

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

CARLOS AKIO SABACK MIURA

**Efeito do laser de baixa potência sobre células tronco da polpa
de dentes decíduos esfoliados humanos (SHED)**

BAURU
2014

CARLOS AKIO SABACK MIURA

**Efeito do laser de baixa potência sobre células tronco da polpa
de dentes decíduos esfoliados humanos (SHED)**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia
de Bauru da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências no
Programa de Ciências Odontológicas
Aplicadas, na área de concentração
Odontopediatria.

Orientador: Profa. Dra Maria Aparecida de
Andrade Moreira Machado

Versão corrigida

BAURU
2014

M699e Miura, Carlos Akio Saback
Efeito do laser de baixa potência sobre células
tronco da polpa de dentes decíduos esfoliados
humanos (SHED) / Carlos Akio Saback Miura. –
Bauru, 2014.
71p. : il. ; 31cm.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia
de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientador: Profa. Dra. Maria Aparecida de
Andrade Moreira Machado

Nota: A versão original desta dissertação/tese encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

Autorizo exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:05/12/2014

DEDICATÓRIA

A Deus

Aos meus pais Miura e Maria

A minha noiva Valdivia Alves de Sousa

AGRADECIMENTOS

Esta Tese representa cada segundo vivenciado dentro da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, instituição que me fez crescer na parte acadêmica e pessoal. Agradeço a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a conquista deste grande objetivo, dentre os quais destaco:

Prof^a Dr^a Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado, melhor dizendo, professora Cidinha. Obrigado por acreditar em mim. Nunca me esquecerei da frase que me disse na sua sala quando tivemos a nossa primeira reunião. “Orientado meu não fica desempregado, mas para isso tem que conquistar o seu espaço”. Mesmo com as inúmeras atividades que tinha que cumprir como Vice-Diretora e agora como Diretora da FOB e Professora da graduação e pós-graduação, sempre encontrava um tempo para atender a todos os seus orientados, mesmo que fosse durante o turno noturno.

Prof^a Dr^a Paloma Dias da Silva Telles. Agradeço pela sua paciência e dedicação nos momentos mais difíceis que tive que atravessar. Você bem sabe como o meu caminho até aqui foi árduo e cheio de obstáculos. Mas como sempre me disse, eu não poderia parar no Mestrado. Grande incentivadora, você foi a minha bússola, que me guiou na melhor das direções e me ajudou a encontrar o rumo certo neste mar de turbulências que naveguei até aqui.

Prof Dr Diego Menezes por abrir as portas do laboratório NBBio – Núcleo de Biotecnologia e Bioprospecção da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, e possibilitar a realização da pesquisa. Muito obrigado por me acompanhar durante a realização dos experimentos. Sua dedicação e competência com um recém-chegado ao laboratório me deram a força que eu precisava para vencer!

Thiago, Mariana, Katharine, Marizete, Samuel, Evandro e André Conrado, companheiros do NBBIO, obrigado pela ajuda no laboratório.

Prof Dr Vanderlei Salvador Bagnato do CEPOF/IFSC/USP por ceder o aparelho de laser usado na pesquisa.

Prof^a Dr^a Salete, Prof Dr Rui, Prof Dr José Eduardo, Prof^a Dr^a Thaís e Prof^a Dr^a Daniela por toda troca de experiências na clínica de Odontopediatria da FOB.

Funcionários Dona Lia, Estela, Lilian e Alexandre por receberem o baiano de braços abertos.

A Ana Lúcia por me dar apoio quando precisei durante estes anos em Bauru.

Tatiana, Natalino, Juliana, Adriana, Mariana, Susi, Sileide e Carla meus colegas de Doutorado, obrigado.

À minha família, pai, mãe e irmãs, obrigado por aturarem todos os meus momentos de estresse e por segurarem as pontas em Salvador durante o período em que estive longe.

Minha noiva Valdivia, palavras são poucas para dizer o que fez por mim durante este Doutorado. Aguentar tanto tempo longe de você não foi fácil. Guerreira como você é, sempre me apoiou e me deu toda a força que eu necessitava para concluir mais uma etapa da nossa vida. Sempre que me encontrava estressado uma simples ligação sua me dava um novo ânimo para continuar.

Agradeço a CAPES pela bolsa oferecida que me ajudou a me manter em Bauru durante este período.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

RESUMO

Avaliou-se a proliferação das células tronco da polpa de dentes decíduos esfoliados humanos (SHED) após aplicação única do laser de baixa potência. Foi realizada a análise da viabilidade das SHED cultivadas sob déficit nutricional e em condições ideais após irradiação com o laser de baixa potência vermelho de Índio Gálio Alumínio e Fósforo - InGaAlP (660nm, 40mW e 10J/cm²) e infravermelho (780nm, 40mW e 10J/cm²) durante 4 e 8 segundos, nos períodos de 24, 48 e 72 horas através dos ensaios de redução do MTT e do ensaio colorimétrico de Busatti e Gomes. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA complementado pelo teste de Tukey com nível de significância de 5% (p< 0,05). Observou-se tanto com o MTT quanto com o ensaio colorimétrico de Busatti e Gomes uma tendência de aumento da proliferação celular diretamente relacionada à dose do LBP, estatisticamente significativa nos períodos de 24, 48 e 72 horas. Ao analisar os resultados e considerando os parâmetros utilizados e o protocolo de LBP, pode-se concluir que o LBP promoveu a proliferação das SHED tanto a 660 nm quanto a 780nm, pode influenciar a viabilidade e a proliferação das SHED nas doses e comprimentos de onda utilizados e os ensaios do MTT e colorimétrico de Busatti e Gomes demonstraram dentro de suas limitações ser eficientes para determinar a viabilidade e proliferação das SHED.

Palavras-chave: Células tronco. Laser. Polpa dentária.

ABSTRACT

Effect of low level laser on stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED)

It was evaluated the proliferation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) after a single application of low power laser. The viability of SHED grown under ideal conditions and under nutritional deficit after irradiation with red laser (660/780nm, 10J/cm² and 40mW) during periods of 4 and 8 seconds was analyzed through the MTT reduction assays and rapid colorimetric assay of Busatti and Gomes. Statistical analysis was performed using the ANOVA and Tukey's multiple comparisons test with a significance level of 5% ($p < 0.05$). It was observed with the MTT assay and Busatti and Gomes assay a trend of cell proliferation increase directly related to the irradiation dose, statistically significant. After 24, 48 and 72 hours, all the groups showed higher cell proliferation when compared to control. Analyzing the results and considering the used parameters and LBP protocol, it can be concluded that LBP promoted the proliferation of SHED both 660nm and 780nm according to the dosage and wavelengths used, and MTT assay and colorimetric Busatti and Gomes demonstrated within their limitations to be effective in determining the viability and proliferation of SHED.

Keywords: Stem Cells. Laser. Dental pulp.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

Figura 1 - Possíveis aplicações de células tronco da polpa dentária na Odontologia.....	31
Figura 2 - Substituição do implante de titânio pelo “implante biológico”.....	32
Figura 3 - SHED em microscópio óptico no aumento de 10X	41
Figura 4 - Distribuição dos grupos teste e controle	46
Figura 5 - Dispositivo de cartolina preta.....	47
Figura 6 - Tira de cartolina preta	47
Figura 7 - Aparelho de Laser de Baixa Potência de InGaAIP (Twin flex evolution [®] – MMOptics)	48

- GRÁFICOS

Gráfico 1 Redução do MTT 24 horas	53
Gráfico 2 Redução do MTT 48 horas	54
Gráfico 3 Redução do MTT 72 horas	54
Gráfico 4 Busatti e Gomes 24 horas	55
Gráfico 5 Busatti e Gomes 48 horas	56
Gráfico 6 Busatti e Gomes 72 horas	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição do DMEM	42
Tabela 2 - Componentes do SFB	43
Tabela 3 - Composição do tampão fosfato salino	44
Tabela 4 - Componentes da tripsina	45

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ATP	Trifosfato de Adenosina
CEPOF	Centro de Pesquisa em Óptica e Fotônica
CO ₂	Gás carbônico
CP	Controle Positivo
CN	Controle Negativo
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPSC	Células tronco da polpa dentária (<i>Dental Pulp Stem Cells</i>)
EBMSP	Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública
EUA	Estados Unidos da América
FACS	Marcador celular ativado por fluorescência
FOB	Faculdade de Odontologia de Bauru
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
G	Grupo
GaAIs	Arseneto de Gálio e Alumínio
hDPSC humanos	Células tronco da polpa dentária de dentes permanentes humanos
IFSC	Instituto de Física de São Carlos
InGaAlP	Índio Gálio Alumínio e Fósforo
J/cm ²	Joules por centímetro quadrado
LASER	amplificação da luz por emissão estimulada de radiação (<i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i>)
LBP	Laser de baixa potência
LETI	Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia
LTDA	Limitada
LV	Laser vermelho
mg	miligrama
mg/L	miligrama por litro
mm	milímetro
mM	milimolar

mW	megawatts
MTT	<i>Metiltetrazolium</i> [3-(4.5-dimethylthiazol-2yl)]-2.5 <i>diphenyltetrazoliumbromide</i>
NBBIO	Núcleo de Biotecnologia e Bioprospecção
nm	nanômetros
NY	Nova Iorque
PBS	Tampão fosfato salino
pH	potencial de hidrogênio
RNA	Ácido Ribonucleico
RPM	rotações por minuto
SFB	Soro Fetal Bovino
SHED	Células tronco da polpa de dentes decíduos esfoliados
SP	São Paulo
USP	Universidade de São Paulo
USA	Estados Unidos da América (<i>United States of America</i>)
µg/ml	microgramas por mililitro

LISTA DE SÍMBOLOS

®	Marca registrada
≈	Aproximadamente
°C	Graus centígrados
<	Menor que
p	valor de p

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1	CONCEITO DE CÉLULAS TRONCO	25
2.2	ESTRUTURA DA POLPA DENTÁRIA	25
2.3	OBTENÇÃO DE CÉLULAS TRONCO DA POLPA DENTÁRIA	26
2.4	CÉLULAS TRONCO DA POLPA DE DENTES PERMANENTES (DPSC)	27
2.5	CÉLULAS TRONCO DA POLPA DE DENTES DECÍDUOS ESFOLIADOS HUMANOS (SHED)	28
2.6	PERSPECTIVAS DE APLICAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO DA POLPA DENTÁRIA NA ODONTOLOGIA	29
2.7	LASER DE BAIXA POTÊNCIA NA ODONTOLOGIA	32
3	PROPOSIÇÃO	35
4	MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1	MATERIAL PARA CULTURA CELULAR	41
4.1.1	Linhagem Celular	41
4.1.2	Meio de cultura	42
4.1.3	Soro fetal bovino (SFB)	42
4.1.4	Tampão fosfato salino - PBS	44
4.1.5	Penicilina / Estreptomicina	44
4.1.6	Dimetil Sulfóxido – DMSO	44
4.1.7	Tripsina	44
4.2	MÉTODO DE CULTURA CELULAR	45
4.3	DISPOSITIVO DE CARTOLINA PRETA	47
4.4	DISPOSITIVO PARA FOTOTERAPIA	47
4.5	REDUÇÃO DO MTT	49
4.6	ENSAIO COLORIMÉTRICO DE BUSATTI E GOMES	49
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	50
5	RESULTADOS	51
5.1	ANÁLISE DA REDUÇÃO DO MTT	53
5.2	ANÁLISE DO ENSAIO COLORIMÉTRICO DE BUSATTI E GOMES	55

6	DISCUSSÃO	57
7	CONCLUSÕES	63
	REFERÊNCIAS	67

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

A cárie dentária ainda é um problema de Saúde Pública no Brasil. Em Odontopediatria, a perda precoce de um dente decíduo ou permanente jovem implicará numa série de problemas relacionados ao desenvolvimento da oclusão e estética, podendo também gerar problemas psicológicos à criança devido ao *bullying*. Apesar de todo desenvolvimento tecnológico e dos avanços nas pesquisas sobre biomateriais, até a presente data não existe um material que substitua em todas as características o dente humano. A engenharia de tecidos tem avançado muito nos últimos anos contribuindo para mudar paradigmas científicos e com isso, abriu perspectivas para mudanças impactantes na área da saúde. As pesquisas com células tronco da polpa dentária têm avançado no mundo com o objetivo de formar a partir destas células um dente com forma, função e características semelhantes ao dente humano. Alguns autores, utilizando-se de proteínas, obtiveram a formação de tecido dentinário a partir de células tronco da polpa dentária (KABIR *et al* 2014, SAKAI *et al* 2010).

Atualmente vivemos na era da Odontologia Preventiva, porém, há uma necessidade de que a Odontologia evolua para a era da Odontologia Molecular, onde os avanços no conhecimento sobre a função e organização de células e moléculas serão modificadores positivos para o reparo das estruturas dentárias comprometidas pelo processo das doenças bucais, sendo a cárie dentária a principal delas. O uso de células tronco da polpa dentária na engenharia tecidual e regeneração tecidual para substituir as terapias convencionais tem sido objeto de estudos nas diversas áreas (Eduardo *et al* 2008, KABIR *et al* 2014). Não restam dúvidas de que estas células possuem um grande potencial de aplicação clínica na Odontologia, porém a decisão de estabelecer um protocolo de aplicação clínica com células tronco da polpa dentária em seres humanos necessita de inúmeras análises quanto aos riscos e benefícios à saúde do paciente. Durante a manipulação dessas células em laboratório, elas passam por situações de estresse que podem levar ao déficit nutricional. Por isso, as pesquisas estão buscando formas de minimizar este estresse sofrido pela célula para a realização do seu transplante em humanos. Uma das vertentes que busca diminuir os efeitos do déficit nutricional é a terapia fotônica com o laser (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*), dispositivo que

amplifica a luz por emissão estimulada de radiação e produz radiação eletromagnética monocromática, coerente e colimada.

Em 2008, Eduardo *et al* afirmaram que o laser de InGaAIP estimula a proliferação de células tronco da polpa de dentes permanentes humanos hDPSC sob déficit nutricional. Em 2013 Elnaghe *et al* afirmaram que o laser de baixa potência pode estimular ou reduzir a proliferação de células tronco da polpa de dentes decíduos humanos esfoliados (SHED). Porém, até o presente momento não há um protocolo ideal estabelecido para a utilização do laser e células tronco da polpa dentária em terapias com humanos. Existem tempos de irradiação, comprimento de onda, potência e tipos de laser diferentes e por isso ainda não foi possível estabelecer um protocolo ideal de uso, fazendo com que mais estudos sejam necessários.

Portanto, o objetivo desta Tese foi fazer uma revisão de literatura sobre laser de baixa potência e células tronco da polpa dentária de dentes decíduos (SHED) e permanentes (DPSC), e avaliar a proliferação das SHED após aplicação única do laser de baixa potência Índio Gálio Alumínio Fósforo – InGaAIP (Twinflex evolution MMOptics® LTDA – São Carlos, SP, Brasil).

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CONCEITO DE CÉLULAS TRONCO

As células tronco são definidas como células clonogênicas capazes de auto renovação, de multiplicar-se sem a perda de suas propriedades, e diferenciação multilinhagem, onde a depender do estímulo a que forem submetidas, são capazes de se diferenciar em células de tecidos adultos especializados e regenerar órgãos em diferentes partes do corpo humano como coração, ossos, músculos e sistema nervoso. Podem ser de origem embrionária ou pós-natais (adultas) e são classificadas segundo seu potencial de desenvolvimento em unipotentes, multipotentes, pluripotentes ou totipotentes. As células unipotentes são capazes de diferenciar-se em um tipo celular. As multipotentes dão origem a tipos celulares específicos, as pluripotentes são capazes de se produzir células dos três folhetos embrionários, e as totipotentes são capazes de gerar um organismo inteiro. As células tronco adultas não são totipotentes e são classificadas de acordo com a sua origem e capacidade de diferenciação (GRONTHOS *et al* 2002; KABIR *et al* 2014; KREBSBACH *et al* 2002, MIURA *et al* 2010, TELLES *et al* 2011). Devido aos entraves que dificultavam estudos com as células tronco embrionárias, houve um aumento na quantidade de estudos com células tronco adultas. Estas células têm sido isoladas de uma variedade de tecidos dentre as quais podemos citar medula óssea, cérebro, pele e polpa dentária, tanto de dentes decíduos quanto de dentes permanentes (GRONTHOS *et al* 2000; GRONTHOS *et al* 2002; MIURA *et al* 2003; MIURA *et al* 2010, TELLES *et al* 2011). O tecido pulpar tem sido descrito como fonte de células-tronco multipotentes que apresentam eficiência clonogênica e capacidade de se auto renovar e de se diferenciar em menos tipos celulares do que as totipotentes, mas apresentam vantagens como ser fonte para transplantes autólogos, o que minimiza o risco de rejeição autoimune. Teoricamente podem ser obtidas do indivíduo em qualquer estágio da vida (CASAGRANDE *et al* 2011).

2.2 ESTRUTURA DA POLPA DENTÁRIA

A polpa dentária, derivada de componentes ectodérmicos e mesenquimais, está contida numa câmara não expansiva de dentina e é constituída por tecido

conjuntivo apresentando quatro camadas distintas: a camada odontoblástica, localizada na porção mais externa da polpa, logo abaixo da pré-dentina. Esta camada, produtora de dentina é formada por odontoblastos alinhados, que forram a face interna da dentina. A segunda camada é a zona de Weill ou zona pobre em células, caracterizada por numerosos prolongamentos transversais de células subjacentes, vasos e fibras nervosas, rica em matriz extracelular. A terceira camada é a zona rica em células, que contém uma proporção alta de células mesenquimais indiferenciadas com plasticidade e pluripotência, além de fibroblastos. A quarta camada é a central da polpa, que contém os maiores vasos e inervações do tecido, sendo os fibroblastos as células mais abundantes, além de células mesenquimais e macrófagos (D'AQUINO *et al* 2008; MIURA *et al* 2010). A polpa é frequentemente exposta a estímulos físicos, químicos e mecânicos de intensidades variadas, e caso estes estímulos promovam uma injúria, a polpa evidenciará um aumento na sua densidade vascular e permeabilidade, o que pode gerar o início de um processo deletério até a uma lesão irreversível (TELLES *et al* 2003).

2.3 OBTENÇÃO DE CÉLULAS TRONCO DA POLPA DENTÁRIA

Avaliar a vitalidade do tecido pulpar antes de iniciar uma cultura com as células tronco é fundamental. Para a obtenção destas células a condição de vitalidade da polpa dentária, o tempo decorrido da exodontia até o laboratório, o meio de armazenamento e a variação de temperatura são determinantes e não deve exceder 40 horas (ARORA *et al* 2009,). O dente deve ser transportado em um *vial* estéril contendo PBS em temperatura controlada de 4 a mais ou menos 2°C, promovendo hipotermia, dentro de uma térmica durante o seu transporte. Este processo é chamado de sustentação (ARORA *et al* 2009, GIOVENTU *et al* 2012). A polpa deve ser exposta durante 35 minutos a colagenase tipo I (3mg/ml) e dipase (4mg/ml) para obtenção das células. Em seguida, realizar centrifugação 600g (2000rpm por 5 minutos). Após a obtenção das células da polpa dentária, três procedimentos para isolar as células tronco podem ser feitos: retrijsinização da cultura por um curto período de tempo onde apenas as células estromais irão descolar da garrafa de cultura pois as células epiteliais ou endoteliais são mais aderentes; trocar o meio após 4-6 horas após abrir nova garrafa, pois as células tronco irão aderir mais rapidamente à garrafa de cultura do que as diferenciadas;

separar as células tronco utilizando marcador celular ativado por fluorescência (FACS) que pode ser o STRO-1, CD29, CD31, CD44, CD117, CD146; realizar citometria de fluxo para identificar marcadores de superfície de células indiferenciadas, além de indução e análise de diferenciação em outros tipos celulares (SUCHÁNEK J et al 2010). Apostando no potencial de aplicação clínica das células tronco da polpa dentária, alguns países já estão realizando a criopreservação destas células em bancos de células tronco para a sua possível utilização no futuro (ARORA et al 2009; KABIR et al 2014).

2.4 CÉLULAS TRONCO DA POLPA DE DENTES PERMANENTES (DPSC)

Em meados dos anos 2000, Gronthos et al isolaram e caracterizaram células tronco adultas da polpa de terceiros molares permanentes humanos nomeando-as *Dental Pulp Stem Cells* (DPSC). Estas células caracterizam-se por serem indiferenciadas, capazes de multiplicação sem a perda de suas propriedades, e capacidade de diferenciação em células especializadas a depender dos estímulos a que forem submetidas (GRONTHOS et al 2000, GRONTHOS et al 2002, Huang et al 2009, MIURA et al 2010). Outra característica é a facilidade de obtenção, visto que podem ser obtidas de terceiros molares, que são dentes normalmente indicados para exodontia em virtude de serem de difícil higienização e por às vezes não terem função mastigatória, ou de qualquer outro dente permanente indicado para exodontia por motivos ortodônticos (GRONTHOS et al 2000, GRONTHOS et al 2002, JO et al 2006, MIURA et al 2010). Apresentam a capacidade de diferenciar-se em adipócitos, células neurais, odontoblastos, osteoblastos, células do músculo liso, e de regenerar um complexo dentino-pulpar similar ao complexo encontrado na polpa dental de seres humanos, contendo matriz mineralizada tubular com odontoblastos e tecido fibroso contendo vasos, a depender do estímulo a que forem submetidas (GRONTHOS et al 2002; KABIR et al 2014). Em 2002, Gronthos et al realizaram transplante de células-tronco da polpa de dentes permanentes em ratos imunocomprometidos e obtiveram um tecido semelhante ao complexo dentina-polpa. A microscopia eletrônica demonstrou que as DPSC formaram uma matriz mineralizada com padrão globular de calcosferitos semelhantes à dentina primária, e diferente daquela vista no osso ectópico lamelar, observado no transplante de células tronco de medula óssea. Para verificar o potencial de auto-renovação das

DPSC, Gronthos *et al* (2002) isolaram células-tronco desses primeiros transplantes de células dentárias em ratos imuno-suprimidos após o período de três meses. Os resultados demonstraram que as células-tronco da polpa dentária são capazes de auto-renovação após transplante *in vivo*. Shi *et al* em 2001 relataram a semelhança entre o perfil de expressão genética de células-tronco da polpa dentária e os precursores dos osteoblastos, que são as células-tronco da medula óssea. Batouli *et al* em 2003 demonstraram a capacidade das DPSCs formarem uma estrutura semelhante à dentina reparadora na superfície de dentina humana, indicando a possibilidade e o desafio de se utilizar essas células para reparar estruturas dentárias e obturar os canais radiculares.

2.5 CÉLULAS TRONCO DA POLPA DE DENTES DECÍDUOS ESFOLIADOS HUMANOS

As células tronco da polpa de dentes decíduos esfoliados (SHED) foram isoladas e caracterizadas por Miura *et al* em 2003 e possuem diversas vantagens como grande capacidade de proliferação sem a perda de suas propriedades, diferenciação multilinhagem, capacidade de regenerar estruturas dentárias e ósseas, e possivelmente auxiliar no tratamento de doenças neurais ou degenerativas como o Mal de Parkinson e Alzheimer. Sua alta capacidade proliferativa assegura um grande potencial para prover células suficientes para aplicações clínicas (MIURA *et al* 2003, TELLES *et al* 2011). Apresentam maior capacidade de proliferação quando em comparação com as DPSC, podem diferenciar-se em odontoblastos, adipócitos e células neurais, e são capazes de estimular a formação óssea (MIURA *et al* 2003, TELLES *et al* 2011). Acredita-se que as SHED possam ser menos maduras do que as outras células do corpo devido à sua maior capacidade proliferativa (KABIR *et al* 2014). Podem ser consideradas fontes ideais de células tronco devido ao processo fisiológico de esfoliação do dente decíduo que ocorre dos 5 aos 12 anos de idade, além de serem de fácil obtenção e armazenamento para uso futuro no tratamento de doenças (ARORA *et al* 2009), e como a dentição decídua completa é formada por 20 dentes, são 20 potenciais fontes doadoras de SHED. Junto ao processo de esfoliação ocorre simultaneamente a irrupção do dente sucessor permanente e, portanto, o dente decíduo será naturalmente substituído (MIURA *et al* 2003, TELLES *et al* 2011). As SHED se originam na sexta semana durante o estágio embrionário

do desenvolvimento humano e se multiplicam mais rapidamente do que outros tipos de células adultas, inclusive do que as DPSC. As células da polpa dental produzem fatores neurotróficos e, particularmente, as SHED expressam marcadores celulares neuronais e gliais, como a nestina e proteína glial fibrilar ácida os quais podem estar relacionados à origem da crista neural da polpa dental. Estas evidências suportam a noção de que células-tronco de dentes decíduos podem se diferenciar em células neurais (ARORA *et al* 2009, MIURA *et al* 2003, OTSU *et al* 2014, SAKAI *et al* 2010).

2.6 PERSPECTIVAS DE APLICAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO DA POLPA DENTÁRIA NA ODONTOLOGIA

A Odontologia atual vive a era da prevenção e busca evitar que doenças acometam o meio bucal. Porém, quando a doença cárie já está instalada, o uso de tratamentos restauradores se faz necessário. Mesmo com os avanços nas pesquisas sobre biomateriais odontológicos, esses materiais restauradores tem que ser trocados com o passar do tempo, e com isso, mais estrutura dentária sadia poderá ser perdida. Até o presente momento, não existe um material que substitua em todas as características o dente natural. Em condições patológicas de lesões de cárie, a atividade odontoblástica é estimulada para produzir a dentina reparadora. Porém, quando a extensão da lesão de cárie é maior, pode ocorrer a morte de alguns odontoblastos, e haver uma reação da polpa frente ao processo agressor. Numa tentativa de proteção do complexo dentino-pulpar, células tronco indiferenciadas podem transformar-se em odontoblastos e secretar uma matriz de dentina reacional. O conceito de migração das células tronco para o local da lesão para diferenciar-se em odontoblastos é fundamental para a regeneração tecidual principalmente quando a vitalidade dos odontoblastos primários encontra-se comprometida (GRONTHOS *et al* 2002, TELLES *et al* 2011). Porém, na presença de inflamação na pulpíte irreversível, a migração e a diferenciação das células tronco ficarão comprometidas e a terapia pulpar será necessária. O uso de células tronco para regeneração tecidual na Medicina e na Odontologia tem sido objeto de vários estudos. Os estudos sobre essas células vêm sendo direcionados para a regeneração tecidual e engenharia de tecidos (GRONTHOS *et al* 2000; GRONTHOS *et al* 2002, KABIR *et al* 2014, MIURA *et al* 2003, OTSU *et al* 2014). A aplicabilidade de células tronco em humanos depende da sua capacidade de proliferação,

potencial de diferenciação, e acessibilidade. As células tronco são capazes de transformar-se em células diferenciadas a depender de estímulos específicos. As células tronco da polpa dentária certamente irão produzir tecidos dentários, portanto a sua aplicabilidade na odontologia é de extrema importância (CASAGRANDE *et al* 2011, GRONTHOS *et al* 2000, Huang *et al* 2009, MIURA *et al* 2003). As pesquisas com células tronco da polpa dentária têm evoluído e trouxeram novas perspectivas para o reparo dos tecidos dentários, uma vez que tanto dentes decíduos como permanentes podem disponibilizar estas células para serem diferenciadas. A partir delas, já é possível desenvolver em laboratório, estruturas que compõem os dentes, com função e características semelhantes às dos dentes humanos (EDUARDO *et al* 2008, MIURA *et al* 2010, NAKASHIMA *et al* 2009, SAKAI *et al* 2010, SLOAN *et al* 2007, STEIN *et al* 2005, STEIN *et al* 2008). Trabalhos foram realizados com esta finalidade, abordando a regeneração tecidual, a reversão nos quadros de pulpíte e a neoformação óssea a partir de células tronco da polpa dentária (CASAGRANDE *et al* 2011, GRONTHOS *et al* 2000, GRONTHOS *et al* 2002, MIURA *et al* 2010, MIURA *et al* 2003, SAKAI *et al* 2010, SLOAN *et al* 2007, TAMAOKI *et al* 2010, ULMER *et al* 2010). Sakai *et al* em 2010 implantaram as SHED através de *scaffolds* e fatias de terceiros molares humanos em dorso de ratos imunocomprometidos, e promoveram a diferenciação em odontoblastos e a formação de dentina tubular. A formação da dentina foi comprovada através do manchamento por tetraciclina. Eduardo *et al* em 2008 utilizando laser de baixa potência InGaAlP em hDPSC promoveram aumento da proliferação celular sob déficit nutricional. Elnaghy *et al* em 2013 afirmaram que o laser de baixa potência Aseneto de Gálio e Alumínio (GaAlAs) pode estimular ou reduzir a proliferação celular, degradação e mineralização das SHED dentro de estruturas semelhantes à polpa dentária.

Com o passar dos anos, inúmeras pesquisas sobre células tronco da polpa dentária foram desenvolvidas (CORDEIRO *et al* 2008, EDUARDO *et al* 2008, GRONTHOS *et al* 2000, GRONTHOS *et al* 2002, MIURA *et al* 2003, SHI *et al* 2005, MIURA *et al* 2010) no intuito de promover terapias com estas células em seres humanos, porém até o presente momento não há estudos clínicos em humanos que comprovem a sua aplicabilidade. A terapia celular com células tronco consiste em um conjunto de métodos e abordagens tecnológicas com a utilização dessas células no tratamento de doenças e tem despertado grande interesse na comunidade científica devido à capacidade que essas células indiferenciadas têm de preservar

sua própria população e de se diferenciar em células dos diversos tecidos. Encontrar a fonte de células-tronco ideal para uso terapêutico depende de diversos fatores, como a sua capacidade de proliferação sem a perda de suas propriedades, assim como suas características fenotípicas e seu potencial de diferenciação. Estas características fazem das células tronco da polpa dentária uma ferramenta importante para a regeneração tecidual (D'AQUINO *et al* 2008). A polpa dentária tanto de dente permanente (DPSC), quanto de dente decíduo (SHED) pode ser considerada uma fonte ideal de células tronco por não ser órgão vital, devido ao fácil acesso, e por ser um tecido que normalmente seria descartado, no caso de dentes permanentes com exodontia indicada devido a condições ortodônticas, ou de dentes decíduos devido ao processo natural de esfoliação e substituição pelos sucessores permanentes. Na odontologia, os avanços da engenharia tecidual apontam para a terapia pulpar com células tronco, através da substituição do tecido pulpar inflamado ou necrótico por um tecido funcional saudável, capaz de formar uma nova dentina e para reparos ósseos e osseointegração de implantes (D'AQUINO *et al* 2008, JO *et al* 2007, TELLES *et al* 2011) Figura 1.

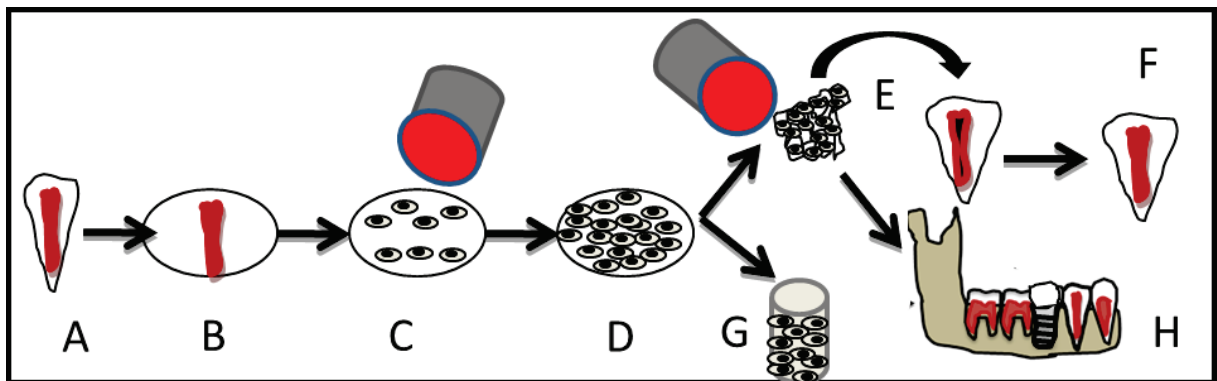


Figura 1– Possíveis aplicações de células tronco da polpa dentária na Odontologia: (A) Dente decíduo ou permanente (B) Polpa dentária (C) Cultura de células tronco irradiada com LBP (D) Células tronco em confluência (E) Inoculação das SHED/DPSC em dente com polpa comprometida através de *scaffold* e irradiação com LBP (F) Tecido pulpar neoformado após terapia com células tronco (G) Congelamento das SHED/DPSC (H) Osseointegração do implante e neoformação óssea.

Para o transplante dessas células *in vivo* é necessário a utilização de arcabouços biodegradáveis (*scaffolds*) e o estímulo de proliferação e diferenciação *in vitro*. No futuro, existe a possibilidade de aplicação na Odontologia regenerativa, onde as células tronco da polpa dentária poderiam regenerar um dente danificado ou

até substituir o implante de titânio, construindo um dente com forma, função e cor similares ao dente natural (DUAILIB *et al* 2004, JO *et al* 2007, OTSU *et al* 2014)

Figura 2.

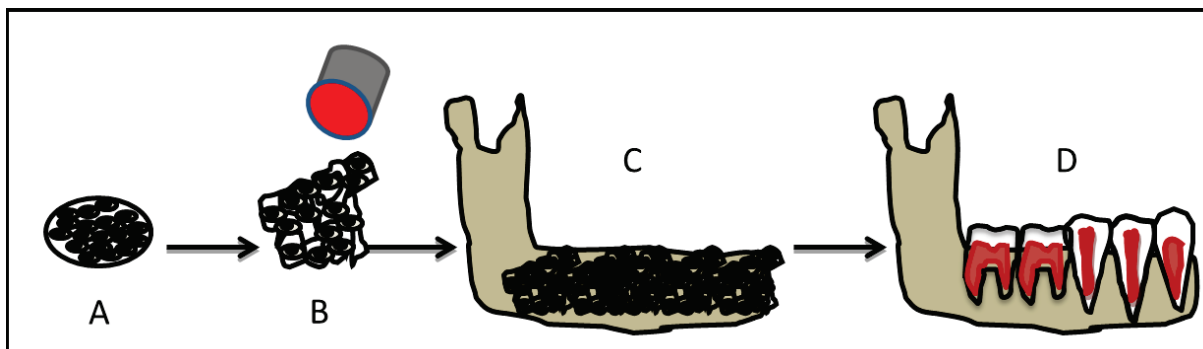


Figura 2 – Substituição do implante de titânio pelo “implante biológico”: (A) Cultura de DPSC em semi-confluência (B) Irradiação das DPSC em *scaffold* com LBP (C) Inoculação das DPSC na mandíbula de ser humano (D) Dentes com anatomia, cor, tamanho e função similares ao dente natural.

2.7 LASER DE BAIXA POTÊNCIA NA ODONTOLOGIA

O laser (do inglês *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*), amplificação da luz por emissão estimulada de radiação, é um dispositivo que produz radiação eletromagnética monocromática, coerente e colimada. É constituído por substâncias de origem sólida, líquida ou gasosa, que quando estimulada por uma fonte de energia produz um feixe de luz denominado de raio laser. O laser tem sido utilizado em diversas áreas da Odontologia como cirurgia, endodontia, periodontia e dentística, e pode ser classificado em laser de alta potência e de baixa potência. O laser de alta potência ou cirúrgico apresenta efeitos térmicos com propriedades de corte, vaporização e hemostasia. O laser de baixa potência ou terapêutico (LBP) apresenta propriedades analgésicas, anti-inflamatórias e de bioestimulação (FERREIRA *et al* 2001, LINS *et al* 2010). O LBP é utilizado para acelerar os processos de reparo dos tecidos mineralizados e moles, devido aos efeitos biomoduladores nas células e tecidos. Eles ativam ou inibem processos fisiológicos, bioquímicos e metabólicos através de efeitos fotofísicos ou fotoquímicos. Esses fenômenos biomodulatórios promovem os efeitos terapêuticos de morfodiferenciação e proliferação celular, neoformação tecidual, revascularização, redução do edema, maior regeneração celular, aumento da

microcirculação local e permeabilidade vascular, e agem levando ao equilíbrio células que se encontram em condições desfavoráveis como o déficit nutricional (EDUARDO *et al* 2007). Estudos usando o LBP em diferentes densidades de energia em culturas de células têm evidenciado resultados que encorajam o aprofundamento do uso desta modalidade terapêutica para proliferação celular, como maiores taxas de síntese de RNA, DNA e ATP, promovendo aumento da oxigenação, nutrição e regeneração celular. (ALGHAMDI *et al* 2012, EDUARDO *et al* 2007, EDUARDO *et al* 2008, ELNAGHY *et al* 2013, STEIN *et al* 2005). Os estudos relatam que o LBP quando utilizado até $10\text{J}/\text{cm}^2$ de potência estimula a proliferação celular e que acima dessa potência tende a promover efeitos inibidores de crescimento (ALGHAMDI *et al* 2012). O LBP não emite calor, sons ou vibrações e por isso não promove aumento da temperatura da cultura celular ou tecido irradiado. Devido a essas propriedades, o LBP tem sido usado na Odontologia para o tratamento da hipersensibilidade dentinária, clareamento, gengivite, periodontite, infecções fúngicas, tratamentos endodônticos e no tratamento de ulcerações recorrentes e mucosite bucal provocada pela radioterapia e quimioterapia em pacientes com neoplasias (ALGHAMDI *et al* 2012, KABIR *et al* 2014, ELNAGHY *et al* 2013, SANTOS *et al* 2010). A aceleração do tratamento de uma lesão a partir da aplicação do LBP permite uma redução do tempo de cadeira a que o paciente ficaria exposto. Na Odontopediatria, a redução do tempo de cadeira para a criança significa uma melhoria na qualidade do manejo e conseqüentemente na qualidade de vida do paciente.

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO

O presente estudo teve por objetivo avaliar:

O efeito do laser de baixa potência vermelho (660nm, 40mw e 10J/cm²) e infravermelho (780nm, 40mw e 10J/cm²) de InGaAlP na proliferação de células tronco da polpa de dentes decíduos esfoliados humanos SHED após aplicação única.

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi dividido em duas partes:

- Cultura celular das SHED
- Avaliação do efeito do LBP sobre as SHED através do ensaio de redução do MTT e ensaio colorimétrico de Busatti e Gomes.

4.1 MATERIAL PARA CULTURA CELULAR

Para a realização de cultura celular das SHED foram utilizados os seguintes materiais:

4.1.1 Linhagem celular

As SHED foram gentilmente cedidas pela Professora Doutora Paloma Dias da Silva Telles que faz parte da equipe do Professor Doutor Jaques Eduardo Nör da Faculdade de Odontologia da Universidade de Michigan – EUA e foram armazenadas em Nitrogênio Líquido no Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia (LETI) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) (figura 3), e posteriormente transferidas para o Núcleo de Biotecnologia e Bioprospecção (NBBIO) da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP) onde foi realizado o experimento na passagem P10.



Figura 3 - SHED em microscópio óptico no aumento de 10X.

4.1.2 Meio de cultura

Foi utilizado o meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), que é uma modificação do meio de Eagle com uma concentração maior de aminoácidos. Este meio tem sido amplamente utilizado em cultura de células de crescimento monocamada, incluindo as SHED (ENALGHY *et al* 2013, MIURA *et al* 2010) e a sua composição pode ser vista na tabela 1.

Sais Inorgânicos		mg/L		
CaCl ₂ H ₂ O	265,00		L-serina	42,00
Fe(NO ₃) ₃ .9H ₂ O	0,10		L-treonina	95,00
KCL	400,00		L-triptofano	16,00
MgSO ₄ .7H ₂ O	200,00		L-tirosina	104,20
NaCL	6.400,00		L-valina	94,00
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	125,00			
NaHCO ₃	3.700,00			
Aminoácidos		mg/L	Vitaminas	
L-arginina.HCL	84,00		Cloreto de Colina	4,00
L-cistina	62,57		pantotenato de cálcio	4,00
L-glutamina	584,00		ácido fólico	4,00
Glicina	30,00		Inositol	7,20
L-histidina.HCL.H ₂ O	42,00		Nicotinamida	4,00
L-isoleucina	105,00		piridoxina.HCL	4,00
L-leucina	105,00		Riboflavina	0,40
L-lisina.HCL	146,00		tiamina.HCL	4,00
L-metionina	30,00			
L-fenilalanina	66,00		Outros Componentes	
			Glicose	1.000,00
			piruvato de sódio	110,00
			vermelho de fenol	15,00

Fonte DMEM

Tabela 1- Composição do DMEM

4.1.3 Soro fetal bovino (SFB)

Para o grupo controle positivo foi utilizada a concentração de 10% do SFB (GIBCO[®] Invitrogen Corporation, Grand Island, N.Y., U.S.A.) e para o controle negativo 5%, condição de subestímulo, que promove aproximadamente metade do

crescimento celular obtido nas condições ideais (EDUARDO *et al* 2007). A composição do SFB pode ser vista na tabela 2.

Componentes do Soro Fetal Bovino	Valores padrão
Proteínas totais	3,8g/100ml
Albumina	2,3g/100ml
Endotoxinas	0,36 ng/100ml
Hemoglobina	11,3 mg/100ml
Colesterol	31 mg/100ml
Ácidos graxos	Sem especificação
Fosfolipídeos	Sem especificação
Triglicerídeos	Sem especificação
Glicose	125 mg/100ml
Insulina	10 µU/ml
Corticóides	0,5 µg/100ml
Tiroxinas	12,1 ng/100ml
Tironina	119 ng/100ml
PTH	1718 pg/ml
PGE	5,91 ng/ml
PGF	12,33 ng/ml

Tabela 2- Composição do SFB

4.1.4 Tampão fosfato salino - PBS

O PBS (pH 7.4) foi preparado com as seguintes substâncias conforme a tabela 3:

Substância	Concentração (mM)
Cloreto de sódio	137
Cloreto de potássio	2,68
Fosfato diácido de potássio	1,47
Fosfato monoácido de sódio	8,1

Tabela 3 – Composição do tampão fosfato salino

4.1.5 Penicilina / Estreptomicina

Foi utilizado 1% de Penicilina 10000 unidades/ml e Estreptomicina 10000µg/ml (GIBCO® Invitrogen Corporation, Grand Island, N.Y., U.S.A.)

4.1.6 Dimetil Sulfoxido – DMSO

O DMSO de fórmula C_2H_6SO é um crioprotetor e foi utilizado na proporção de 10% para o congelamento das SHED, associado a 60% de DMEM e 30% de SFB.

4.1.7 Tripsina

A tripsina foi utilizada na concentração de 0,25% para tripsinização das SHED e os seus componentes estão descritos na tabela 3:

Componentes	Peso molecular	Concentração (mg/L)	Mm
Sais inorgânicos			
Cloreto de potássio (KCl)	75.0	400.0	5.3333335
Fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄)	136.0	60.0	0.44117647
Bicarbonato de sódio (NaHCO₃)	84.0	350.0	4.1666665
Cloreto de sódio (NaCl)	58.0	8000.0	137.93103
Fosfato de sódio dibásico (Na₂HPO₄·7H₂O)	268.0	90.0	0.33582088
Outros componentes			
D-Glucose (Dextrose)	180.0	1000.0	5.5555553
Fenol vermelho	398.0	10.0	0.025125628
Tripsina	23800.0	2500.0	0.10504202

Tabela 4- Componentes da Tripsina

4.2 MÉTODO DE CULTURA CELULAR

As células SHED foram cultivadas em meio de cultura *Dubecco's Modified Eagle Medium Low Glucose 1X* (DMEM) (GIBCO® Invitrogen Corporation, Grand Island, N.Y., U.S.A.) contendo 10% de Soro fetal Bovino (GIBCO® Invitrogen Corporation, Grand Island, N.Y., U.S.A.) e 1% de Penicilina 10000 unidades/ml e Estreptomicina 10000 µg/ml (GIBCO® Invitrogen Corporation, Grand Island, N.Y., U.S.A.) em Estufa de CO₂ ELITE II® (REVCO) a 5% na temperatura de 37°C até a obtenção de número suficiente de células para o experimento. O meio de cultura foi trocado a cada dois dias até as células atingirem a semi-confluência, quando foram tripsinizadas com tripsina a 0,25% durante 4 minutos, que foi neutralizada com SFB,

e em seguida centrifugadas em centrífuga refrigerada CT-5000R[®] (CIENTEC) a 4°C e 850 RPM por 10 minutos. A contagem das células foi realizada em câmara de Neubauer e a concentração para semear nas placas de cultura de 24 e 96 poços foi de 1×10^4 células por poço na concentração de 10% do SFB (MIURA *et al* 2010, STEIN *et al* 2005). Foi intercalado o espaço de 1 poço para cada amostra nas placas de 96 poços (figura 4).

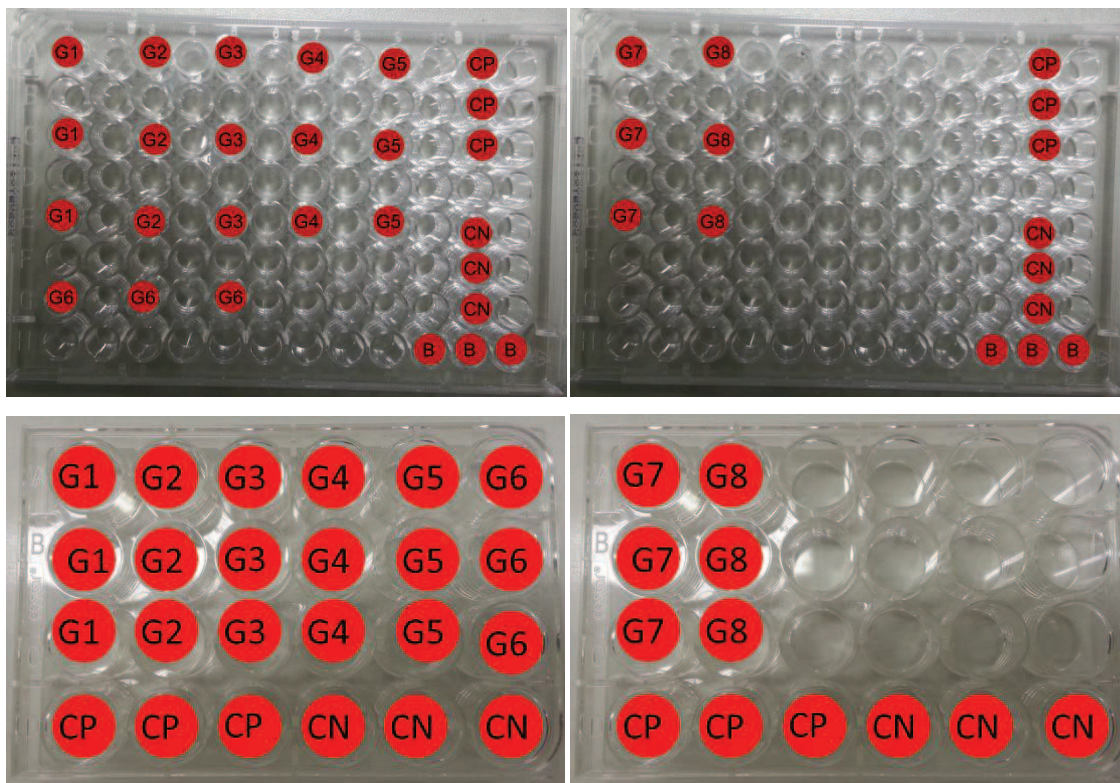


Figura 4- Distribuição dos grupos teste e controle.

Para as placas de 24 poços, não foi realizada a intercalação dos poços devido à área do poço ser maior do que a ponta ativa do LBP e à propriedade da emissão do laser ser colimada, ou seja, propaga-se como feixe de ondas praticamente paralelas. As células ficaram incubadas pelo período de 24 horas para permitir a adesão ao fundo da placa de cultura.

4.3 DISPOSITIVO DE CARTOLINA PRETA

Este dispositivo foi desenvolvido para evitar a influência de outras fontes de luz durante a irradiação com o LBP e apresenta diâmetro compatível com a ponta ativa dos dispositivos de laser de 660nm e 780nm (figura 5).



Figura 5- Dispositivo de cartolina preta

Antes da irradiação com o LBP foram acopladas tiras de cartolina preta ao dispositivo para evitar influência de outras fontes de luz deixando aberto apenas o orifício do grupo irradiado para evitar influências de fontes de luz externas (figura 6).



Figura 6-Tira de cartolina preta

4.4- DISPOSITIVO PARA FOTOTERAPIA

O dispositivo utilizado para irradiar as células tronco foi um aparelho de laser de baixa potência de Índio Gálio Alumínio e Fósforo – InGaAlP (Twinflex evolution[®] - MMOptics Ltda - São Carlos, SP, Brasil) com uma ponteira de diodo emitindo no comprimento de onda vermelho visível (660nm), 10J/cm² com potência de 40mW, e a

outra ponteira emitindo no comprimento de onda infravermelho (780nm), $10\text{J}/\text{cm}^2$ e potência de 40mW , com área de $0,04\text{cm}^2$ na ponta ativa (Figura 7).

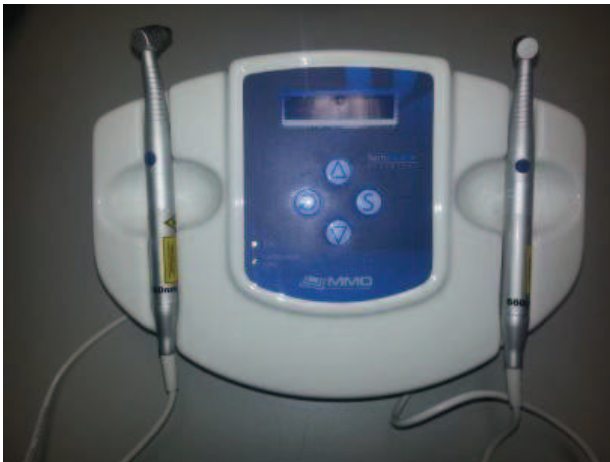


Figura 7- aparelho de laser de baixa potência de InGaAIP (Twinflex evolution[®] – MMOptics)

Todos os grupos foram submetidos às mesmas condições ambientais como luz, umidade, temperatura e tempo fora da estufa de CO_2 . O meio de cultura foi trocado pelas respectivas concentrações de soro fetal bovino e as células foram irradiadas em dose única no modo contínuo com o LBP conforme descrito a seguir:

G1 - LBP 660nm, 40mW, $10\text{J}/\text{cm}^2$, 4 segundos	}	5% SFB
G2 - LBP 660nm, 40mW, $10\text{J}/\text{cm}^2$, 8 segundos		
G3 - LBP 780nm, 40mW, $10\text{J}/\text{cm}^2$, 4 segundos		
G4 - LBP 780nm, 40mW, $10\text{J}/\text{cm}^2$, 8 segundos		
G5 - LBP 660nm, 40mW, $10\text{J}/\text{cm}^2$, 4 segundos	}	10% SFB
G6 - LBP 660nm, 40mW, $10\text{J}/\text{cm}^2$, 8 segundos		
G7 - LBP 780nm, 40mW, $10\text{J}/\text{cm}^2$, 4 segundos		
G8 - LBP 780nm, 40mW, $10\text{J}/\text{cm}^2$, 8 segundos		

CP – Controle Positivo - Meio completo com 10% de SFB sem LBP

CN – Controle Negativo - Meio completo com 5% de SFB sem LBP

B – Branco - Meio completo sem células e sem LBP

No momento da aplicação a ponta ativa dos dispositivos de LBP foi posicionada totalmente em contato com o fundo dos poços. A distância entre a ponta do dispositivo e a monocamada de células foi mantida constante em 1mm através do fundo da placa de 96 poços e 24 poços. Dessa forma, o raio laser não teve que

atravessar o meio de cultura e foi aplicado diretamente sobre as células (EDUARDO *et al* 2007).

Após a realização da fototerapia as placas de cultura foram armazenadas em estufa de CO₂ durante os períodos de 24, 48 e 72 horas para a realização dos ensaios de viabilidade celular de redução do MTT e ensaio colorimétrico de Busatti e Gomes.

4.5 REDUÇÃO DO MTT

Este ensaio tem sido amplamente utilizado em pesquisas realizadas com cultura de células e baseia-se na metabolização do *Metiltetrazolium*[3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)]-2.5 *diphenyltetrazoliumbromide* (MTT) pela mitocôndria de células viáveis, que irá liberar a enzima succinato desidrogenase, capaz de converter o sal do tetrazolium, que é hidrossolúvel e de cor amarelada em cristais de Formazan, de cor azul escura. A atividade mitocondrial foi avaliada através da incubação das células tronco numa solução de 0,5mg de MTT/ml em DMEM sem SFB durante 4 horas em estufa de CO₂ a 5% e 37°C. Após a remoção da solução, a absorbância do extrato alcoólico de cada poço foi mensurada a \cong 570nm no leitor de ELISA. A função mitocondrial das células viáveis correspondentes a cada tratamento foi calculada em relação ao controle negativo CN - Meio completo com 5% de SFB sem irradiação de LBP e ao controle positivo CP – Meio completo com 10% de SFB sem irradiação de LBP. O resultado é medido pela densidade óptica. Quanto mais escura for a coloração, maior foi a metabolização do MTT pelas células viáveis, maior a densidade óptica e conseqüentemente maior a proliferação celular.

4.6- ENSAIO COLORIMÉTRICO DE BUSATTI E GOMES

Este ensaio é um método colorimétrico viável, barato e confiável. Foi inicialmente desenvolvido para analisar o efeito anti-giardial de medicamentos e adaptado para avaliar o efeito do LBP neste experimento. Para este ensaio as células foram plaqueadas em placas de cultura de 24 poços em triplicata conforme a distribuição descrita anteriormente.

Após o período de incubação de 24 horas para permitir a adesão das SHED ao fundo da placa de cultura, o meio foi retirado e as células foram lavadas com 1ml

de PBS. Em seguida, o PBS foi retirado e foi adicionado 1 ml de metanol durante 15 minutos para fixar as células. O metanol foi retirado e as células foram lavadas novamente com PBS. Foi colocado 1ml de azul de metileno diluído em tampão borato a 0,1% e aguardou-se 10 minutos. O corante foi retirado e as células foram lavadas com 1ml de tampão borato. Em seguida colocou-se 500µl de HCl a 0,1mol e aguardou-se 10 minutos. Em seguida 200µl da suspensão de cada poço foram plaqueadas em placas de cultura de 96 poços. A análise foi feita em leitora de ELISA a 630nm (BUSATTI E GOMES 2007).

4.7- ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados estatisticamente pelo programa Graphpad Prism 5[®]. Os dados medidos por absorbância foram submetidos à análise de variância ANOVA complementada pelo teste de Tukey com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

5 Resultados

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE DA REDUÇÃO DO MTT

O resultado do ensaio do MTT reflete o número de células vivas. Após o período de 24 horas, os grupos teste apresentaram densidade óptica maior do que o grupo controle negativo. Com exceção do G3, todos os resultados foram estatisticamente significantes quando comparados ao grupo controle negativo. G5, G6, G7 e G8 proliferaram mais do que o controle positivo, e ambos foram estatisticamente significantes conforme demonstrado no gráfico 1.

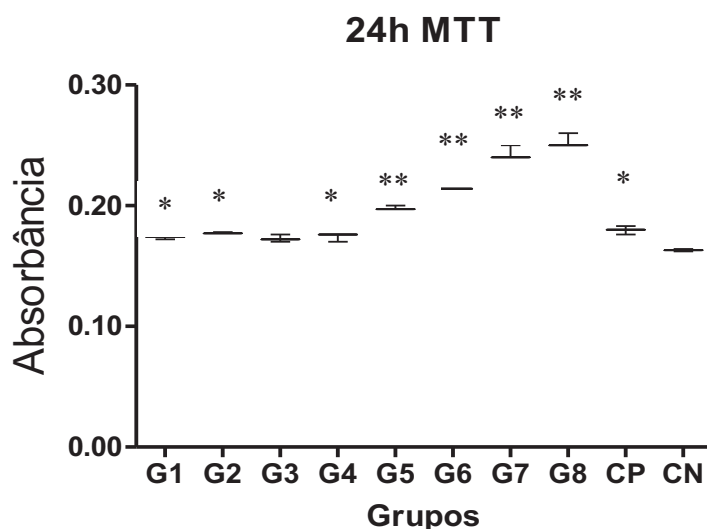


Gráfico 1 – Redução do MTT 24 horas. * Diferença estatisticamente significativa em relação ao CN. ** Diferença estatisticamente significativa em relação ao CP e ao CN.

Todos os grupos teste proliferaram mais do que o controle negativo após a irradiação com o LBP, sendo que G7 e G8 obtiveram o melhor resultado. Porém, os grupos teste G1 a G4 não proliferaram mais do que o CP. Houve uma relação direta entre dose do LBP com a proliferação das SHED, de maneira que quanto maior a dose, maior a proliferação celular.

Após o período de 48 horas, os grupos teste proliferaram mais do que o grupo controle negativo conforme demonstrado no gráfico 2.

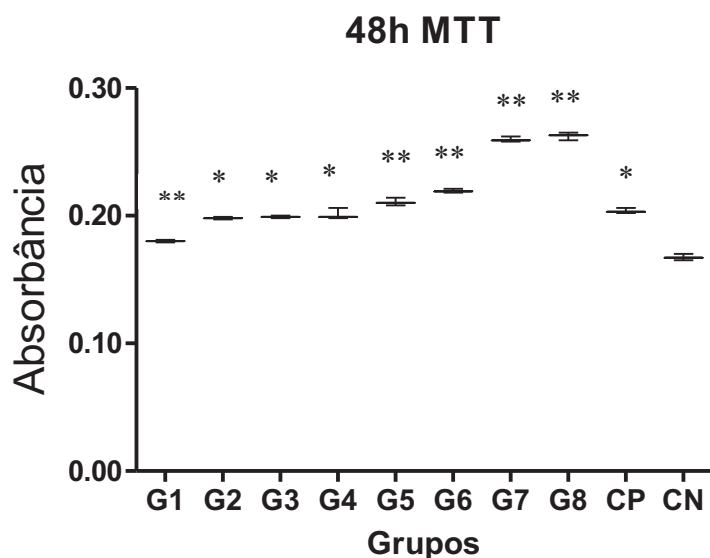


Gráfico 2 - Redução do MTT 48 horas. * Diferença estatisticamente significativa em relação ao CN. ** Diferença estatisticamente significativa em relação ao CP e ao CN.

Após o período de 72 horas, os grupos teste apresentaram uma diminuição na diferença em relação ao grupo controle conforme observado no gráfico 3.

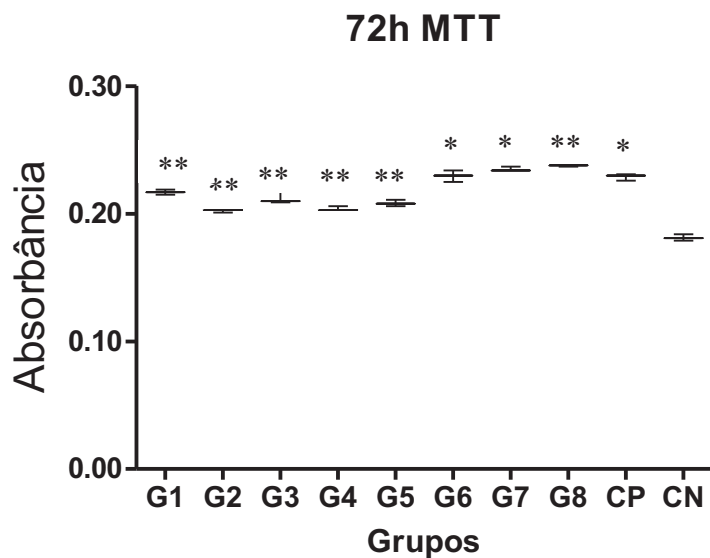


Gráfico 3 - Redução do MTT 72 horas. * Diferença estatisticamente significativa em relação ao CN. ** Diferença estatisticamente significativa em relação ao CP e ao CN.

5.2 ANÁLISE DO ENSAIO COLORIMÉTRICO DE BUSATTI E GOMES

O resultado do ensaio colorimétrico de Busatti e Gomes reflete a quantidade de células presentes na cultura. Após o período de 24 horas, todos os grupos teste proliferaram mais do que os grupos CP e CN, conforme visualizado no gráfico 4. Os grupos que foram irradiados por 8 segundos, proliferaram mais quando comparados com os que receberam irradiação por 4 segundos. Estes resultados permitem afirmar que a influência do LBP InGaAIP na proliferação das SHED está diretamente relacionada à dose do LBP.

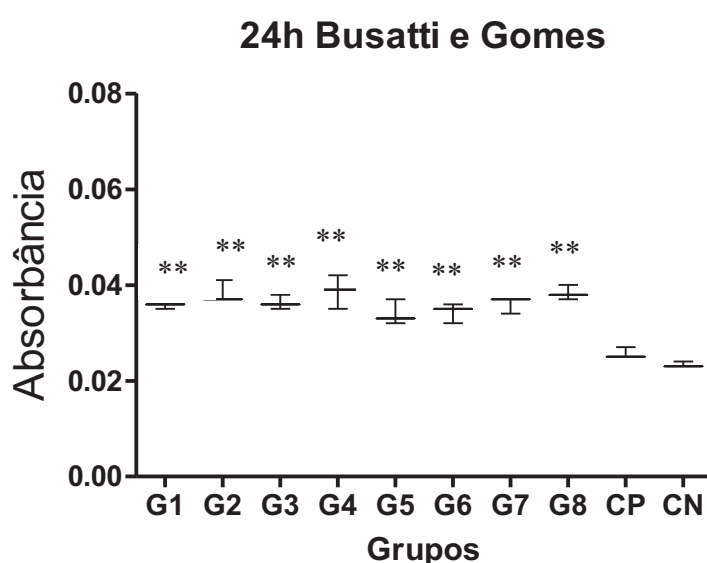


Gráfico 4 - Busatti e Gomes 24 horas. * Diferença estatisticamente significativa em relação ao CN. ** Diferença estatisticamente significativa em relação ao CP e ao CN.

Após 48 horas, todos os grupos teste proliferaram mais do que o controle negativo. podemos constatar que os grupos G2, G4, G6 e G8 que tiveram aplicações de 8 segundos do LBP tanto a 660nm quanto a 780 nm promoveram maior proliferação das SHED quando comparados com G1, G3, G5 e G7 que tiveram aplicações de 4 segundos respectivamente conforme visualizado no gráfico 5. Estes dados reafirmam que o efeito de proliferação do LBP está diretamente relacionado com a dose de aplicação do LBP.

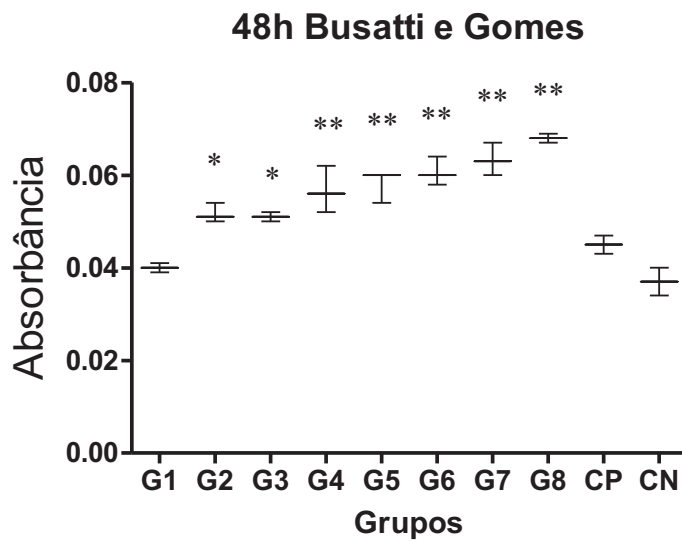


Gráfico 5 - Busatti e Gomes 48 horas. * Diferença estatisticamente significativa em relação ao CN. ** Diferença estatisticamente significativa em relação ao CP.

Após o período de 72 horas, os grupos G2, G4, G6 e G8 obtiveram o melhor resultado entre os grupos teste e controle, o que indica que o LBP tanto a 660nm quanto a 780nm promoveu maior crescimento das SHED e que este crescimento está diretamente relacionado com a dose do LBP, conforme visualizado no gráfico 6.

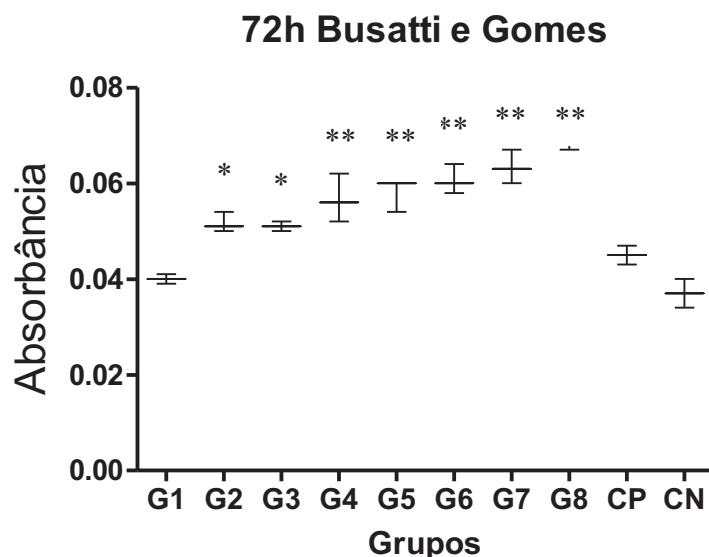


Gráfico 6 - Busatti e Gomes 72 horas. * Diferença estatisticamente significativa em relação ao CN. ** Diferença estatisticamente significativa em relação ao CP.

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

A utilização das células tronco em humanos já vem sendo empregada em doenças sanguíneas e analisadas em pacientes com doenças cardíacas e problemas na visão, porém ainda não é uma realidade clínica devido a algumas questões que necessitam ser respondidas dentre as quais se destacam descobrir como as células indiferenciadas tornam-se diferenciadas, e quais são os sinais que irão induzir essa diferenciação (SCHWARTS *et al* 2012). Para as possíveis aplicações clínicas das células tronco, promover a proliferação de número suficiente de células, diferenciar as células no tipo desejado, garantir a sobrevivência das células no indivíduo transplantado, garantir o correto funcionamento das células e evitar qualquer tipo de dano no transplantado são os grandes desafios. A utilização de células tronco autólogas minimiza esta possibilidade, e por isso, cada vez mais pessoas estão buscando os serviços de bancos de dentes para o armazenamento de células tronco (ARORA *et al* 2009). Criar dispositivos que diminuam o risco de morte das células tronco após o transplante *in vivo* tem sido objeto de estudo nas pesquisas (ELNAGHY *et al* 2013) e a terapia fotônica com laser de baixa potência pode se tornar uma alternativa viável para este fim. Por outro lado, uma das principais doenças investigadas pela medicina é o câncer que ocorre devido a anormalidades na divisão celular e diferenciação das células. Descobrir como controlar a divisão celular e a diferenciação dessas células também se torna um grande desafio.

Na Odontologia, a busca por um material restaurador que substitua o dente natural em todas as suas características é uma constante, e inúmeras opções de tratamento estão disponíveis no mercado, que vão desde uma restauração em resina composta até a prótese sobre implante. Com os avanços na engenharia tecidual, e na biotecnologia, o papel das células tronco da polpa dentária na regeneração tecidual tem sido estudado nos últimos anos. Uma das possíveis aplicações clínicas das SHED seria a geração de órgãos e tecidos para reparar ou substituir um dente inteiro, contendo esmalte, dentina, cemento e polpa em forma, função, tamanho e cor (CASAGRANDE *et al* 2011, D'AQUINO *et al* 2008, TELLES *et al* 2011). Devido à capacidade de proliferação e diferenciação multilinhagem, elas são capazes de regenerar o tecido lesionado a partir do estímulo a que forem submetidas. A manipulação dessas células para o transplante *in vivo* através de

scaffolds pode levar a uma situação de déficit nutricional e uma vertente que tenta minimizar este efeito é a terapia fotônica através da utilização do laser de baixa potência (LBP). Existem inúmeros trabalhos na literatura que abordam o efeito do LBP sobre diversas células, porém muito poucos sobre células tronco da polpa dentária e principalmente, nenhum que tenha utilizado as dosagens testadas neste trabalho (EDUARDO *et al* 2008, ENALGHY *et al* 2013, STEIN *et al* 2005, VINCK *et al* 2003). Desde o início das investigações sobre a terapia fotônica com o LBP, inúmeras condições clínicas e laboratoriais têm sido testadas. A existência de uma variedade de aparelhos com potências e voltagens variadas, diferentes padrões de irradiação, além de diferentes condições laboratoriais e clínicas, e aplicações tanto para a Medicina, quanto para a Odontologia, contribuem para resultados às vezes contraditórios na literatura (VINCK *et al* 2003).

Apesar de algumas contradições terem sido observadas na literatura, os aparelhos emissores de LBP são muito bem aceitos no tratamento de diversas lesões, como tratamento de feridas infectadas, ulcerações aftosas recorrentes, mucosites, e outras alterações em tecidos moles (VOLPATO *et al* 2007). Devido às evoluções na biotecnologia e engenharia tecidual, as pesquisas com LBP têm crescido no intuito da promoção de regeneração tecidual. Sabe-se que durante a manipulação das células tronco, elas passam por variação de temperatura, mudança de ambiente, ação da tripsina entre outros fatores, o que pode levar as células ao déficit nutricional. Alguns autores afirmaram que os efeitos bioestimulatórios do LBP ocorrem apenas quando as células estão sob condições de estresse, como por exemplo o déficit nutricional (Almeida-Lopes *et al* 2001, Eduardo *et al* 2007). Os achados deste estudo apontam para a possibilidade do uso do LBP no tratamento prévio das células tronco para o seu transplante *in vivo*, visto que quando cultivadas tanto sob déficit nutricional (5% de SFB) quanto em condições ideais (10% SFB), as SHED proliferaram mais do que o controle positivo e negativo, que não foram tratadas com o LBP.

Em 2007, Eduardo *et al* avaliaram o efeito do LBP em células epiteliais de rim de macaco e afirmaram que a concentração de 2% e 5% de SFB leva as células a uma condição de déficit nutricional, quando comparadas ao grupo que utilizou 10% de SFB. Afirmaram ainda que após a irradiação com os LBP de GaAlAs a 660nm, 3J/cm² e 5J/cm² e InGaAlP, e 780nm 3J/cm² e 5J/cm², as células dos grupos teste quando comparadas com o controle negativo, 2% de SFB, proliferaram mais do que

as não irradiadas, porém não tanto quanto as tratadas com 10% de SFB, e que a proliferação celular está diretamente relacionada com a quantidade de aplicações do LBP. No presente estudo foi realizada apenas uma irradiação com o LBP e os resultados de proliferação celular demonstraram que o LBP InGaAIP tanto a 660nm vermelho quanto a 780nm infravermelho durante 4 e 8 segundos, foram capazes de estimular a proliferação das SHED.

Em 2005, Stein *et al* demonstraram os primeiros resultados de aumento de proliferação de osteoblastos humanos utilizando um laser de baixa potência He-Ne a 630nm e 40mW. Eles realizaram duas aplicações de 3 segundos no intervalo de 24 horas cada. Apesar de ter sido feita apenas uma aplicação do LBP, os resultados dos grupos tanto para 24 quanto para 48 horas apontam para o efeito de proliferação causado pelo LBP durante 4 e 8 segundos. O ensaio de Busatti e Gomes comprova este efeito principalmente 48 e 72 horas após a proliferação celular. A aplicação de 8 segundos do LBP demonstrou ser mais efetiva do que 4 segundos nos períodos de 24, 48 e 72 horas em todos os grupos, tanto para o MTT quanto para Busatti e Gomes. A dose de aplicação está diretamente relacionada ao tempo de exposição ao LBP. Portanto, quanto maior o tempo de exposição, maior a dose do LBP. Estes resultados sugerem que novos estudos sobre terapia fotônica com LBP sejam realizados no intuito de se estabelecer um protocolo de irradiação prévia das SHED em *scaffolds* para transplante em humanos. Porém, a possibilidade de causar alterações na diferenciação e proliferação dessas células e levar ao desenvolvimento de efeitos colaterais existe, por isso, a necessidade de desenvolver modelos experimentais em animais é fundamental para o entendimento dos efeitos que a proliferação das SHED induzida pelo LBP pode causar.

7 Conclusões

7 CONCLUSÕES

Através da análise dos resultados obtidos no presente trabalho, considerando os parâmetros e protocolos de fototerapia utilizados, pode-se concluir que:

O LBP de InGaAIP (Twinflex evolution[®] – MMOptics) promoveu proliferação das SHED tanto a 660nm quanto a 780nm.

O LBP pode influenciar a viabilidade e a proliferação das SHED nas doses e comprimentos de onda aplicados nas SHED.

Os ensaios do MTT e colorimétrico de Busatti e Gomes demonstraram dentro de suas limitações serem eficientes para determinar a viabilidade e a proliferação das SHED após a irradiação com o LBP.

Referências

REFERÊNCIAS

- AlGhamdi KM, Kumar A, Noura A, Moussa NA. Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells *Lasers Med Sci* 2012; 27:237–249.
- Almeida-Lopes L, Rigau J, Zangaro RA, Guidugli-Neto J, Jaeger MM. Comparison of the Low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. *Lasers Surg Med* 2001; 29(2): 179-84.
- Arora V, Arora P, Munshi AK. Banking stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED): saving for the future. *J ClinPediatr Dent.*2009;33:289-94.
- Batouli S, Miura M, Brahim J, Tsutsui TW, Fisher LW, Gronthos S, Robey PG, Shi S. Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis. *J Dent Res.* 2003; 82 (12): 976-81.
- Busatti HGNO, Gomes MA. A simple colourimetric method to determine anti-giardial activity of drugs. *Parasitol Res* 2007; 101:819-21.
- Casagrande L, Cordeiro M M, Nör S A, Nör J E. Dental pulp stem cells in regenerative dentistry. *Odontology* 2011;99:1-7.
- Cordeiro MM, Dong Z, Kaneko T, Zhang Z, Miyazawa M, Shi S, Smith AJ, Nör, JE. Dental Pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. *J Endod.* 2008; 34(8): 962-9.
- D'aquino R, Papaccio G, LainoG, Graziano A. Dental Pulp Stem Cells: A Promising Tool for Bone Regeneration. *Stem Cell.*2008; 4: 21-26.
- Duailib MT, Duailibi SE, Young CS, Bartlet JD, Vanacti JP, Yelick PC. Bioengineered teeth from cultured rat tooth bud cells. *J Dent Res.* 2004; 83:523-8.
- Eduardo FP, Bueno DF, Freitas PM, Marques MM, Passos-Bueno MR, Eduardo CP, Zats M. Stem Cell proliferation under Low Intensity Laser Irradiation: a preliminary study. *Lasers in Surg and Med.* 2008; 40, 433-8.
- Eduardo FP, Mehnert DU, Monezi TA, Zezell DM, Schubert MM, Eduardo CP, et al. Cultures epithelial cells response to phototherapy with low intensity laser. *Lasers in Surg and Med.* 2007; 39: 365–372.
- Elnaghy AM, Murray PE, Bradley P, Marchesan M, Namerow KN, Badr AE et al. Effects of low intensity laser irradiation phototherapy on dental pulp constructs. *World J ofStomatol.* 2013; 2(1): 12-7.
- Ferreira CM, Brandão CG, Bramante CM. Uso do laser diagnodent no diagnostico de cárie. *Rev Bras Odontol.* 2001; 58(1): 30-2.
- Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. *ProcNatlAcadSci USA.* 2000; 97: 13625-30.

Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A. Stem cells properties of human dental pulp cells. *J Dent Res.* 2002; 81: 531-5.

Huang GJ, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources. *J Dent Res.* 2009; 88(9): 792-806.

Jo YY,.; Lee HJ, Kook SY *et al.* Isolation and characterization of postnatal stem cells from human dental tissues. *Tissue Engineering.* 2007; 13(4): 767-773.

Kabir R, Gupta M, Aggarwal A, Sharma D, Sarin A, Kola MZ. Imperative role of dental pulp stem cells in regenerative therapies: a systematic review. *Niger Surgery.* 2014; 20(1): 1-8.

Lins RDAU Dantas EM, Lucena KCR, Catão MHCV, Granville-Garcia AF, Carvalho Neto LG. Efeitos bioestimulantes do laser de baixa potência no processo de reparo. *An Bras Dermatol.* 2010;85(6):849-55.

Miura CAS, Sá MS, Lima RS, Machado MAAM, Telles PDS. Avaliação da toxicidade de materiais endodônticos em células tronco da polpa dentária. *Rev Odontol Bras Central.* 2010; 19(50): 192-195.

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

Otsu K, Kumakami-Sakano M, Fujiwara N, et al. Stem cell sources for tooth regeneration: current status and future prospects. *Frontiers in Physiology.* 2014; 5: 1-10.

Sakai VT, Zhang Z, Dong Z, Neiva KG, Machado MA, Shi S, Santos CF, Nör JE. SHED differentiate into functional odontoblasts and endothelium. *J Dent Res.* 2010; 89(8):791-6.

Santos PSS, Dias RR, Barros JCA, Freiras RR. Prevenção da mucosite oral utilizando laser terapêutico. *Arq Med Hosp Fac Cienc Med Santa Casa São Paulo.* 2010; 55(1): 7-11.

Schwartz SD, Hubschman JP, Heilwell G, et al. Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report. *The Lancet.* 2012; 379(9817): 713-20.

Shi S, Robey PG, Gronthos S. Comparison of human dental pulp and bone marrow stromal stem cells by cDNA microarray analysis. *Bone.* 2001; 29 (6): 532-9.

Sloan, A.J.; Smith, A.J.; Stem cells and the dental pulp: potential roles in dentine regeneration and repair. *Oral Diseases.* 2007; 13: 151-157.

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

Stein E, Koehn J, Sutter W, Wendtlandt G, Wanschitz F, Thurnher D et al. Initial effects of low-level laser therapy on growth and differentiation of human osteoblast-like cells. *Wien Klin Wochenschr.* 2008; 120(3-4):112-7.

Suchánek Jakub, Višek Benjamín, Soukup Tomáš, et al. Stem cells from human exfoliated deciduous teeth – isolation, long term cultivation and phenotypical analysis. *Acta Médica (Hradec Králové)* 2010; 53(2): 93–99.

Tamaoki N. Dental pulp cells for induced pluripotent stem cell banking. *J Dent Res* 2010; 89(8): 773-8.

Telles PD, Machado MAAM, Sakai VT, Nör JE. Pulp tissue from primary teeth: new source of stem cells. *J Appl Oral Sci.* 2011; 19(3): 189-194.

Ulmer F L, Winkel A, Kohorst P, Stiesch M.; Stem cells – Prospects in dentistry. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 2010; 120: 860-72.

Vinck EM, Cagnie BJ, Cornelissen MJ, Declercq HÁ, Cambier DC. Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiation. *Lasers in Medical Science* 2003; 18: 95-9.

Volpato LER, Silva TC, Sakai VT, Machado MAAM. Mucosite bucal rádio e quimioinduzida. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia.* 2007; 73: 562-8.