1 mL de Tween 20 em um volume final de 1 L de água destilada, pH 7,6) à temperatura ambiente por 1 h, para bloqueio de sítios inespecíficos. Foi realizado incubação com o anticorpo primários anti-ALP (monoclonal de coelho, 1:4000, Abcam-108337); anti-RUNX2 (monoclonal de coelho, 1:2000, Cell Signaling-8465); e anti-OPN (monoclonal de coelho, 1:1000, Thermo-PA5 34579) por 2 h. Posteriormente foi realizado a incubação do anticorpo secundário por 40 min (cabra anti-coelho IgG1, 1:3000, Cell Signaling). Entre cada incubação, as membranas foram lavadas três vezes por 10 min, com TBS-Tween. Ao término da última lavagem, as membranas foram incubadas por 5 min em solução quimioluminescente (Bio-Rad) e analisadas no aparelho G-Box (Syngene, Índia) que detecta a luminescência das bandas marcadas referentes às proteínas de interesse (ALP: 75 KDa; RUNX2: 60 KDa; OPN: 44 kDa).

Ao final do processo, as membranas foram incubadas em solução *Re-blots plus mild* (Millipore, EUA), à temperatura ambiente por 20 min, para a remoção dos anticorpos primário e secundário e submetidas ao mesmo processo descrito, usando anticorpo primário anti-GAPDH (monoclonal de coelho, 1:1000, Santa Cruz - sc25778) e anticorpo secundário (cabra anti-coelho IgG1, 1:3000, Cell Signaling). A expressão da proteína selecionada foi quantificada utilizando o software de imagens *Image J* (NIH, MD, EUA) (Schneider et al., 2012), normalizada pela expressão da proteína constitutiva GAPDH (37 KDa).

4.6.5 Atividade de fosfatase alcalina (ALP)

Aos 7 e 14 dias a atividade de ALP foi avaliada pela liberação de timolftaleína pela hidrólise do substrato de timolftaleína monofosfato, utilizando um kit comercial (Labtest, SP, Brasil). Foram utilizados tubos de ensaio branco, padrão e os testes. Em todos os tubos foram adicionados 50 μ L de substrato e 500 μ L de tampão. No tubo padrão foi acrescentado 50 μ L da solução padrão. Os poços contendo as células foram incubados com 1 mL de solução de lauril sulfato de sódio 0,1% (Sigma-Aldrich). Ao final de 30 min, a solução contida em cada poço foi homogeneizada e 50 μ L do lisado foram transferidos para os tubos de ensaio previamente aquecidos em banho maria a 37 °C, onde permaneceram por mais 10 min. Após esse período, foram adicionados em cada tubo (branco, padrão e testes) 2 mL do reagente de cor. Aliquotas de 150 μ L da solução de cada tubo foram transferidas para placas de 96 poços (Corning) e a densidade óptica foi lida em comprimento de onda de 590 nm em espectrofotômetro μ Quant (BioTek).

A atividade de ALP foi calculada a partir da medida do tubo padrão, normalizada pela quantidade de proteína total (obtida de acordo com o método descrito por Lowry et al. (1951). Para tanto, 1 mL do mesmo lisado utilizados para a quantificação da atividade de ALP foi transferido para tubos de ensaio, misturado com 1 mL de solução de Lowry (Sigma-Aldrich, EUA) e mantido em repouso à temperatura ambiente por 20 min. Após esse período, foi adicionado a cada tubo 0,5 mL da solução de reagente de fenol de *Folin e Ciocalteu's* (Sigma-Aldrich) e mantidos em temperatura ambiente por mais 30 min. Em seguida, a absorbância de cada tubo foi lida no espectrofotômetro utilizando-se o comprimento de onda de 680 nm e a concentração de proteína total (mg/mL) de cada poço foi calculada a partir de uma curva padrão feita com albumina bovina (Sigma-Aldrich). Os dados, obtidos em quintuplicata (n=5), foram expressos por absorbância calculada como descrito acima e expressos em μ mol de timolftaleína/h/mg de proteína.

4.6.6 Detecção e quantificação de matriz extracelular mineralizada

Aos 17 dias, a formação de matriz extracelular mineralizada foi detectada por coloração com vermelho de alizarina S (Sigma-Aldrich), que cora áreas de mineralização ricas em cálcio. O meio foi removido e os poços lavados com PBS aquecido a 37 °C e as células fixadas em paraformaldeído 4% por, pelo menos, 24 h. Em seguida, as células foram submetidas a desidratação em séries crescentes de álcoois e deixadas para secar à temperatura ambiente por 24 h. Posteriormente foram coradas com vermelho de alizarina S 2%, pH 4,2, mantidas em temperatura ambiente por 10 min e lavadas com PBS. A quantificação foi realizada por extração de cálcio como descrito por Gregory et al. (2004). A cada poço foram adicionados 280 µL de ácido acético (Acros Organics) a 10% e mantidos à temperatura ambiente por 30 min, sob agitação. Após esse período, a solução de cada poço foi homogeneizada e transferida para tubos de 1,5 mL. Os tubos foram incubados a 85 °C por 10 min e transferidos por 5 min para recipiente contendo gelo para parar o aquecimento. Os tubos foram centrifugados a 13.000 rpm por 20 min e 100 µL do sobrenadante foram transferidos para uma placa de 96 poços (Corning). Em seguida, foi adicionado 40 µL de hidróxido de amônia 10% (Reagen, PR, Brasil) em cada poço para neutralizar o ácido. O volume final do sobrenadante foi utilizado para a leitura em espectrofotômetro µQuant (BioTek) em comprimento de onda de 405 nm. Os dados, obtidos em quintuplicata (n=5), foram expressos por absorbância.

4.6.7 Análise preliminar do mecanismo de ação da FBM

4.6.7.1 Avaliação do estresse oxidativo pela mensuração de óxido nítrico

A produção de NO foi indiretamente determinada pela análise da concentração de nitrito, através da reação de Griess (Green et al., 1982). Aos 3 dias de cultivo, 24 h após a aplicação da FBM, os meios dos três grupos foram coletados e mantidos em freezer -80 °C até o momento das análises. Brevemente, 50 µL do total coletado foram incubados com igual volume de reagente de Griess (1% sulfonilamida; 0,1%

naftilenodiamina e 2,5% de ácido orto-fosfórico) em placa de 96 poços em temperatura ambiente na ausência de luz. Como padrão foi utilizado 200 mM de nitrito de sódio (NaNO_2). As placas foram lidas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm, e os dados foram expressos em μM de NO_2 com base na curva padrão ($n=2$).

4.6.7.2 Análise da expressão de genes

Aos 10 dias de cultivo, foi avaliada a expressão gênica por RT-PCR dos genes fator indutor de hipóxia 1 alfa (*Hf1- α*), *Nf-kb* e *Rages*, como descrito no item 4.6.3. Os *primers* foram desenhados utilizando o programa Primer Express 3.0 (Applied Biosystems) para ter eficiência entre 95-105% (Tabela 4.3).

Tabela 4.3 – Sequência de primers para cada gene usados para RT-PCR

Gene	Forward
	Reverse
<i>Hf1- a</i>	AGAGCAATTCTCCAAGCCCTC TGATTCATCAGTGGTGGCAGTT
<i>Nf-kb</i>	TTCAACATGGCAGACGACGA AGGTATGGGCCATCTGTTGAC
<i>Rages</i>	GTCGGGCAACTAACAGGCTT ACGTCCCCACCTTATTAGGGA

Alp – fosfatase alcalina; *Runx2* – fator de transcrição relacionado ao runt-2;
Opn - osteopontina; *Bsp* – sialoproteína óssea; *Gapdh* – gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

Fonte: O autor.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Estatísticas descritivas foram obtidas para cada experimento empregando o software SigmaPlot 12.0 (Systat Software Inc, CA, EUA). Todos os dados foram submetidos ao teste de aderência à curva normal e homogeneidade de variâncias para avaliar a aderência à curva normal e, posteriormente, analisados por testes paramétricos ou não-paramétricos para verificar as diferenças entre as variáveis estudadas. Os dados dos níveis de glicemia e peso corporal foram comparados por análise de variância com dois fatores e medidas repetidas. Dados da análise morfométrica dos fêmures reconstruídos foi comparado por teste t. Os dados de viabilidade celular, RT-PCR, Western Blot, atividade de ALP e mineralização foram avaliados usando ANOVA com um ou dois fatores, seguidos pelo teste de Student Newman-Keuls, quando indicado. Dados da quantificação de NO foi comparado por Kruskal-Wallis. O nível de significância adotado foi de 5% ($p \leq 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 INDUÇÃO DO DM

O estado diabético experimental dos animais foi caracterizado pelo acompanhamento do peso corporal e dos níveis sanguíneos de glicose a partir do 7º dia após a indução com STZ (60 mg/kg) e pelos 30 dias subsequentes (Figura 5.1). Ao longo do experimento todos os animais ganharam peso. O ganho foi mais evidente no Controle comparado aos animais DM dos 14 aos 30 dias ($p < 0,001$ para grupos e $p < 0,001$ para períodos) (Figura 5.1 A). Os animais DM exibiram maiores níveis de glicemia capilar ($563,16 \pm 27,69$) comparado ao Controle ($116,5 \pm 4$ mg/dL) em todos os períodos avaliados ($p < 0,001$), mas não houve aumento da glicemia em relação ao tempo ($p = 0,256$) (Figura 5.1 B).

Figura 5.1 - Valores médios de (A) glicemia (mg/dL) e (B) peso corporal (g) de ratos machos saudáveis (Controle) e diabéticos após 7, 14, 21 e 30 dias da injeção com solução tampão ou STZ (60mg/kg), respectivamente. Os dados estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (ANOVA dois fatores com repetição, $p \leq 0,05$)

Fonte: O autor.

5.2 ANÁLISE MICROTOMOGRÁFICA E MORFOMÉTRICA

As reconstruções tridimensionais dos fêmures evidenciaram diferenças qualitativas na estrutura óssea dos animais Controle comparado aos DM (Figura 5.2). Nota-se que a epífise do fêmur do animal Controle apresenta cortical inalterada e com maior quantidade de trabéculas (Figura 5.2 A), enquanto a epífise do fêmur do animal DM exhibe contorno externo alterado e redução significativa da densidade trabecular (Figura 5.2 B).

Figura 5.2 - Reconstruções microtomográficas tridimensionais dos fêmures de ratos do grupo controle (A) e diabético (B), 4 semanas após injeção de solução tampão ou STZ (60 mg/kg), respectivamente

Fonte: O autor.

As análises morfométricas da porção distal dos fêmures indicaram diferenças estatisticamente significantes para todos os parâmetros avaliados: porcentagem de volume ósseo (Figura 5.3 A; $p < 0,001$), densidade de superfície óssea (Figura 5.3 B, $p = 0,001$), espessura (Figura 5.3 C, $p < 0,001$) e separação trabecular (Figura 5.3 D, $p = 0,004$), densidade de conectividade (Figura 5.3 E, $p = 0,011$) e densidade mineral óssea (Figura 5.3F, $p < 0,001$). Os dados estão representados na Figura 5.3.

Figura 5.3 - Parâmetros morfométricos obtidos após reconstrução dos fêmures de ratos do grupo controle e diabético (DM), por microtomografia computadorizada. Volume ósseo (A); Densidade de superfície óssea (B), Espessura trabecular (C), Separação trabecular (D), Densidade de conectividade (E), Densidade mineral óssea (F). Os dados estão representados como média $\pm$ desvio padrão ($n=3$). Asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significantes (Teste t, $p \leq 0,05$)

Fonte: O autor.

5.3 AVALIAÇÃO DAS RESPOSTAS CELULARES

5.3.1 Morfologia Celular

Imagens de microscopia de fluorescência dos OBs de todos os grupos e períodos revelaram uma monocamada celular representada por células viáveis com os citoesqueletos marcadas em verde e os núcleos em azul. Após 24 h, todas as células encontravam-se aderidas e em estágio inicial de espreadimento. Nota-se que OB-DM estão menores e apresentam formato mais arredondado comparado aos OB (Figura 5.4, comparar B com A); por outro lado, OB-DM expostos à FBM apresentam morfologia semelhante aos OB (Figura 5.4, comparar C com B e A). Aos 3 dias de cultivo, as células OB, OB-DM e OB-DM-FBM encontram-se espalhadas e sem diferenças morfológicas aparentes entre os grupos (Figura 5.4 D-F).

Figura 5.4 - Fotomicrografia de osteoblastos diferenciados de células-tronco mesenquimais (CTMs) derivadas da medula óssea de ratos controle (OB) (A,D), de ratos diabéticos (OB-DM) (B, E) e OB-DM expostos à terapia de fotobiomodulação (OB-DM-FBM) (C, F) cultivados em meio osteogênico por 24 (A-C) e 72 horas (D-F). Marcação por fluorescência direta do citoesqueleto de actina (faloidina, verde) e núcleo (DAPI, azul). Ampliação de 20x. Barra de escala = 100 μ m

Fonte: O autor.

5.3.2 Viabilidade Celular

A viabilidade celular apresentou diferenças na dependência do grupo, tempo experimental e a interação entre eles ($p = 0,017$; $p < 0,001$ e $p < 0,001$ respectivamente). OB e OB-DM apresentaram pico de viabilidade aos 7 dias, com queda após 10 dias. Por outro lado, nota-se aumento da viabilidade de OB de 4 para 10 dias ($p < 0,05$ para todos os grupos). Aos 4 dias de cultivo, a viabilidade de OB-DM-FBM foi menor que OB ($p = 0,015$) e igual a OB-DM ($p = 0,117$), dentre as quais não foi detectado diferença estatisticamente significativa ($p = 0,183$). Aos 7 dias, nota-se que a viabilidade de OB é maior que OB-DM ($p = 0,011$) e ambos maiores que OB-DM-FBM ($p < 0,001$ para ambos). Aos 10 dias, a viabilidade celular de OB-DM-FBM é maior que OB-DM, e ambos maiores comparados com OB ($p < 0,001$ para todos) (Figura 5.5).

Figura 5.5 - Viabilidade de osteoblastos diferenciados de células-tronco mesenquimais (CTMs) derivadas da medula óssea de ratos controle (OB), de ratos diabéticos (OB-DM) e OB-DM expostos à terapia de fotobiomodulação (OB-DM-FBM) aos 4, 7 e 10 dias. Os dados estão representados como média $\pm$ desvio padrão ($n=5$). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos; asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significantes entre os tempos experimentais (ANOVA com dois fatores, $p \leq 0,05$)

Fonte: O autor.

5.3.3 Expressão de genes marcadores da diferenciação osteoblástica

Os resultados qualitativos observados nos eletroferogramas e nos respectivos géis, assim como os dados quantitativos detectados pelo RIN (todos acima de 9,2), indicaram que o RNA total de OB, OB-DM e OB-DM-FBM encontram-se íntegros (Figura 5.6).

Figura 5.6 - Avaliação da integridade do RNA total de osteoblastos diferenciados de células-tronco mesenquimais (CTMs) derivadas da medula óssea de ratos controle (OB), de ratos diabéticos (OB-DM) e OB-DM expostos à terapia de fotobiomodulação (OB-DM-FBM) aos 10 dias. Os picos dos eletroferogramas e as bandas mais intensas nos géis correspondem ao RNA ribossômico 18S e 28S e representam qualitativamente a integridade das amostras. Os valores de RIN (*RNA Integrity Number*) representam a qualidade das amostras de RNA total

Fonte: O autor.

A expressão gênica dos marcadores osteoblásticos *Alp*, *Bsp*, *Runx2* e *Opn* foi estatisticamente diferente entre os grupos experimentais ($p < 0,001$; $p = 0,008$; $p < 0,001$ e $p = 0,001$, respectivamente) (Figuras 5.7 A-D). OB-DM resultou em expressões mais baixas de *Alp* ($p < 0,001$), *Bsp* ($p = 0,006$), *Runx2* ($p < 0,001$) e *Opn* ($p < 0,001$) quando comparado ao OB. A terapia de FBM aumentou a expressão dos genes de *Alp* ($p < 0,001$), *Bsp* ($p = 0,048$) e *Opn* ($p < 0,001$) e diminuiu a expressão de *Runx2* ($p < 0,001$) quando comparado a OB-DM.

Figura 5.7 - Expressão relativa dos genes fosfatase alcalina (Alp), sialoproteína óssea (Bsp), osteopontina (Opn) e fator de transcrição relacionado ao Runt-2 (Runx-2) de osteoblastos diferenciados de células-tronco mesenquimais (CTMs) derivadas da medula óssea de ratos controle (OB), de ratos diabéticos (OB-DM) e OB-DM expostos à terapia de fotobiomodulação (OB-DM-FBM) aos 10 dias. Os dados estão representados como média $\pm$ desvio padrão (n=4). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes (ANOVA com um fator $p \leq 0,05$)

Fonte: O autor.

5.3.4 Expressão de proteínas marcadoras da diferenciação osteoblástica

A expressão proteica dos marcadores osteoblásticos ALP, RUNX2 e OPN foi estatisticamente diferente entre os grupos ($p = 0,038$; $p < 0,001$ e $p < 0,001$ respectivamente). A expressão de ALP foi menor em OB-DM comparado ao OB ($p = 0,037$), enquanto não foram observadas diferenças entre OB-DM e OB-DM-FBM ($p = 0,460$) e entre OB e OB-DM-FBM ($p = 0,055$) (Figura 5.8 A).

Não houve diferença na expressão de RUNX2 entre OB e OB-DM ($p = 0,086$); OB-DM-FBM apresentou menor expressão de RUNX2 comparado ao OB-DM ($p < 0,001$) e ao OB ($p < 0,001$) (Figura 5.8 B).

OB-DM apresentou menor expressão de OPN comparado ao OB ($p = 0,003$). Nota-se aumento da expressão de OPN em OB-DM-FBM comparado ao OB e OB-DM ($p = 0,029$ e $p < 0,001$ respectivamente) (Figura 5.8 C).

Figura 5.8 - Detecção e quantificação relativa das proteínas ALP (A), RUNX2 (B) e OPN (C) de osteoblastos diferenciados de células-tronco mesenquimais (CTMs) derivadas da medula óssea de ratos controle (OB), de ratos diabéticos (OB-DM) e OB-DM expostos à terapia de fotobiomodulação (OB-DM-FBM) aos 7 dias. As bandas superiores representam os alvos e as inferiores o constitutivo GAPDH. Os dados estão representados como média $\pm$ desvio padrão ($n=3$). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (ANOVA com um fator, $p \leq 0,05$)

Fonte: O autor.

5.3.5 Atividade de ALP

A atividade de ALP apresentou diferenças na dependência do grupo, do tempo experimental e na interação entre os fatores ($p < 0,001$ para todos). Houve aumento da atividade de ALP de 7 para 14 dias em todos os grupos experimentais ($p < 0,001$, para todos). Aos 7 dias, não houve diferença estatisticamente significativa na atividade de ALP entre OB e OB-DM ($p = 0,091$) e entre OB e OB-DM-FBM ($p = 0,113$); contudo a atividade de ALP foi maior em OB-DM-FBM comparado ao OB-DM ($p = 0,008$). Aos 14 dias, a atividade de ALP foi menor em OB-DM comparado ao OB ($p = 0,003$) e maior em OB-DM-FBM em relação à OB e OB-DM ($p < 0,001$). Digno de nota, a FBM aumentou a atividade de ALP de OB-DM nos dois tempos experimentais ($p = 0,008$ e $p < 0,001$ para 7 e 14 dias) (Figura 5.9).

Figura 5.9 - Atividade de fosfatase alcalina (ALP) de osteoblastos diferenciados de células-tronco mesenquimais (CTMs) derivadas da medula óssea de ratos controle (OB), de ratos diabéticos (OB-DM) e OB-DM expostos à terapia de fotobiomodulação (OB-DM-FBM) aos 7 e 14 dias. Os dados estão representados como média $\pm$ desvio padrão ($n=5$). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes; asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significantes entre os tempos experimentais (ANOVA com dois fatores, $p \leq 0,05$)

Fonte: O autor.

5.3.6 Detecção e quantificação de matriz extracelular mineralizada

A produção de matriz extracelular mineralizada foi estatisticamente diferente entre os grupos ($p < 0,001$) (Figura 5.11). O DM diminuiu a produção de matriz quando comparado ao OB ($p < 0,001$); e a terapia de FBM resultou no aumento da quantidade de matriz em relação ao OB-DM ($p = 0,005$), mas sem diferença em relação à OB ($p = 0,136$).

Figura 5.10 - Detecção e quantificação de matriz extracelular mineralizada de osteoblastos diferenciados de células-tronco mesenquimais (CTMs) derivadas da medula óssea de ratos controle (OB), de ratos diabéticos (OB-DM) e OB-DM expostos à terapia de fotobiomodulação (OB-DM-FBM) aos 17 dias. Os dados estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão ($n = 5$). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes (ANOVA com um fator, $p \leq 0,05$)

Fonte: O autor.

5.3.7 Análise preliminar do mecanismo de ação da FBM

5.3.7.1 Mensuração dos níveis de NO

Os níveis de NO dos grupos OB, OB-DM e OB-DM-FBM ficaram abaixo da curva padrão, indicando que os níveis deste composto sobrenadante não foram detectáveis pelo método proposto ($p = 0,339$) (Figura 5.11).

Figura 5.11 - Mensuração de óxido nítrico (NO) de osteoblastos diferenciados de células-tronco mesenquimais (CTMs) derivadas da medula óssea de ratos controle (OB), de ratos diabéticos (OB-DM) e OB-DM expostos à terapia de fotobiomodulação (OB-DM-FBM), em 48h de cultivo e 24h após aplicação de FBM. Os dados estão representados como média $\pm$ desvio padrão ($n=2$) (Kruskal-Wallis, $p \leq 0,05$)

Fonte: O autor.

5.3.7.2 Análise da expressão de genes *Hf1α*, *Nfkb* e *Rages*

A expressão gênica de *Hf1α*, *Nfkb* e *Rages* foi estatisticamente diferente entre os grupos experimentais ($p < 0,001$; $p < 0,001$ e $p = 0,005$, respectivamente) (Figuras 5.12 A-C). A expressão de *Hf1α* foi menor em OB-DM-FBM comparado com OB e OB-DM ($p < 0,001$ para ambos), entre os quais não foi detectado diferença estatística ($p = 0,154$). A expressão de *Nfkb* em OB-DM foi menor quando comparado ao OB e maior comparado ao OB-DM-FBM ($p < 0,001$ para todos). A expressão dos *Rages*

não foi afetada pelo DM ($p = 0,214$), e foi maior em OB-DM-FBM comparada com OB e OB-DM ($p = 0,005$ e $p = 0,015$, respectivamente).

Figura 5.12 – Expressão relativa dos genes fator indutor de hipóxia 1 alfa (*Hf1a*), fator nuclear kappa B (*Nf-kb*) e receptores dos produtos finais de glicação (*Rages*) de osteoblastos diferenciados de células-tronco mesenquimais (CTMs) derivadas da medula óssea de ratos controle (OB), de ratos diabéticos (OB-DM) e OB-DM expostos à terapia de fotobiomodulação (OB-DM-FBM), aos 10 dias. Os dados estão representados como média $\pm$ desvio padrão ($n=4$). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes (ANOVA com um fator $p \leq 0,05$)

Fonte: O autor.

6 DISCUSSÃO

O emprego da terapia celular autóloga e da engenharia de tecidos no tratamento de defeitos ósseos em indivíduos portadores de doenças como o DM é limitado, uma vez que as alterações resultantes deste distúrbio modificam a arquitetura tecidual e o metabolismo celular, com impacto negativo no processo de regeneração óssea. Assim, pesquisas em busca de estratégias para recuperar as funções celulares prejudicadas pelo DM têm sido impulsionadas. Baseado no conhecimento dos efeitos negativos do DM nas funções celulares e no efeito terapêutico da FBM, este estudo foi desenhado para avaliar o efeito da FBM no potencial osteogênico de CTMs derivadas da medula óssea de ratos diabéticos. Nossos resultados confirmaram que o DM diminui a diferenciação osteoblástica das CTM *in vitro*, e a FBM recupera seu potencial osteogênico, evidenciado por modificações na morfologia celular e no aumento da atividade da ALP, da expressão de genes e proteínas ósseas e da produção de matriz extracelular mineralizada.

A evolução do peso corporal, os níveis glicêmicos e o quadro de poliúria e polidipsia confirmaram o estado diabético dos animais e validam o modelo proposto de injeção única de alta dose de STZ, vindo ao encontro de resultados previamente publicados (Furman, 2015). Ainda em acordo com a literatura, o DM resultou no efeito negativo na arquitetura óssea, observado pelas imagens reconstruídas dos fêmures e dos parâmetros morfométricos obtidos, que evidenciam diferenças qualitativas na estrutura óssea dos animais diabéticos comparado ao grupo controle (Lalla et al., 2000; Ding et al., 2006; Vestergaard, 2007; Bayat et al., 2009).

O mecanismo pelo qual a hiperglicemia resulta na perda da densidade mineral óssea é controverso. Alguns autores sugerem que o DM provoca diminuição na quantidade de células osteoprogenitoras e na atividade dos osteoblastos (McCarthy et al., 2004; Stolzinger et al., 2010; Weinberg et al., 2014) aliado ao aumento na atividade osteoclástica (Wang et al., 2014). Ainda, foi observado maior diferenciação de CTM em adipócitos em detrimento dos osteoblastos (Li et al., 2010; Kim et al., 2015). Em nosso estudo, observamos o efeito negativo do DM na diferenciação das CTMs em OBs desde as alterações morfológicas iniciais até a produção de matriz extracelular mineralizada, corroborando com outros autores que afirmam que o uso

de CTM do paciente portador de DM não representa uma alternativa de tratamento para a regeneração óssea (Lu et al., 2003; Qian et al., 2015).

Diversos modelos experimentais *in vitro* têm sido utilizados para investigar o efeito do DM nas células, como o uso de CTMs de doadores saudáveis cultivadas em meios contendo alta concentração de glicose ou de CTMs de doadores diabéticos cultivados em ambientes normo e/ou hiperglicêmicos (Al-Qarakhli et al., 2019; Huang et al., 2019;). No presente estudo, as células foram obtidas de animais diabéticos e cultivadas em condição normoglicêmica, metodologia baseada em resultados que evidenciaram que as células de doadores diabéticos sofrem alterações epigenéticas que persistem após diversas divisões celulares, mesmo quando expostas a níveis normais de glicose (El-Osta et al., 2008; Kim et al., 2015). Nossos resultados vão parcialmente ao encontro daqueles obtidos por Deng et al. (2018), que demonstraram diferenças significativas na diferenciação celular; contudo a proliferação destas foi levemente afetada pelo DM, o que pode estar relacionado às condições de cultivo e ao tipo de diabetes.

No presente estudo, OB-DM irradiadas apresentaram morfologia semelhante à OB saudáveis e aumento da viabilidade celular. Alterações no arranjo celular e no citoesqueleto de células tratadas com FBM foram previamente descritas (Garrido et al., 2019). Estudos demonstraram que a FBM aumenta a proliferação e diferenciação de CTMs e diferentes tipos celulares (Arany et al., 2014; Choi et al., 2013; Moreira et al., 2017; Soleimani et al., 2012). Em nosso estudo, as células foram irradiadas a cada 72 h e notou-se aumento da viabilidade após 10 dias. O ensaio de MTT baseia-se na precipitação de mitocôndrias e, portanto, pode ser visto como um ensaio para avaliar o metabolismo celular; considerando que a FBM resulta em ativação mitocondrial, o aumento da viabilidade após 10 dias é esperado. Resultados semelhantes foram observados com intervalos de 48 h de irradiação (Li et al., 2010; Soares et al., 2015) ou 3 vezes por semana (Magri et al., 2015; Patrocínio-Silva et al., 2014).

Contrariamente, Zare et al. (2020) relataram diminuição da proliferação celular de CTM diabéticas irradiadas com maior frequência e sugerem que a “sobredose” de FBM resultaria em maior acúmulo de ROS. Assim, acredita-se que os efeitos observados (positivos ou negativos) estejam relacionados à modulação das ROS: altos níveis de ROS inibem a proliferação e reduzem a viabilidade celular enquanto adequados níveis de ROS estimulam importantes vias de sinalização (Hamblin, 2018; Kumar et al., 2019; Zare et al., 2020). Os diferentes achados na literatura precisam

ser interpretados com cautela, considerando os demais parâmetros selecionados para cada estudo.

Tanto o DM como a FBM desencadeiam eventos celulares e moleculares que resultam na expressão diferencial de genes e na regulação negativa ou positiva de diversas vias de sinalização (Wu et al., 2012; Giannelli et al., 2013; Ahrabi et al., 2019). Nossos achados vão ao encontro da literatura ao evidenciar menor expressão de *Alp*, *Bsp*, *Runx2* e *Opn* em OB-DM comparado aos OBs, e trazem novas perspectivas ao mostrar o aumento da expressão gênica de *Alp*, *Bsp* e *Opn* em OB-DM tratadas com FBM. A expressão proteica de ALP nos grupos estudados foi praticamente inalterada, no entanto observamos que a FBM aumentou a expressão gênica de *Alp* e a atividade da enzima, o que pode ser atribuído ao desenvolvimento primário da maturação osteoblástica estimulado pela FBM (Stein et al., 2005). Por outro lado, tanto a expressão do gene quanto da proteína de OPN aumentaram no grupo irradiado. Por conseguinte, a produção de matriz extracelular mineralizada, que contém diferentes quantidades destas proteínas, também foi maior no grupo OB-DM-FBM, evidenciando o impacto positivo na diferenciação celular. Notadamente, células irradiadas apresentaram menor expressão gênica e proteica do fator-chave de transcrição *Runx2*, essencial na diferenciação de osteoblastos e majoritariamente expresso em células na fase inicial da diferenciação celular (Komori, 2010). Assim, a diminuição de sua expressão pode ser explicada pelo tempo da análise de 7 e 10 dias (Fávaro-Pipi et al., 2011; Tim et al., 2015).

A diminuição da expressão e da atividade da ALP e da quantidade de matriz extracelular em OB-DM podem estar relacionados à produção dos AGEs (Chaudhuri et al., 2018; Jiao et al., 2015). Ao aumento destes produtos foi atribuído a apoptose das CTMs com consequente diminuição de osteoblastos (Alikhani et al., 2007). Ainda, a interação AGEs-RAGEs resulta no acúmulo de ROS e na ativação de importantes vias de sinalização, como a Notch 2, que estão relacionadas com a inibição da osteoblastogênese a partir de progenitores mesenquimais (Huang et al., 2019).

Na tentativa de avaliar a expressão dos radicais livres e o efeito da FBM no estresse oxidativo celular, a expressão de NO foi investigada pelo método de Griess. A principal via para o metabolismo do NO é a oxidação gradual em nitrito e nitrato, já que o NO é um radical livre com vida extremamente curta em sistemas biológicos (Kelm, 1999). O método proposto promove uma estimativa indireta de NO pela mensuração de nitrito; contudo, sua concentração não foi detectada nos grupos

experimentais, o que pode ser atribuído à baixa concentração do radical no meio, à sua meia vida curta e alta reatividade com outras moléculas, como o oxigênio (Guevara et al., 1998).

Resultados de um único tempo experimental indicaram diminuição dos fatores *Hf1- α* e *Nf-kB*, que pode evidenciar o papel da FBM na modulação dessas vias de sinalização (Kumar et al., 2019; Rendra et al., 2019). Por outro lado, o aumento da expressão dos receptores de AGEs em períodos tardios pode ser entendido como um mecanismo compensatório, e não deve ser interpretado como aumento da expressão da proteína ligante circulante. Investigações quanto à expressão temporal dos genes envolvidos nessas vias, especialmente em períodos mais precoces, são necessárias para o entendimento do papel do DM e da FBM nos mecanismos celulares.

Estabelecer os parâmetros ideais para a FBM é um desafio em curso. A literatura aponta forte relação entre a dose, tempo e modo de irradiação e a resposta celular e apresenta uma variedade de protocolos de FBM, em modelos experimentais distintos, com resultados divergentes (Magri et al., 2015; Marques et al., 2016; Mostafavinia et al., 2017; Ayuk et al., 2018; Garrido et al., 2019; Pasternak-Mnich et al., 2019). Doses variando de 1 a 20 J/cm² foram avaliadas e a dose 5 J/cm² foi escolhida para a presente investigação por aumentar a proliferação de CTMs. Ainda, aos 5 J/cm² de energia tem sido relacionado à regulação de fatores-chave de remodelação óssea, modulação do processo inflamatório e da angiogênese e a ativação da sinalização celular de diferentes tecidos (Ferreira et al., 2019; Han et al., 2019).

Avaliações dos mecanismos moleculares subjacentes aos efeitos benéficos da terapia são fundamentais para o entendimento do mecanismo de ação do laser nas células diabéticas. Ainda, estudos pré-clínicos envolvendo a terapia celular e/ou a engenharia de tecidos são necessários para confirmar a influência terapêutica e determinar os parâmetros ideais da FBM com vistas à regeneração do tecido ósseo em animais com DM.

7 CONCLUSÃO

Este estudo confirmou que o DM diminui o potencial de diferenciação osteoblástica de CTMs derivadas da medula óssea de ratos diabéticos e evidenciou que a terapia de FBM, nos parâmetros selecionados, recupera o potencial osteogênico dessas células.

Juntos, os resultados sugerem que a FBM pode otimizar o tratamento de defeitos ósseos em indivíduos portadores de DM.

REFERÊNCIAS¹

Ahrabi B, Rezaei Tavirani M, Khoramgah MS, et al. The effect of photobiomodulation therapy on the differentiation, proliferation, and migration of the mesenchymal stem cell: a review. *J Lasers Med Sci*. 2019;10(Suppl 1):S96-S103. doi:10.15171/jlms.2019.S17.

Akyol UK, Güngörmüş M. Effect of biostimulation on healing of bone defects in diabetic rats. *Photomed Laser Surg*. 2010;28(3):411-6. doi:10.1089/pho.2008.2478.

Alikhani M, Alikhani Z, Boyd C, MacLellan CM, Raptis M, Liu R, et al. Advanced glycation end products stimulate osteoblast apoptosis via the MAP kinase and cytosolic apoptotic pathways. *Bone*. 2007;40(2):345-353. doi:10.1016/j.bone.2006.09.011.

Al-Qarakhli AMA, Yusop N, Waddington RJ, Moseley R. Effects of high glucose conditions on the expansion and differentiation capabilities of mesenchymal stromal cells derived from rat endosteal niche. *BMC Mol Cell Biol*. 2019;20(1):51. doi:10.1186/s12860-019-0235-y.

Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Bone tissue engineering: recent advances and challenges. *Crit Rev Biomed Eng*. 2012;40(5):363-408. doi:10.1615/critrevbiomedeng.v40.i5.10.

Anders JJ, Lanzafame RJ, Arany PR. Low-level light/laser therapy versus photobiomodulation therapy. *Photomed Laser Surg*. 2015;33(4):183-184. doi:10.1089/pho.2015.9848.

Arany PR, Cho A, Hunt TD, Sidhu G, Shin K, Hahm E, et al. Photoactivation of endogenous latent transforming growth factor- β 1 directs dental stem cell differentiation for regeneration. *Sci Transl Med*. 2014;6(238):238ra69. doi:10.1126/scitranslmed.3008234.

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. Equipamento Eletromédico. Parte 2: Prescrições particulares para a segurança de equipamento terapêutico e de diagnóstico a laser. Rio de Janeiro: ABNT; 1997 (NBR IEC 60601-2- 22:1997).

---

¹ De acordo com estilo Vancouver.

Ayuk SM, Abrahamse H, Houreld NN. The role of matrix metalloproteinases in diabetic wound healing in relation to photobiomodulation. *J Diabetes Res*. 2016;2016:2897656. doi:10.1155/2016/2897656.

Ayuk SM, Houreld NN, Abrahamse H. Effect of 660 nm visible red light on cell proliferation and viability in diabetic models in vitro under stressed conditions. *Lasers Med Sci*. 2018;33(5):1085-93. doi:10.1007/s10103-017-2432-2.

Baiguera S, Jungebluth P, Mazzanti B, Macchiarini P. Mesenchymal stromal cells for tissue-engineered tissue and organ replacements. *Transpl Int*. 2012;25(4):369-82. doi:10.1111/j.1432-2277.2011.01426.x.

Barbosa JH, Oliveira SL, Seara LT. O papel dos produtos finais da glicação avançada (AGEs) no desencadeamento das complicações vasculares do diabetes [The role of advanced glycation end-products (AGEs) in the development of vascular diabetic complications]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2008;52(6):940-50. doi:10.1590/s0004-27302008000600005.

Bayat M, Abdi S, Javadieh F, Mohsenifar Z, Rashid MR. The effects of low-level laser therapy on bone in diabetic and nondiabetic rats. *Photomed Laser Surg*. 2009;27(5):703-8. doi:10.1089/pho.2008.2351.

Bell RB, Gregoire C. Reconstruction of mandibular continuity defects using recombinant human bone morphogenetic protein 2: a note of caution in an atmosphere of exuberance. *J Oral Maxillofac Surg*. 2009;67(12):2673-8. doi:10.1016/j.joms.2009.07.085.

Borciari G, Montalbano G, Baldini N, Cerqueni G, Vitale-Brovarone C, Ciapetti G. Co-culture systems of osteoblasts and osteoclasts: Simulating in vitro bone remodeling in regenerative approaches. *Acta Biomater*. 2020;108:22-45. doi:10.1016/j.actbio.2020.03.043.

Boyce BF, Xing L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Res Ther*. 2007;9 Suppl 1(Suppl 1):S1. doi:10.1186/ar2165.

Brassolatti P, de Andrade ALM, Bossini PS, et al. Photobiomodulation on critical bone defects of rat calvaria: a systematic review. *Lasers Med Sci*. 2018;33(9):1841-8. doi:10.1007/s10103-018-2653-z.

Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*. 2005;54(6):1615-25. doi:10.2337/diabetes.54.6.1615.

Brydone AS, Meek D, Maclaine S. Bone grafting, orthopaedic biomaterials, and the clinical need for bone engineering. *Proc Inst Mech Eng H*. 2010;224(12):1329-43. doi:10.1243/09544119JEIM770.

Cavallo C, Cuomo C, Fantini S, Ricci F, Tazzari PL, Lucarelli E, et al. Comparison of alternative mesenchymal stem cell sources for cell banking and musculoskeletal advanced therapies. *J Cell Biochem*. 2011;112(5):1418-30. doi:10.1002/jcb.23058.

Chaudhuri J, Bains Y, Guha S, Kahn A, Hall D, Bose N, et al. The role of advanced glycation end products in aging and metabolic diseases: bridging association and causality. *Cell Metab*. 2018;28(3):337-52. doi:10.1016/j.cmet.2018.08.014.

Choi K, Kang BJ, Kim H, Lee S, Bae S, Kweon OK, Kim WH. Low-level laser therapy promotes the osteogenic potential of adipose-derived mesenchymal stem cells seeded on an acellular dermal matrix. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2013;101(6):919-28. doi:10.1002/jbm.b.32897.

Dai J, Wang X, Shen G. Cotransplantation of autologous bone marrow stromal cells and chondrocytes as a novel therapy for reconstruction of condylar cartilage. *Med Hypotheses*. 2011;77(1):132-3. doi:10.1016/j.mehy.2011.03.045.

Deng X, Xu M, Shen M, Cheng J. Effects of Type 2 Diabetic Serum on Proliferation and Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *J Diabetes Res*. 2018;2018:5765478. doi:10.1155/2018/5765478.

Dillenburg CS, Martins MA, Munerato MC, et al. Efficacy of laser phototherapy in comparison to topical clobetasol for the treatment of oral lichen planus: a randomized controlled trial. *J Biomed Opt*. 2014;19(6):068002. doi:10.1117/1.JBO.19.6.068002.

Dimitriou R, Jones E, McGonagle D, Giannoudis PV. Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC Med*. 2011;9:66. Published 2011 May 31. doi:10.1186/1741-7015-9-66.

Ding KH, Wang ZZ, Hamrick MW, Deng ZB, Zhou L, Kang B, et al. Disordered osteoclast formation in RAGE-deficient mouse establishes an essential role for RAGE in diabetes related bone loss. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;340(4):1091-7. doi:10.1016/j.bbrc.2005.12.107

Ding DC, Shyu WC, Lin SZ. Mesenchymal stem cells. *Cell Transplant*. 2011;20(1):5-14. doi:10.3727/096368910X.

Diniz IMA, Carreira ACO, Sipert CR, Uehara CM, Moreira MSN, Freire L, et al. Photobiomodulation of mesenchymal stem cells encapsulated in an injectable rhBMP4-loaded hydrogel directs hard tissue bioengineering. *J Cell Physiol*. 2018;233(6):4907-18. doi:10.1002/jcp.26309.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7. doi:10.1080/14653240600855905.

Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res*. 1998;(355 Suppl):S7-S21. doi:10.1097/00003086-199810001-00003.

El Gammal ZH, Zaher AM, El-Badri N. Effect of low-level laser-treated mesenchymal stem cells on myocardial infarction. *Lasers Med Sci*. 2017;32(7):1637-46. doi:10.1007/s10103-017-2271-1.

El-Osta A, Brasacchio D, Yao D, Pocai A, Jones PL, Roeder RG, et al. Transient high glucose causes persistent epigenetic changes and altered gene expression during subsequent normoglycemia. *J Exp Med*. 2008;205(10):2409-17. doi:10.1084/jem.20081188.

Escudero JSB, Perez MGB, de Oliveira Rosso MP, Buchaim DV, Pomini KT, Campos LMG, et al. Photobiomodulation therapy (PBMT) in bone repair: A systematic review. *Injury*. 2019;50(11):1853-67. doi:10.1016/j.injury.2019.09.031.

Fávaro-Pípi E, Ribeiro DA, Ribeiro JU, Bossini P, Oliveira P, Parizotto NA, et al. Low-level laser therapy induces differential expression of osteogenic genes during bone repair in rats. *Photomed Laser Surg*. 2011;29(5):311-7. doi:10.1089/pho.2010.2841.

Ferreira LS, Diniz IMA, Maranduba CMS, Miyagi SPH, Rodrigues MFSD, Moura-Netto C, Marques MM. Short-term evaluation of photobiomodulation therapy on the proliferation and undifferentiated status of dental pulp stem cells. *Lasers Med Sci*. 2019;34(4):659-66. doi:10.1007/s10103-018-2637-z.

Finkemeier CG. Bone-grafting and bone-graft substitutes. *J Bone Joint Surg Am*. 2002;84(3):454-64. doi:10.2106/00004623-200203000-00020.

Florencio-Silva R, Sasso GR, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int.* 2015;2015:421746. doi:10.1155/2015/421746.

Flório P; Souza ATP; de Oliveira FS; Rosa AL, Beloti MM. Efeito da diabetes mellitus sobre o fenótipo osteoblástico de células-tronco mesenquimais diferenciadas em osteoblastos. *Anais da 39a Jornada Odontológica de Ribeirão Preto*; 2017. 1:135.

Furman BL. Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Curr Protoc Pharmacol.* 2015;70:5.47.1-5.47.20. Published 2015 Sep 1. doi:10.1002/0471141755.ph0547s70.

Garcia VG, Sahyon AS, Longo M, Fernandes LA, Gualberto Junior EC, Novaes VC, et al. Effect of LLLT on autogenous bone grafts in the repair of critical size defects in the calvaria of immunosuppressed rats. *J Craniomaxillofac Surg.* 2014;42(7):1196-202. doi:10.1016/j.jcms.2014.02.008.

Garrido PR, Pedroni ACF, Cury DP, Moreira MS, Rosin F, Sarra G, Marques MM. Effects of photobiomodulation therapy on the extracellular matrix of human dental pulp cell sheets. *J Photochem Photobiol B.* 2019;194:149-57. doi:10.1016/j.jphotobiol.2019.03.017.

Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res.* 2010;107(9):1058-70. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.223545.

Giannelli M, Bani D, Viti C, Tani A, Lorenzini L, Zecchi-Orlandini S, Formigli L. Comparative evaluation of the effects of different photoablative laser irradiation protocols on the gingiva of periodontopathic patients. *Photomed Laser Surg.* 2012;30(4):222-30. doi:10.1089/pho.2011.3172.

Giannelli M, Chellini F, Sassoli C, Francini F, Pini A, Squecco R, et al. Photoactivation of bone marrow mesenchymal stromal cells with diode laser: effects and mechanisms of action. *J Cell Physiol.* 2013;228(1):172-81. doi:10.1002/jcp.24119.

Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury.* 2005;36 Suppl 3:S20-S27. doi:10.1016/j.injury.2005.07.029.

Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.* 1982;126(1):131-8. doi:10.1016/0003-2697(82)90118-x

Gregory CA, Gunn WG, Peister A, Prockop DJ. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal Biochem.* 2004;329(1):77-84. doi:10.1016/j.ab.2004.02.002.

Guevara I, Iwanejko J, Dembińska-Kieć A, Pankiewicz J, Wanat A, Anna P, et al. Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. *Clin Chim Acta.* 1998;274(2):177-88. doi:10.1016/s0009-8981(98)00060-6.

Hamada Y, Fujii H, Fukagawa M. Role of oxidative stress in diabetic bone disorder. *Bone.* 2009;45 Suppl 1:S35-S38. doi:10.1016/j.bone.2009.02.004.

Han B, Fan J, Liu L, Tian J, Gan C, Yang Z, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells treatments for fibroblasts of fibrotic scar via downregulating TGF- β 1 and Notch-1 expression enhanced by photobiomodulation therapy. *Lasers Med Sci.* 2019;34(1):1-10. doi:10.1007/s10103-018-2567-9.

Hamblin MR. Mechanisms and Mitochondrial Redox Signaling in Photobiomodulation. *Photochem Photobiol.* 2018;94(2):199-212. doi:10.1111/php.12864.

Harkness JE, Wagner JE. *Biologia e clínica de coelhos e roedores.* 3ª ed. São Paulo: Roca; 1993. 48-55.

Harorli OT, Hatipoglu M, Erin N. Effect of Photobiomodulation on Secretion of IL-6 and IL-8 by Human Gingival Fibroblasts In Vitro. *Photobiomodul Photomed Laser Surg.* 2019;37(8):457-64. doi:10.1089/photob.2018.4589.

Hawkins DH, Abrahamse H. Time-dependent responses of wounded human skin fibroblasts following phototherapy. *J Photochem Photobiol B.* 2007;88(2-3):147-55. doi:10.1016/j.jphotobiol.2007.07.003.

Huang YY, Sharma SK, Carroll J, Hamblin MR. Biphasic dose response in low level light therapy - an update. *Dose Response.* 2011;9(4):602-18. doi:10.2203/dose-response.11-009.Hamblin.

Huang KC, Chuang PY, Yang TY, Huang TW, Chang SF. Hyperglycemia inhibits osteoblastogenesis of rat bone marrow stromal cells via activation of the Notch2 signaling pathway. *Int J Med Sci.* 2019;16(5):696-703. doi:10.7150/ijms.32707.

International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, 9th edn. Brussels, Belgium: 2019. Disponível em: <https://www.diabetesatlas.org>. Data de acesso: 17 de agosto 2020.

Janghorbani M, Van Dam RM, Willett WC, Hu FB. Systematic review of type 1 and type 2 diabetes mellitus and risk of fracture. *Am J Epidemiol*. 2007;166(5):495-505. doi:10.1093/aje/kwm106.

Jiao H, Xiao E, Graves DT. Diabetes and its effect on bone and fracture healing. *Curr Osteoporos Rep*. 2015;13(5):327-35. doi:10.1007/s11914-015-0286-8.

Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica*. 10ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.

KazemiKhoo N, Ansari F. Blue or red: which intravascular laser light has more effects in diabetic patients?. *Lasers Med Sci*. 2015;30(1):363-6. doi:10.1007/s10103-014-1672-7.

Kazemikhoo N, Sarafnejad AF, Ansari F, Mehdipour P. Modifying effect of intravenous laser therapy on the protein expression of arginase and epidermal growth factor receptor in type 2 diabetic patients. *Lasers Med Sci*. 2016;31(8):1537-45. doi:10.1007/s10103-016-2012-x.

Kelm M. Nitric oxide metabolism and breakdown. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1411(2-3):273-89. doi:10.1016/s0005-2728(99)00020-1.

Killington K, Mafi R, Mafi P, Khan WS. A systematic review of clinical studies investigating mesenchymal stem cells for fracture non-union and bone defects. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2018;13(4):284-91. doi:10.2174/1574888X12666170915121137.

Kim H, Han JW, Lee JY, Choi YJ, Sohn YD, Song M, Yoon YS, et al. Diabetic Mesenchymal Stem Cells Are Ineffective for Improving Limb Ischemia Due to Their Impaired Angiogenic Capability. *Cell Transplant*. 2015;24(8):1571-84. doi:10.3727/096368914X682792.

Komori T. Regulation of osteoblast differentiation by Runx2. *Adv Exp Med Biol*. 2010;658:43-9. doi:10.1007/978-1-4419-1050-9_5.

Kumar Rajendran N, George BP, Chandran R, Tynga IM, Houreld N, Abrahamse H. The Influence of Light on Reactive Oxygen Species and NF- κ B in Disease Progression. *Antioxidants (Basel)*. 2019;8(12):640. doi:10.3390/antiox8120640

Lalla E, Lamster IB, Feit M, Huang L, Spessot A, Qu W, et al. Blockade of RAGE suppresses periodontitis-associated bone loss in diabetic mice. *J Clin Invest*. 2000;105(8):1117-1124. doi:10.1172/JCI8942.

Langhans MT, Yu S, Tuan RS. Stem Cells in Skeletal Tissue Engineering: Technologies and Models. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2016;11(6):453-74. doi:10.2174/1574888x10666151001115248.

Langer R, Vacanti J. Advances in tissue engineering. *J Pediatr Surg*. 2016;51(1):8-12. doi:10.1016/j.jpedsurg.2015.10.022.

Levinger I, Seeman E, Jerums G, McConell GK, Rybchyn MS, Cassar S, et al. Glucose-loading reduces bone remodeling in women and osteoblast function in vitro. *Physiol Rep*. 2016;4(3):e12700. doi:10.14814/phy2.12700.

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;28 Suppl 1:S157-S165. doi:10.1089/pho.2009.2540.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8. doi:10.1006/meth.2001.1262.

Lowry Oh, Rosebrough Nj, Farr Al, Randall Rj. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265-75.

Lu H, Kraut D, Gerstenfeld LC, Graves DT. Diabetes interferes with the bone formation by affecting the expression of transcription factors that regulate osteoblast differentiation. *Endocrinology*. 2003;144(1):346-52. doi:10.1210/en.2002-220072.

Magri AM, Fernandes KR, Assis L, Mendes NA, da Silva Santos AL, de Oliveira Dantas E, Rennó AC. Photobiomodulation and bone healing in diabetic rats: evaluation of bone response using a tibial defect experimental model. *Lasers Med Sci*. 2015;30(7):1949-57. doi:10.1007/s10103-015-1789-3.

Marin C, Luyten FP, Van der Schueren B, Kerckhofs G, Vandamme K. The Impact of Type 2 Diabetes on Bone Fracture Healing. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:6. doi:10.3389/fendo.2018.00006.

Marín-Conde F, Castellanos-Cosano L, Pachón-Ibañez J, Serrera-Figallo MA, Gutiérrez-Pérez JL, Torres-Lagares D. Photobiomodulation with low-level laser therapy reduces oral mucositis caused by head and neck radio-chemotherapy: prospective randomized controlled trial. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2019;48(7):917-23. doi:10.1016/j.ijom.2018.12.006.

Marques MM, Diniz IM, de Cara SP, Pedroni AC, Abe GL, D'Almeida-Couto RS, et al. Photobiomodulation of dental derived mesenchymal stem cells: a systematic review. *Photomed Laser Surg*. 2016;34(11):500-8. doi:10.1089/pho.2015.4038

Masiello P, Broca C, Gross R, Roye M, Manteghetti M, Hillaire-Buys D, et al. Experimental NIDDM: development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide. *Diabetes*. 1998;47(2):224-9. doi:10.2337/diab.47.2.224.

McCarthy AD, Etcheverry SB, Bruzzone L, Lettieri G, Barrio DA, Cortizo AM. Non-enzymatic glycosylation of a type I collagen matrix: effects on osteoblastic development and oxidative stress. *BMC Cell Biol*. 2001;2:16. doi:10.1186/1471-2121-2-16.

McCarthy AD, Uemura T, Etcheverry SB, Cortizo AM. Advanced glycation endproducts interfere with integrin-mediated osteoblastic attachment to a type-I collagen matrix. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36(5):840-8. doi:10.1016/j.biocel.2003.09.006

Merlotti D, Gennari L, Dotta F, Lauro D, Nuti R. Mechanisms of impaired bone strength in type 1 and 2 diabetes. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2010;20(9):683-90. doi:10.1016/j.numecd.2010.07.008.

Mester E, Juhász J, Varga P, Karika G. Lasers in clinical practice. *Acta Chir Acad Sci Hung*. 1968;9(3):349-57.

Moreira MS, Diniz IM, Rodrigues MF, de Carvalho RA, de Almeida Carrer FC, Neves II, et al. In vivo experimental model of orthotopic dental pulp regeneration under the influence of photobiomodulation therapy. *J Photochem Photobiol B*. 2017;166:180-6. doi:10.1016/j.jphotobiol.2016.11.022

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1-2):55-63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4.

Mostafavinia A, Razavi S, Abdollahifar M, Amini A, Ghorishi SK, Rezaei F, et al. Evaluation of the Effects of Photobiomodulation on Bone Healing in Healthy and Streptozotocin-Induced Diabetes in Rats. *Photomed Laser Surg*. 2017;35(10):537-45. doi:10.1089/pho.2016.4224.

Nancarrow-Lei R, Mafi P, Mafi R, Khan W. A Systemic Review of Adult Mesenchymal Stem Cell Sources and their Multilineage Differentiation Potential Relevant to Musculoskeletal Tissue Repair and Regeneration. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2017;12(8):601-10. doi:10.2174/1574888X12666170608124303.

Nikita E. The Human Skeleton. In: *Osteoarchaeology*. Academic Press, 2017. p 1-75. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804021-8.00001-2>.

Organização Mundial da Saúde. Relatórios globais sobre o Diabetes. Geneva: WHO; 2016. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204871/1/9789241565257_eng.pdf.

Organização Mundial da Saúde. Classificação do Diabetes Mellitus. Geneva: WHO; 2019. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/325182>.

Pachón-Peña G, Yu G, Tucker A, Wu X, Vendrell J, Bunnell BA, Gimble JM. Stromal stem cells from adipose tissue and bone marrow of age-matched female donors display distinct immunophenotypic profiles. *J Cell Physiol*. 2011;226(3):843-51. doi:10.1002/jcp.22408.

Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, et al. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res*. 1987;2(6):595-610. doi:10.1002/jbmr.5650020617.

Pasternak-Mnich K, Ziemia B, Szwed A, Kopacz K, Synder M, Bryszewska M, Kujawa J. Effect of Photobiomodulation Therapy on the Increase of Viability and Proliferation of Human Mesenchymal Stem Cells. *Lasers Surg Med*. 2019;51(9):824-33. doi:10.1002/lsm.23107.

Patrocínio-Silva TL, de Souza AM, Goulart RL, Pegorari CF, Oliveira JR, Fernandes K, et al. The effects of low-level laser irradiation on bone tissue in diabetic rats. *Lasers Med Sci.* 2014;29(4):1357-64. doi:10.1007/s10103-013-1418-y

Perez JR, Kouroupis D, Li DJ, Best TM, Kaplan L, Correa D. Tissue Engineering and Cell-Based Therapies for Fractures and Bone Defects. *Front Bioeng Biotechnol.* 2018;6:105. Published 2018 Jul 31. doi:10.3389/fbioe.2018.00105.

Phimphilai M, Pothacharoen P, Kongtawelert P, Chattipakorn N. Impaired osteogenic differentiation and enhanced cellular receptor of advanced glycation end products sensitivity in patients with type 2 diabetes. *J Bone Miner Metab.* 2017;35(6):631-41. doi: 10.1007/s00774-016-0800-9.

Pinheiro AL, Martinez Gerbi ME, Carneiro Ponzi EA, Pedreira Ramalho LM, Marques AM, Carvalho CM, et al. Infrared laser light further improves bone healing when associated with bone morphogenetic proteins and guided bone regeneration: an in vivo study in a rodent model. *Photomed Laser Surg.* 2008;26(2):167-74. doi:10.1089/pho.2007.2027.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999;284(5411):143-47. doi:10.1126/science.284.5411.143.

Qian C, Zhu C, Yu W, Jiang X, Zhang F. High-Fat Diet/Low-Dose Streptozotocin-Induced Type 2 Diabetes in Rats Impacts Osteogenesis and Wnt Signaling in Bone Marrow Stromal Cells. *PLoS One.* 2015;10(8):e0136390. Published 2015 Aug 21. doi:10.1371/journal.pone.0136390.

Rendra E, Riabov V, Mossel DM, Sevastyanova T, Harmsen MC, Kzhyshkowska J. Reactive oxygen species (ROS) in macrophage activation and function in diabetes. *Immunobiology.* 2019;224(2):242-53. doi:10.1016/j.imbio.2018.11.010.

Retzepi M, Donos N. The effect of diabetes mellitus on osseous healing. *Clin Oral Implants Res.* 2010;21(7):673-81. doi:10.1111/j.1600-0501.2010.01923.x.

Rosa AL, de Oliveira PT, Beloti MM. Macroporous scaffolds associated with cells to construct a hybrid biomaterial for bone tissue engineering. *Expert Rev Med Devices.* 2008;5(6):719-28. doi:10.1586/17434440.5.6.719

Santinoni CD, Oliveira HF, Batista VE, Lemos CA, Verri FR. Influence of low-level laser therapy on the healing of human bone maxillofacial defects: A systematic review. *J Photochem Photobiol B*. 2017;169:83-9. doi:10.1016/j.jphotobiol.2017.03.004.

Saygun I, Nizam N, Ural AU, Serdar MA, Avcu F, Tözüm TF. Low-level laser irradiation affects the release of basic fibroblast growth factor (bFGF), insulin-like growth factor-I (IGF-I), and receptor of IGF-I (IGFBP3) from osteoblasts. *Photomed Laser Surg*. 2012;30(3):149-54. doi:10.1089/pho.2011.3079.

Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol*. 2014;24(10):R453-R462. doi:10.1016/j.cub.2014.03.034.

Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*. 2012;9(7):671-5. doi:10.1038/nmeth.2089.

Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, et al. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol*. 2006;7:3. Published 2006 Jan 31. doi:10.1186/1471-2199-7-3.

Stein A, Benayahu D, Maltz L, Oron U. Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. *Photomed Laser Surg*. 2005;23(2):161-6. doi:10.1089/pho.2005.23.161.

Stolzing A, Sellers D, Llewelyn O, Scutt A. Diabetes induced changes in rat mesenchymal stem cells. *Cells Tissues Organs*. 2010;191(6):453-65. doi:10.1159/000281826.

Soares DM, Ginani F, Henriques ÁG, Barboza CA. Effects of laser therapy on the proliferation of human periodontal ligament stem cells. *Lasers Med Sci*. 2015;30(3):1171-4. doi:10.1007/s10103-013-1436-9.

Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD). Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2019-2020. Editora Clannad. Disponível em: <https://www.diabetes.org.br/profissionais/images/DIRETRIZES-COMPLETA-2019-2020.pdf>

Soleimani M, Abbasnia E, Fathi M, Sahraei H, Fathi Y, Kaka G. The effects of low-level laser irradiation on differentiation and proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells into neurons and osteoblasts--an in vitro study. *Lasers Med Sci*. 2012;27(2):423-30. doi:10.1007/s10103-011-0930-1.

Sommer AP, Pinheiro AL, Mester AR, Franke RP, Whelan HT. Biostimulatory windows in low-intensity laser activation: lasers, scanners, and NASA's light-emitting diode array system. *J Clin Laser Med Surg*. 2001;19(1):29-33. doi:10.1089/104454701750066910.

Sundararaghavan V, Mazur MM, Evans B, Liu J, Ebraheim NA. Diabetes and bone health: latest evidence and clinical implications. *Ther Adv Musculoskelet Dis*. 2017;9(3):67-74. doi:10.1177/1759720X16687480.

Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res*. 2001;50(6):537-46.

Tim CR, Bossini PS, Kido HW, et al. Effects of low-level laser therapy on the expression of osteogenic genes during the initial stages of bone healing in rats: a microarray analysis. *Lasers Med Sci*. 2015;30(9):2325-33. doi:10.1007/s10103-015-1807-5.

van Breugel HH, Bär PR. Power density and exposure time of He-Ne laser irradiation are more important than total energy dose in photo-biomodulation of human fibroblasts in vitro. *Lasers Surg Med*. 1992;12(5):528-37. doi:10.1002/lsm.1900120512.

van de Vyver M. Intrinsic Mesenchymal Stem Cell Dysfunction in Diabetes Mellitus: Implications for Autologous Cell Therapy. *Stem Cells Dev*. 2017;26(14):1042-53. doi:10.1089/scd.2017.0025.

Vestergaard P. Discrepancies in bone mineral density and fracture risk in patients with type 1 and type 2 diabetes--a meta-analysis. *Osteoporos Int*. 2007;18(4):427-44. doi:10.1007/s00198-006-0253-4.

Younger EM, Chapman MW. Morbidity at bone graft donor sites. *J Orthop Trauma*. 1989;3(3):192-5. doi:10.1097/00005131-198909000-00002.

Wang Y, Chen X, Cao W, Shi Y. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. *Nat Immunol*. 2014;15(11):1009-16. doi:10.1038/ni.3002.

Weinberg E, Maymon T, Moses O, Weinreb M. Streptozotocin-induced diabetes in rats diminishes the size of the osteoprogenitor pool in bone marrow. *Diabetes Res Clin Pract*. 2014;103(1):35-41. doi:10.1016/j.diabres.2013.11.015.

Wu JY, Wang YH, Wang GJ, et al. Low-power GaAlAs laser irradiation promotes the proliferation and osteogenic differentiation of stem cells via IGF1 and BMP2. *PLoS One*. 2012;7(9):e44027. doi:10.1371/journal.pone.0044027.

Wu V, Helder MN, Bravenboer N, et al. Bone Tissue Regeneration in the Oral and Maxillofacial Region: A Review on the Application of Stem Cells and New Strategies to Improve Vascularization. *Stem Cells Int*. 2019;2019:6279721. doi:10.1155/2019/6279721.

Zare F, Bayat M, Aliaghaei A, Piryaee A. Photobiomodulation therapy compensate the impairments of diabetic bone marrow mesenchymal stem cells. *Lasers Med Sci*. 2020;35(3):547-56. doi:10.1007/s10103-019-02844-y.

ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética no Uso de Animais

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Comissão de Ética no Uso de Animais
 Tel. (11) 3091 7842
 ceuafop@usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito da Terapia de fotobiomodulação in vitro e sistêmica sobre o potencial osteogênico de células-tronco e a qualidade do tecido ósseo de ratos diabéticos" registrada com o nº 027/2018, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Emanuela Prado Ferraz, Isabella Nunes Copeti e Natalia Pieretti Buen, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Odontologia da USP, em reunião de 12/11/2018.

Finalidade	( ) Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/12/2018 a 01/12/2019
Espécie/linhagem/raça	Rato isogênico Wistar
Nº de animais	80
Peso/Idade	150-200g
Sexo	
Origem	Biotério Central do ICB - USP

São Paulo, 13 de novembro de 2018.

Profa. Associada Dra. Sílvia Vanessa Lourenço
 Coordenadora do CEUA-FOUSP

ANEXO B – Artigo publicado em periódico

G Model JORMAS-779; No. of Pages 4 ARTICLE IN PRESS J Stomatol Oral Maxillofac Surg xxx (2019) xxx-xxx			
	Available online at ScienceDirect www.sciencedirect.com	Elsevier Masson France EM consulte www.em-consulte.com/en	
Case Report Unusual giant complex odontoma: A case report N.P. Bueno^a, M.L. Bergamini^b, F.M. Elias^a, P.H. Braz-Silva^{b,c}, E.P. Ferraz^{a,*} ^aDepartment of Oral and Maxillofacial Surgery, Prosthesis and Traumatology, School of Dentistry, University of Sao Paulo, Sao-Paulo, SP, Brazil ^bDepartment of Stomatology, School of Dentistry, University of Sao Paulo, Sao-Paulo, SP, Brazil ^cLaboratory of Virology, Institute of Tropical Medicine of Sao Paulo, University of Sao Paulo, Sao Paulo, SP, Brazil			
ARTICLE INFO <i>Historique de l'article :</i> Received 11 December 2019 Accepted 16 December 2019 Keywords: Odontogenic tumors Complex odontoma Giant Surgical removal		ABSTRACT Odontomas are benign, non-aggressive, and the most common odontogenic tumor of the jaws. Composed of dental tissues, it can be classified as compound or complex odontomas depending on their radiological and histological features. Among them, complex odontomas are less common and usually is presented as a small and asymptomatic radiopaque mass surrounded by a radiolucent halo, found on routine radiographic examination. Although benign tumors, odontomas can reach large sizes leading to facial asymmetry and decreasing bone strength, which predisposes fractures and infection. Our aim was to present a case report of an unusual giant mandibular odontoma on the left mandibular angle and ramus successfully treated by surgical excision and highlight the importance of the earlier diagnostic to minimize damages. © 2020 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.	

1. Introduction

Odontomas are the most common odontogenic benign tumor of the jaws. According to the World Health Organization, odontomas are considered mixed tumors due to their origin from epithelial and ectomesenchymal cells and are classified as compound or complex [1]. Compound odontomas consist of many tooth-like structures while complex odontomas present dental tissues occurring in more or less disorderly pattern [2].

The etiology of the odontomas is unknown, although it has been implicated in some pathological conditions as trauma, infection, hereditary syndromes (i.e., Gardner's syndrome), and gene alterations that might result in an abnormal pattern of morpho-differentiation of cells that give rise to ameloblasts and odontoblasts [2,3]. There is no consensus on the epidemiological and clinical features of these lesions [3]. Complex odontomas are usually asymptomatic and located at posterior mandible and might be associated with missing or malpositioning teeth [3,4]. Due to its slow growth and nonaggressive behavior, complex odontomas can reach large sizes leading to cortical bone expansion

with facial asymmetry, and even they can erupt to the oral cavity and cause infections [5,6].

Odontomas are commonly found and diagnosed during routine radiographic examination. Radiographic features depend on their development stage, from a radiolucent on the initial phase to a radiopaque mass at later stages [2,4]. Complex odontomas present irregular and disorganized radiopaque mass, usually surrounded by a well-defined thin radiolucent halo [2,4]. The diagnosis is based on clinical and radiographic/tomographic images and must be confirmed with the histopathological findings. The differential diagnosis from other calcified bone lesions such as osteoma, fibrous dysplasia, florid osseous dysplasia, or ossifying fibroma is important to dictate the appropriate treatment [5].

Despite benign features and limited grown potential, the treatment option is surgical removal. The lack of treatment might lead to tissue degeneration and cyst formation, teeth eruption disturbances, mandibular bone fracture, exposure to the oral cavity, and even infection [2,5–7]. This paper aims to report a giant complex odontoma and to emphasize the importance of the radiographic findings and treatment planning.

2. Case report

A 42-year male patient was referred to Oral Surgery Clinic of Dental School, complaining of limitation of mouth opening and asymptomatic swelling at the left mandibular angle for the past

* Corresponding author at: Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Prosthesis and Traumatology, School of Dentistry, University of Sao Paulo, Sao-Paulo, SP, Brazil.
E-mail address: emanuelaferaz@usp.br (E.P. Ferraz).

<https://doi.org/10.1016/j.jormas.2019.12.009>
2468-7855/© 2020 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Please cite this article in press as: Bueno NP, et al. Unusual giant complex odontoma: A case report. J Stomatol Oral Maxillofac Surg (2020), <https://doi.org/10.1016/j.jormas.2019.12.009>

FULL ARTICLE

Recovering the osteoblastic differentiation potential of mesenchymal stem cells derived from diabetic rats by photobiomodulation therapy

Natália Pieretti Bueno¹ | Isabella Nunes Copete¹ | Helena Bacha Lopes² |
Praveen R. Arany³ | Márcia Martins Marques^{1,4} | Emanuela Prado Ferraz^{1*}

¹School of Dentistry, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

²Bone Research Lab, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

³School of Dental Medicine, University at Buffalo, New York, New York

⁴School of Dentistry, Ibirapuera University, São Paulo, Brazil

*Correspondence

Emanuela Prado Ferraz, Department of Oral Surgery, Prosthesis and Traumatology, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, 2227, Professor Lineu Prestes Avenue, 05508-000, São Paulo, Brazil.
Email: emanuelaferraz@usp.br

Funding information

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Grant/Award Number: 306423/2018-9; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Grant/Award Number: 2018/20302-5

Abstract

Autologous cell-based therapy for bone regeneration might be impaired by diabetes mellitus (DM) due to the negative effects on mesenchymal stem cells (MSCs) differentiation. Strategies to recover their osteogenic potential could optimize the results. We aimed to evaluate the effect of photobiomodulation (PBM) therapy on osteoblast differentiation of rats with induced DM. Bone marrow MSCs of healthy and diabetic rats were isolated and differentiated into osteoblasts (OB and dOB, respectively). dOB were treated with PBM therapy every 72 hour (660 nm; 0.14 J; 20 mW; 0.714 W/cm², and 5 J/cm²). Cell morphology, viability, gene and protein expression of osteoblastic markers, alkaline phosphatase (ALP) activity, and the mineralized matrix production of dOB-PBM were compared to dOB. PBM therapy improved viability of dOB, increased the gene and protein expression of bone markers, the ALP activity and the mineralized matrix production. PBM therapy represents an innovative therapeutic approach to optimize the treatment of bone defects in diabetic patients.

KEYWORDS

bone, diabetes, osteoblast, photobiomodulation therapy, stem cell

1 | INTRODUCTION

Bone is a highly dynamic tissue capable of regeneration, which is characterized by a physiological process that involves coordinated events, including cells and growth factors.^[1] However, under metabolic disease conditions, the bone repair may be disturbed, and additional treatments are necessary. Cell therapy strategies using autologous mesenchymal stem cells (MSCs) appears as an encouraging approach for bone regeneration. However, these cells may not be completely therapeutically

effective when they are exposed to pathological microenvironments that result in functional and molecular alterations.^[2, 3]

Diabetes mellitus (DM) is a chronic metabolic disorder characterized by hyperglycemia resulted from defected action and/or secretion of insulin related to pathogenic processes, such as the destruction of pancreatic cells, resistance of insulin, or insulin secretion disorders.^[4] The prevalence of DM is increasing, and it is predicted that over 700 million people worldwide will be affected by 2045.^[4] Hyperglycemia contributes to skeletal

ANEXO C - Artigos enviados para publicação

Journal of Materials Science: Materials in Medicine
The effect of bioactive-glass ceramic with two crystalline phases on osteoclast differentiation and activity
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:		
Full Title:	The effect of bioactive-glass ceramic with two crystalline phases on osteoclast differentiation and activity	
Article Type:	Original Research	
Corresponding Author:	Emanuela Ferraz School of Dentistry, University of São Paulo São Paulo, BRAZIL	
Corresponding Author Secondary Information:		
Corresponding Author's Institution:	School of Dentistry, University of São Paulo	
Corresponding Author's Secondary Institution:		
First Author:	Rayana Longo Bighetti-Trevisan	
First Author Secondary Information:		
Order of Authors:	Rayana Longo Bighetti-Trevisan Alann Thaffarell Portilho Souza Ingrid Wenzel Tosin Natália Pieretti Bueno Murilo Camuri Crovace Marcio Mateus Beloti Adalberto Luiz Rosa Emanuela Prado Ferraz	
Order of Authors Secondary Information:		
Funding Information:	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (406526/2018-4) Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (2016/22528-5)	Dr Emanuela Prado Ferraz Ms Ingrid Wenzel Tosin
Abstract:	Despite osteoclasts play a crucial role in the physiological process of bone repair, bone tissue engineering strategies have been focusing on osteoblasts-biomaterial interaction. Biosilicate ® with two crystalline phases (BioS-2P) exhibited osteogenic properties and meaningful bone formation, but its effect on osteoclasts are unknown. This study aimed to investigate the in vitro and in vivo effect of BioS-2P on osteoclast differentiation and activity. RAW 264.7 cells were cultured in osteoclastogenic medium (OCM) or OCM conditioned by BioS-2P (OCM-BioS-2P), and cell morphology, viability and osteoclast differentiation were evaluated. BioS-2P scaffolds were implanted into rat calvarial defects and after 2 and 4 weeks, bone tissue were evaluated by tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) staining and RT-PCR to detect the gene expression of the osteoclast markers, compared to bone grown in empty defects. OCM-BioS-2P favored cell viability and osteoclast activity, evidenced by an increase in TRAP-positive cells and on matrix resorption. The bone tissue grown on BioS-2P scaffolds exhibited higher expression of the osteoclast marker genes Ctpk , Mmp 9 , Rank (2 and 4 weeks) and RankL/Opg ratio (2 weeks). The Trap gene expression was lower at 2 weeks, and more TRAP-positive cells were noticed on newly bone on BioS-2P compared to bone at empty defects at both periods. The results of	

ANEXO D - Prêmio 1º lugar Apresentação Oral no Simpósio Virtual 2020 da *Osteology Foundation*

25 April 2020

Virtual Osteology Symposium Orlando
 NEXT REGENERATION: Where Research meets Practice

Osteology Research Award**Dr. Emanuela Ferraz**

**"The Role of Photobiomodulation on Osteoblast Differentiation in
 a Rat Model of Diabetes"**

1. Prize in the Category Basic Research
 (free attendance at the Osteology Research Academy Boston 2020)

Prof. William Giannobile
 Chairman

Prof. Pamela McClain
 Chairman

Prof. Gustavo Avila-Ortiz
 Program Chairman

Dr. Hector Sarmiento
 Session Moderator

The Osteology Foundation is an ADA CERP Recognized Provider. ADA CERP is a service of the American Dental Association to assist dental professionals in identifying quality providers of continuing dental education. ADA CERP does not approve or endorse individual course or instructors, nor does it imply acceptance of credit hours by boards of dentistry.

Concerns or complaints about a CE provider may be directed to the provider or the Commission for Continuing Education Provider Recognition and ADA.org/CERP.

LINKING SCIENCE WITH
 PRACTICE IN REGENERATION

ADA CERP® Continuing Education
 Recognition Program

CERTIFICATE

ANEXO E - Prêmio 2º lugar Apresentação Oral no Congresso Universitário Brasileiro 2018

ANEXO F - Certificado de apresentação na 36ª Reunião Anual da SBPqO 2019

Certificamos que o trabalho **PI0001 - EFEITO DA TERAPIA DE FOTOBIMODULAÇÃO NA DIFERENCIAÇÃO OSTEOLÁSTICA DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE RATOS DIABÉTICOS** de Copete IN*, Bueno NP, Souza ATP, Marques MM, Miniello TG, Ferraz EP foi apresentado

na 36ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica
no período de 04 a 07 de Setembro de 2019

Isabela Almeida Pordeus
Presidente

Paulo Francisco César
Vice-Presidente

ANEXO G - Certificado de apresentação no 27º Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da USP - Etapa Internacional

27º Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da USP - Etapa Internacional

Declaração de Participação nº 1910

Declaro para os devidos fins que **Isabella Nunes Copete** apresentou o trabalho **EFEITO DA TERAPIA DE FOTOBIMODULAÇÃO NA DIFERENCIAÇÃO OSTEOLÁSTICA DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DA MEDULA ÓSSEA DE RATOS DIABÉTICOS** na área de **Ciências da Saúde** na Etapa Internacional do 27º Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da USP - SIICUSP, sob a orientação de **Emanuela Prado Ferraz**, com a colaboração de **Marcia Martins Marques** e **Natália Pieretti Bueno**, em 2019.

Prof. Dr. Sylvio Roberto Accioly Canuto
Pró Reitor de Pesquisa
Universidade de São Paulo

Documento emitido às 14:31:30 horas do dia 12/11/2019 (hora e data de Brasília).

Código de controle: KWFF-79J7-3MNZ-X2IP

A autenticidade deste documento pode ser verificada na página da Universidade de São Paulo

<http://uspdigital.usp.br/webdoc>