ANA CLARA FAGUNDES PEDRONI

Efeito da *cell sheet* de células-tronco da polpa dentária humana, associada ou não à terapia de fotobiomodulação, no reparo de lesões ósseas em calvárias de ratos portadores de *Diabetes Mellitus*

São Paulo

2020

ANA CLARA FAGUNDES PEDRONI

Efeito da *cell sheet* de células-tronco da polpa dentária humana, associada ou não à terapia de fotobiomodulação, no reparo de lesões ósseas em calvárias de ratos portadores de *Diabetes Mellitus*

Versão Corrigida

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

Área de concentração: Laser em Odontologia.

Orientador: Profa. Dra. Márcia Martins Marques

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

Pedroni, Ana Clara Fagundes.

Efeito da *cell sheet* de células-tronco da polpa dentária humana, associada ou não à terapia de fotobiomodulação, no reparo de lesões ósseas em calvárias de ratos portadores de *Diabetes Mellitus* / Ana Clara Fagundes Pedroni; orientador Márcia Martins Marques -- São Paulo, 2020.

123 p. : tab., fig., graf. ; 30 cm.

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

Versão corrigida

1. Diabetes Mellitus. 2. Terapia de fotobiomodulação. 3. Células-tronco. 4. Terapia baseada em transplante de células e tecidos. 5. Regeneração tecidual. 6. Reparo ósseo. I. Marques, Márcia Martins. II. Título.

Pedroni ACF. Efeito da *cell sheet* de células-tronco da polpa dentária humana, associada ou não à terapia de fotobiomodulação, no reparo de lesões ósseas em calvárias de ratos portadores de *Diabetes Mellitus*. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: 27/05/2020

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). Luciana Corrêa

Instituição: FO-USP Faculdade de Odontologia da USP

Julgamento: Aprovada

Prof(a). Dr(a). Maria Stella Nunes Araújo Moreira

Instituição: UNIB – Universidade Ibirapuera

Julgamento: Aprovada

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

Instituição: Hospital Israelita Albert Einstein

Julgamento: Aprovada

À Minha Mãe, Deni, pelo exemplo de amor, dedicação e trabalho

Aos meus avós, Júlio e Zulmira, pelo exemplo de família e união

Ao meu pai de coração, Walter, por me amar como filha

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço à **Deus**, minha **mãe**, **Deni**, meu padrasto, **Sérgio**, meus **avós**, **Júlio e Zulmira** - exemplos de amor, força e caridade – meus **tios Matilde, Marcelo, Silvana, Euder, Anderson, Salete e Sezar**...e todos os primos queridos! E Claro, a “porrolinha”, minha **irmã Luísa**. Nossa família é minha maior riqueza.

Ao meu pai de coração, **Walter**, e minha mãe “postixa”, **Neusa**, por cuidarem tão bem de mim aqui em São Paulo! Muito obrigada por todo o carinho e respeito, sem o suporte de vocês seria muito difícil o meu ingresso na vida acadêmica.

Ao meu melhor amigo, meu companheiro, amante e ainda noivo nas horas vagas, Rafael (ou “**Pipo**”), obrigada! E não posso deixar de agradecer também aos seus pais **Vera** e **Tadeu**, por todo o carinho, acolhimento e lanchinhos gostosos. Agradeço por tudo, amo vocês!

Agradeço a minha querida orientadora, **Márcia**. Não só por toda a confiança depositada em mim nos 6 anos em que estamos trabalhando juntas, mas principalmente pela amizade e exemplo de pessoa e profissional que és para mim. Muito obrigada por todo apoio e por topar minhas teimosias...possibilitando assim meu tão sonhado Doutorado Sanduíche em Harvard. E claro, obrigada por nunca desistir de um paper, uma bolsa de pesquisa ou auxílio Fapesp, mesmo que significasse escrever 3 reconsiderações! Sua perseverança é um exemplo e é em verdadeiro orgulho ser sua filha científica. Te admiro muito.

E ainda, um agradecimento muito especial aos **pacientes** que concordaram em doar material biológico para essa e outras pesquisas no país. Bem como aos **animais** utilizados, que nos possibilitaram ampliar nossos conhecimentos na busca de melhores tratamentos.

AGRADECIMENTOS

À **FOUSP**, pelo suporte acadêmico e de infraestrutura durante o curso de doutorado.

Aos **pacientes da FOUSP**, sejam aos das clínicas da graduação ou de pós. Agradeço a confiança em nome de todos os dentistas, professores, pesquisadores e alunos de odontologia – todos que em algum momento dependeram dessa confiança para aprenderem suas profissões.

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

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

Aos **professores do Departamento de Dentística** o meu muito obrigada por todos os ensinamentos e convívio diário. Agradeço por me receberem tão bem e pela confiança em mim depositada durante as Disciplinas em que pude colaborar junto aos alunos de graduação, tanto nas atividades teóricas quanto laboratórios de pré-clínica e clínica.

Ao **LELO**, Laboratório Especial de Laser em Odontologia, seus professores, funcionários e pacientes, por guiarem meus primeiros passos na Laserterapia, mesmo antes do meu ingresso no mestrado. Bem como por estarem sempre de portas abertas quando surge alguma urgência odontológica a ser resolvida!! Obrigada **Lili, Leni e Ana** por serem sempre tão gentis.

Às Profas. Dras. Maria Cristina, Graça, Dalva, Emanuela (cirurgia) e Luciana Corrêa (patologia) pela colaboração e disponibilidade para tirar dúvidas teóricas e práticas. Agradeço imensamente por todos os ensinamentos e por estarem sempre tão disponíveis. Obrigada também pelos almoços e cafés compartilhados. Vocês são um grande exemplo!

Ao **Laboratório de Pesquisa Básica** da FOU SP, em nome da **Profa. Dra. Márcia Martins Marques**, e ao **Biotério do Departamento de Biologia Oral**, em nome do Prof. Dr. Victor Arana Chaves, pelo suporte técnico e operacional à essa pesquisa.

Aos **funcionários** da FOU SP e outros institutos, sem os quais seria impossível a execução dos trabalhos: **Aldo, David, Leandro, Selminha, Débora e Silvana** (Departamento de Dentística); **Douglas e Eli** (em nome do Departamento de Biologia Oral); **Alcimar e Leandro** (Informática) **Vânia e Glauci** (em nome da Biblioteca da FOU SP); **Cátia e Alessandra** (Secretaria de Pós-Graduação). E tantos outros que não tive tanto contato, mas que são insubstituíveis em suas tarefas para o bom andamento da Instituição. Obrigada a todos pelo carinho, atenção, dedicação e ajuda preciosa.

Aos queridos amigos de laboratório **Thaís** (Diagnóstico), **Natacha (cirurgia), Samantha (cirurgia), Natália (cirurgia) Giovanna Sarra (endodontia), Letícia (periodontia); Emanuel (periodontia)** e as “agregadas”, **Sueli Miyagi e Stella Moreira**. Muito obrigada por todos os momentos compartilhados, por todas as ajudas e muuuuuuuitos ensinamentos. Especialmente à **Sueli, Stella, Ivana e Roberta**, muito obrigada por compartilhar da experiência de vocês e se fazerem disponíveis para nos ensinar mesmo com todas as ocupações que têm. Muito obrigada **Natacha**

(cirurgia) e **Samantha (cirurgia)**, pela fundamental colaboração nesse trabalho, onde executamos em parceria todos os procedimentos cirúrgicos.

Stella, você é uma grande inspiração! Muito obrigada por sua paciência em nos ensinar. Não bastasse, ainda é uma grande amiga, ótima companheira de risadas e dos trabalhos de fim de semana! Torço muito pelo seu sucesso e felicidade.

A **todos os alunos de IC** que estiveram conosco nesse tempo, **Danilo, Ana Vitória, Carol, Gabriela, Giovanna Lopes, Ana Flávia, Débora, Shady, Tomais, Thaís Massareto e Pâmela** – além da minha eterna aluna de IC, **Gio Sarra!** foram muitas horas de treinamento, trabalho, apresentações, cuidado com os animais, limpeza de gaiolas (aff) e risadas! Tive muita sorte de contar com a ajuda de pessoas tão dedicadas. Agradeço também aos alunos de pós **Fernando, (radiologia), Thaís (diagnóstico) e Samantha (cirurgia)**, por dividirem (além de conhecimento), seu tempo para o rodízio de cuidado dos animais. Formamos uma ótima equipe.

Aos **colegas de pós-graduação da Dentística, Endodontia e Laser em Odontologia** pela amizade e atividades que desenvolvemos juntos dentro e fora da FO-USP.

Também agradeço a todos os **alunos da graduação** que porventura tenham tido contato comigo nas aulas teóricas, seminários, laboratórios ou clínicas. Apreendi muito mais do que ensinei.

Aos **Profs. Drs, Roland Baron e Francesca Gori** por me receberem e ensinarem tanto durante meu estágio sanduíche em Boston. Muito obrigada pela confiança, foi uma honra ser a primeira brasileira a trabalhar no laboratório – e a todos os *labmates* com quem compartilhei ótimas experiências e aprendi

muito. Foram 365 dias aprendendo diariamente (sim, incluindo fins de semana).

À **Harvard School of Dental Medicine**, por me receber sem custos e suprir toda a estrutura necessária para experimentos e (inúmeros) treinamentos.

Agradeço à **FAPESP** pelo suporte financeiro na forma da bolsa de doutorado, doutorado sanduíche e auxílio a essa pesquisa, o que possibilitou minha dedicação exclusiva à pesquisa durante esse período.

*“essa é a receita da vida
minha mãe disse
me abraçando enquanto eu chorava
pense nas flores que você planta
a cada ano no jardim
elas nos ensinam
que as pessoas
também murcham
caem
criam raiz
crescem
para florescer no final”*

Rupi Kaur

RESUMO

Pedroni ACF. Efeito da *cell sheet* de células-tronco da polpa dentária humana, associada ou não à terapia de fotobiomodulação, no reparo de lesões ósseas em calvárias de ratos portadores de *Diabetes Mellitus* [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2020. Versão Corrigida.

Diabetes Mellitus (DM) é uma desordem metabólica que compromete a reparação óssea, demandando novas estratégias terapêuticas. Uma delas se baseia na aplicação da terapia celular por meio da utilização de cultivos do tipo "*Cell sheet*" (CS) - que preservam o contato célula-célula, a organização estrutural e o fenótipo das células-tronco (CTs). Outro tratamento alternativo é a terapia de fotobiomodulação (PBMT), que induz respostas que favorecem a regeneração tecidual. O objetivo deste estudo foi o de avaliar o efeito do uso de CSs de CTs da polpa dentária humana (hDPSC4) indiferenciada, associadas ou não à PBMT, no reparo de lesões ósseas em calvária de ratos diabéticos. O estudo contempla duas etapas: uma *in vitro* (obtenção e caracterização das CSs) e uma *in vivo*. Primeiramente, DM foi induzida em 54 ratos, pela administração de Estreptozotocina. Lesões ósseas foram realizadas nos ossos parietais de todos os animais. Essas lesões foram tratadas de acordo com os seis grupos experimentais (n = 6 por grupo/tempo experimental) - G.Controle: lesão sem tratamento; G.PBMT: lesão tratada com PBMT; G.MCol: colocação de membrana de colágeno suíno comercial; G.MCol+PBMT: colocação da membrana de colágeno suíno seguida da aplicação da PBMT; G.CS: colocação da CS e G.CS+PBMT: Colocação da CS seguida da PBMT. A PBMT foi realizada com laser infravermelho (808 nm, 40 mW, 0,028 cm² de área do feixe, 1,4 W/cm², 3 s, 4 J/cm², 0,12 J por ponto) imediatamente, 48 e 96 horas após a cirurgia. Trinta e 60 dias após a cirurgia, as calotas cranianas foram dissecadas, fixadas e submetidas às análises de: Microtomografia Computadorizada (MicroCT), histologia (HE) e histoquímica (Tricrômico de Masson). Os dados foram tratados estatisticamente (p≤0,05). A CS de DPSC indiferenciada não acelerou o processo de reparo ósseo na maioria das lesões, ocorrendo abundante formação óssea em apenas dois animais do G.CS+PBMT em 60 dias. A MicroCT revelou, em 60 dias, aumento significativo no

volume ósseo relativo ($p=0,0064$) e número de trabéculas ($p=0,0068$) no grupo G.MCol+PBMT e no volume ósseo relativo ($p<0,0001$) e espessura de trabéculas ($p<0,0001$) no grupo G.PBMT. Histologicamente, foi possível observar que a CS, em 30 dias, promoveu a formação de tecido osteóide organizado, rico em fibras colágenas e células osteoblásticas, com formação de ilhotas de neoformação óssea distantes dos bordos da lesão. No entanto essa neoformação foi considerada imatura, quando comparada aos outros grupos. Quando a CS foi associada ao PBMT foi possível observar mais fibras colágenas e maior frequência de ilhotas no centro da lesão. Nas condições experimentais dessa pesquisa, na maioria dos casos, a *cell sheet* (CS) de hDPSC4 indiferenciada não foi capaz de acelerar o processo de reparo de lesões ósseas críticas em calvária de ratos diabéticos.

Palavras-chave: *Diabetes Mellitus*. Terapia de fotobiomodulação. *Cell sheet*. Células-tronco da polpa dentária humana. Terapia celular. Regeneração tecidual. Reparação óssea. Regeneração óssea guiada

ABSTRACT

Pedroni ACF. Effect of *cell sheet* of human dental pulp stem cell, associated or not with photobiomodulation therapy, on the repair of critical size bone defects in calvaria of rats with Type 2 *Diabetes Mellitus* [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2020. Versão Corrigida.

Diabetes Mellitus (DM) is a metabolic disorder that compromises bone repair, requiring new therapeutic strategies. One of them is based on the application of cell therapy through the use of "Cell sheet" (CS) cultures - which preserve cell-cell contact, the structural organization and the phenotype of stem cells (CTs). Another alternative treatment is photobiomodulation therapy (PBMT), which induces responses that favor tissue regeneration. The aim of this study was to evaluate the effect of the use of CSs from undifferentiated human dental pulp (hDPSC4), associated or not with PBMT, in the bone repair of lesions in calvaria of diabetic rats. The study comprises two stages: one *in vitro* (obtaining and characterizing the CSs) and one *in vivo*. First, DM was induced in 54 rats, by the administration of Streptozotocin. Bone lesions were performed on the parietal bones of all animals. These injuries were treated according to the six experimental groups (n = 6 per group / experimental time) - G.Control: injury without treatment; G.PBMT: lesion treated with PBMT; G.MCol: placement of commercial porcine collagen membrane; G.MCol+PBMT: placement of the porcine collagen membrane followed by the application of PBMT; G.CS: placement of CS and G.CS+PBMT: placement of CS followed by PBMT. PBMT was performed using an infrared laser (808 nm, 40 mW, 0.028 cm² of beam area, 1.4 W/cm², 3 s, 4 J/cm², 0.12 J per point) immediately, 48 and 96 hours after the surgery. Thirty and 60 days after surgery, the skull caps were dissected, fixed and submitted to the analysis of: Computed Microtomography (MicroCT), histology (HE) and histochemistry (Masson's Trichrome). The data were treated statistically (p≤0.05). Undifferentiated DPSC CS did not accelerate the bone repair process in most lesions, with abundant bone formation in only two animals from G.CS+PBMT in 60 days. MicroCT revealed, in 60 days, a significant increase in relative bone volume (p=0.0064) and number of trabeculae (p=0.0068) in the G.MCol+PBMT group and in relative bone volume (p<0.0001) and trabecula

thickness ($p < 0.0001$) in the G.PBMT group. Histologically, it was possible to observe that CS, in 30 days, promoted the formation of organized osteoid tissue, rich in collagen fibers and osteoblastic cells, with formation of islets of bone neoformation distant from the edges of the lesion. However, this new formation was considered immature when compared to the other groups. When CS was associated with PBMT, it was possible to observe more collagen fibers and a greater frequency of islets in the center of the lesion. In the experimental conditions of this research, in most cases, the undifferentiated hDPSC4 cell sheet (CS) was not able to accelerate the process of repairing critical bone lesions in diabetic rat calvaria.

Keywords: *Diabetes Mellitus*. Photobiomodulation therapy. Cell sheet. Human Dental Pulp Stem Cell. Tissue regeneration. Bone repair. Cell therapy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1	Mecanismos celulares e moleculares de alterações ósseas na <i>Diabetes Mellitus</i>	35
Figura 2.2	Mecanismos de ação do laser em mitocôndrias	46
Figura 4.1	Fotografias do procedimento de obtenção da linhagem de células tronco	55
Figura 4.2	Fotografia das CSs suspensas em solução tampão	56
Figura 4.3	Ilustração da curva de Gauss obtida com a aplicação do teste para o Cálculo amostral	61
Figura 4.4	Distribuição dos tratamentos no modelo experimental de calota dividida, visando redução do número de animais	62
Figura 4.5	Fotografias representativas do momento cirúrgico	64
Figura 5.1	Imunofenotipagem das moléculas de superfície das hDPSC4 (G1) e das células isoladas das <i>cell sheets</i> , hDPSC4-CS (G2).	71
Figura 5.2	Fotografia dos poços evidenciando as colônias formadas (CFU-f)	72
Gráfico 5.1	Representação gráfica da Curva de Crescimento.....	73
Figura 5.3	Imagens representativas da fluorescência das CSs submetidas ao ensaio Live/Dead® e representação gráfica da viabilidade celular	74
Figura 5.4	Imagens ilustrativas de uma CS suspensa no poço depois de formada.....	75
Figura 5.5	Imagens representativas do ensaio Vermelho de Alizarina do G1 (hDPSC4) e G2 (hDPSC4-CS).....	76
Gráfico 5.2	Representação gráfica das médias das porcentagens (%) de volume ósseo relativo (VO/VT), espessura trabecular (mm), número de trabéculas (mm ⁻¹) e separação entre trabéculas (mm), das lesões de todos os grupos experimentais nos dois períodos de análise.	78
Figura 5.6	Imagens ilustrativas das reconstruções em 3D dos dados de MicroCT.....	79
Figura 5.7	Fotomicrografias representativas das lesões dos grupos G.Controle e G.Controle+PBMT em 30 dias e 60 dias após os tratamentos.....	83
Figura 5.8	Fotomicrografias representativas das lesões dos grupos G.MCol e G.MCol+PBMT em 30 dias e 60 dias após os tratamentos.....	85

Figura 5.9	Fotomicrografias representativas das lesões dos grupos G.CS e G.MCol+PBMT em 30 dias e 60 dias após os tratamentos.	87
Figura 5.10	Fotomicrografias de detalhes no G.CS+PBMT em 30 dias (aumento 40x).....	89
Figura 5.11	Fotomicrografias de detalhes G.CS e G.CS+PBMT em 30 dias (aumento 200x).....	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA	<i>American Diabetes Association</i>
ADP	do inglês <i>adenosine diphosphate</i>
AGEs	do inglês <i>advanced glycation end-products</i>
ALP	do inglês <i>alkaline phosphatase</i>
AsGaAl	laser de diodo de arseneto de gálio-alumínio
ATP	do inglês <i>adenosine triphosphate</i>
BMMSCs	do inglês <i>bone marrow mesenchymal stem cells</i>
BMP4	do inglês <i>bone matrix protein 4</i>
CA	Estado da California
CD105	anticorpo anti o alvo CD 105
CD106	anticorpo anti o alvo CD 106
CD13	anticorpo anti o alvo CD 13
CD14	anticorpo anti o alvo CD 14
CD146	anticorpo anti o alvo CD 146
CD24	anticorpo anti o alvo CD 24
CD29	anticorpo anti o alvo CD 29
CD34	anticorpo anti o alvo CD 34
CD44	anticorpo anti o alvo CD 44
CD45	anticorpo anti o alvo CD 45
CD73	anticorpo anti o alvo CD 73
CD90	anticorpo anti o alvo CD 90
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CFU	do inglês <i>colony formation units</i>
CFU-F	do inglês <i>colony formation units-fibroblastic</i>
cit c	citocromo c oxidase
CO ₂	dióxido de carbono
CS	<i>cell sheet</i>
CTs	células-tronco
DM	<i>Diabetes Mellitus</i>

DMO	densidade de massa óssea
DMP1	do inglês <i>dentin matrix acidic phosphoprotein 1</i>
DMT1	<i>Diabetes Mellitus</i> tipo 1
DMT2	<i>Diabetes Mellitus</i> tipo 2
DP	tempo de Dobra da População
DPSC	do inglês <i>dental pulp stem cells</i>
DSP	do inglês <i>dentin sialoprotein</i>
DXA	do inglês, <i>dual X-ray absorptiometry</i>
EDTA	do inglês <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EP	eficiência de Plaqueamento
EUA	Estados Unidos da America
ffo-Fundecto	Fundação para Desenvolvimento científico e tecnológico da Odontologia
GMSC	do inglês <i>mesenchymal stem cells derived from human gingiva</i>
GIP	inibidor gástrico polipeptídeo
GLP1	peptídeo semelhante ao glucagon 1
hDPSC	do inglês <i>human dental pulp stem cells</i>
hDPSC4	linhagem 4 da célula hDPSC
hDPSC4-CS	célula hDPSC4 após se soltar da <i>cell sheet</i>
HE	hematoxilina e eosina
HGF	do inglês <i>hepatocyte growth fator</i>
HGF-DPSCs	células DPSC transfectadas por HGF
ICB/USP	Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo
IDF	<i>International Diabetes Federation</i>
IGFBP2	proteína 2 de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina
IPS	do inglês <i>induced pluripotent stem cells</i>
JAK / STAT	via de sinalização JAK / STAT
LED	do inglês <i>Light Emission Diod</i>
Ln	logaritmo natural
Mclono	meio de cultura clonogênico
MCol	membrana de colágeno suíno comercial
MD	Estado de Maryland

MEC	matriz extracelular
mg/dL	miligrama por decilitro
mg/Kg	miligrama por kilograma
MicroCT	Micro tomografia computadorizada
MM	meio mineralizante
MSC	do inglês <i>mesenchymal stem cells</i>
MSC-FBS,	soro fetal bovino próprio para <i>mesenchymal stem cells</i>
Nanog	Nanog
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
NO	óxido nítrico
Notch-1	do inglês <i>translocation-associated Notch homolog 1</i>
NY	Estado de Nova York
Oct 3 / 4	do inglês <i>Octamer-binding Transcription fator 3 and 4</i> (alvo)
OCN	osteocalcina
OPN	osteopontina
OR	Estado do Oregon
PBMT	do inglês <i>Photobiomodulation therapy</i>
PBS	do inglês <i>phosphate buffered saline</i>
PDL	fibroblastos do ligamento periodontal
PDLSC	do inglês <i>periodontal ligament stem cells</i>
PLGA	do inglês <i>poly lactic-co-glycolic acid</i>
pPDLSC	células-tronco do ligamento periodontal de suínos
PTH	hormônio paratireóideo
p53	gene p53
REDOX	processos de Redução / Oxidação
ROS	do inglês <i>reactive oxygen species</i>
RUNX2	do inglês <i>runt-related transcription factor 2</i>
SCAP	do inglês <i>stem cells from the apical papila</i>
SHED	do inglês <i>stem cells from human exfoliated deciduous</i>
SOST	gene codificador de esclerostina
STRO1	anticorpo anti o alvo STRO1
STZ	do inglês <i>Streptozotocina</i>
Tb.N	número de trabéculas

Tb.Sp	separação de trabéculas
Tb.Th	espessura de trabéculas
TET1	gene codificador da enzima telomerase
TGF- β	do inglês <i>transforming growth factor-β</i>
U/ml	unidade por mililitro
UI/kg	unidade de insulina por kilograma
USP	Universidade de São Paulo
VC	vitamina C
VEGF	do inglês <i>vascular endothelial growth factor</i>
VO	volume ósseo
VOI	volume de interesse
VT	volume total de tecido
W / cm ²	watts por centímetro quadrado
WNT	via de sinalização WNT
Wnt10b	proteína Wnt10b
α -MEM	do inglês α - <i>Minimal Essential Medium</i>
μ g / ml	micrograma por mililitro
3Rs	do inglês <i>reduction, replacement, and refinement</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

nm	nanômetro
mW	miliwatt
cm ²	centímetro quadrado
W / cm ²	watts por centímetro quadrado
J	joule
J / cm ²	joule por centímetro quadrado
mM	milimolar
L	litro
%	porcentagem
°C	graus celsius
mm	milimetro
μL	microlitro
μM	micromolar
mL	mililitro
min	minuto
pH	pH
i.p	intraperitonal
kV	Kilovolt
μA	microamper
O ²⁻	superóxido
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
OH ⁻	radical hidroxila
¹ O ²	oxigênio singleto

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	29
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	33
3	PROPOSIÇÃO	51
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	53
5	RESULTADOS.....	71
6	DISCUSSÃO	93
7	CONCLUSÕES	103
	REFERÊNCIAS.....	105
	ANEXOS	119

1 INTRODUÇÃO

O número de portadores de *Diabetes Mellitus* (DM) está aumentando em virtude do crescimento e envelhecimento populacional, da maior urbanização, progressiva incidência de obesidade, sedentarismo e da maior sobrevivência de pacientes com DM. Já é considerada uma epidemia em curso e, em 2017, a Federação Internacional de Diabetes (International Diabetes Federation, IDF) estimou que 8,8% da população mundial entre 20 a 79 anos (424,9 milhões de pessoas) vivia com diabetes. Se as tendências atuais persistirem, estima-se que o número de pessoas com DM será superior a 628,6 milhões em 2045 (Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2019/2020). Cerca de 80% desses indivíduos vivem em países em desenvolvimento, onde a epidemia tem maior intensidade e há crescente proporção de pessoas acometidas em grupos etários mais jovens.

DM é uma desordem metabólica caracterizada por hiperglicemia crônica que ocorre devido à baixa secreção ou ação de insulina, resultando em duas doenças distintas denominadas DM tipo 1 (DMT1) e DM tipo 2 (DMT2) (ADA American Diabetes Association, 2020). Esta hiperglicemia crônica afeta múltiplos órgãos gerando outras patologias, tais como: retinopatia diabética, nefropatia, neuropatia, cardiomiopatia, microangiopatia e doença óssea (ADA American Diabetes Association, 2020). Vários estudos descrevem doenças ósseas metabólicas associadas com DMT1 e DMT2, o que leva a alto risco de fratura e osteoporose (Wongdee; Charoenphandhu, 2011; Napoli et al., 2017; Kasperk et al., 2017).

Apesar da prevalência de DMT2 em cerca de 90% a 95% dos casos de diabetes, as desordens ósseas nesse tipo de distúrbio são menos estudadas. No entanto, existem diversos modelos que descreveram um desequilíbrio no metabolismo ósseo no DMT2, levando a um fenótipo similar à osteoporose, com ausência na deposição de matriz mineralizada, lacunas de reabsorção óssea associadas com alta atividade de osteoclastos, redução significativa da atividade de fosfatase alcalina em associação com alterações em marcadores ósseos específicos (Hamann et al., 2011; Wongdee; Charoenphandhu, 2015; Carnovali et al., 2016; Napoli et al., 2017; Kasperk et al., 2017). Já pacientes portadores de DMT1 exibem uma densidade óssea reduzida em todo o esqueleto, independentemente do gênero, idade e índice de massa corporal (Zhukouskaya et al., 2013).

Portanto, a reparação óssea nestes indivíduos é comprometida, gerando a necessidade de novas estratégias terapêuticas, especialmente naqueles casos de defeitos críticos do osso.

A reabilitação de pacientes com defeitos ósseos já deu largos passos nas técnicas cirúrgicas e materiais desenvolvidos visando a neoformação tecidual. Apesar disso, o enxerto autógeno continua sendo o de escolha nos casos de defeitos ósseos críticos. Apesar de ser considerado como enxerto padrão ouro, possui como desvantagens absorção imprevisível em longo prazo, quantidade limitada de osso e demanda cirurgia adicional no leito doador (Dimitriou et al., 2011). Portanto, as pesquisas cada vez mais avançam em busca de um material que se aproxime das vantagens do osso autógeno, com melhor prognóstico tardio e menor morbidade ao paciente. Nesse contexto é crescente o interesse na engenharia tecidual e terapias celulares, ambos mediados por células-tronco (CTs) (Oreffo; Triffitt, 1999; Oliveira et al., 2019; Pedroni et al., 2019).

As CTs são células capazes de sofrer divisão assimétrica gerando uma célula-tronco e outra célula capaz de se diferenciar em tipos celulares especializados, de acordo com os estímulos locais. Em Odontologia são as CTs adultas que têm sido utilizadas na regeneração de tecidos, especialmente as células-tronco da polpa dentária humana (hDPSC, do inglês *human dental pulp stem cells*). Essas CTs são de fácil isolamento e cultivo, podendo ser obtidas de elementos dentários que já seriam extraídos ou teriam indicação de tratamento endodôntico (Gronthos et al., 2000). Além do mais, apresentam alta capacidade de diferenciação em tecidos duros (Arany et al., 2014) e baixa imunogenicidade, mesmo quando heteróloga (de Sá Silva et al., 2012; Marques et al., 2016).

Dentre as linhas de estudos que se baseiam nas técnicas regenerativas guiadas por CTs adultas, uma alternativa contemporânea promissora é a engenharia de cultivos do tipo *Cell Sheet* (CS). As CSs consistem em cultivar uma grande quantidade de células com estímulos específicos para que elas se soltem espontaneamente das placas de cultivo sem a necessidade do uso de enzimas, ou seja, sem subcultivos. Essas CSs são diferentes de uma simples suspensão de células por preservar o íntimo contato célula-célula e manter a organização estrutural, o que torna desnecessário o uso de arcabouços (*scaffolds*). Além disso, preserva a matriz extracelular (MEC) endógena que contém diversos fatores de modulação importantes para a manutenção de fenótipo das células. Portanto, a

grande vantagem do uso das CSs seria a de se conseguir grande quantidade de CTs em um arcabouço natural e que poderia ser transplantada para sítios que induziriam as CTs pelos fatores de crescimento locais do tecido a ser reposto (Okano et al., 1995; Ohashi et al., 2007; Pedroni et al., 2018; Pedroni et al., 2019; Garrido et al., 2019). Assim sendo, essas CSs já vem sendo testadas na odontologia regenerativa, quer seja como auxiliar no reimplante dentário, na regeneração de defeitos ósseos periodontais, entre outros modelos *in vivo* (Zhao et al., 2013).

Um dos estímulos para obtenção de CSs é a suplementação do meio de cultivo com vitamina C (VC) (Wei et al., 2012; Pedroni et al., 2018), substância que apresenta efeitos positivos no metabolismo celular, tais como indução de proliferação com manutenção da viabilidade celular. Esses são semelhantes àqueles já reportados como resultado da terapia de fotobiomodulação (PBMT, do inglês *Photobiomodulation therapy*). Além destes, a PBMT também já se mostrou capaz de prevenir a morte celular (Moreira et al., 2011), bem como prolongar sua longevidade tanto *in vitro*, quanto *in vivo* (Park et al., 2015).

As similaridades das respostas biológicas à VC nas CSs (Wei et al., 2012) e aquelas da PBMT sobre células e tecidos (Moreira et al., 2009; Moreira et al., 2011; Romão et al., 2015; Marques et al., 2016; de Freitas; Hambling, 2016), levaram nosso grupo de pesquisa a testar a hipótese de que estas terapias poderiam se complementar melhorando o prognóstico de aplicação clínica das CSs em regenerações de tecidos de interesse odontológico (Pedroni et al., 2018; Garrido et al., 2019). Para testar esta hipótese CSs de células-tronco da polpa dentária humana (hDPSC) foram analisadas *in vitro* (Pedroni, et al., 2018), com resultados promissores. Os resultados desse trabalho mostraram que a PBMT não prejudica a ação da VC na formação de CSs *in vitro* e ainda melhora a manipulação dessas membranas, o que facilitaria o transporte dessas ao leito receptor no momento do transplante. Assim, podemos supor que também no pós-transplante a PBMT poderia ser associada à CS, sem prejuízo da integridade da mesma. Mais ainda, o paciente poderia receber todos os efeitos benéficos da PBMT no pós-transplante, o que poderia melhorar ainda mais o desfecho clínico da regeneração tecidual.

Segundo Anders et al. (2015) a PBMT é definida como "Uma forma de terapia de luz que utiliza formas não ionizantes de fontes de luz, incluindo lasers, LEDs e luz de banda larga, no espectro visível e infravermelho. Trata-se de um processo não térmico envolvendo cromóforos endógenos desencadeando eventos fotofísicos (isto

é, lineares e não lineares) e fotoquímicos em várias escalas biológicas. Este processo resulta em resultados terapêuticos benéficos, incluindo - mas não limitados - ao alívio da dor ou inflamação, imunomodulação, promoção da cicatrização de feridas e regeneração de tecidos" (Anders et al., 2015).

Entre os efeitos da PBMT de importância para a regeneração óssea destacam-se a manutenção da viabilidade de células e a indução de síntese de VEGF (do inglês *vascular endothelial growth factor*) o que promoveria condições de nutrição para as células das CSs após o transplante, bem como poderia induzir a síntese ou mesmo ativar outros fatores de crescimento latentes (Damante et al., 2009; Arany et al., 2014). Além disso, é sabido que a PBMT pode potencializar os mecanismos de migração e de diferenciação de células-tronco (Pellicoli et al., 2014; Arany et al., 2014; Arany, 2016; Marques et al., 2016) que, após o transplante, entrariam em contato com os fatores de crescimento locais culminando no sucesso do processo de regeneração - mesmo em casos complexos como os defeitos ósseos críticos em pacientes portadores de doenças que prejudicam a regeneração óssea. Como, por exemplo, a *Diabetes Mellitus*.

Assim sendo, o objetivo deste estudo foi o de avaliar o efeito da aplicação de *Cell Sheets* (CSs) de células-tronco da polpa dentária humana, associadas ou não à terapia de fotobiomodulação (PBMT), na regeneração de lesões ósseas em calota craniana de ratos diabéticos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DIABETES MELLITUS E O TECIDO ÓSSEO

2.1.1 Principais considerações clínicas das alterações ósseas na DM

A quantidade de massa óssea presente no esqueleto é o resultado da formação e da reabsorção. Este *turnover* está diretamente relacionado à necessidade corporal de manter uma concentração fisiológica de cálcio ionizado nos fluidos orgânicos e, especialmente, à necessidade de manter a integridade estrutural do esqueleto. A DM tipo 1 e 2 afetam a homeostase óssea, suprimindo a formação e estimulando a reabsorção óssea em um *turnover* não fisiológico. Esse desequilíbrio metabólico, além de aumentar o risco de fraturas pela diminuição da resistência óssea, ainda interfere negativamente no processo de reparo em caso de lesões (Ivers et al., 2001; Zhukouskaya et al., 2013; Starup-Linde; Vestergaard, 2016; Napoli et al., 2017; Kasperk et al., 2017). Os mecanismos fisiopatológicos subjacentes à fragilidade óssea na DM são complexos e incluem: hiperglicemia, estresse oxidativo e acúmulo de produtos finais da glicação avançada (AGEs, do inglês, *advanced glycation end-products*). Esses comprometem as propriedades do colágeno, o aporte vascular, aumentam a adiposidade da medula, liberam fatores inflamatórios e adipocinas da gordura visceral e, acredita-se, alteram a função dos osteócitos (Napoli et al., 2017; Kasperk et al., 2017).

Para a DMT1, a redução da densidade óssea é um dos principais fatores associados ao risco de fratura, principal afecção clínica atribuída à problemas ósseos em pacientes diabéticos. No entanto, os mecanismos subjacentes são pouco claros e ainda não existem evidências suficientes para um modelo conclusivo de fragilidade óssea no DM. Segundo Zhukouskaya et al. (2013), pacientes com DMT1 exibem uma densidade óssea reduzida em todo o esqueleto, independentemente do gênero, idade e índice de massa corpórea. Em sua pesquisa, avaliaram a DMO (densidade de massa óssea) dos ossos espinhal e femoral por DXA (do inglês, *dual X-ray absorptiometry*) de 82 pacientes com DMT1 (26 homens e 56 mulheres, idade

aproximada de 31 anos e tempo de progressão da doença similares aos pacientes do grupo controle). Já Jawhar et al. (2020) avaliou, pela mesma metodologia, 141 pacientes com DMT2 e não encontrou diferença na DMO, para ambos os gêneros. Por vezes ainda relatou aumento da DMO em pacientes com sobrepeso. Apesar da aparente normalidade quanto à densidade óssea, os autores relacionaram a presença de DMT2 com uma maior incidência de osteoporose em mulheres.

Por fim, a diminuição da DMO em pacientes portadores de DMT1 já foi relacionada com um risco maior que 5 vezes de fratura de quadril (Kasperk et al., 2017), sendo esse quadro clínico considerado o de maior morbidade entre as possíveis complicações do sistema esquelético nesses pacientes. Em odontologia, as principais afecções relacionadas ao desequilíbrio no remodelamento ósseo na DM estão relacionados à doença periodontal e atraso no processo de cicatrização pós-cirúrgico (ADA American Diabetes Association, 2020).

2.1.2 Mecanismos celulares e moleculares das alterações ósseas na DM

Ainda não existem evidências suficientes para estabelecer o mecanismo que leva à fragilidade óssea na DM. No entanto, alguns fatores devem ser altamente considerados. Com o declínio da função das células β , a hiperglicemia crônica causa estresse oxidativo, inflamação, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês, *reactive oxygen species*) e produtos finais de glicação avançada (AGEs), causando danos aos órgãos e fragilidade óssea (Napoli et al., 2017) (Figura 2.1).

Figura 2.1 – Mecanismos celulares e moleculares de alterações ósseas na diabetes mellitus. (GIP, inibidor gástrico polipeptídeo; GLP1, peptídeo semelhante ao glucagon 1)

Fonte: Adaptado de Napoli et al. (2017)

Os principais efeitos deletérios descritos agem desequilibrando o *turnover* ósseo, especialmente quanto à supressão da função dos osteoblastos. Em particular, o acúmulo de AGEs no colágeno ósseo diabético determina propriedades reduzidas do material e maior suscetibilidade à fratura. Também é descrito como o possível desencadeador das complicações vasculares da DM. AGEs e hiperglicemia também inibem diretamente a formação óssea através da supressão da função dos osteoblastos. A baixa formação óssea também é causada por distúrbios na via de sinalização WNT, com aumento da expressão de SOST, níveis mais altos de esclerostina e diminuição dos níveis de IGFBP2 (proteína 2 de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina) e proteína Wnt10b. No DMT1 e nos estágios finais do DMT2, a formação óssea também é diminuída pela deficiência de insulina através de um efeito inibitório nos osteoblastos, diretamente ou através de alterações nos níveis do IGF1 (fator de crescimento semelhante à insulina 1). Outros fatores tipicamente ligados ao DMT2, e à obesidade, interferem na saúde óssea. Desregulação de adipocinas como adiponectina e leptina têm um efeito negativo através de mecanismos centrais e periféricos complexos. Novas evidências também

indicam um efeito negativo na saúde óssea pela perda do efeito incretina, com formação óssea reduzida e aumento da osteoclastogênese. Finalmente, alterações no eixo do cálcio - PTH (hormônio paratireóideo) resultam em um balanço negativo de cálcio, contribuindo assim para a desmineralização óssea no DM (Napoli et al., 2017) (Figura 2.1).

Existem também evidências da perturbação mitocondrial nas células da medula óssea devido ao aumento do estresse oxidativo mitocondrial na DMT2, o que prejudica o metabolismo ósseo e pode estar relacionado ao aumento da gordura na medula óssea e aumento da prevalência de fraturas vertebrais (Kasperk et al., 2017).

2.2 MODELO DE DEFEITO ÓSSEO CRÍTICO EM CALVÁRIA DE RATOS

Defeito crítico é a ferida de menor tamanho possível que não possui capacidade natural de reparo durante o tempo de vida normal de um animal (Schmitz; Hollinger, 1996), não possuindo capacidade de regeneração espontânea e necessitando de intervenção terapêutica (Spicer et al., 2012).

A calvária do rato permite a realização de um defeito padronizado, reprodutível e que pode ser avaliado facilmente por meio de exames de imagens e análises histológicas. Sua localização anatômica oferece um campo visual satisfatório para acesso cirúrgico e manejo operatório. A duramáter e a camada subcutânea fornecem suporte mecânico adequado para os materiais ali implantados, dispensando a necessidade de fixações. A calvária do rato permite a comparação entre as diversas substâncias que podem ser enxertadas em um modelo de defeito ósseo crítico, com o objetivo de avaliar o reparo de lesões extensas (Gomes; Fernandes, 2011). Mais ainda, é um osso similar à mandíbula, já que ambos possuem um tecido medular esponjoso entre duas finas camadas ósseas corticais (Schmitz; Hollinger, 1996). O defeito ósseo realizado em calvária de ratos é ainda discutido, divergindo entre 5, 6 ou 8 mm de diâmetro sendo que os defeitos ósseos de 5 e 6 podem ser considerados semicríticos e os de 8 mm são críticos (Schmitz; Hollinger, 1996; Efeoglu et al., 2009; Gomes; Fernandes, 2011; Spicer et al., 2012).

2.3 CÉLULAS-TRONCO

Células-tronco (CTs) são células indiferenciadas que possuem a capacidade de auto-renovação e também a habilidade de se diferenciar em pelo menos um tipo de célula especializada ou madura (Denham et al., 2005). São classificadas de acordo com sua capacidade de diferenciação, podendo ser unipotentes, multipotentes, pluripotentes ou totipotentes. CTs unipotentes são capazes de se diferenciar em apenas um tipo de célula adulta (ex: CTs musculares), CTs multipotentes em dois ou mais tipos celulares (células do feto em desenvolvimento e CTs adultas, como as mesenquimais e hematopoiéticas), já as pluripotentes são capazes de se diferenciar em todas as células de um organismo adulto, exceto linhagens extra- embrionárias (ex.: CTs embrionárias, derivadas da massa celular interna de embriões em estágio de blastocisto) e, por fim, CTs totipotentes podem se especializar em qualquer tipo de célula adulta e também nos tecidos extra embrionários (que inclui os oócitos fertilizados e os blastômeros de embriões antes do estágio de mórula). Mais recentemente também foram descritas CTs derivadas de tecidos neoplásicos, as CTs cancerígenas, que resultam em células neoplásicas indiferenciadas, parcial ou totalmente diferenciadas (Denham et al., 2005).

As terapias com CTs apresentam um grande potencial em termos de regeneração de tecidos vivos, o que tem impulsionado uma série de linhas de pesquisa voltadas para o cultivo *in vitro* desses tipos celulares (Denham et al., 2005). Assim, soluções para os limites biológicos desses cultivos, como a necessidade de grande número de células, controle da diferenciação / indiferenciação e da viabilidade das CTs vêm sendo alvo constante de investigações. Além das dificuldades biológicas acima observadas, os avanços em estudos com CTs, principalmente de origem embrionária, também são dificultados por fatores éticos, aumentando ainda mais a necessidade de conhecimento sobre o potencial de CTs originadas de tecidos adultos. Em especial as oriundas de tecidos que normalmente seriam descartados, como as linhagens de CTs mesenquimais isoladas dos tecidos dentários e adjacentes a esses (Gronthos et al., 2000; Gronthos et al., 2002).

2.3.1 Células-tronco da Polpa Dentária Humana

Em tecidos saudáveis, frequentemente, as células-tronco progenitoras da polpa dentária humana encontram-se em estado quiescente. Porém, na presença de lesões que danifiquem ou destruam odontoblastos – a exemplo de cáries, traumas e restaurações – fatores de crescimento são liberados pela MEC, recrutando e induzindo esses tipos celulares a migrar, proliferar e se diferenciar, com a finalidade de substituir as células danificadas (Iohara et al., 2004; Harada et al., 2008; Ferracane et al., 2010; Harumi et al., 2011).

O dente humano e suas estruturas de suporte são fontes de múltiplas linhagens de células-tronco multipotentes. Estas células podem ser isoladas da polpa dentária (DPSC, do inglês, *Dental Pulp Stem Cells*) (Gronthos et al., 2000); da polpa de dentes decíduos esfoliados (SHED, *Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous*) (Miura et al., 2003); do ligamento periodontal (PDLSC, *Periodontal Ligament Stem Cells*) (Seo et al., 2004); da papila apical (SCAP, *Stem Cells from the Apical Papilla*) (Sonoyama et al., 2008) e da gengiva humana (GMSC, *Mesenchymal Stem Cells derived from human Gingiva*) (Zhang et al., 2009).

As células-tronco da polpa dentária (DPSCs), foram primeiramente isoladas por Gronthos et al. (2000), sendo descritas como células mesenquimais multipotentes e capazes de regenerar o complexo dentino-pulpar. Estas podem ser caracterizadas através de marcadores de superfície, tais como: marcadores mesenquimais STRO1, CD13, CD44, CD24, CD29, CD73, CD90, CD105, CD106 e CD146 e marcadores de células embrionárias Oct 3 / 4 e Nanog (Kawashima, 2012; Sharma et al., 2013). A Mitofilina também foi descrita como um de seus marcadores, sendo expressa nessas células quando ainda se apresentam indiferenciadas (Hwang et al., 2015). Desde então tem aumentado o interesse em modelos de estudo baseados nesse tipo de CTs, principalmente devido à sua multipotencialidade, fácil isolamento, cultivo, baixa imunogenicidade e ainda ao fato de que não enfrenta barreiras éticas - já que tem por fonte um tecido que normalmente seria descartado após extrações dentárias (Gronthos et al., 2000; Pierdomenico et al., 2005; Arany et al., 2014; Jayaraman et al., 2016).

Apesar de as DPSCs serem consideradas boas candidatas para a engenharia de tecidos duros, inclusive com maior capacidade osteogênica do que CTs da medula

óssea (Laino et al., 2005), ainda existem questionamentos quanto a melhor forma de otimizar sua aplicação para terapias regenerativas. Nesse contexto, Xavier Acasigua et al. (2014) analisou a neoformação das fibras colágenas em situações diferentes de aplicação das DPSCs. Foram criados defeitos ósseos críticos na calota de ratos, os quais foram tratados em 3 grupos: 1) apenas *scaffold* de PLGA (do inglês, *poly lactic-co-glycolic acid*), 2) PLGA com adição de DPSCs indiferenciadas da polpa dentária de decíduos 3) mesmo que grupo 2, mas as DPSCs foram induzidas à diferenciação com meio mineralizante. Observou-se uma maior e significativa presença de fibras colágenas quando se comparou o grupo 3, onde DPSCs que receberam estímulo prévio para diferenciação foram semeadas no *scaffold*, em comparação ao grupo 2, onde utilizaram o *scaffold* com DPSCs que não receberam estímulos adicionais quando ainda *in vitro* (ou seja, indiferenciadas). Concluíram que as DPSCs necessitam de seu maquinário de síntese proteica já desenvolvido para a tradução do colágeno, que constituirá a matriz orgânica do futuro osso. Curiosamente o grupo 1, em que foi utilizado somente o *scaffold*, apresentou uma maior concentração de fibras colágenas do que o grupo 2 (*scaffold* + DPSC indiferenciada). Também descreveram que, possivelmente, o fato de essas DPSCs modularem negativamente o processo inflamatório que se instala na região poderia ser o responsável pela redução da liberação de fatores indutores sinalizadores do processo de reparo (como, por exemplo, citocinas pró-inflamatórias). Assim, sugeriram que essa escassez de sinalização do reparo retardaram a diferenciação das DPSCs em osteoblastos e consequentemente a produção de colágeno. Já a utilização do *scaffold* sem células (grupo 1) atuaria como arcabouço para as células do hospederio e do tecido de granulação formado no processo de cicatrização. (Xavier Acasigua et al., 2014).

Além disso, recentemente foi publicada uma revisão sistemática em regeneração de defeitos ósseos periodontais com DPSC (Amghar-Maach et al., 2019). Nessa concluíram que: 1) maior volume ósseo é promovido quando são aplicadas DPSCs arranjadas em *cell sheet* em comparação à injeção do mesmo tipo celular; 2) a adição de fatores tróficos (como adição de biomoléculas por transfecção celular ou adicionados ao meio de cultivo) favorece a diferenciação celular de DPSCs; 3) a regeneração do cemento e ligamento periodontal dependem tanto do tipo celular quanto de outros fatores ainda desconhecidos, sendo que outras CTs de origem dental (como a PDLSC) poderiam resultar em melhor regeneração

periodontal que a DPSC e 4) é necessário investigar quais fatores de crescimento e *scaffolds* seriam capazes de otimizar esse reparo (Amghar-Maach et al., 2019).

2.4 MEMBRANAS CELULARES (*CELL SHEETS*) NA ENGENHARIA TECIDUAL

A engenharia tecidual para a reposição de tecidos perdidos envolve três fatores primordiais: células, fatores de modulação e arcabouço (*scaffold*), tendo ainda como fator determinante do sucesso *in vivo* o suprimento sanguíneo adequado para nutrir e oxigenar os novos tecidos (Bartold et al., 2016). Além das limitações biológicas das células, a utilização de *scaffolds* tem como empecilho a nutrição e oxigenação das células que proliferam em seu interior, bem como a resposta imunológica do hospedeiro a este corpo estranho (Yamato; Okano, 2004). Visando transpor a necessidade de utilização desse aparato, Okano et al. (1993) desenvolveram uma placa de cultivo especial (*UpCell dish*, *CellSeed Inc.*, Shinjuku- ku, Tóquio, Japão), que possibilita a formação de uma “membrana celular” organizada capaz de soltar-se da placa praticamente intacta, sendo possível o transporte e implantação dessas células sem a necessidade de um scaffold mediador (Okano et al., 1993; 1995; Yang et al., 2005; 2007; Wang et al., 2014). Nesse modelo isso ocorre devida à capacidade da *UpCell dish* em promover inversão na polaridade de sua superfície de adesão quando exposta à variação negativa de temperatura, transformando a placa hidrofóbica em hidrofílica, o que promove um desprendimento dessas células do fundo da placa sem a necessidade de uso de agentes de digestão enzimática, mantendo seus depósitos de MEC. A essa “membrana celular” chamaram de *Cell Sheet*. Uma segunda técnica já bem estabelecida para a obtenção das CSs em laboratório é a indução através da suplementação do meio de cultivo com ácido ascórbico (vitamina C, VC), em concentração ideal (Nakamura et al., 2010; Wei et al., 2012; Pedroni et al., 2018; Garrido et al., 2019). Já, nesse segundo caso, a formação da CS se faz em placas de cultivo comuns, onde a vitamina C aumenta o metabolismo celular e deposição de MEC ao ponto de formarem também uma “membrana celular”, capaz de se destacar espontaneamente do fundo da placa.

A engenharia tecidual mediada por CSs já tem sido aplicada em diversos tecidos / órgãos como córnea, miocárdio, fígado e tecidos periodontais (Nishida et al., 2004; Shimizu et al., 2006; Ohashi et al., 2007; Ding et al., 2010; Zhao et al., 2013). Também já foram desenvolvidas culturas em 3D, onde a sobreposição das monocamadas de CSs, do mesmo tipo celular ou não, possibilitou a formação de estruturas funcionais complexas, mimetizando, por exemplo, o tecido cardíaco (Haraguchi et al., 2012). Dentro da Odontologia regenerativa, a periodontia tem se destacado na aplicação das CSs (Flores et al., 2008a; Flores et al., 2008b), principalmente na tentativa de repor o tecido periodontal perdido ao redor de raízes dentárias (Fujita et al., 2009; Wei et al., 2012).

Sendo a MEC mediadora da transmissão de sinais químicos e mecânicos fundamentais na fisiologia celular (i.e. adesão, migração, proliferação, diferenciação, senescência e morte), além de prover suporte e sítios físicos para agregação das células (Freshney, 2005; 2006), o simples fato de os processos de obtenção das CSs serem capazes de manter a MEC praticamente intacta - já que não são realizados subcultivos que empregariam enzimas proteolíticas - poderiam representar uma vantagem aos métodos tradicionais de cultivo (Yang et al., 2005; Zhou et al., 2012).

2.5 ÁCIDO ASCÓRBICO NA REGENERAÇÃO TECIDUAL

O ácido ascórbico, ou Vitamina C (VC), é um nutriente hidrossolúvel comum e vital para a saúde humana, sendo essencial para a síntese e função de fatores do sistema imunológico, biossíntese de colágeno e outros constituintes da MEC, agindo também como cofator em diversas reações biológicas (Stone; Meister, 1962; Nandi et al., 2005). No corpo humano, a VC é encontrada predominantemente na forma de Ascorbato (mono-ânion) (Levine et al., 1999), capaz de reduzir radicais livres altamente reativos, gerando então o radical Ascorbil, sua forma ionizada, que é relativamente pouco reativa (Bielski et al., 1975), razão essa principal de seu efeito antioxidante.

Seu efeito benéfico sobre o metabolismo e longevidade celular tem sido amplamente aplicado, com diversas finalidades, em estudos *in vivo* e *in vitro*

(Halliwell, 2001), inclusive com células-tronco. Tendo em vista a complexidade dos processos e reações do ciclo celular influenciadas por VC, alguns autores sugerem que outras intervenções, além da supressão dos radicais livres, poderiam somar-se e justificar a eficiência dessa vitamina. Assim, já foram reconhecidas: 1) sua ação sobre o aumento da expressão de Nanog através da ativação da via de sinalização JAK / STAT (Wu et al., 2014); 2) repressão da expressão dos genes p53 (Shi et al., 2010) e TET1 (Chen et al., 2013), agindo no processo de senescência celular e auxiliando na reprogramação de células somáticas em IPS; 3) aumento da atividade da enzima telomerase em PDLSCs (Wei et al., 2012) e CSs de DPSC (Pedroni et al., 2018); onde 4) também induziu a formação de *Cell Sheets* através do aumento do metabolismo celular e, conseqüentemente, da produção e deposição de MEC (Wei et al., 2012; Pedroni et al., 2018; Garrido et al., 2019).

2.5.1 Ácido Ascórbico induzindo a formação de CSs (Cell Sheet)

Inicialmente o ácido ascórbico (vitamina C, VC) passou a ser utilizado nas concentrações entre 50 a 100 µg/ml, apenas como complementação na técnica original de obtenção das CSs pelo cultivo nas *UpCell dishes* - não sendo, nessas concentrações, tão eficaz em formar sozinho CSs verdadeiras, ou seja, que se soltassem passivamente da placa. O objetivo era aumentar a deposição de componentes da MEC, bem como induzir o início da diferenciação em tecidos osteóides ainda *in vitro* (Flores et al., 2008a; Flores et al., 2008b; Wang et al., 2014).

Aparentemente, o primeiro a sugerir a indução de formação de CSs apenas pela suplementação com VC e em placas de cultivo convencionais, foi Park et al. (2006). Neste estudo, os condrócitos suínos imaturos foram induzidos por meio suplementado com 50 µg/mL de VC com o objetivo de reconstruir a cartilagem suína. As células foram mantidas em cultura por 1 a 5 semanas quando foram aplicadas nas articulações de suínos. Ensaio bioquímicos mostraram que a deposição de glicosaminoglicanos foi gradual e contínua. Histologicamente a deposição de glicosaminoglicanos foi se tornando cada vez mais homogênea e intensa com o passar das semanas.

Um dos artigos pioneiros na utilização de *cell sheet* de células da cavidade oral utilizando o ácido ascórbico foi Flores et al. (2008a). Os autores isolaram células de ligamento periodontal humano e conseguiram desenvolver *cell sheets* por meio do uso da *UpCell dish* associado a um meio de diferenciação osteogênica contendo 50µg/ml de ácido ascórbico-2-fostato, 10 nM de dexametasona e 10 mM de β-glicerofosfato. O objetivo do estudo foi avaliar o comportamento de CSs induzidas por três semanas em cultura na regeneração do complexo ligamento/cimento da região periodontal. Após 1 a 6 semanas no dorso de camundongos associados a discos de dentina foi observada formação de dentina e ligamentos periodontais imaturos na região de membrana próxima ao dente.

Em Zhou et al., 2012, culturas de fibroblastos do ligamento periodontal (PDL) de cães foram enriquecidas com 100 µg/ml de VC para estimular a formação da *cell sheet*. As culturas foram mantidas por 8 semanas, sem subcultivos, até que a *cell sheet* se auto destacasse da placa. Dentes extraídos tiveram seus tecidos moles removidos e os canais tratados, e então suas raízes foram envolvidas pela membrana de PDL e reimplantadas em seus alvéolos. O tecido regenerado apresentou grande quantidade de colágeno tipo III, tipo I e fibronectina.

Wei et al. (2012) estudaram a qualidade de CSs de CTs do ligamento periodontal de suínos (pPDLSC) induzidas apenas por ação da VC. Para isto, foram comparadas CSs produzidas em placa termo ajustável (*UpCell dish*) (grupo controle) e aquela induzida pela VC isolada, em diferentes dosagens. Foram plaqueadas 1×10^5 células em placas de 60 mm para todos os grupos, após a confluência o meio clonogênico era repostado e suplementado com dosagens variadas de VC (0 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml ou 50 µg/ml). Após 10 a 13 dias as CSs descolaram das placas e foram aplicadas em lesões periodontais induzidas em dentes de mini pigs. Após 12 semanas *in loco* os animais foram submetidos à eutanásia e as amostras processadas para análise histológica, microscopia eletrônica de transmissão (MET) e RT-PCR. Nas dosagens até 10 µg/ml não houve a formação de CSs. As concentrações 20 e 50 µg/ml formaram CSs, no entanto não houve diferença histológica. O sucesso da formação de CSs foi de 80 % na técnica *UpCell dish* enquanto que no grupo induzido por VC foi de 100 %. Por MET foi observada formação de junções tight entre as células e a manutenção da matriz extracelular endógena nos grupos tratados com VC. Além disso, no grupo tratado com 20 µg/ml de VC houve melhor taxa de proliferação, atividade de telomerase e maiores níveis

de RNAm de proteínas de matriz extracelular (colágeno tipo I, $\beta 1$ integrina e fibronectina), de marcadores de indiferenciação (Oct4, Sox2 e Nanog) e de marcadores osteogênicos (RUNX2, ALP e OCN). No modelo animal a porcentagem de cemento / ligamento / osso alveolar-símile foi significativamente maior no grupo VC que no grupo *UpCell dish*. Complementando este estudo, a dosagem 20 $\mu\text{g/ml}$ de vitamina C também foi capaz de induzir a formação de CSs de células-tronco mesenquimais de outras fontes (medula óssea e cordão umbilical humano) sugerindo seu potencial em estudos de regeneração tecidual.

Cao et al. (2015) foi um dos primeiros a analisar o comportamento de CSs de DPSCs para reparo ósseo em modelo *in vivo* (periodonto de dentes suínos). Em seu estudo, as DPSCs foram transfectadas com o gene HGF (do inglês, *hepatocyte growth factor*) que é um fator de crescimento angiogênico frequentemente utilizado para a regeneração periodontal. Sabe-se que este fator é um potente mitógeno, com atividade antiapoptótica e morfogênica podendo aprimorar o processo de regeneração de diversos órgãos (Matsumoto; Nakamura, 1997). O comportamento de CSs foi comparado com a injeção das mesmas células (cultivadas pelo método tradicional, ou seja, sem indução de CSs), transfectadas ou não pelo fator, em lesões periodontais induzidas. Para a produção das CSs foram cultivadas 1×10^5 HGF- DPSCs ou DPSCs em placas de petri de 60 mm contendo meio de cultivo α -MEM suplementado com 20 $\mu\text{g/ml}$ de VC por 10 a 15 dias. Após 12 semanas os animais foram submetidos à eutanásia. Histologicamente foi observado que, tanto nos grupos de células injetadas quanto de CSs (transfectados ou não), houve produção de novo osso alveolar. No grupo controle onde não foi realizado nenhum tratamento os defeitos foram preenchidos de forma irregular com tecido fibroso e epitélio. A análise por tomografia computadorizada mostrou que maior volume de osso produzido nos grupos de CSs (transfectados ou não) que nos grupos de células injetadas. Quanto à produção de tecidos moles, os grupos CSs foram capazes de repor tecidos próximo da normalidade, sendo em maior grau que nos grupos onde as células foram injetadas. Não houve diferença entre as CSs com células-transfectadas ou não na produção de tecidos moles. Os autores sugerem o uso de CSs (HGF-DPSCs ou DPSCs) para técnicas de regeneração periodontal.

2.6 FOTOBIMODULAÇÃO (PBMT)

A Fotobiomodulação (PBMT, do inglês *photobiomodulation therapy*) é a aplicação de luz laser em baixa intensidade (comprimentos de onda entre 600 - 1100 nm, ou seja, vermelho ao infravermelho próximo), variando na potência e densidade de energia (geralmente entre 1 mW a 500 mW e 1 a 20 J/cm², respectivamente) de acordo com o tipo de tecido / célula e objetivos do tratamento (Karu; Afanas'eva, 1995; Huang et al., 2011; Alghamdi et al., 2012). Sendo esses principalmente a modulação de processos inflamatório e cicatricial, alívio de dor e promoção de regeneração tecidual. A luz absorvida é capaz de causar alterações químicas, assim como ocorre no processo de fotossíntese nas plantas (Huang et al., 2011), não possuindo efeito térmico perceptível (Huang et al., 2009).

O primeiro a descrever seus efeitos foi Endre Mester (1967, publicado em 1968) (Mester et al., 1968), quando observou que os pêlos de camundongos irradiados cresceram mais rápido do que os de controles não irradiados. Já a pioneira em teorias para explicar os fenômenos da fotomodulação foi Tina Karu, em sua teoria da fotodissociação, onde sugere que fotoceptores intracelulares estariam envolvidos na absorção da luz (Karu, 1989). Resumidamente, a luz ativaria fotoceptores mitocondriais desligando componentes reguladores da cadeia respiratória e reestabelecendo o fluxo de elétrons com produção de ATP (do inglês, *adenosinetriphosphate*) (Huang et al., 2009, 2011; Alghamdi et al., 2012). Moléculas sinalizadoras produzidas nesse processo poderiam ainda desencadear eventos moleculares e celulares bioestimulatórios.

Assim, uma reação fotobiológica envolve a absorção de luz em um comprimento de onda específico por uma molécula fotorreceptora (fotoceptora; cromóforo) nativa, que pode eventualmente assumir um estado eletronicamente excitado em decorrência da absorção de luz (Karu, 1999). Esse é o caso da citocromo c oxidase (cit c), uma enzima situada na membrana interna mitocondrial, descrita por diversos autores como sendo sensível à irradiação na região do vermelho ou do infravermelho próximo (Karu, 1989; Karu et al., 1995b; Karu, 1999; Gao; Xing, 2009; Huang et al., 2011).

2.6.1 Mecanismos de ação da PBMT

Os mecanismos de ação da PBMT ainda não foram totalmente esclarecidos, no entanto existe um consenso entre autores de que os cromóforos celulares seriam os responsáveis pela captação da luz visível em células de mamíferos. Dentre os cromóforos sensíveis aos comprimentos de onda da luz vermelha (aproximadamente 660 nm), o mais estudado na literatura atual é a enzima Citocromo C Oxidase (cit-c) (Karu; Afanas'eva, 1995), componente da cadeia respiratória que se encontra na membrana interna mitocondrial (Figura 2.2). Assim, essa organela tem sido considerada como local provável do início do processo de fotobiomodulação, onde desencadeia uma cascata de eventos biológicos (Hamblin; Demidova, 2006; Hamblin, 2008).

Figura 2.2 – Ilustração de uma mitocôndria detalhando a membrana mitocondrial interna, local da absorção dos fótons de laser no comprimento de luz vermelha (A). Na maior ampliação (B), vemos a representação ilustrativa da estrutura da cadeia transportadora de elétrons na membrana mitocondrial interna em uma célula com metabolismo normal. Nessa condição, a citocromo c (cit c) - enzima terminal (complexo IV) da cadeia respiratória – é responsável por mediar a transferência de elétrons ao oxigênio molecular, gerando como produto uma molécula de água (H_2O) e bombeando 2 H^+ para o espaço intermembranoso. Isso gera uma concentração de prótons nessa região, levando a um gradiente osmótico que induz a passagem desses prótons pela molécula ATP sintase. Esse processo é conhecido como “força próton-motora”, e é capaz de promover uma alteração conformacional na molécula de ATP sintase, que sofre rotação, produzindo energia suficiente para converter o ADP em ATP

Estrutura da cadeia de transporte de elétrons na membrana interna mitocondrial

A redução das atividades metabólicas celulares em situações adversas é um mecanismo protetor de sobrevivência celular, e em consequência, há diminuição dos ciclos respiratórios (Tata; Waynant, 2011). Isso se dá pela ligação de NO (óxido nítrico), ao invés de oxigênio, em sítios dentro do complexo IV reduzindo-se assim a taxa de conversão de ADP (do inglês, *adenosine diphosphate*) em ATP pela ATP sintase (fosforilação oxidativa). O óxido nítrico, por sua vez, é uma molécula reguladora do fluxo de elétrons na cadeia mitocondrial. Variações no fluxo de elétrons na cadeia respiratória, portanto, ditarão a produção de maior ou menor quantidade de ATP. Por outro lado, o desligamento de NO dos sítios do complexo IV implica em reestabelecimento do ciclo de elétrons normal na cadeia respiratória.

Existem evidências de que fótons de luz possam desfazer a ligação do NO nos sítios do cit c (Huang et al., 2011). Dessa forma, a PBMT tem a habilidade de reverter a inibição da respiração celular induzida pelo NO e, como já mencionado, aumentar a atividade de bombeamento de prótons de hidrogênio pela cit c. O aumento de ciclos respiratórios com a remoção do NO gera energia, mas também maior disponibilidade de elétrons para captura pelo oxigênio molecular, levando à produção de ROS. Isso explicaria porque os efeitos da laserfototerapia são vistos principalmente em células/tecidos que se encontram em algum desequilíbrio, ou seja, mais propensos aos processos de Redução / Oxidação (REDOX) - como privações nutricionais, inflamações, cultivos *in vitro*, estresse oxidativo, entre outros - enquanto essa parece não influenciar significativamente o metabolismo de células e tecidos que se encontram em normalidade (Hamblin, 2008).

Em síntese, o processo subsequente à absorção do fóton de luz pelo cit-c, que reestabelece a respiração mitocondrial, induz ao aumento da produção de ATP e consequentemente do metabolismo celular. Em concomitância, alterações na cadeia iônica promovem a modulação de espécies reativas de oxigênio (ROS) capazes de sinalizar fatores de transcrição gênica que levariam às respostas secundárias (efeitos tardios) nas células e tecidos circundantes. Entre as espécies reativas de oxigênio mais relatadas após PBMT estão o superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($OH^\cdot$), oxigênio singleto (1O_2) e óxido nítrico (NO), sempre em baixas concentrações (Chaudhari et al., 2012). Assim temos que, se por um lado grandes quantidades de ROS podem ser danosas aos tecidos, levando à senescência celular, apoptose e carcinogênese (Balaban et al., 2005), por outro

encontramos que baixos níveis de ROS – como os decorrentes das PBMT – podem atuar como sinalizadores celulares, tendo papel inclusive na manutenção da indiferenciação e na diferenciação de células-tronco, bem como na auto-renovação de, por exemplo, MSC (do inglês *mesenchymal stem cells*) de origem dentária (Marques et al., 2016).

Dentre os principais efeitos tardios descritos para o fenômeno de fotobiomodulação estão o aumento da proliferação e migração celular e a modulação dos níveis de citocinas, fatores de crescimento e mediadores inflamatórios, além do aumento da oxigenação dos tecidos (Kato et al., 1981; Karu 1989; Karu, 1995a; Karu e Afanas'eva, 1995; Karu, 1999; Karu; Kolyakok 2005; Karu et al., 2005; Hamblin e Demidova, 2006; Hamblin, 2008; Karu, 2008; Huang et al., 2011). Assim, respostas secundárias seriam as responsáveis pela ação da PBMT, não apenas imediatamente, mas também cerca de 24 a 72 horas após a irradiação (Hamblin; Demidova, 2006).

2.6.2 PBMT em células e tecidos

Assim como os fatores de crescimento, a PBMT também tem mostrado ser capaz de induzir a proliferação e migração celular, além de influenciar na potencialidade e auto-renovação de CTs (Eduardo et al., 2008; Damante et al., 2009; Giannelli et al., 2013; Diniz et al., 2018; Ferreira et al., 2019). Nosso grupo de pesquisa vem há anos estudando os efeitos da fotobiomodulação sobre células e tecidos (Pereira et al., 2002; Fujihara et al., 2006; Eduardo et al., 2008; Damante et al., 2009; Moreira et al., 2011; Diniz et al., 2018; Ferreira et al., 2019). Estes estudos mostraram a capacidade da PBMT em influenciar o metabolismo e fisiologia celular de acordo com o microambiente em que se encontram e com os parâmetros de irradiação empregados. Neste sentido, os estudos mais recentes apontaram para a possibilidade desta terapia poder ser aplicada na engenharia tecidual com o objetivo de melhorar as respostas de células-tronco favorecendo a regeneração.

Em consequência da PBMT são observados aumento na síntese de DNA e RNA, por exemplo, com produção de proteínas constituintes da matriz extracelular (fibronectina e colágeno), aumento na proliferação e migração celular, propriedades imunomodulatórias melhoradas, angiogênese, entre outros (Tadakuma, 1993; Garavello et al., 2004; Eduardo et al., 2008; Damante et al., 2009; Moreira et al.,

2011). Ou seja, respostas biológicas bastante semelhantes às induzidas pela vitamina C, citadas anteriormente.

2.6.3 PBMT pode influenciar a potencialidade de células-tronco

A PBMT pode manter a indiferenciação ou induzir a diferenciação de células-tronco a depender do microambiente e dosimetria (Giannelli et al., 2013; Arany et al., 2014; Diniz et al., 2018; Ferreira et al., 2019). Sendo a combinação de fatores de crescimento e parâmetros ideais de irradiação os principais fatores estudados na atualidade, que guiarão para o objetivo esperado (Arany et al., 2014; Diniz et al., 2018; Ferreira et al., 2019).

A falar especificamente da PBMT, além da forma de aplicação (ex: contínua / pulsada; em contato / sem contato; frequência do tratamento), alterações na resposta à irradiação também podem ser conseguidas através da modificação do comprimento de onda (vermelho / infravermelho), densidade de energia (DE) e densidade de potência (DP) às quais as células serão expostas. Nosso grupo de pesquisa encontrou que as densidades de energia de 3 J/cm² e 5 J/cm², aplicadas em hDPSCs em condições de déficit nutricional, foram capazes de promover proliferação significativa destas células, sendo 5 J/cm² também capaz de induzir diferenciação, quando associada a fatores de crescimento, sejam endógenos ou exógenos (Eduardo et al., 2008; Diniz et al., 2018; Ferreira et al., 2019). Diniz et al. (2018) e Arany et al. (2014), demonstraram que a PBMT seria capaz de induzir, nas CTs da polpa, o aumento da expressão de marcadores de diferenciação para tecidos mineralizados, quando associadas a fatores de crescimento BMP2 (incorporado) e TGF- β (endógeno), *in vitro* e *in vivo*, respectivamente. Em contrapartida, na ausência de fatores de crescimento, a PBMT com 5 J/cm² passou a expressar marcadores celulares de indiferenciação, Nestin e CD90 (Ferreira et al., 2019), sugerindo que a presença de fatores de crescimento poderia ser um direcionador da ação da PBMT, induzindo diferenciação ou, na ausência, mantendo a multipotência de CTs mesenquimais. Assim, em Giannelli et al. (2013), a PBMT mostrou ser capaz de estimular a proliferação de MSCs via Notch-1 - um fator importante na regulação da auto-renovação, ou seja, na capacidade de gerar célula-filha multipotente como a célula-mãe - onde observaram altos níveis desse e de seu receptor no citoplasma e núcleo 72 horas após a irradiação das células.

Muitos são também os estudos relacionados à diferenciação de células-tronco induzidas por PBMT (Abramovitch-Gottlib et al., 2005; Matsui et al., 2007; Hou et al., 2008; Matsui et al., 2008; Wu et al., 2013; Arany et al., 2014; Diniz et al., 2018). Entre essas pesquisas, Arany et al. (2014) destaca-se em importância já que comprovou a possível aplicação clínica do laser induzindo regeneração dentária *in vivo*. Reportaram também os efeitos da PBMT e seu mecanismo de ação na ativação de TGF- β latente para promoção de diferenciação de DPSCs e formação de dentina terciária *in vivo*. Para tal utilizaram um modelo acelular com soluções de soro para testar o microambiente pós-cicatrização hemostática de feridas, o qual poderia estar presente durante o tratamento com a PBMT, e que conteria quantidades abundantes de TGF- β latente derivado de soro ou plaquetas. Observaram que a terapia induz alterações conformacionais em constituintes complexos do soro, e que um desses constituintes seria o TGF- β 1. Em seguida, utilizando células normais ou mutadas no resíduo metionina (posição 253) da molécula do TGF- β 1, o qual é conhecidamente sensível à sensibilização por espécies reativas de oxigênio (ROS), os autores confirmaram que a presença de superóxido, peróxido de hidrogênio ou radicais hidroxila é necessária para que haja ativação do TGF- β por meio da PBMT. A PBMT ainda promoveu a diminuição na expressão de marcadores de células-tronco, como STRO1, CD90, CD117 e CD44, sugerindo que a transição celular induzida pelo laser, nessa situação de microambiente com presença de fator de crescimento, seria voltada para diferenciação, ou seja, longe do estado multipotente inicial. Ao mesmo tempo, encontraram maior expressão de marcadores odontoblásticos, como DMP1, DSP e OPN do que os controles não-irradiados. *In vivo*, utilizando modelo de camundongo *knockout* condicional para TGF- β , a PBMT induziu quantidades de dentina terciária similares ao grupo controle. Células da polpa dental não-irradiadas derivadas desse modelo foram capazes de produzir tecido mineralizado quando induzidas por BMP4, mas não foram responsivas à estimulação por TGF- β 1. Dessa forma, os autores constataram o papel do eixo ROS-TGF- β 1 em mediar os efeitos regenerativos da PBMT na indução de dentina terciária.

Diante do exposto, ainda há muito que se estudar para o entendimento dos efeitos biológicos da PBMT, na regeneração tecidual – especialmente no que tange as vias de sinalização envolvidas no processo.

3 PROPOSIÇÃO

Geral:

Avaliar o efeito da aplicação da *Cell sheet* (CS) de células-tronco da polpa dentária humana indiferenciada, associada ou não à terapia de fotobiomodulação (PBMT), no reparo de lesões ósseas críticas em calvária de ratos diabéticos.

Específicas:

- 1- Analisar o processo de fechamento das lesões em estudo por microtomografia computadorizada (MicroCT);
- 2- Analisar em cortes histológicos as características histomorfológicas e histoquímicas do tecido formado no interior das lesões durante o reparo ósseo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Esse projeto foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP), bem como ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. Os experimentos foram iniciados apenas após as devidas aprovações (CAAE: 68562817.2.0000.0075, Anexo A; CEUA:002/2017, Anexo B)

O Cálculo Amostral e Poder do Teste foram aplicados para delimitar o número de animais necessários. E os detalhes estatísticos estão descritos na sessão 4.5.1 Modelo experimental *in vivo* - Delimitação da amostra. Os animais utilizados nesse estudo foram aclimatados e mantidos no biotério do Laboratório de Biologia Oral do Departamento de Biomateriais e Biologia Oral da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

A metodologia do trabalho foi realizada em duas partes consecutivas, a saber: (1) estudo *in vitro*: obtenção e caracterização das CSs; (2) estudo *in vivo*.

Parte 1: Estudo *in vitro*

Todos os experimentos *in vitro* apresentados nessa tese já foram publicados no periódico *Clinical Oral Investigations*, Qualis Capes A1 (Pedroni et al., 2019). Para reprodução das imagens e resultados foi solicitada a autorização da revista (Copyright).

4.1 ISOLAMENTO E CULTIVO CELULAR

Para este projeto, foram isoladas células da polpa dentária de terceiros molares extraídos por razões ortodônticas de doadores entre 18 e 45 anos ($n = 7$), não fumantes e que relatavam boa saúde geral (Figura 4.1). Todos os doadores eram

pacientes da clínica de Atualização em cirurgia oral menor da ffo-Fundecto (Fundação para Desenvolvimento científico e tecnológico da Odontologia).

Para o isolamento, foram seguidas as recomendações de Gronthos et al. (2000). O *pool* das células isoladas desses pacientes foi expandido e criopreservado em baixas passagens, no Banco de Células da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, mais especificamente no Laboratório de Pesquisas Básicas do Departamento de Dentística. Após o estabelecimento da linhagem celular, a mesma foi caracterizada imunofenotipicamente e então nomeada hDPSC4.

As células foram cultivadas em meio de cultura clonogênico (Mclono) composto por: α -MEM (GIBCO/*Life Technologies*, Grand Island, NY, EUA) suplementado com 15% de soro fetal bovino (MSC-FBS, Gibco), 100 U/ml de solução de antibióticos (penicilina + estreptomicina; Pen Strep, Gibco), 2 mM de L-glutamina (Gibco) e 0,1 mM de solução de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, EUA). As mesmas foram mantidas incubadas a 37°C numa atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% de dióxido de carbono (CO₂) e expandidas até, no máximo, 4 passagens (P4).

O monitoramento do crescimento celular foi realizado diariamente em microscópio invertido de fase e o meio de cultivo trocado a cada 2 ou 3 dias, de acordo com o metabolismo celular. Os subcultivos foram feitos quando as células atingiam a subconfluência (aproximadamente 70-80 % do fundo da placa ocupado por células). As células foram destacadas com enzima proteolítica (e.g solução de tripsina a 0,25%; LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil), transferidas para um tubo de ensaio e centrifugadas. Após esse processo as mesmas foram ressuspensas e plaqueadas em novos frascos, criando novas passagens da cultura. Com o intuito de manter a menor passagem possível, foram realizados estoques congelados em nitrogênio líquido de alíquotas de células de primeira à terceira passagens (P1 a P3).

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

Figura 4,1 – Fotografias do procedimento de obtenção da linhagem de células tronco (A-E). Terceiros molares extraídos (n = 7) de pacientes entre 18 e 45 anos foram coletados imediatamente após a cirurgia. Sob um fluxo laminar, cada dente foi limpo e com uma ponta diamantada em alta rotação e sob irrigação, um sulco foi feito ao longo da junção cemento-esmalte (sem atingir a câmara pulpar) (A). Com o auxílio de fórceps, cada dente foi fraturado nessa região para separar a coroa da raiz (B). O tecido pulpar da porção coronariana foi coletado e, em seguida, cortado com auxílio de lâmina de bisturi estéril, até atingir pequenos fragmentos (<0,5mm) (C e D). Esses fragmentos (explantes) foram distribuídos em placas de Petri de 35 mm (E). Em seguida, o meio de cultura clonogênico foi colocado nas placas e essas acomodadas em incubadora de CO₂ a 37°C. Fotomicrografia da cultura primária de polpa dentária (F) (aumento original: 100x)

Fonte: O autor

4.1.1 Indução da *Cell Sheet*

Para obtenção das CSs foi seguido o protocolo de Wei et al. (2012) e Pedroni et al. (2018). Desta forma, as hDPSC4 foram plaqueadas em placas de 35 mm (1 x 10⁵ células por placa) na passagem 3 (P3). As células foram cultivadas em meio clonogênico suplementado com vitamina c (20 µg / ml) (Mclono-VC) e incubadas à 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. As culturas confluentes foram mantidas sem subcultivos e seu meio foi trocado a cada 2 dias, até que a quantidade de matriz extracelular (MEC) formada fosse tamanha que a membrana tomasse

forma e suas extremidades começassem a soltar nas bordas do poço. Neste ponto, as multicamadas celulares se separavam espontaneamente do fundo da placa formando as CSs (Figura 4.2). Esse processo levou cerca de 10 dias.

Figura 4.2 – Fotografia das CSs suspensas em solução tampão

Fonte: O autor

4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS

Com o objetivo de verificar se o fenótipo celular de MSCs (*Mesenchymal stem cells*) seria mantido após a indução de formação das CSs, as hDPSC4 foram caracterizadas e recaracterizadas, antes e após a indução para formar as CSs, de acordo com os grupos abaixo:

Grupos experimentais *in vitro*:

G1 **hDPSC4**: linhagem celular originada do *pool* de células isoladas de todos os pacientes e cultivadas em meio de cultura clonogênico (Mclono)

G2 **hDPSC4-CS**: células isoladas das CSs - após a formação das *Cell Sheets*, as mesmas foram submetidas à dissociação enzimática com solução de tripsina a 0,25% (LGC Biotecnologia, Cotia, São Paulo, Brasil) durante 10 minutos

4.2.1 Caracterização imunofenotípica por citometria de fluxo

A natureza das células dos grupos **G1** e **G2** foi avaliada pela análise do perfil imunológico das moléculas de superfície usando citometria de fluxo. Para a citometria de fluxo, alíquotas de hDPSC4 (1×10^5 células) em P3 e hDPSC4-CS (1×10^5 células) foram lavadas e ressuspensas em solução tampão fosfato-salina (PBS, do inglês *phosphate buffered saline*) contendo concentrações saturantes de anticorpos monoclonais primários conjugados (1: 200) que são específicos para marcadores de células-tronco mesenquimais (MSC) (CD44, CD105, CD146, Oct 3 / 4 e STRO1) e não associados (CD34, CD14 e CD45) (BD Biosciences, CA, EUA). As células foram analisadas em leitura no citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson, CA, EUA) no Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP. Foram adquiridos no mínimo 50.000 eventos dentro do *gate* e os dados analisados pelo programa 9.6.2 FlowJo Software Version (*Tree Star*, OR, EUA).

4.2.2 Contagem de Unidades Formadoras de Colônias – Fibroblásticas (CFU-F do inglês *colony formation units-fibroblastic*)

As hDPSC4 foram plaqueadas (200 células/poço de 35 mm) ($n = 12$) e cultivadas em meio clonogênico (Mclono) por 9 dias. Os meios foram trocados a cada 2 dias. Após esse período as células foram lavadas com tampão PBS, fixadas em solução de PFA (paraformaldeído) a 4% e coradas com solução de azul de toluidina 1% em solução de PFA 4%. As CFU-Fs foram registradas em fotografias e seu número determinado no programa Image-J (NIH, *National Institutes of Health*, MD, EUA) onde consideramos como colônia (1 unidade) grupos maiores de 50 células. O experimento foi realizado em duplicata. O cálculo de Eficiência de Plaqueamento (EP) foi aplicado como indicador da viabilidade celular seguindo a fórmula abaixo:

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

4.2.3 Tempo de Dobra Populacional (DP)

A DP foi determinada através da análise da curva de crescimento, obtida por contagem do número de células na câmara de Neubauer. As hDPSC4 foram plaqueadas em poços de 35 mm (5×10^4 células por poço) ($n = 3$) e cultivadas em Mclono por 9 dias. As contagens foram realizadas nos tempos de 24, 48, 72, 96, 168 e 216 hora após o plaqueamento. O experimento foi realizado em triplicata. Para o cálculo do tempo de dobra populacional foi aplicada a seguinte fórmula: logaritmo natural (Ln) de (número de células em 216 horas menos o número de células em 24 horas) dividido pelo Ln de 2, seguindo a fórmula abaixo:

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

4.3 LONGEVIDADE DAS CELL SHEETS

Para a análise da longevidade das células nas CSs, foi utilizado o ensaio de viabilidade celular *Live/Dead®*. O kit *Live/Dead®* (Molecular Probes, *Life Technologies*, NY, EUA) foi aplicado nas células imediatamente após a soltura das CSs, 24, 48, 72 e 96 horas após ($n = 6$ CSs por grupo).

Resumidamente, após a lavagem das CSs com PBS, 10 µL de etidium-homodimer-1 (2 µM) e 5 µl de calceína (2 µM) foram adicionados em 10 ml de meio de cultura sem soro fetal bovino durante 45 min e incubados a 37°C. Utilizou-se então um microscópio de fluorescência (Microscópio Invertido Ti S Nikon, Melville, NY, USA) para observar as células. Cinco imagens (aumento de 400 x), de pontos equidistantes previamente determinados, foram examinadas por grupo e a

viabilidade celular foi calculada usando o programa Image-J (Versão 1.64, NIH, MD, EUA). Células viáveis exibem fluorescência verde, enquanto as células mortas emitem fluorescência vermelha. A quantidade de fluorescência verde e vermelha foi medida por área. A medida do tempo zero (imediatamente após as CSs serem soltas) foi considerada como 100% de viabilidade.

4.4 DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA

Previamente ao estudo *in vivo*, as células da linhagem hDPSC4 (**G1**) e as células dissociadas da CSs (hDPSC4-CS, **G2**), foram testadas quanto à capacidade funcional de diferenciação osteogênica. A diferenciação osteogênica das células dos grupos **G1** e **G2** foram analisadas medindo a formação de matriz mineralizada pelo ensaio de Vermelho de Alizarina. As células foram cultivadas em meio de cultura clonogênico (Mclono; controle negativo) ou em meio mineralizante (MM; controle positivo). O meio mineralizante foi composto por α -MEM (Gibco), suplementado com 15% de soro fetal bovino para MSC (MSC-FBS; Gibco), 100 μ g / ml de estreptomicina (Invitrogen / Gibco), 100 U / ml de penicilina (Invitrogen / Gibco), ácido ascórbico 0,1 mM (Sigma-Aldrich), L-glutamina 2 mM (Gibco), β -glicerofosfato 10 mM (Sigma Aldrich) e dexametasona 0,1 mM (Sigma). As células foram plaqueadas (5×10^3 células por poço) em placas de 24 poços (mínimo de 6 por grupo).

Vinte e quatro horas após o plaqueamento, o meio de cultivo foi substituído pelos meios experimentais (Mclono para controle negativo e MM para controle positivo). Após 21 dias, todas as culturas foram submetidas ao ensaio de Vermelho de Alizarina para detectar nódulos de mineralização. Os nódulos foram dissolvidos numa solução de amoníaco a 10% e a absorbância foi medida em espectrofotômetro (Synergy HT, Biotek, EUA) no comprimento de onda 550 nm.

Parte 2: Estudo *in vivo*

4.5 MODELO EXPERIMENTAL *IN VIVO*

4.5.1 Grupos experimentais:

- I) **G.Controle:** lesão óssea sem tratamento adicional
- II) **G.PBMT:** Lesão óssea seguida de PBMT
- III) **G.MCol:** Colocação da membrana comercial de colágeno suíno sobre o leito cirúrgico
- IV) **G.MCol+PBMT:** Colocação da membrana comercial de colágeno suíno sobre o leito cirúrgico, seguida da aplicação da PBMT
- V) **G.CS:** Colocação da *Cell Sheet* sobre o leito cirúrgico
- VI) **G.CS+PBMT:** Colocação da *Cell Sheet* sobre o leito cirúrgico seguida da PBMT

4.5.2 Delimitação da amostra

Dados prévios, obtidos em experimentos similares do grupo de pesquisa, foram utilizados na aplicação do teste estatístico para o Cálculo Amostral e Poder do Teste. Foram utilizadas médias e desvio padrão submetidas ao Teste-t no programa G*Power 3.0.10, chegando a um $n = 6$ animais/lesões por grupo experimental (Figura 4.3).

Figura 4.3 – Ilustração da curva de Gauss obtida com a aplicação do teste para o Cálculo amostral (Software G*Power 3.0.10)

Fonte: O autor

Os animais foram randomizados em Excel e divididos em 6 grupos teste e 2 tempos experimentais de eutanásia (30 e 60 dias). Dessa forma, inicialmente, foi prevista a necessidade de 72 animais. No entanto, seguindo as recomendações dos 3Rs (do inglês *reduction, replacement, and refinement*), e após teste piloto, o modelo de cabeça dividida foi escolhido, de forma a reduzir a quantidade de animais necessários para alcançar o “n” mínimo. Todavia, foi preciso levar em consideração os possíveis efeitos sistêmicos e por proximidade dos grupos que receberam PBMT (PBMT, MCol+PBMT; CS+PBMT). O esquema abaixo ilustra a distribuição das “duplas” de lesões (Figura 4.4).

Figura 4.4 – Distribuição dos tratamentos no modelo experimental de calota dividida, visando redução do número de animais. Nos grupos que receberam PBMT (PBMT, MCol+PBMT e CS+PBMT) os tratamentos foram sempre executados do lado direito da calota, o lado esquerdo foi excluído das análises desse estudo para evitar possível efeito sistêmico

Fonte: O autor

Dessa forma, foram utilizados 54 ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), apresentando 45 dias, e provenientes do Biotério de Produção de Ratos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo ICB/USP.

4.5.2 Indução ao Diabetes

Os animais foram submetidos a jejum de 14 a 16 horas anteriormente à indução ao diabetes. Essa foi realizada por meio de administração única (via intraperitoneal), de 60 mg/Kg de Estreptozotocina (*Streptozotocin* - STZ - Sigma Chemical Co. St Louis, MO, EUA), dissolvida em 0,1 ml de solução tampão citrato de sódio (pH 4,5). Todos os animais tiveram sua dose calculada com base no peso individual medido previamente à administração da STZ. Setenta e duas horas após a administração da droga STZ, as taxas de glicemia foram aferidas por meio de um glicosímetro capilar Accucheck (Roche®) através do sangue coletado de ferida realizada na extremidade distal da cauda dos animais por meio de secção por bisturi (Glicemia de

Confirmação). A mesma mensuração foi repetida durante o transoperatório de todos os animais. Foram considerados diabéticos os animais que apresentaram glicemia acima de 200mg/dL nas duas medições pré e transoperatória.

Durante o período da pesquisa os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno ventiladas, forradas com maravalha de madeira, com ciclo dia/noite de 12/12 horas sendo alimentados com ração para roedores e água *ad libitum*.

Os animais foram pesados para calcular a dose adequada em relação à sedação, anestesia, analgesia e antibioticoterapia. Os experimentos foram conduzidos seguindo as recomendações éticas do *Guide for Care and Use of Laboratory for animals* (National Research Council, 1996).

4.5.3 Defeito crítico na calvária de ratos

Nesse estudo, os procedimentos cirúrgicos seguiram as recomendações de Moreira et al. (2011) e Sendyk (2014).

Em todos os animais a mesma sequência operatória foi seguida: Após a pesagem, os animais foram submetidos à anestesia geral, por via intramuscular (pata traseira), com cloridrato de Ketamina (50mg/kg, Ketalar, Cristália®), associado ao relaxante muscular Diazepan (5mg/kg, i.p; Valium, Cristália®), além da profilaxia antibiótica, também por via intramuscular, com benzilpenicilina benzatina (Roche®) na dose de 150.000 UI/kg.

Em seguida, a tricotomia foi realizada com auxílio de lâmina de bisturi 22 e a antisepsia do campo cirúrgico com digluconato de clorexidina a 2% (Figura 4.5A).

Figura 4.5 – Fotografias representativas do procedimento cirúrgico

Fonte: O autor

Foi realizado um retalho na pele do animal sobre a região central do crânio (Figura 4.5B). A pele, o tecido subcutâneo, o músculo temporal e o periósteo foram divulsionados até a completa exposição dos ossos parietais. Nesse momento a glicemia transoperatória era aferida com auxílio de glicosímetro (Figura 4.5C). Em seguida, os defeitos ósseos foram realizados, um em cada osso parietal, com uma broca trefina de aço de 5 mm de diâmetro, adaptada a uma peça reta em motor cirúrgico de baixa rotação (Driller®) e irrigação constante com soro fisiológico a 0,9 %. (Figura 4.5D e E). O fragmento ósseo foi retirado com auxílio de descoladores ósseos e pinça cirúrgica, tomando cuidado de remover espículas óssea remanescentes (Figura 4.5E e F). Um animal teve a duramáter lesionada e foi excluído do estudo. Três animais tiveram uma de suas lesões não satisfatórias (e.g. excesso de espículas ósseas visíveis) e essas lesões foram excluídas das análises.

Após a execução dos defeitos ósseos, cada animal recebeu 1 dos 6 tratamentos. A ordem de execução dos tratamentos foi randomizada previamente ao momento cirúrgico, utilizando o programa Excel. Os Grupos MCol e MCol+PBMT receberam a membrana comercial de colágeno suíno (BioGide™, Geistlich, Suíça -

ref. 30802.6/500111, LOT 81700696 e ref. 30803.4/500112, LOT 81700888), cortada com tesoura estéril no tamanho da lesão.

Após os tratamentos foi efetuada a síntese da pele com fio de sutura de seda 3-0 (Ethicon®) (Figura 4.5G). Os animais foram mantidos em gaiolas individuais durante todo o período experimental. Seis animais de cada grupo foram eutanasiados em 30 e 60 dias, para as análises de MicroCT, histologia e histoquímica.

4.5.4 Terapia de Fotobiomodulação (PBMT)

Para a PBMT foi utilizado um equipamento laser de diodo de arseneto de gálio-alumínio (AsGaAl) (Photon Lase III, DMC Equipamento LTDA, São Carlos, SP, Brasil), em baixa intensidade, modo de operação contínuo, pontual e em contato. Os parâmetros de irradiação se basearam em estudos prévios do nosso grupo de pesquisa que apresentaram resultados positivos em estudos *in vivo* (Moreira et al., 2009; 2011) (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 – Parâmetros da PBMT

Grupos experimentais	Comprimento de onda (nm)	Potência (mW)	Área do feixe (cm ²)	Densidade de Potência (W/cm ²)	Tempo (s)	Densidade de energia (J/cm ²)	Energia por ponto (J)
G.PBMT G.MCol+PBMT G.CS	808	40	0,028	1,4	3	4	0,12

Fonte: O autor

Foram realizadas 3 irradiações com intervalos de 48 horas, iniciando-se no transoperatório, 48 e 96 horas após o ato cirúrgico. As irradiações foram feitas em contato com a pele do animal no local da lesão de forma pontual, em 3 pontos

equidistantes por lesão. Para as irradiações em 48 e 96 horas os animais não apresentaram resistência, dispensando a necessidade de sedação.

A potência do equipamento laser foi aferida antes e após todas as sessões de irradiação, com auxílio de medidor de potência (Laser Check, MM Optics Ltda, São Carlos, SP, Brasil). O valor da emissão foi programado para o parâmetro do estudo através desse medidor, e não pelo valor no painel de controle do equipamento.

Todos os procedimentos com o laser foram realizados seguindo as normas de segurança NBR/IEC 601.2.22 e IEC 60825-1/2001-8.

4.6 COLETA DAS AMOSTRAS

Os animais foram anestesiados e então eutanasiados em guilhotina, as calotas cranianas foram imediatamente removidas com tesouras cirúrgicas e seu tecido mole cuidadosamente dissecado com o cuidado de não manipular a região do defeito ósseo. As peças anatômicas foram fixadas em formaldeído 10% tamponado, por um período de 48 horas. Posteriormente as calotas foram lavadas em PBS e mantidas nessa solução até o momento da análise por MicroCT. A seguir, o material foi descalcificado em solução de EDTA 10% e preparado para ser embocado em parafina para as análises histológica e histoquímica.

4.7 ANÁLISE DAS AMOSTRAS

4.7.1 Microtomografia computadorizada (MicroCT) de alta resolução (Análise histomorfométrica)

Os tempos experimentais para esta análise foram de 30 e 60 dias. As calotas fixadas e mantidas em solução tampão PBS, foram levadas para o microtomógrafo de alta resolução (SkyScan 1172; Bruker microCT, Kontich, Bélgica) localizado no

laboratório de microtomografia do Instituto de Biologia da USP – São Paulo. A digitalização seguiu os parâmetros apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 - Parâmetros do escaneamento para MicroCT

Parâmetros	SKY SCAN 1172
Filtro- AL	0,2mm
Resolução	9 μm
Voltagem	40 kV
Amperagem	398 μA
Ângulo de rotação	180°
Passo da rotação	0,6°
Quadros	4

Fonte: O autor

Após a digitalização, as imagens foram reconstruídas no *software* NRecom. Os dados foram então inseridos no programa DataViewer para reorientação dos eixos, seleção do eixo axial e obtenção do volume de interesse (VOI). Os dados foram então avaliados no *software* CTAnalyser® (SkyScan, Antuérpia, Bélgica) para análise de microestrutura de trabéculas a partir da região de interesse (ROI) nas imagens binárias. Esses dados também foram usados para reconstruir imagens em 3D (*software* CTVox).

O limiar máximo na escala de cinza foi de 255, enquanto o mínimo foi definido quanto à densidade trabécula como sendo 120 – a exceção dos grupos MCol e MCol+PBMT, onde os parâmetros mínimo e máximo foram ajustados para 140 e 255 devido a radiopacidade original do material. Com este limiar estabelecido, selecionamos para análise os seguintes dados morfométricos: formação óssea relativa utilizando a razão entre o volume ósseo (VO) e o volume total de tecido (VT) (VO/VT), número de trabéculas (Tb.N), espessura de trabéculas (Tb.Th) e separação de trabéculas (Tb.Sp).

Os dados obtidos foram tratados estatisticamente e foram aplicados os testes ANOVA dois critérios complementado por Tukey quando as variâncias eram normais

e Kruskal Wallis seguido de Dunn quando dos dados estavam fora da normalidade. Foi utilizado o software GraphPad Prism 7.04 (significância ≤ 0.05).

4.7.2 Processamento das amostras para Análises histológicas

As mesmas peças anatômicas que foram analisadas em MicroCT (tempos experimentais de 30 e 60 dias) foram lavadas com solução tampão PBS e seguiram para o processo de descalcificação em EDTA a 10 % por aproximadamente 20 dias - ou até que a descalcificação fosse suficiente para permitir o corte das secções. Os espécimes foram desidratados em concentrações crescentes de etanol, diafanizados em xilol, infiltrados e posteriormente incluídos em parafina para posterior microtomia (com espessura de 4 μm) e processamento ideal à cada análise proposta.

O osso parietal contendo a lesão foi hemisseccionado e cada parte foi emblocada separadamente para permitir a obtenção de cortes histológicos (4 μm) da região central da lesão. Foram feitos 2 cortes seriados, sendo o primeiro processado para coloração de HE e o segundo para Tricrômico de Masson. As lâminas foram analisadas por microscopia de luz, sendo observados aspectos de toda a extensão do defeito nas regiões de bordas e central de cada lado da lesão.

4.7.2.1 Análise histomorfológica por coloração de Hematoxilina-Eosina (HE) e histoquímica por coloração de Tricrômico de Masson

Os cortes histológicos corados em HE e tricrômico de Masson foram avaliados sob microscopia de luz convencional por dois avaliadores e de forma cega. Em um primeiro momento foram observadas as seguintes características do reparo: infiltrado neutrofílico e linfocitário, presença de material exógeno, edema, necrose, presença de tecido de granulação, áreas de hemorragia, presença de células gigantes, vascularização, osteoclastos, osteoblastos e neoformação óssea. Após observação inicial das características do tecido neoformado e remanescente foram

determinados quais seriam os parâmetros a serem reavaliados para análise estatística subjetiva.

Por permitir detalhamento de estruturas do tecido conjuntivo e observação das fibras colágenas, os cortes histológicos corados em tricrômico de Masson foram eleitos para a gradação subjetiva quanto à frequência de elementos teciduais presentes no campo histológico. As lâminas foram analisadas sob microscopia de luz convencional, em aumento final de 100X. A avaliação seguiu a seguinte escala: 0 – ausente; 1 – discreta (menos de 25% do campo histológico exibindo o elemento analisado); 2 – discreta a moderada (entre 26% e 50% do campo exibindo a estrutura analisada); 3 – moderada a intensa (entre 51% e 75%); 4 – intensa (76% ou mais). Os elementos teciduais analisados foram: necrose, hemorragia, inflamação, reação de corpo estranho, grau de vascularização, depósito de fibras colágenas e neoformação óssea.

Para as avaliações histológicas subjetivas foram aplicados os testes estatísticos Test t (não paramétrico) (comparação entre mesmo grupo experimental em tempos diferentes) e Kruskal Wallis seguido de Dunn (comparação entre todos os grupos no mesmo tempo experimental). Foi utilizado o software GraphPad Prism 7.04 (significância ≤ 0.05).

5 RESULTADOS

5.1 FASE *IN VITRO*

5.1.1 Imunofenotipagem das hDPSC4 antes e após induzidas à formação das *cell sheets*

As células hDPSC4 (**G1**) e as células isoladas das CSs (hDPSC4-CS; **G2**) apresentaram níveis típicos de marcadores de superfície de células-tronco mesenquimais (Figura 5.1). As culturas foram positivas para os marcadores de MSC (CD44, CD105, CD146, Oct 3 / 4 e STRO1), enquanto os marcadores celulares não específicos de MSC (CD34, CD14 e CD45) estavam ausentes.

As porcentagens de células que apresentaram os marcadores positivos de MSC foram semelhantes entre as populações de células do **G1** em comparação com o **G2**, exceto para Oct 3 / 4 e STRO1. A porcentagem de células positivas para Oct 3 / 4 foi de 37% para a população **G1** e 65,5% para **G2**. Já a porcentagem de células positivas para o STRO1 foi de 23,8% para a população **G1** e de 6,81% para **G2**.

Figura 5.1 – Imunofenotipagem das moléculas de superfície das hDPSC4s (**G1**) e das células isoladas das *Cell Sheets*, hDPSC4-CS (**G2**). Observe que hDPSC4-CS preservaram os mesmos marcadores positivos e negativos apresentados pelas hDPSC4

Fonte: O autor

5.1.2 As hDPSC4 foram capazes de formar colônias dentro de um padrão normal esperado para células-tronco da polpa dentária

A figura 5.2 mostra colônias de hDPSC4 que foram visualizadas por coloração de azul de toluidina. Após 9 dias em cultura houve formação de CFU-Fs em número médio de 49 por poço, com eficiência de plaqueamento calculada em 24,5%.

Figura 5.2 – Fotografia dos poços evidenciando as colônias formadas. As hDPSC4 foram capazes de formar colônias dentro de um padrão normal esperado para DPSCs

Fonte: O autor

5.1.3 As hDPSC4 apresentam dobra populacional aproximada de 20 horas.

A curva de crescimento das hDPSC4 está graficamente representada no gráfico 5.1. As células cresceram até 96 horas quando atingiram o *plateau*. A média ($n = 4$) do número de células nos tempo experimentais inicial e final foram aplicadas ao cálculo do tempo de Dobra Populacional, apresentando o resultado numérico de $\cong 19,75$ – ou seja, tempo de DP é aproximadamente de 20 horas.

Gráfico 5.1 – Representação gráfica da Curva de Crescimento. Os pontos representam as médias e as barras indicam o desvio padrão

Fonte: O autor

5.1.4 Longevidade das *cell sheets* após descolamento da placa de cultivo

O ensaio Live/Dead® revelou uma maioria de células marcadas em verde (células vivas) nas CSs e uma escassa quantidade de células mortas (marcadas em vermelho) durante todo o tempo experimental (Figura 5.3A-E). A representação gráfica da quantidade de células viáveis (fluorescência verde) mostrou um decréscimo significativo ($p < 0,01$) até 72 horas após a soltura das CSs. Depois disso, o número de células viáveis foi mantido estável (Figura 5.3F).

Figura 5.3 – Imagens representativas da fluorescência das CSs submetidas ao ensaio Live/Dead® (A-E) e representação gráfica da viabilidade celular (F; fluorescência verde). (A) Zero hora (imediatamente após o descolamento da CS, considerado como 100%), 24 horas (B), 48 horas (C), 72 horas (D) e 96 horas (E) após. Em F, letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,01$). Os dados quantitativos são expressos como a média $\pm$ erro padrão da média (SEM)

Fonte: O autor

As CSs apareceram como membranas finas e delicadas flutuando no meio de cultura. Foi possível manipular e transferir essas membranas para outros poços (Figura 5.4A). Quando as CSs foram mantidas em suspensão nos poços de cultura, elas liberaram células que se aderiram e proliferaram no fundo dos poços (Figura 5.4B). Quando estas células foram submetidas ao ensaio Live/Dead®, foi possível observar células viáveis no fundo dos poços (Figura 5.4C).

Figura 5.4 - Imagens ilustrativas de uma CS suspensa no poço depois de formada. (A) Fotomicrografia de fase de uma CS (entre setas) dentro do poço de cultura; (B) Fotomicrografia de fase das células oriundas da CS e readeridas à placa de cultura (setas); e (C) Fotomicrografia de fluorescência da CS (setas) e células viáveis aderidas ao fundo do poço

Fonte: O autor

5.1.5 As células-tronco que se soltaram das *Cell Sheets* mantiveram a capacidade de diferenciação osteogênica

A figura 5.5 ilustra o resultado do ensaio de Vermelho de Alizarina de células hDPSC4 (**G1**) (Figura 5.5A-D) e hDPSC4-CS (**G2**) (Figura 5.5E-H) após 21 dias do plaqueamento. A formação de nódulos mineralizados foi observada em ambos os grupos. Uma representação gráfica da absorbância medida nestas placas mostrou uma quantidade significativamente maior de coloração nas células cultivadas em meio mineralizado (controle positivo) em comparação com aquelas cultivadas em meio clonogênico (controle negativo) (Figura 5.5B, D).

Figura 5.5 – Imagens representativas do ensaio Vermelho de Alizarina do **G1** (hDPSC4) (A-D) e **G2** hDPSC4-CS (E-H). (A, E) fotografias das placas de cultura; (B, F) - fotomicrografias de células cultivadas em meio clonogênico (controle negativo); Fotomicrografias (C, G) de células cultivadas em meio mineralizante (controle positivo) – evidenciando nódulos vermelhos de material mineralizado; (D, H) representação gráfica da absorbância média do corante recuperado das placas de **G1** (D) e **G2** (H). NC: controle negativo (célula cultivada em meio clonogênico); PC: controle positivo (célula cultivada em meio mineralizante); * significativamente maior que o controle negativo ($p < 0,01$). Barras são o erro padrão da média (SEM)

Fonte: O autor

5.2 FASE *IN VIVO*

5.2.1 Microtomografia computadorizada

5.2.1.1 A PBMT promoveu aumento na formação óssea em 60 dias, mas não em 30.

A PBMT isoladamente (G.PBMT) foi capaz de aumentar a porcentagem de volume ósseo (VO/VT) apenas no tempo experimental de 60 dias ($p < 0,0001$; Gráfico 5.2A). O mesmo resultado foi observado entre os grupos que receberam a membrana de colágeno comercial (G.MCol e G.MCol+PBMT) ($p = 0,0064$; Gráfico 5.2B).

O número de trabéculas em 60 dias foi aumentado ($p = 0,0068$) no grupo G.MCol+PBMT quando comparado ao tempo de 30 dias (Gráfico 5.2 D), não revelando diferença nos demais grupos (Gráfico 5.2 E e F).

A espessura trabecular apresentou resultado similar, onde a PBMT isolada apresentou espessura significativamente maior ($p < 0,0001$) apenas em 60 dias, quando comparado ao G.Controle em ambos os tempos (Gráfico 5.2G). Os grupos tratados com MCol e CS, com e sem PBMT, não tiveram diferenças quanto a esse parâmetro (Gráfico 5.2 H e I).

Nenhum tratamento mostrou diferença na separação entre trabéculas (Gráfico 5.2 J-L).

Não houveram diferenças nos grupos que receberam a *Cell Sheet* (G.CS e G.CS+PBMT), tanto entre tratamentos quanto entre os tempos experimentais, para nenhum dos parâmetros avaliados (Gráfico 5.2 C, F, I, L).

A Figura 5.6 ilustra imagens representativas de cada grupo e tempo experimental (reconstrução 3D).

Gráfico 5.2 – Representação gráfica das médias das porcentagens (%) de volume ósseo relativo (VO/VT), espessura trabecular (mm), número de trabéculas (mm^{-1}) e separação entre trabéculas (mm), das lesões de todos os grupos experimentais nos dois períodos de análise. Barras indicam erro padrão da média (SEM). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes (p indicado em cada gráfico)

Fonte: O autor

Figura 5.6 – Imagens ilustrativas das reconstruções em 3D dos dados de MicroCT

Fonte: O autor

5.2.2 Avaliação histológica

5.2.2.1 Avaliação histológica subjetiva

A gradação histológica subjetiva está representada numericamente pela mediana dos scores na tabela 5.1. Os cortes histológicos corados em tricrômico de Masson foram avaliados sob microscopia de luz convencional em aumento final de 100X. Os elementos teciduais analisados foram: necrose, hemorragia, inflamação, reação de corpo estranho, grau de vascularização, depósito de fibras colágenas e neoformação óssea.

Não foram observados focos de necrose em nenhuma lâmina e a mediana dos scores de reação a corpo estranho marcaram zero. As lâminas que apresentaram

algum grau pontual de reação a corpo estranho, normalmente estavam associadas a presença de maravalha ou pelo na lesão.

Não houveram diferenças estatísticas, entre tempos experimentais versus mesmos tratamentos, para: hemorragia, fibras colágenas e neoformação óssea.

Em 30 dias G.PBMT apresentou maior presença de áreas hemorrágicas do que G.Controle e G.CS+PBMT ($p=0.0012$). Já, em 60 dias, os grupos que receberam a membrana de colágeno apresentaram menos hemorragia que G.PBMT ($p=0.0015$).

Todos os grupos apresentaram processo inflamatório similar em 60 e 30 dias, sendo que, em 30 dias, apenas G.MCol+PBMT mostrava maior grau de inflamação que o controle ($p=0.0020$). Esse processo inflamatório inicial no G.MCol+PBMT foi reduzido do primeiro para o segundo tempo experimental ($p=0.0117$).

No primeiro tempo de análise, foi vista maior porcentagem de vasos sanguíneos em G.MCol+PBMT e G.CS+PBMT comparados a G.PBMT e G.Controle ($p<0.0001$). Em 60 dias G.MCol+PBMT e G.CS+PBMT estavam altamente vascularizados e estatisticamente maiores que o G.Controle ($p=0.0015$).

Todos os tratamentos apresentaram grande quantidade de fibras colágenas e em maior porcentagem que o G.Controle, em ambos os tempos experimentais ($p=0.0003$).

Em 30 dias, a neoformação óssea foi maior nos grupos que receberam a membrana de colágeno (G.MCol e G.MCol+PBMT), sendo similar ao G.PBMT. O grupo que recebeu apenas *cell sheet* (G.CS) foi similar ao G.Controle. No entanto, quando a *cell sheet* foi associada ao laser (G.CS+PBMT), a neoformação óssea foi estatisticamente maior que o controle ($p<0.0001$).

Já em 60 dias, a neoformação óssea foi maior no grupo G.MCol+PBMT (comparado aos grupos que receberam CSs e controle) e similar a G.MCol e G.PBMT ($p<0.0001$).

As Figuras 5.7 a 5.9 mostram fotomicrografias representativas de toda a extensão da lesão (em um corte histológico da área central, aumento de 40x) para todos os grupos em ambos os tempos. As Figuras 5.10 e 5.11 mostram detalhes histológicos observados nos grupos que receberam *cell sheet*.

Tabela 5.1- Gradação histológica subjetiva. Os números na tabela representam a mediana dos scores. Letras diferentes indicam diferenças significativas (<0,01). Letras maiúsculas comparam o mesmo parâmetro entre os tempos experimentais no mesmo grupo (linha, teste t para variâncias não paramétricas). Letras minúsculas comparam o mesmo parâmetro e tempo experimental entre todos os grupos (coluna, teste Kruskal Wallis seguido de Dunn). As medianas dos parâmetros necrose e reação de corpo estranho foram igual a zero para todos os grupos e tempos experimentais, sendo então excluídos da tabela

	Hemorragia		Inflamação		Vascularização		Fibras Colágenas		Neoformação Óssea	
	30	60	30	60	30	60	30	60	30	60
G.Controle	1 a A	1,5 a,b A	1,5 a A	1,5 a A	1,5 a A	2 a A	0,5 a A	1 a A	2 a A	2,5 a A
G.PBMT	3,5 b A	3,5 b A	2 a,b A	2 a A	2 a,d A	3 a,b A	2,5 b A	3 b A	3 a,b,c A	3 a,b,c A
G.MCol	2 a,b A	1 a A	2 a,b A	2 a A	3 a,c A	2,5a,b A	3,5 b A	3 b A	3,5 b A	4 b,c A
G.MCol+PBMT	2 a,b A	1 a A	2,5 b A	1,5 a B	3,5 b,c A	4 b A	3,5 b A	4 b A	4 b A	4 b A
G.CS	3 a,b A	3 a,b A	2 a,b A	2 a A	2,5 a,c A	3 b B	3 b A	3 b A	2 a,c A	2 a A
G.CS+PBMT	1 a A	1,5 a,b A	2 a,b A	2 a A	3 c A	3,5a,b A	3 b A	3,5 b A	2,5 c A	3 a,c A

Fonte: O Autor

Figura 5.7 - Fotomicrografias representativas das lesões dos grupos G.Controle (A, B) e G.PBMT (C,D) em 30 dias (A, C) e 60 dias (B, D) após os tratamentos. Observe que as lesões de ambos os grupos se apresentam abertas e preenchidas por tecido conjuntivo fibroso e delgado em 30 dias. Neste período o G.PBMT (C) já apresenta núcleos de formação óssea (inserto e setas). Em 60 dias na lesão do G.Controle (B) começam a aparecer núcleos de formação de osso imaturo (seta), enquanto no grupo G.PBMT a lesão aparece mais fechada e com bordas formadas por osso neoformado, porém mais diferenciado do que aquele das bordas do G.Controle (B). (Tricrômico de Masson, aumento original 40X)

Fonte: O Autor

Figura 5.8 – Fotomicrografias representativas das lesões dos grupos G.MCol (A, B) e G.MCol+PBMT (C,D) em 30 dias (A, C) e 60 dias (B, D) após os tratamentos. Em 30 dias em ambos os grupos a área da lesão apresenta grande quantidade de tecido ósseo imaturo. O tecido ósseo formado na lesão do grupo G.MCol+PBMT em 30 dias (C) apresenta-se mais espesso, similar ao osso formado no grupo G.MCol em 60 dias (B). O grupo G.MCol+PBMT em 60 dias (D) aparece mais organizado, inclusive com a borda inferior bastante mineralizada. Em todos os tempos e em ambos os grupos foi possível observar áreas desprovidas de tecido ósseo. (Tricrômico de Masson, aumento original 40X)

Fonte: O Autor

Figura 5.9 – Fotomicrografias representativas das lesões dos grupos G.CS (A, B) e G.CS+PBMT (C, D) em 30 dias (A, C) e 60 dias (B, D) após os tratamentos. As lesões tratadas com a G.CSI apresentaram-se na sua maioria muito similares. A área da lesão abaixo da pele dos animais está representada por tecido conjuntivo fibroso, delgado e bem delimitado em ambos os tempos e ambos os grupos. No grupo G.CS+PBMT era possível em alguns espécimes observar núcleos de formação óssea (C, seta). (Tricrômico de Masson, aumento original 40X)

Fonte: O Autor

Figura 5.10 Fotomicrografias de lesões dos grupos CS e CS+PBMT. Em 30 dias em alguns espécimes era possível observar uma camada de osteoblastos ao redor de osso neoformado na borda da lesão (A, setas). Grande quantidade de vasos sanguíneos também era observada em 30 dias no grupo CS (B, setas). Tecido conjuntivo fibroso, com fibras arranjadas em feixes bem organizados em íntimo contato com as bordas da lesão estavam presentes no grupo CS+PBMT em 30 dias (C, D). Alguns espécimes do grupo CS PBMT em 30 dias apresentaram núcleos de formação óssea (E, setas). Em duas amostras foi possível observar em 60 dias (F) fechamento da lesão com osso maduro e com áreas de mineralização [Tricrômico de Masson, aumento original 200X (A, B), 100X (C, D) e 40X (E,F)]

Fonte: O Autor

Figura 5.11 Fotomicrografias dos grupos G.CS e G.CS+PBMT em 30 dias (100x aumento original, imagens do lado esquerdo). Em detalhe, núcleos de ossificação na região central da lesão no grupo G.CS+PBMT (200x aumento original) (Tricrômico de Masson)

Fonte: O autor

6 DISCUSSÃO

Diabetes Mellitus é uma condição patológica considerada uma epidemia em curso, estimando-se atualmente na população mundial uma prevalência da ordem de 387 milhões e com estimativa para alcançar 471 milhões em 2035. As alterações metabólicas ósseas nesses casos têm estado em evidência nos estudos modernos, visto a maior expectativa de vida que os avanços na indústria farmacêutica proporcionam a esses pacientes – exemplo disso é a edição de janeiro de 2016 do periódico *Bone*, inteiramente direcionada a pesquisas em alterações metabólicas ósseas da DM tipo 1 e 2. Isto posto, fica clara a necessidade aumentada de se buscar soluções que melhorem a qualidade de vida e sobrevida desses pacientes.

Nosso grupo de pesquisa já vem estudando a alguns anos métodos auxiliares que favoreçam a regeneração tecidual, dentre eles a PBMT (Pereira et al., 2002; Eduardo et al., 2007; Eduardo et al., 2008; Moreira et al., 2011; Silva et al., 2014; Pellicoli et al., 2014; Romão et al., 2015; Moreira et al., 2016; Marques et al., 2016; Diniz et al., 2018; Ferreira et al., 2019). Mais recentemente, o grupo passou a estudar terapias celulares baseadas em células-tronco de origem dentoalveolar, incluindo as *Cell Sheets* de hDPSCs (Pedroni et al., 2018; Garrido et al., 2019; Pedroni et al., 2019). Baseados nos resultados destes estudos, acreditamos que a associação dessas técnicas contemporâneas poderia potencializar reparações teciduais complexas, como as decorrentes de alterações metabólicas crônicas em tecido ósseo, entre elas o DM tipo 1.

Os defeitos ósseos de tamanho crítico representam um dos problemas mais difíceis que os cirurgiões enfrentam na prática clínica. No entanto, terapias com células-tronco e técnicas de engenharia tecidual podem facilitar a reconstrução e o reparo ósseo (Xavier Acasigua et al., 2014). Em nosso estudo, foram testadas duas técnicas de indução óssea por biomembranas, uma baseada em terapia celular (*cell sheet* de hDPSC4 indiferenciada) e a outra na regeneração óssea guiada (membrana de colágeno suíno comercial). O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da aplicação da *cell sheet* (CS) de células-tronco da polpa dentária humana (hDPSC) indiferenciada, associadas ou não à terapia de fotobiomodulação (PBMT), na regeneração de lesões ósseas críticas em calvária de ratos diabéticos. Os experimentos da fase *in vitro* apresentados nessa tese já foram publicados (Pedroni

et al., 2019) e as devidas autorizações foram solicitadas para reprodução dos dados nesse documento.

A escolha das hDPSCs como modelo de estudo é útil devido à sua multipotencialidade de diferenciação em vários tipos celulares (Gronthos et al., 2000; Alge et al., 2010). Adicionalmente, as células-tronco mesenquimais de tecidos dentais, tais como, células-tronco da polpa dentária adulta (Pierdomenico et al., 2005) e de decíduos (Xavier Acasigua et al., 2014), células-tronco do ligamento periodontal (Wada et al., 2009), células-tronco da papila apical e aquelas derivadas de gengiva (Zhang et al., 2009), demonstraram ter efeitos imunomoduladores enquanto inibem a proliferação e a função dos linfócitos T (de Sá Silva et al., 2012; Silva et al., 2014). Assim sendo, células tronco da polpa dentária humana podem ser transplantadas em ratos normoreativos, não havendo a necessidade de se utilizar animais imunossuprimidos, já que estas células apresentam baixa imunogenicidade (Xavier Acasigua et al., 2014; Silva et al., 2014; Petridis et al., 2015; Hirose et al., 2016; Nicola et al., 2017; Yang et al., 2017). Além disso, as hDPSCs são fáceis de isolar e cultivar, e não enfrentam barreiras éticas para sua obtenção, já que sua fonte é um tecido que normalmente seria descartado após a exodontia (de Sá Silva et al., 2012; Pedroni et al., 2018; Gronthos et al., 2000). Adicionalmente, as hDPSCs exibem maior capacidade osteogênica do que as células-tronco da medula óssea, tornando-as candidatas a serem utilizadas para fins terapêuticos onde o objetivo seja o reparo / regeneração dos ossos craniofaciais e do osso alveolar (Laino et al., 2005).

Para esse estudo foram isoladas células-tronco da polpa dentária de terceiros molares humanos, e essas células foram induzidas para formar CSs nas condições experimentais descritas por Wei et al. (2012) (ou seja, cultivo celular com meio clonogênico suplementado com 20 µg/ml de vitamina C). Para confirmar que o *pool* dessas células possuíam características esperadas de células-tronco mesenquimais (MSC), as mesmas foram caracterizadas pelas técnicas de citometria de fluxo, dobra populacional (DP) e pela capacidade de gerar colônias (CFU-f), seguindo os protocolos prévios do grupo Pedroni et al.; 2018. Então, para verificar se o fenótipo celular de MSC seria mantido após a formação das CSs, as mesmas foram tripsinizadas e as células que se soltaram (aqui chamadas de hDPSCs4-CS) foram recaracterizadas e seu perfil imunofenotípico comparado.

Quando transplantadas para o paciente, as *cell sheets* podem oferecer um grande número de células que deveriam iniciar a formação de novos tecidos. No entanto, para esse fim, essas células devem manter seu fenótipo e a capacidade de proliferar e diferenciar. A este respeito, um achado importante do presente estudo foi a retenção da estirpe da linhagem hDPSC4 original nas células que foram induzidas e formaram a CS, mesmo após cultivadas em confluência por aproximadamente 10 a 15 dias. De fato, todos os marcadores de células-tronco expressos nos hDPSC4 originais ainda eram positivos nas células recuperadas das CSs (aqui chamadas de hDPSCs4-CS). Esses marcadores são típicos de células-tronco mesenquimais indiferenciadas (por exemplo, CD105, CD146, CD44, STRO1 e Oct 3 / 4) (Gronthos et al., 2000; Huang et al., 2009), que foram expressos em porcentagens semelhantes nos dois tipos celulares, exceto Oct 3 / 4 e STRO1. Essas foram as diferenças mais marcantes no perfil imunofenotípico dessas células. As porcentagens de células positivas para Oct 3 / 4 aumentaram nas hDPSCs4-CS, enquanto as porcentagens de células positivas para STRO1 diminuíram. O aumento no número de células apresentando o marcador de superfície Oct 3 / 4, geralmente associado a células com fenótipo embrionário, pode estar relacionado ao efeito da VC adicionada ao meio de cultura celular para a formação e manutenção das CSs.

De fato, muitos estudos já indicaram que a adição de VC, em concentrações específicas, pode inibir a diferenciação e regular a expressão do marcador de pluripotência Oct 3 / 4 (Potdar et al., 2010; Wei et al., 2012; Pedroni et al., 2018). Já as células-tronco mesenquimais positivas para STRO1 são frequentemente associadas ao direcionamento da diferenciação osteogênica nas populações de DPSC (Yu et al., 2010; Li et al., 2017) e BMMSCs (do inglês, *Bone marrow mesenchymal stem cells*) (Gronthos et al., 1994). Assim, a redução de células marcadas com STRO1 também poderia estar relacionada à regulação positiva do estado mais indiferenciado promovido pela vitamina C. Lei et al. (2014) descreveu resultado similar também em DPSCs, com manutenção da porcentagem populacional para marcadores de MSCs e redução de células STRO1 positivas. Em seu estudo foi feita a recharacterização de DPSCs re-isoladas do tecido neoformado, proveniente de um implante de CS.

Inicialmente consideramos que esse achado seria interessante para a aplicação das *cell sheets* de hDPSC4 - uma vez que mais células-tronco indiferenciadas estariam disponíveis para, sob indução dos fatores de crescimento locais,

participarem do processo de regeneração tecidual. Esse fato pareceu ser especialmente útil em situações onde a intenção seria a de regenerar mais de um tecido, como, por exemplo, no tecido periodontal – onde uma face seria diferenciada em ligamento periodontal e a outra tecido ósseo. De fato, tanto as hDPSC4 quanto as hDPSC4-CS foram capazes de se diferenciar *in vitro* quando cultivadas em meio osteogênico.

No entanto, nossos resultados *in vivo* demonstraram um processo de reparo ósseo retardado – apesar de organizado - nos grupos que receberam a CS (G.CS e G.CS+PBMT), quando comparados aos outros tratamentos (G.MCol e G.MCol+PBMT) e ao controle (G.Controle). Dessa forma, acreditamos que os resultados de microCT dos grupos G.CS e G.CS+PBMT foram discretos dado ao fato de que essa análise é capaz de quantificar o processo de ossificação em um estado mais maduro do que o encontrado nos grupos que receberam *cell sheet*. Em contrapartida, histologicamente, foi observada matriz óssea neoformada nas bordas dos defeitos e matriz colagênica preenchendo a lesão. Também estava presente grande quantidade de células de morfologia similar as de células progenitoras ósseas, por vezes, exibindo fenótipo de osteoblastos - adjacentes a matriz óssea recém-depositada. No grupo G.CS+PBMT a matriz colagênica mostrou-se mais exuberante, apresentando núcleos de ossificação e maior quantidade de vasos sanguíneos. Isso pode ser um indicativo de que a PBMT seria capaz de melhorar o reparo promovido pela *cell sheet*. Esse efeito talvez pudesse ser melhor observado se o tempo experimental fosse em uma fase mais adiantada desse processo.

O método do MicroCT é capaz de fornecer informações adicionais sobre a variação na radiopacidade dos tecidos duros, além de ser um método não invasivo que possibilita análises em 3D de densidade e volume tecidual. A PBMT isoladamente (G.PBMT) foi capaz de aumentar a porcentagem de volume ósseo (VO/VT) apenas no tempo experimental de 60 dias. O mesmo resultado foi observado entre os grupos que receberam a membrana comercial de colágeno suíno (G.MCol e G.MCol+PBMT). Curiosamente, não ocorreu aumento de volume ósseo condicionado ao tempo experimental no grupo G.MCol. No entanto, no tempo tardio, a associação da PBMT (G.MCol+PBMT) mostrou-se benéfica ao ponto de dobrar os valores obtidos quando comparado ao grupo G.MCol. Essa melhora no desempenho da regeneração óssea guiada por MCol quando associada a PBMT já havia sido descrita em nosso grupo de pesquisa por Alves (2018) em modelo de

ratas osteoporóticas. Nesse trabalho - que utilizou os mesmos parâmetros de laser e tempos experimentais desta pesquisa – o grupo tratado com a membrana associada à PBMT obteve a maior formação óssea, enquanto não se observou aumento no volume ósseo relativo entre os tempos experimentais no grupo tratado apenas com membrana de colágeno. Sendo assim, a PBMT parece ter ação importante sobre a regeneração óssea guiada pela membrana de colágeno, acelerando o processo de maturação do tecido ósseo neoformado. Essa afirmação corrobora ainda com os achados histológicos, onde foi observada maior deposição de tecido ósseo maduro no grupo G.MCol+PBMT quando comparado ao G.MCol.

A gradação histológica subjetiva revelou ausência de focos de necrose e reação a corpo estranho insignificante para todos os tratamentos. Em 30 dias G.PBMT apresentava mais áreas hemorrágicas do que G.Controle e G.CS+PBMT. Já, em 60 dias, os grupos que receberam a membrana de colágeno apresentaram menos hemorragia que G.PBMT. As áreas hemorrágicas em cortes histológicos podem estar associadas a maior fragilidade capilar, onde os vasos se romperiam durante o corte do tecido. No entanto, nesse caso específico, acreditamos que a maior área hemorrágica está relacionada justamente com o aumento da porcentagem de vasos também vista nos grupos que receberam a PBMT. Além disso, tanto em 30 quanto em 60 dias, foi observada uma tendência de maior vascularização nos grupos G.MCol+PBMT e G.CS+PBMT quando comparados ao uso isolado das biomembranas. Apenas G.MCol+PBMT apresentou processo inflamatório significativamente aumentado no primeiro tempo experimental. Esse aumento inicial no G.MCol+PBMT foi reduzido do primeiro para o segundo tempo experimental. Curiosamente, o tratamento com maior formação óssea também foi G.MCol+PBMT, o que pode ser um indicativo de que essa inflamação promovida pelo laser foi de alguma forma benéfica para a indução e maturação precoce do tecido neoformado. Diversos trabalhos na literatura discursam sobre a ação da PBMT na promoção de vascularização (Garavello et al., 2004; Moreira et al., 2011; Moreira et al., 2016) e efeitos sobre o sistema imunológico (Tadakuma et al., 1993; Moreira et al., 2009; Marques et al., 2016).

Em 30 dias, a neoformação óssea foi maior nos grupos que receberam a membrana de colágeno (G.MCol e G.MCol+PBMT), sendo similar ao G.PBMT. O grupo que recebeu apenas cell sheet (G.CS) foi similar ao G.Controle. No entanto, quando a *cell sheet* foi associada ao laser (G.CS+PBMT), a neoformação óssea foi

estatisticamente maior que o controle. Já em 60 dias, a neoformação óssea foi maior no grupo G.MCol+PBMT (comparado aos grupos que receberam CSs e controle) e similar a G.MCol e G.PBMT.

Ainda sobre os achados histológicos, inicialmente o projeto desse estudo previa a análise dos osteoclastos na área da lesão neoformada através da técnica de TRAP (do inglês, *tartrate-resistant acid phosphatase*). No entanto, as análises histológicas demonstraram uma baixa presença desse tipo celular, inviabilizando a análise. Isso poderia ser explicado pelo fato de marcadores de reabsorção e formação óssea serem mais baixos em pacientes com diabetes, o que poderia levar a alterações no *turnover* do remodelamento ósseo causando desequilíbrio no processo de diferenciação das células osteoprogenitoras (He et al., 2004; Starup-Linde; Vestergaard, 2016).

A membrana comercial de escolha para esse estudo (G.MCol e G.MCol+PBMT) é composta de colágeno suíno tipo I e III e assemelha-se às membranas de colágeno humano. Seu diferencial é o fato de ser uma estrutura de colágeno natural (sem alterações físicas e químicas) onde as fibras estão organizadas em bicamada, que tanto é capaz de impedir a permeação do tecido mole para dentro da região de enxertia, quanto permite a vascularização homogênea - favorecendo o processo de anastomose. Sua decomposição ocorre de forma enzimática, onde é decomposta naturalmente em aminoácidos, sem a produção de subprodutos tóxicos (Alpar et al., 2000). O tecido endógeno liga-se ao retículo poroso de colágeno e os osteoblastos se desenvolvem ao longo das fibras em direção ao interior da estrutura. Já os vasos se formam na superfície da membrana e entre as fibras (Schwarz et al., 2006; 2008). Essa membrana já é consagrada mundialmente e tem sua eficácia clínica comprovada por diversos estudos e anos de uso clínico (Zitzmann et al., 1997; Tal et al., 2008). Assim, já esperávamos que os grupos G.MCol e G.MCol+PBMT resultariam em uma formação tecidual expressiva, servindo, inclusive, como controle positivo para observação do processo de neoformação com envolvimento de uma biomembrana. Apesar da aplicação dessas membranas não serem uma novidade, os resultados obtidos da associação da técnica com a PBMT (G.MCol+PBMT) são de grande importância para a prática clínica, reafirmando o potencial de melhoria da técnica regenerativa com o uso em conjunto desses tratamentos. Podemos afirmar ainda que os resultados positivos de aumento no ganho ósseo e aceleração do processo de reparo, com os parâmetros de PBMT usados nesse estudo, não foram

aleatórios. Como citado anteriormente, nosso grupo já obteve o mesmo resultado ao testar essas membranas isoladamente ou associadas a dois parâmetros de PBMT (0,12 J e 0,40 J por ponto) - sendo um deles o mesmo protocolo de nossa escolha - no mesmo modelo de lesão em calota, porém em ratas osteoporóticas (Alves, 2018).

Até onde sabemos, o presente estudo foi o primeiro a seguir a viabilidade das células nas CSs e o destino dessas células quando destacadas da mesma. A viabilidade celular e a motilidade das células são relevantes para o sucesso de um transplante. A viabilidade das hDPSC4 nas CS foi monitorada por até 96 horas após a soltura do fundo da placa, quando pelo menos 30% das células nas CSs estavam vivas. Esse tempo seria suficiente para transplantar essas CSs em procedimentos cirúrgicos de longa duração. A diminuição no número de células vivas, como esperado, foi acompanhada por um aumento no número de células mortas. No entanto, esse aumento ocorreu apenas até 48 horas. Após esse ponto, a diminuição no número de células vivas foi acompanhada por uma diminuição no número de células mortas. Assim, as células vivas não sofreram morte celular. De fato, as células nas CSs, embora aderidas entre si através da matriz extracelular, devem ter sido destacadas da CS. Ao observar as placas nas quais as CSs foram mantidas durante a análise de viabilidade, pudemos entender esses achados. De fato, encontramos células no fundo dos poços de cultura, onde elas se aderiram e proliferavam. Como as células das CSs foram capazes de se destacar e manter sua capacidade de readir e proliferar, sugerimos que, no tecido hospedeiro, esse descolamento possa ocorrer, seguido de uma adesão no tecido alvo. Esse processo promoveria o preenchimento, por exemplo, de defeitos ósseos que se regenerariam não apenas das bordas, mas também de dentro para fora às custas da CS. Essa hipótese mostrou-se verdadeira, onde, histologicamente, pudemos observar ilhotas de neo formação óssea distantes dos bordos da lesão, dispersas na matriz colagênica espessa. Esses achados indicaram que a CS de hDPSC4 indiferenciada foi capaz de induzir neoformação óssea, no entanto, quando comparado aos outros grupos experimentais, esse processo mostrou-se retardado.

Resultado semelhante foi descrito por Xavier Acasigua et al. (2014) também em lesões críticas na calota craniana de ratos. Eles descreveram atraso no reparo ósseo tratado com membrana de PLGA (do inglês, *poly lactic-co-glycolic acid*) semeadas com células-tronco indiferenciadas da polpa de dentes decíduos, com formação óssea significativamente menor que em lesões que receberam

membranas sem células. Já as lesões tratadas com as mesmas membranas e mesmas células, porém pré-induzidas para a diferenciação osteogênica por uso de meio de cultivo mineralizante, apresentaram resultado significativamente maior de formação óssea que o controle. Portanto, concluíram que o tempo necessário para a ativação do maquinário de diferenciação das células-tronco implantadas em estado indiferenciado atrasaria o início do processo de neoformação tecidual. Sugeriram então que as células-tronco da polpa dentária responderiam melhor, ou pelo menos mais rápido, quando implantadas após sinalização prévia para a diferenciação – pelo menos para o tecido ósseo. O uso das CSs com células-tronco indiferenciadas ou previamente diferenciadas ainda é uma controvérsia na literatura e parece estar condicionado ao tipo de MSC e ao tecido alvo. Dentro de nosso entendimento, até o presente momento, apenas um trabalho *in vivo* foi encontrado relatando o uso de CS de DPSC para regeneração óssea (Cao et al., 2015). No estudo em questão, a CS não foi cultivada em meio de diferenciação osteogênica, no entanto tratava-se de uma linhagem celular que foi transfectada com fator de crescimento de hepatócitos (HGF). O comportamento da CSs foi comparado com a injeção das mesmas células (cultivadas pelo método tradicional, ou seja, sem indução de CS), transfectadas ou não pelo fator, em lesões periodontais induzidas em *minipigs*. Foi relatado um aumento da formação óssea quando utilizada a CS, em detrimento da suspensão celular.

Embora a técnica de cultivo de *cell sheets* seja simples, pode-se discutir se a grande quantidade de tempo necessária para adquiri-las é uma limitação para aplicações clínicas imediatas. No entanto, as CSs de células-tronco de origem dentoalveolar podem ser facilmente preparadas em laboratório para aplicação em engenharia tecidual, já que a extração do terceiro molar é um procedimento eletivo. Adicionalmente, as hDPSCs podem ser isoladas, expandidas, congeladas e armazenadas em quantidades suficientes para serem utilizadas em momento oportuno. Além disso, as CSs já prontas podem ser congeladas sem perda de suas propriedades após o descongelamento (Li et al., 2017). Eles mostraram que a criopreservação não altera as propriedades biológicas das CSs derivadas do ligamento periodontal. Essa propriedade resolve essa possível desvantagem da técnica, possibilitando o seu armazenamento para uso até mesmo em casos de emergência cirúrgica (Li et al., 2017).

De fato, as CSs já possuem uma matriz extracelular que atua como *scaffold* natural para as células-tronco. Assim, as CSs de hDPSCs poderiam ser adequadas para o tratamento de perda óssea sem necessidade de *scaffolds* artificiais ou substitutos ósseos. Essa indicação do uso isolado é limitada aos casos onde não existe necessidade de grande ganho de volume, já que a CS não contempla essa propriedade. No entanto, poderia ser utilizada na interface de enxertos em bloco - sejam esses autógenos, alógenos, heterógenos ou sintéticos – onde as falhas em *gap* e dificuldade de celularização e vascularização são os maiores desafios para o sucesso imediato e tardio da técnica.

Até o momento, não há relatos sobre o uso de tais técnicas em humanos para regeneração óssea, mas as CSs foram testadas em estudos translacionais que mostraram resultados promissores. Nestes estudos, as *cell sheets* de células-tronco de origens variadas foram utilizadas isoladamente ou em combinação com biomateriais para tratamentos de doenças ósseas. Nakamura et al. (2010) já mostraram que a fratura do fêmur foi completamente curada pelo transplante de CS de células da medula óssea de rato, sugerindo que o transplante de CS poderia ser aplicado na reconstrução de tecidos duros em casos difíceis, como defeitos ósseos críticos e osteonecrose. Já Wang et al. (2017) incorporaram CS de BMMSCs em grânulos de fibrina ricos em plaquetas e hidroxapatita, que promoveram extensa regeneração óssea na calvária de coelhos. Usando um modelo de sínfise mandibular em ratos, Ueyama et al. (2016) demonstraram a neoformação óssea em abundância em um grupo tratado com implante de CS de células mesenquimais osteogênicas. Todos esses estudos indicam que a aplicação da técnica da CS é uma abordagem terapêutica promissora para a substituição óssea. Nossos resultados *in vitro* sugerem que as CSs obtidas de polpa dentária humana também poderiam ser aplicadas para esses propósitos clínicos, com possibilidades de sucesso ainda melhores, uma vez que os DPSCs são mais adequados que os BMMSCs (Alge et al., 2010) ou células-tronco ligamentares (Lei et al., 2014) para regeneração de tecidos mineralizados. No entanto, nossos resultados *in vivo* não comprovaram essa hipótese, já que a CS de hDPSC4 indiferenciada induziu uma neoformação óssea, apesar de bem organizada, mais lenta em comparação aos outros grupos. Esse aparente atraso no processo de reparo ósseo poderia ser contornado com a indução prévia da diferenciação das CSs ainda *in vitro*. Assim, essa técnica seria particularmente útil para o tratamento de defeitos ósseos críticos

de pacientes normoreativos ou qualquer tipo de defeito ósseo em pacientes portadores de doenças que prejudicam o reparo ósseo, como *diabetes mellitus*, osteonecrose mandibular e osteoporose. Novos estudos são necessários para testar essa hipótese.

7 CONCLUSÕES

Nas condições experimentais dessa pesquisa concluímos que, na maioria dos casos, a *cell sheet* (CS) de células-tronco da polpa dentária humana indiferenciada não foi capaz de acelerar o processo de reparo de lesões ósseas críticas em calvária de ratos diabéticos.

A ação da PBMT foi benéfica em 60 dias, aumentando significativamente o volume ósseo relativo e número de trabéculas no grupo que recebeu a membrana de colágeno comercial (G.MCol+PBMT), o volume ósseo relativo e a espessura de trabéculas no grupo que recebeu apenas PBMT (G.PBMT). Já quando a PBMT foi associada à CS (G.CS), foi possível observar mais fibras colágenas e maior frequência de ilhotas no centro da lesão e - ainda que em um número reduzido de animais - fechamento da lesão com osso maduro em 60 dias.

De acordo com os resultados dessa pesquisa, o melhor tratamento foi G.MCol+PBMT. Apesar da aplicação dessas membranas não serem uma novidade, os resultados obtidos são de grande importância, reafirmando o potencial de melhoria da técnica regenerativa com o uso em conjunto desses tratamentos na prática clínica.

Novas pesquisas poderiam ser conduzidas para testar a hipótese de que a *cell sheet* de hDPSC previamente induzida para diferenciação osteogênica, levariam a um melhor reparo ósseo. Também são necessários estudos com acompanhamento tardio e observações quanto à qualidade, densidade e resistência óssea após amadurecimento do tecido formado.

REFERÊNCIAS¹

Abramovitch-Gottlib L, Gross T, Naveh D, Geresh S, Rosenwaks S, Bar I, et al. Low level laser irradiation stimulates osteogenic phenotype of mesenchymal stem cells seeded on a three-dimensional biomatrix. *Lasers Med Sci.* 2005;20(3-4):138–46.

ADA_American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes-2020 Abridged for Primary Care Providers. *Clin Diabetes.* 2020 Jan;38(1):10-38.

Alge DL, Zhou D, Adams LL, Wyss BK, Shadday MD, Woods EJ, Gabriel Chu TM, Goebel WS. Donor-matched comparison of dental pulp stem cells and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a rat model. *J Tissue Eng Regen Med.* 2010; 4:73–81.

Alghamdi KM, Kumar A, Moussa NA. Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. *Lasers Med Sci.* 2012;27:237-49.

Alpar B, Leyhausen G, Günay H, Geurtsen W. Compatibility of resorbable and nonresorbable guided tissue regeneration membranes in cultures of primary human periodontal ligament fibroblasts and human osteoblast-like cells. *Clin Oral Investig.* 2000 Dec;4(4):219-25.

Alves FAM. Estudo imaginológico da regeneração óssea guiada associada ou não à terapia de fotobiomodulação (PBMT) em ratas com osteoporose [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2018.

Amghar-Maach S, Gay-Escoda C, Sánchez-Garcés MA. Regeneration of periodontal bone defects with dental pulp stem cells grafting: Systematic Review. *J Clin Exp Dent.* 2019 Apr; 11(4): e373–81.

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

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):238-69.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Arany PR. Photobiomodulation Therapy: Communicating with Stem Cells for Regeneration? *Photomed Laser Surg.* 2016 Nov;34(11):497-9.

Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell.* 2005;120(4):483–95.

Bartold PM, Gronthos S, Ivanovski S, Fisher A, Hutmacher DW. Tissue engineered periodontal products. *J Periodontal Res.* 2016 Feb;51(1):1-15.

Bielski BH, Richter HW, Chan PC. Some properties of the ascorbate free radical. *Ann N Y Acad Sci.* 1975 Sep 30;258:231-7.

Cao Y, Liu Z, Xie Y, Hu J, Wang H, Wang S, et al. Adenovirus-mediated transfer of hepatocyte growth factor gene to human dental pulp stem cells under good manufacturing practice improves their potential for periodontal regeneration in swine. *Stem Cell Res Ther.* 2015 Dec 15;6(1):249.

Carnovali M, Luzi L, Banfi G, Mariotti M. Chronic hyperglycemia affects bone metabolism in adult zebrafish scale model. *Endocrine.* 2016 Dec;54(3):808-17.

Chaudhari P, Ye Z, Jang YY. Roles of reactive oxygen species in the fate of stem cells. *Antioxid Redox Signal.* 2012;20(12):1881-90.

Chen J, Guo L, Zhang L, Wu H, Yang J, Pei D. Vitamin C modulates TET1 function during somatic cell reprogramming. *Nature genetics.* 2013;45(12):1504-9.

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

de Freitas LF, e Hamblin MR. Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics.* 2016;22(3):1-17.

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

Denham M, Conley B, Olsson F, Cole TJ, Mollard R. Stem cells: an overview. *Curr Protoc Cell Biol.* 2005;23(23):1. doi: 10.1002/0471143030.cb2301s28.

Dimitriou R, Mataliotakis GI, Angoules AG, Kanakaris NK, Giannoudis PV. Complications following autologous bone graft harvesting from the iliac crest and using the RIA: a systematic review. *Injury.* 2011 Sep;42 Suppl 2:S3-15.

Ding G, Liu Y, Wang W, Wei F, Liu D, Fan Z, et al. Allogeneic periodontal ligament stem cell therapy for periodontitis in swine. *Stem Cells.* 2010 Oct;28(10):1829-38.

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 Jun;233(6):4907-4918.

Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes [homepage on the Internet]. Disponível em: <http://www.diabetes.org.br/sbdonline/images/docs/DIRETRIZES-SBD-2015-2016.pdf>.

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

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

Efeoglu C, Burke JL, Parsons AJ, Aitchison GA, Scotchford C, Rudd C, et al. Analysis of calvarial bone defects in rats using microcomputed tomography: potential for a novel composite material and a new quantitative measurement. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2009 Dec;47(8):616-21.

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

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 Jun;34(4):659-66.

Flores MG, Hasegawa M, Yamato M, Takagi R, Okano T, Ishikawa I. Cementum-periodontal ligament complex regeneration using the cell sheet technique. *J Periodontal Res.* 2008a Jun;43(3):364-71.

Flores MG, Yashiro R, Washio K, Yamato M, Okano T, Ishikawa I. Periodontal ligament cell sheet promotes periodontal regeneration in athymic rats. *J Clin Periodontol.* 2008b Dec;35(12):1066-72.

Freshney RI. Basic principles of cell culture. Hoboken: John Wiley & Sons; 2006.

Freshney RI. Culture of animal cells: A manual of basic technique. 5th. New York: Edition, Wiley; 2005.

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

Fujita H, Shimizu K, Nagamori E. Application of a cell sheet-polymer film complex with temperature sensitivity for increased mechanical strength and cell alignment capability. *Biotechnol Bioeng.* 2009 Jun 1;103(2):370-7.

Gao X, Xing D. Molecular mechanisms of cell proliferation induced by low power laser irradiation. *J Biomed Sci.* 2009;16:4.

Garavello I, Baranauskas V, Da Cruz-Höfling MA. The effects of low laser irradiation on angiogenesis in injured rat tibiae. *Histol Histopathol.* 2004;19(1):43–8.

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 May;194:149-57.

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.

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

Gronthos S, Graves SE, Ohta S, Simmons PJ. The STRO1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors. *Blood*. 1994 Dec 15;84(12):4164-73.

Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97:13625–30.

Halliwell B. Vitamin C and genomic stability. *Mutation Research*. 2001;475(1):29–35.

Hamann C, Goettsch C, Mettelsiefen J, Henkenjohann V, Rauner M, Hempel U, et al. Delayed bone regeneration and low bone mass in a rat model of insulin-resistant type 2 diabetes mellitus is due to impaired osteoblast function. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2011Dec;301(6):E1220-8.

Hamblin MR, Demidova TN. Mechanisms of low level light therapy. *International Society for Optics and Photonics. Biomedical Optics*. 2006. Feb:614001-614001.

Hamblin MR. The role of nitric oxide in low level light therapy. *Proc SPIE*. 2008;(6846):684602–14.

Harada M, Kenmotsu S, Nakasone N, Nakamura KO, Ohshima H. Cell dynamics in the pulpal healing processing following cavity preparation in rat molars. *Histochem Cell Biol*. 2008 Oct;130(4):773-83.

Haraguchi Y, Shimizu T, Sasagawa T, Sekine H, Sakaguchi K, Okano T, et al. Fabrication of functional three-dimensional tissues by stacking cell sheets in vitro. *Nature protocols*. 2012;7(5):850-8.

Harumi SPM, Kerkis I, Maranduba CMC, Gomes CM, Martins MD, Marques MM. Expression of extracellular matrix proteins in human dental pulp stem cells depends on the donor tooth conditions. *J Endod*. 2011;36(5):826-31.

He H, Liu R, Desta T, Leone C, Gerstenfeld L C, Graves D T. Diabetes causes decreased osteoclastogenesis, reduced bone formation, and enhanced apoptosis of osteoblastic cells in bacteria stimulated bone loss. *Endocrinology* 2004;145: 447-52.

Hirose Y, Yamamoto T, Nakashima M, Funahashi Y, Matsukawa Y, Yamaguchi M, Kawabata S, Gotoh M. Injection of dental pulp stem cells promotes healing of damaged bladder tissue in a rat model of chemically induced cystitis. *Cell Transplant* 2016;25:425–36.

Hou J, Zhang H, Yuan X, Li J, Wei Y, Hu S. In vitro effects of low-level laser irradiation for bone marrow mesenchymal stem cells: proliferation, growth factors secretion and myogenic differentiation. *Lasers Surg Med.* 2008;40(10):726–33.

Huang GT, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res.* 2009;88(9):792–806.

Huang YY, Chen ACH, Carroll JD, Hamblin MR. Biphasic dose response in low level light therapy. *Dose Response.* 2009;7(4):358–83.

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

Hwang HI, Lee TH, Jang YJ. Cell Proliferation-Inducing Protein 52/Mitofilin Is a Surface Antigen on Undifferentiated Human Dental Pulp Stem Cells. *Stem Cells Dev.* 2015,Jun;24(11):1309-19.

Iohara K, Nakashima M, Ito M, Ishikawa M, Nakasima A, Akamine A. Dentin regeneration by dental pulp stem cell therapy with recombinant human bone morphogenetic protein 2. *J Dent Res.* 2004;(83):590-95.

Ivers RQ, Cumming RG, Mitchell P, Peduto AJ, Blue Mountains Eye Study. Diabetes and risk of fracture: The Blue Mountains Eye Study. *Diabetes Care.* 2001 Jul;24(7):1198-203.

Jawhar DS, Hassan NA, Shamssain MH. Dual-energy x-ray absorptiometry scan (DXA) findings in diabetic and non-diabetic female: A retrospective cohort study. *Med J Malaysia.* 2020 Jan;75(1):47-51.

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

Karu T, Pyatibrat L, Kalendo G. Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro. *J Photochem Photobiol B Biol.* 1995a;27(3):219–23.

Karu T. Interaction of monochromatic visible light and near infra- red radiation with cells: currently discussed mechanisms, SPIEProc. 1995b;2391(1995):576-86.

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

Karu TI, Kolyakov SF. Exact action spectra for cellular responses relevant to phototherapy. Photomed Laser Surg. 2005;(23):355-36.

Karu TI, Pyatibrat LV, Afanasyeva NI. Cellular effects of low power laser therapy can be mediated by nitric oxide. Lasers Surg Med. 2005, Apr;36(4):307-14.

Karu TI. Laser biostimulation: a photobiological phenomenon. J Photochem Photobiol. 1989;(4)3: 638-40.

Karu TI. Mitochondrial signaling in mammalian cells activated by red and near-Irradiation. Photochem Photobiol. 2008, Sep-Oct;84(5):1091-9.

Karu TI, Afanas'eva. [Cytochrome c oxidase as the primary photoacceptor upon laser exposure of cultured cells to visible and near IR-range light]. Dokl Akad Nauk. 1995 Jun;342(5):693-5.

Kasperk C, Georgescu C, Nawroth P. Diabetes Mellitus and Bone Metabolism. Exp Clin Endocrinol Diabetes. 2017 Apr;125(4):213-7.

Kato K, Shinizawa K, Yoshikawa S. Cytochrome oxidase is a possible photoreceptor in mitochondria, Photobiochem. Photobiophys. 1981;(2):263-9.

Kawashima N. Characterisation of dental pulp stem cells: a new horizon for tissue regeneration. Arch Oral Biol. 2012 Nov;57(11):1439-58.

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

Lei M, Li K, Li B, Gao LN, Chen FM, Jin Y. Mesenchymal stem cell characteristics of dental pulp and periodontal ligament stem cells after in vivo transplantation. Biomaterials. 2014 Aug;35(24):6332-43.

Levine M, Rumse SC, Daruwala R, Park JB, Wang Y. Criteria and recommendations for vitamin C intake. *JAMA*. 1999;(281)15:1415-23.

Li M, Feng C, Gu X, He Q, Wei F. Effect of cryopreservation on proliferation and differentiation of periodontal ligament stem cell sheets. *Stem Cell Res Ther*. 2017 Apr 17;8(1):77.

Marques MM, Diniz IM, de Cara SP, Pedroni AC, Abe GL, D'Almeida-Couto RS, Lima PL, Tedesco TK, Moreira MS. Photobiomodulation of Dental Derived Mesenchymal Stem Cells: A Systematic Review. *Photomed Laser Surg*. 2016 Nov;34(11):500-8.

Matsumoto K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor (HGF) as a tissue organizer for organogenesis and regeneration. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;239:639–644.

Matsui S, Takeuchi H, Tsujimoto Y, Matsushima K. Effects of Smads and BMPs induced by Ga-Al-As laser irradiation on calcification ability of human dental pulp cells. *J Oral Sci*. 2008;50(1):75–81.

Matsui S, Tsujimoto Y, Matsushima K. Stimulatory effects of hydroxyl radical generation by Ga-Al-As laser irradiation on mineralization ability of human dental pulp cells. *Biol Pharm Bull*. 2007;30(1):27–31.

Mester E, Szende B, Gärtner P. [The effect of laser beams on the growth of hair in mice]. *Radiobiol Radiother (Berl)*. 1968;9(5):621-6. German.

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

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*. 2016 Dec 2;166:180-6.

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

Moreira MS, Velasco IT, Ferreira LS, Ariga SK, Barbeiro DF, Meneguzzo DT, Abatepaulo F, Marques MM. Effect of phototherapy with low intensity laser on local and systemic immunomodulation following focal brain damage in rat. *J Photochem Photobiol B*. 2009 Dec 2;97(3):145-51.

Nakamura A, Akahane M, Shigematsu H, Tadokoro M, Morita Y, Tanaka Y, et al. Cell sheet transplantation of cultured mesenchymal stem cells enhances bone formation in a rat nonunion model. *Bone*. 2010;(46):418–24.

Nandi D, Patra RC, Swarup D. Effect of cysteine, methionine, ascorbic acid and thiamine on arsenic-induced oxidative stress and biochemical alterations in rats. *Toxicology*. 2005;(211):226–35.

Napoli N, Chandran M, Pierroz DD, Abrahamsen B, Schwartz AV, Ferrari SL; IOF Bone and Diabetes Working Group. Mechanisms of diabetes mellitus-induced bone fragility. *Nat Rev Endocrinol*. 2017 Apr;13(4):208-19.

Nicola FD, Marques MR, Odorcyk F, Arcego DM, Petenuzzo L, Aristimunha D, et al. Neuroprotector effect of stem cells from human exfoliated deciduous teeth transplanted after traumatic spinal cord injury involves inhibition of early neuronal apoptosis. *Brain Res*. 2017;1663:95–105.

Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, Watanabe K, Okano T, Tano Y, et al. Corneal reconstruction with tissue engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. *N Engl J Med*. 2004;(351):1187–96.

Ohashi K, Yokoyama T, Yamato M, Kuge H, Okano T, Nakajima Y, et al. Engineering functional two- and three-dimensional liver systems in vivo using hepatic tissue sheets. *Nat Med*. 2007;(13):880–5.

Okano T, Yamada N, Okuhara M, Sakurai Y. Mechanism of cell detachment from temperature-modulated, hydrophilic–hydrophobic polymer surfaces. *Biomaterials*. 1995;(16):297–303.

Okano T, Yamada N, Sakai H, Sakurai Y. A novel recovery system for cultured cells using plasma-treated polystyrene dishes grafted with poly (N-isopropylacrylamide). *J Biomed Mater Res*. 1993;(27):1243–51.

Oliveira NK, Salles THC, Pedroni AC, Miguita L, D'Ávila MA, Marques MM, Deboni MCZ. Osteogenic potential of human dental pulp stem cells cultured onto poly-ε-caprolactone/poly (rotaxane) scaffolds. *Dent Mater*. 2019 Dec;35(12):1740-9.

Oreffo RO, Triffitt JT. Future potentials for using osteogenic stem cells and biomaterials in orthopedics. *Bone*. 1999 Aug;25(2 Suppl):5S-9S.

Park IS, Mondal A, Chung PS, Ahn JC. Vascular regeneration effect of adipose-derived stem cells with light-emitting diode phototherapy in ischemic tissue. *Lasers Med Sci*. 2015 Feb;30(2):533-41.

Park K, Huang J, Azar F, Jin RL, Min BH, Hasty K, et al. Scaffold-free, engineered porcine cartilage construct for cartilage defect repair--in vitro and in vivo study. *Artif Organs*. 2006 Aug;30(8):586-96.

Pedroni ACF, Diniz IMA, Abe GL, Moreira MS, Sipert CR, Marques MM. Photobiomodulation therapy and vitamin C on longevity of cell sheets of human dental pulp stem cells. *J Cell Physiol*. 2018 Oct;233(10):7026-35.

Pedroni ACF, Sarra G, de Oliveira NK, Moreira MS, Deboni MCZ, Marques MM. Cell sheets of human dental pulp stem cells for future application in bone replacement. *Clin Oral Investig*. 2019 Jun;23(6):2713-21.

Pelliccioli AC, Martins MD, Dillenburg CS, Marques MM, Squarize CH, Castilho RM. Laser phototherapy accelerates oral keratinocyte migration through the modulation of the mammalian target of rapamycin signaling pathway. *J Biomed Opt*. 2014 Feb;19(2):028002.

Pereira AN, Eduardo Cde P, Matson E, Marques MM. Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. *Lasers Surg Med*. 2002;31(4):263-7.

Petridis X, Diamanti E, Trigas GC, Kalyvas D, Kitraki E. Bone regeneration in critical-size calvarial defects using human dental pulp cells in an extracellular matrix-based scaffold. *J Craniomaxillofac Surg*. 2015;43:483–90.

Pierdomenico L, Bonsi L, Calvitti M, Rondelli D, Arpinati M, Bagnara GP, et al. Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. *Transplantation*. 2005 Sep 27;80(6):836-42.

Potdar PD, D'Souza SB. Ascorbic acid induces in vitro proliferation of human subcutaneous adipose tissue derived mesenchymal stem cells with upregulation of embryonic stem cell pluripotency markers Oct4 and SOX 2. *Hum Cell*. 2010;23(4):152–5.

Romão MM, Marques MM, Cortes AR, Horliana AC, Moreira MS, Lascale CA. Micro-computed tomography and histomorphometric analysis of human alveolar bone repair induced by laser phototherapy: a pilot study. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2015 Dec;44(12):1521-8.

Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibular facial nonunions. *Clin Orthop Relat Res*. 1996 Apr;(2015):299-308.

Schwarz F, Rothamel D, Herten M, Sager M, Becker J. Angiogenesis pattern of native and cross-linked collagen membranes: an immunohistochemical study in the rat. *Clin Oral Implants Res*. 2006 Aug;17(4):403-9.

Schwarz F, Rothamel D, Herten M, Wüstefeld M, Sager M, Ferrari D, Becker J. Immunohistochemical characterization of guided bone regeneration at a dehiscence-type defect using different barrier membranes: an experimental study in dogs. *Clin Oral Implants Res*. 2008 Apr;19(4):402-15.

Sendyk DI. Avaliação radiográfica e histológica comparativa entre uma nova membrana eletrofiada de PCL/poli(rotaxona) e uma membrana de colágeno suíno na regeneração óssea guiada de defeito crítico em calvária de ratos Wistar [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2014.

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

Sharma LA, Sharma A, Dias GJ. Advances in regeneration of dental pulp – a literature review. *J Invest Clin Dent*. 2013 Aug;(4):1-14.

Shi Y, Zhao Y, Deng H. Powering reprogramming with vitamin C. *Cell Stem Cell*. 2010;(1)6:1-2.

Shimizu T, Sekine H, Yang J, Isoi Y, Yamato M, Okano T, et al. Polysurgery of cell sheet grafts overcomes diffusion limits to produce thick, vascularized myocardial tissues. *FASEB J*. 2006;(20):708-10.

Silva Fde S, Ramos RN, de Almeida DC, Bassi EJ, Gonzales RP, Miyagi SP, et al. Mesenchymal stem cells derived from human exfoliated deciduous teeth (SHEDs) induce immune modulatory profile in monocyte-derived dendritic cells. *PLoS One*. 2014 May 20;9(5):e98050.

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

Spicer PP, Kretlow JD, Young S, Jansen JA, Kasper FK, Mikos AG. Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. *Nat Protoc*. 2012 Oct;7(10):1918-29.

Starup-Linde J, Vestergaard P. Biochemical bone turnover markers in diabetes mellitus - A systematic review. *Bone*. 2016 Jan;82:69-78.

Stone N, Meister A. Function of ascorbic acid in the conversion of proline to collagen hydroxyproline. *Nature*. 1962;(194):555–7.

Tadakuma T. Possible Application of the laser in immunobiology. *Keio J Med*. 1993;42(4):180–2.

Tal H, Kozlovsky A, Artzi Z, Nemcovsky CE, Moses O. Long-term bio-degradation of cross-linked and non-cross-linked collagen barriers in human guided bone regeneration. *Clin Oral Implants Res*. 2008 Mar;19(3):295-302.

Tata DB, Waynant RW. Laser therapy: A review of its mechanism of action and potential medical applications. *Laser Photon Rev*. 2011;5(1):1–12.

Ueyama Y, Yagyuu T, Maeda M, Imada M, Akahane M, Kawate K, Tanaka Y, Kirita T. Maxillofacial bone regeneration with osteogenic matrix cell sheets: an experimental study in rats. *Arch Oral Biol*. 2016;72:138–45.

Wada N, Menicanin D, Shi S, Bartold PM, Gronthos S. Immunomodulatory properties of human periodontal ligament stem cells. *J Cell Physiol*. 2009 Jun;219(3):667-76. doi: 10.1002/jcp.21710.

Wang J, Zhang R, Shen Y, Xu C, Qi S, Xu Y, et al. Recent Advances in Cell Sheet Technology for Periodontal Curr Stem Cell Res T. 2014;(3)9:162-73.

Wang X, Li G, Guo J, Yang L, Liu Y, Sun Q, et al. Hybrid composites of mesenchymal stem cell sheets, hydroxyapatite, and platelet-rich fibrin granules for bone regeneration in a rabbit calvarial critical-size defect model. Exp Ther Med. 2017 May;13(5):1891-1899.

Wei F, Qu C, Song T, Ding G, Fan Z, Wang S, et al. Vitamin C treatment promotes mesenchymal stem cell sheet formation and tissue regeneration by elevating telomerase activity. J Cell Physiol. 2012;(9)2:3216-24.

Wongdee K, Charoenphandhu N. Osteoporosis in diabetes mellitus: Possible cellular and molecular mechanisms. World J Diabetes. 2011 Mar 15;2(3):41-8.

Wongdee K, Charoenphandhu N. Update on type 2 diabetes-related osteoporosis. World J Diabetes. 2015 Jun 10;6(5):673-8.

Wu H, Wu Y, Ai Z, Yang L, Gao Y, Zhang Y, et al. Vitamin C enhances nanog expression via activation of the JAK/STAT signaling pathway. Stem Cells. 2014;(1)32:166-76.

Wu JY, Chen CH, Yeh LY, Yeh ML, Ting CC, Wang YH. Low-power laser irradiation promotes the proliferation and osteogenic differentiation of human periodontal ligament cells via cyclic adenosine monophosphate. Int J Oral Sci 2013;5(2):85–91.

Xavier Acasigua GA, Bernardi L, Braghirolli DI, Filho MS, Pranke P, Medeiros Fossati AC. Nanofiber scaffolds support bone regeneration associated with pulp stem cells. Curr Stem Cell Res Ther. 2014;9(4):330-7.

Yamato M, Okano T. Cell sheet engineering. Materials today. 2004;(5)7:42-7.

Yang C, Li X, Sun L, Guo W, Tian W. Potential of human dental stem cells in repairing the complete transection of rat spinal cord. J Neural Eng. 2017; 14:026005.

Yang J, Yamato M, Kohno C, Nishimoto A, Sekine H, Okano T, et al. Cell sheet engineering: recreating tissues without biodegradable scaffolds. Biomaterials. 2005;(33)26:6415-22.

Yang J, Yamato M, Shimizu T, Sekine H, Ohashi K, Okano T, et al. Reconstruction of functional tissues with cell sheet engineering. *Biomaterials*. 2007; 28(34):5033-43.

Yu J, He H, Tang C, Zhang G, Li Y, Wang R, Shi J, Jin Y. Differentiation potential of STRO1+ dental pulp stem cells changes during cell passaging. *BMC Cell Biol*. 2010 May 8;11:32.

Zhang Q, Shi S, Liu Y, Uyanne J, Shi Y, Shi S, Le AD Mesenchymal stem cells derived from human gingiva are capable of immunomodulatory functions and ameliorate inflammation-related tissue destruction in experimental colitis. *J Immunol*. 2009 Dec 15;183(12):7787-98.

Zhao YH, Zhang M, Liu NX, Lv X, Zhang J, Chen YJ, et al. The combined use of cell sheet fragments of periodontal ligament stem cells and platelet-rich fibrin granules for avulsed tooth reimplantation. *Biomaterials*. 2013;(22)34:5506-20.

Zhou Y, Li Y, Mao L, Peng H. Periodontal healing by periodontal ligament cell sheets in a teeth replantation model. *Arch. Oral Biol*. 2012;(2)57:169-76.

Zhukouskaya VV, Eller-Vainicher C, Vadzianava VV, Shepelkevich AP, Zhurava IV, Korolenko GG, Salko OB, Cairoli E, Beck-Peccoz P, Chiodini I. Prevalence of morphometric vertebral fractures in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2013 Jun;36(6):1635-40.

Zitzmann NU, Naef R, Schärer P. Resorbable versus nonresorbable membranes in combination with Bio-Oss for guided bone regeneration. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1997 Nov-Dec;12(6):844-52. Erratum in: *Int J Oral Maxillofac Implants* 1998 Jul-Aug;13(4):576.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

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

Título da Pesquisa: Efeito da cell sheet de células-tronco da polpa dentária humana, associada ou não à terapia de fotobiomodulação, na regeneração de lesões ósseas críticas em calvárias de ratos portadores de Diabetes Mellitus tipo 2

Pesquisador: Márcia Martins Marques

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 68562817.2.0000.0075

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.097.282

Apresentação do Projeto:

Este projeto pretende avaliar usando ensaios in vitro e in vivo o efeito do uso de monocamadas de células tronco da polpa dentária humana, associadas ou não à terapia de fotobiomodulação, na regeneração de lesões ósseas críticas em calvária de ratos diabéticos. Em 72 ratos diabéticos serão realizadas lesões ósseas críticas padronizadas no osso parietal, que serão tratadas de acordo com os grupos experimentais definidos. Após 4 e 8 semanas da cirurgia, a calota craniana será dissecada, fixada e submetida às análises: por microtomografia computadorizada, por análises histoquímicas e imuno-histoquímicas e os dados serão estatisticamente analisados.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar o efeito da terapia de fotobiomodulação nas células tronco de polpa dentária humana implantadas em ratos "Zucker Diabetic Fatty".

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos são mínimos, pois se trata do uso de cultura de células tronco extraídas de dentes implantadas em rato. Os riscos são os inerentes aos existentes na extração dentária. Não existem benefícios diretos aos participantes da pesquisa.

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Cidade: Cidade Universitária
CEP: 05.508-900
UF: SP
Município: SÃO PAULO
Telefone: (11)3091-7960
Fax: (11)3091-7814
E-mail: ceplo@usp.br

USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 2.087.282

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante, que contribuirá para melhor compreensão dos efeitos da fotobiomodulação em células tronco, quando utilizadas em implantes para reparo, inclusive em diabéticos, avaliando infiltrado neutrofílico e linfocitário, necrose, presença de tecido de granulação, osteogênese e formação e organização da matriz colagênica.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foi apresentado o formulário de informações básicas do projeto, o TCLE, o cronograma do projeto atualizado e corrigido, a autorização para uso da clínica da FUNDECTO, a folha de rosto, a aprovação do projeto na CEUA, a declaração de biorepositório e o projeto detalhado, estando todos conformes.

Recomendações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final, utilizando-se da opção "Enviar Notificação" (descrita no Manual "Submeter Notificação", disponível na Central de Suporte - canto superior direito do site www.saude.gov.br/plataformabrasil).

Qualquer alteração no projeto original deve ser apresentada "emenda" a este CEP, de forma objetiva e com justificativas para nova apreciação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_658678.pdf	17/05/2017 19:33:09		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_ANAautorado_corrigido1.docx	17/05/2017 19:32:30	Márcia Martins Marques	Aceito
Cronograma	cronograma_Doc_ANA_corrigido.docx	04/05/2017 22:18:48	Márcia Martins Marques	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AutorizaçãodePesquisa_doc2017_1.pdf	18/04/2017 22:04:34	Márcia Martins Marques	Aceito

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3091-7980

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 2.087.262

Folha de Rosto	FolhadeRosto_CEPdoc2017_1.pdf	18/04/2017 22:01:18	Márcia Martins Marques	Aceito
Outros	Certificado_Aprovacao_CEUArato_Zuc ker.pdf	15/03/2017 12:31:29	Márcia Martins Marques	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Regulamento_Biorepositório.doc	23/02/2017 22:00:16	Márcia Martins Marques	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_fapesp_CEP_23022017.docx	23/02/2017 19:35:20	Márcia Martins Marques	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SÃO PAULO, 02 de Junho de 2017

Assinado por:
Maria Gabriela Haye Blazevic
(Coordenador)

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3091-7900

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

ANEXO B– Parecer do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE ODONTOLOGIA

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

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito da cell sheet de células-tronco da polpa dentária humana, associada ou não à terapia de fotobiomodulação, na regeneração de lesões ósseas críticas em calvárias de ratos portadores de Diabetes Mellitus tipo 2", registrada com o nº 002/2017, sob a responsabilidade de Marcia Martins Marques, Ana Clara Fagundes Pedroni, Maria Stela Moreira, Thais Gimenez Miniello, Natália Kaline de Oliveira, Natalia Caroline Aguiar Tartaroti, Fernando Amorim Mendonça Alves, Giovanna Serra, Giovanna Lopes, Pamela Kulcz Roling Gonçalves, 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 6.099, 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 13/03/2017.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	13/03/2017 A 13/03/2020
Espécie/inhagem/raça	Rato transgênico Zucker Diabetic Fatty
Nº de animais	72
Peso/idade	300-400g / 9 semanas
Sexo	Masculino
Origem	Centro de desenvolvimento de modelos experimentais para biologia e medicina (CEDEME) da UNIFESP

São Paulo, 14 de março de 2017.

Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chavez
Coordenador do CEUA-FOUSP