



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E DESPORTO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE COLETIVA –
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO ODONTOLOGIA

IVANA MARIA ZACCARA CUNHA ARAÚJO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE CÉLULAS-TRONCO DA POLPA
DENTAL HUMANA SUBMETIDAS AO LASER DE BAIXA INTENSIDADE**

Natal – RN

2013

IVANA MARIA ZACCARA CUNHA ARAÚJO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE CÉLULAS-TRONCO DA POLPA
DENTAL HUMANA SUBMETIDAS AO LASER DE BAIXA INTENSIDADE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Coletiva – Área de Concentração Odontologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte em cumprimento às exigências para obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Galvão Barboza

Natal - RN

2013

IVANA MARIA ZACCARA CUNHA ARAÚJO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE CÉLULAS-TRONCO DA POLPA
DENTAL HUMANA SUBMETIDAS AO LASER DE BAIXA INTENSIDADE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Coletiva – Área de Concentração Odontologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte em cumprimento às exigências para obtenção do grau de Mestre.

Aprovada em: ___/___/___

Prof. Dr. Carlos Augusto Galvão Barboza
Universidade Federal do Rio Grande do Norte
Orientador

Prof. Dra. Ruthinéia Diógenes Alves Uchôa Lins
Universidade Federal do Rio Grande do Norte
Membro

Prof. Dra. Águida Cristina Gomes Henriques Leitão
Universidade Federal da Bahia
Membro

Natal - RN

2013

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, **Hélio** e **Rosane** por todo o suporte que tive durante toda a vida, sendo fundamental na minha formação e no aprendizado dos valores da família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que foram importantes para elaboração desse trabalho, e principalmente, aqueles que contribuíram direta ou indiretamente na minha formação.

Agradeço a **Deus** pelo dom da vida, por me dar discernimento nos momentos difíceis dessa jornada e por me ajudar a ser sempre um pouco melhor.

Ao meu pai, **Hélio**, por todo amor a mim dedicado, pelo exemplo de vida que procuro aplicar sempre à minha vida e pela educação que me deu. Agradeço a Deus pela oportunidade de ser sua filha. Amo você.

À minha mãe, **Rosane**, por muitas vezes abdicar de seus sonhos para que os de seus filhos se tornem realidade e por mostrar que tudo na vida pode passar, mas que o amor que uni uma família é mais forte. Hoje sou o reflexo do que aprendi com você. Amo você.

Aos meus irmãos, **Italo, Igor e Isadora** por sempre estarem ao meu lado quando preciso e por saber que sempre poderei contar com vocês.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Carlos Augusto Galvão Barboza**, pelo privilégio de ter sido sua orientanda, pela amizade, pela dedicação, paciência, pelo estímulo e inspiração no amadurecimento dos meus conhecimentos e por todo o conhecimento compartilhado durante esta pesquisa.

À colega **Fernanda Ginani**, pelos conhecimentos transmitidos durante toda pesquisa na cultura de células, pela paciência e pela disposição em participar deste estudo, sendo essencial para execução e conclusão do mesmo.

Aos professores da Endodontia da UFRN, **Fábio Dametto, Norberto Faria e Marcílio Oliveira** por toda receptividade durante todo meu Estágio a Docência e posteriormente trabalhando juntos na disciplina, pela amizade, pela oportunidade do convívio sempre agradável e pela troca de experiências durante todo este período.

A **todos os professores do Programa de Pós-graduação em Saúde Coletiva/Odontologia** da Universidade Federal do Rio Grande do Norte pelos conhecimentos transmitidos contribuindo para minha formação na docência e pela oportunidade do convívio.

Às amigas da pequena, porém inseparável, turma de Odontologia no Mestrado **Karyna Menezes, Clara Almeida, Ana Clara Soares, Rafaelly Domingos, Maria Helena Moraes e Gabriela Monteiro** pela sorte de tê-las junto comigo durante toda essa jornada, compartilhando bons momentos e tornando-se parte da minha vida. Desejo que este laço não se rompa apesar da possível distância após o final do Mestrado.

Aos queridos amigos **Tiago João, Isabelle Dantas, Karyna Menezes, José Roger, Larissa Souza, Clara Almeida, Haroldo Gurgel** que tive o prazer de criar laços fortes, por serem mais que colegas, verdadeiros amigos, pelos incontáveis bons momentos de diversão juntos, por tornar os meus dias mais felizes nas semanas intermináveis durante todo Mestrado longe de casa.

A **todos os meus amigos** que de alguma forma contribuem para que me torne uma pessoa melhor.

À **Universidade Federal do Rio Grande do Norte**, através do **Programa de Pós-Graduação em Saúde Coletiva/Odontologia**, por ter tornado possível a realização desta etapa da minha formação acadêmica.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pelo auxílio financeiro oriundo de bolsa de estudos que possibilitou a realização deste trabalho.

**“O primeiro passo para você atingir uma meta
é convencer-se de que é capaz disto.”**

Julio Lobos

RESUMO

O laser de baixa intensidade (LBI) tem sido utilizado com a finalidade de promover cicatrização e regeneração dos tecidos. A literatura mostra um efeito positivo do LBI na proliferação celular, porém pouco se sabe sobre a sua eficácia na proliferação de células-tronco dentais. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da irradiação do LBI na atividade biológica de células-tronco da polpa de dente permanente (DPSCs). Extratos de polpa dental foram isolados de cinco terceiros molares hígidos removidos por indicação cirúrgica e/ou ortodôntica. Após a digestão enzimática, as células foram caracterizadas e cultivadas em meio de cultura α MEM suplementado com antibióticos e 15% de soro fetal bovino. No terceiro subcultivo, as células foram irradiadas com um laser diodo InGaAlP, utilizando-se duas diferentes densidades de energia ($0,5 \text{ J/cm}^2$ - 16 segundos e $1,0 \text{ J/cm}^2$ - 33 segundos), comprimento de onda de 660nm e potência de 30mW. Uma nova irradiação, utilizando os mesmos parâmetros, foi realizada 48 h após a primeira. Um grupo controle (não irradiado) foi mantido nas mesmas condições experimentais de cultivo. A fim de avaliar a proliferação celular, foram utilizados o método exclusão por Azul de Tripán e a viabilidade celular medida através do ensaio de MTT, nos intervalos de 24, 48, 72 e 96 h após a primeira aplicação do laser. Nos mesmos intervalos foram avaliados os eventos do ciclo celular. Eventos relacionados à morte celular foram analisados por citometria de fluxo nos intervalos de 24 e 72 horas. Os dados das contagens celulares foram submetidos a testes estatísticos não paramétricos de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, considerando um intervalo de confiança de 95%. Os resultados mostraram que os dois grupos irradiados exibiram uma curva de proliferação mais ascendente, com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle nos intervalos de 72 e 96h, sem alterações consideráveis na viabilidade celular ao longo do experimento. A distribuição das células nas fases do ciclo celular foi coerente com células em proliferação nos três grupos. Os resultados da curva de crescimento, MTT, Anexina/PI e Ciclo celular foram concordantes, dessa forma é possível concluir que o LLLI, principalmente com dose de $1,0 \text{ J/cm}^2$, seja uma terapia de grande importância para o futuro da engenharia tecidual e medicina regenerativa envolvendo DPSCs, uma vez que neste estudo o LLLI contribuiu com o crescimento e viabilidade celular.

Palavras-chave: Lasers, Células-tronco, Polpa Dentária

ABSTRACT

The low-level laser therapy (LLLT) has been used in order to improve wound healing and tissue regeneration. The literature shows a positive effect of LLLT on cell proliferation, but little is known about its effectiveness on the proliferation of dental pulp stem cells. The aim of this study was to evaluate the effect of irradiation LLLT on biological activity of dental pulp stem cells from permanent teeth (DPSCs). Dental pulp extracts were isolated from healthy five third molars removed by surgical and/or orthodontic indication. After enzymatic digestion, the cells were examined and cultured in α MEM supplemented with antibiotics and 15% fetal bovine serum. On the third subculture, the cells were either irradiated with a laser diode InGaAlP, using two different energy densities (0.5 J/cm^2 - 16 seconds and 1.0 J/cm^2 - 33 seconds), wavelength of 660nm and power of 30mW. A new irradiation using the same parameters was performed 48 hours after the first. A control group (non-irradiated) was kept under the same experimental conditions of culture. Cell proliferation was evaluated by Trypan blue exclusion method and by measuring mitochondrial activity using the MTT-based cytotoxicity assay, at intervals of 24, 48, 72 and 96 h after the first laser application. Events of the cell cycle were evaluated in the same intervals, and the events related to cell death were analyzed by flow cytometry in the ranges of 24 to 72 hours. Data from cell counts were submitted to non-parametric Kruskal-Wallis and Mann-Whitney test, considering a confidence interval of 95%. The results showed that the both groups irradiated exhibited an upward cell proliferation curve, with statistically significant difference ($p < 0.05$) compared to the control group in intervals of 72 and 96 hours. No significant changes were observed in cell viability throughout the experiment. The distribution of the cells in the cell cycle phases was consistent with proliferating cells in all three groups. The results of growth curve, MTT, Anxin/PI and cell cycle were concordant, then it is possible conclude that the LLLI, especially with the dose of 1.0 J/cm^2 , it is a therapy of great importance for the future of tissue engineering and regenerative medicine involving stem cells, once in this study it contributed to the growth and viability of DPSCs.

Keywords: Lasers, Stem cells, dental pulp

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Desgaste do dente na linha amelo-dentinária com ponta diamantada.....	35
Figura 2-	Remoção do tecido pulpar.....	36
Figura 3-	Desenho experimental: P1 – primeiro subcultivo; P2 – segundo subcultivo; P3 – terceiro subcultivo; P4 – quarto subcultivo.....	38
Quadro 1-	Parâmetros do Laser utilizado.....	39
Figura 4-	Desenho experimental da irradiação das células com laser de baixa intensidade.....	39
Figura 5-	Disposição dos grupos em placa de 24 poços para Contagem com Azul de Tripán: Azul (grupo I), Laranja (grupo II), Vermelho (grupo III).....	40
Figura 6-	Disposição dos grupos em placa de 96 poços para Ensaio de MTT: Azul (grupo I), Laranja (grupo II), Vermelho (grupo III).....	42
Figura 7-	Percentual de células positivas para os marcadores de células-tronco, em citometria de fluxo.....	45
Figura 8-	DPSCs no estágio indiferenciado (A) e submetidas à diferenciação osteogênica (B) e adipogênica (C). (Microscopia de luz, A: x40; B: coloração Von Kossa, x40; C: coloração Oil Red, x100).....	46
Figura 9-	Curva de crescimento das DPSCs durante os intervalos de tempo analisados..	46
Figura 10-	Nível de absorbância do MTT das DPSCs durante os intervalos de tempo analisados.....	48

- Figura 11-** Imunomarcção das DPSCs com Anexina V/PI. Q1:Anexina V negativo/PI positivo; Q2: Anexina V/PI positivos; Q3:Anexina V positivo/PI negativo; Q4: Anexina V/PI negativos. (A) Grupo I (controle), intervalo de 24 horas; (B) Grupo II (Laser 0,5 J/cm²), intervalo de 24 horas; (C) Grupo III (Laser 1,0 J/cm²), intervalo de 24 horas.....49
- Figura 12-** Imunomarcção das DPSCs com Anexina V/PI. (A) Grupo I (controle), intervalo de 72 horas; (B) Grupo II (Laser 0,5 J/cm²), intervalo de 72 horas; (C) Grupo III (Laser 1,0 J/cm²), intervalo de 72 horas.....50
- Figura 13-** Distribuição das DPSCs nas fases do ciclo celular para os diferentes grupos estudados, nos intervalos de tempo analisados.....51

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1-** Análise do crescimento das DPSCs em cada intervalo de tempo após a lasertarpia nos diferentes grupos estudados. Natal, RN – 2013.....47
- Tabela 2-** Análise do nível de absorbância do MTT das DPSCs em cada intervalo de tempo após a lasertarpia nos diferentes grupos estudados. Natal, RN – 2013..48
- Tabela 3-** Análise do percentual de viabilidade celular das DPSCs em cada intervalo de tempo. Natal, RN – 2013.....49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC: do inglês *adenomatous polyposis coli* traduzido como coli polipose Adenomatosa

ATP: do inglês *adenosine-5'-triphosphate* traduzido como adenosine-5'-trifosfato.

CD – marcador de superfície celular

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

CO₂ – dióxido de carbono

CTM – célula-tronco mesenquimal

DMSO – dimetilsulfóxido

DNA – ácido desoxirribonucléico

DP – desvio-padrão

DPSC – do inglês *postnatal dental pulp stem cells* - células-tronco da polpa de dente permanente

EDTA – ácido etileno diamino tetracético

FITC – do inglês *Fluorescein isothiocyanate* – traduzido como Isotiocianato de fluoresceína

GFAP – do inglês *Glial fibrillary acidic protein* traduzido como Proteína ácida fibrilar glial

HA/TCP – hidroxiapatita associada a fosfatotricálcio

HLA-DR – do inglês *human leukocyte antigen-DR* – antígeno de leucócitos humanos.

InGaAlP: *índio gálio alumínio fósforo*.

ISCT – do inglês *International Society for Cellular Therapy* – Sociedade Internacional de Terapia Celular

J/cm² – Joule por centímetro quadrado

K⁺ - potássio

LBI: laser de baixa intensidade

LLLT: do inglês *low level laser therapy* traduzido como terapia laser de baixa intensidade.

MEM – do inglês *minimum essential media*– meio essencial mínimo

mg/mL – miligrama por mililitro

mL – mililitro

mm - milímetro

mM – milimolar

mW - miliWatt

Na⁺ - sódio

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide.

NeuN– do inglês *neuronal nuclear antigen* – antígeno nuclear neuronal

NFM – Neurofilamento M

nm – nanômetro

PBS – do inglês *Phosphate-Buffered saline* – solução salina tamponada com sais de fosfato

PDLSC – do inglês *periodontal ligament stem cells* – células-tronco do ligamento periodontal

PE – do inglês *Phicoerythrin*, traduzido como Ficoeritrina

pH – potencial de hidrogênio iônico

PI – iodeto de propídeo

PMF – força motriz protônica

P1 – primeiro subcultivo

P2 – segundo subcultivo

P3 – terceiro subcultivo

P4 – quarto subcultivo

RNA – ácido ribonucleico

rpm – rotações por minuto

FBS – do inglês *fetal bovine serum*, traduzido como soro fetal bovino

SHED - do inglês *stem cells from human exfoliated deciduous teeth* - células-tronco da polpa de dentes decíduos humanos esfoliados

TCLE – termo de consentimento livre e esclarecido

T24 – intervalo de tempo de 24 horas

T48 – intervalo de tempo de 48 horas

T72 – intervalo de tempo de 72 horas

T96 – intervalo de tempo de 96 horas

UI/mL – unidades internacionais por mililitro

UV – ultravioleta

µg/mL – micrograma por mililitro

µm– micrometro

µL– microlitro

°C – grau Celsius

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	16
2.	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1	CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS CÉLULAS-TRONCO	20
2.2	CÉLULAS-TRONCO DA POLPA DE DENTES PERMANENTES (DPSC).....	22
2.3	LASER DE BAIXA INTENSIDADE.....	24
2.4	USO DE LASER DE BAIXA INTENSIDADE EM CÉLULAS-TRONCO.....	27
3.	OBJETIVOS	30
3.1.	OBJETIVO GERAL.....	31
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1.	IMPLICAÇÕES ÉTICAS.....	33
4.2	TIPO DE ESTUDO.....	33
4.3	POPULAÇÃO.....	33
4.4	AMOSTRA.....	33
4.4.1	Critérios de Inclusão	34
4.4.2	Critérios de Exclusão	34
4.4.3	Perdas	34
4.5	LOCAL DA PESQUISA.....	34
4.6	OBTENÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO.....	34
4.6.1	Obtenção e Processamento dos dentes	34
4.6.2	Cultura das Células-tronco	35
4.6.3	Caracterização das Células-Tronco	37
4.7	DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	37
4.8	APLICAÇÃO DE LASER DE BAIXA INTENSIDADE.....	38
4.9	ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	39
4.10	AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE E DA MORTE CELULAR.....	42
4.11	ANÁLISE DO CICLO CELULAR	43
4.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
5	RESULTADOS	44
5.1	CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO.....	45

5.2	PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE CELULAR.....	46
5.3	EFEITOS DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE SOBRE A VIABILIDADE E MORTE CELULAR POR ANEXINA V/ PI.....	49
5.4	EFEITOS DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE SOBRE O CICLO CELULAR.....	50
6	DISCUSSÃO.....	52
7	CONCLUSÕES.....	59
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
	ANEXO.....	71
	APÊNDICE.....	74

INTRODUÇÃO

1- Introdução

Células mesenquimais indiferenciadas, células-tronco multipotentes, são caracterizadas pela capacidade de auto-renovação e produção de tipos celulares altamente especializados (GRONTHOS et al., 2006). Estas células, objeto de estudo de várias pesquisas recentes, são consideradas por pesquisadores e diversos profissionais da área da saúde como uma estratégia em potencial para combater muitas doenças, principalmente aquelas que desafiam a ciência há muito tempo. A chave para utilização das células-tronco é a sua capacidade de diferenciação em vários tipos celulares, de acordo com o estímulo recebido (KOLYA, CASTANHO, 2007).

Tais células podem ser obtidas a partir de muitos tecidos, como a medula óssea (CAPLAN, 1991), o tecido adiposo (SECCO et al., 2008), o cordão umbilical (VIEIRA et al., 2008), o ligamento periodontal (SEO et al. 2004; KRAMER et al., 2004; GRONTHOS et al., 2006; TEMMERMAN et al., 2008; VASCONCELOS et al., 2011; SOARES et al., 2013) a polpa dentária (GRONTHOS et al., 2000; GRONTHOS et al., 2002; SHI, ROBEY, GRONTHOS, 2001; MIURA et al., 2003; KERKIS et al., 2006; SLOAN, SMITH, 2007; CORDEIRO et al., 2008, DE MENDONÇA COSTA et al., 2008), entre outros.

O uso de células-tronco da polpa dentária humana (*dental pulp stem cells* – DPSCs) é de grande interesse para a engenharia de tecidos, devido à facilidade de serem isoladas e expandidas em cultura. Dessa forma, representam uma fonte de células multipotentes que tem sido amplamente investigada, já que apresentam eficiência clonogênica quando orientadas e estimuladas com fatores de diferenciação, tanto para formação de tecidos relacionados com as estruturas dentárias, como para outras estratégias e terapias da engenharia tecidual (GRONTHOS et al., 2000; GRONTHOS et al., 2002; SHI, ROBEY, GRONTHOS, 2001; BATOULI et al., 2003; KERKIS et al., 2006; DE MENDONÇA COSTA et al., 2008).

Os lasers são dispositivos que normalmente geram uma radiação eletromagnética relativamente uniforme quanto ao comprimento de onda, à fase e à polarização, tendo sido originalmente descritos por Theodore Maiman (1960), na forma de um laser de rubi. A laserterapia com várias intensidades tem sido utilizada para avaliação da capacidade de estimular ou inibir uma variedade de processos celulares (MOORE, 2007). Estas propriedades permitem inúmeras aplicações médicas, incluindo o uso em cirurgias, a ativação de agentes fotodinâmicos e várias terapias cosméticas que usam calor gerado pelo feixe de laser para destruição tecidual. Estas aplicações de laser são consideradas de alta energia por causa de sua intensidade, que varia de 10 a 100 Watts (ROY, 2005; BROWN, 2009).

Neste contexto, uma outra possibilidade é o uso de laser de baixa intensidade (LBI), que não gera calor e, dessa forma, não causa nenhum dano ao tecido vivo em nível celular (HAWKINS, ABRAHAMSE, 2006; HAWKINS, ABRAHAMSE, 2007). O LBI pode ser utilizado para tratamento de condições patológicas nos tecidos, pois estimula a cicatrização de feridas e síntese de colágeno, promove o processo de regeneração do músculo esquelético após uma lesão, diminui a resposta inflamatória, e eleva a neoformação de vasos sanguíneos em zona de injúria dos músculos esqueléticos (STEIN et al. 2005).

Recentemente, verificou-se que o LBI aumenta a proliferação de células mesenquimais da medula óssea, células-tronco cardíacas e células-tronco do ligamento periodontal (TUBY, MALTZ, ORON, 2007; SOARES et al., 2013). Embora os mecanismos biológicos subjacentes ao efeito bioestimulador não sejam completamente compreendidos, tem sido relatado que o LBI modula processos metabólicos celulares, levando a um reforço no potencial regenerativo de tecidos biológicos (KAMALI et al. 2007) .

Em face da possibilidade de utilização da bioengenharia em processos de regeneração, um tratamento que possibilite a potencialização da proliferação celular e acelere este processo, mantendo a viabilidade celular poderá no futuro ser utilizado na medicina regenerativa. Dessa forma, torna-se importante avaliar o efeito da irradiação promovido pelo LBI sobre a atividade biológica de células-tronco oriundas da polpa de dentes permanentes hígidos humanos.

REVISÃO DE LITERATURA

2- Revisão de Literatura

2.1- Características Gerais das Células-tronco

As células-tronco representam uma grande promessa para a compreensão dos mecanismos básicos do desenvolvimento humano, bem como a esperança de novos tratamentos para doenças cardiovasculares, neurodegenerativas como diabetes mellitus tipo I, acidentes vasculares cerebrais, doenças hematológicas, nefropatias, devido a sua capacidade de renovação fisiológica e diferenciação, que pode ser mantida durante toda a vida (LO, PARHAM, 2009).

Normalmente as células-tronco mesenquimais são classificadas de acordo com o seu local de origem. Células-tronco embrionárias são, portanto, encontradas no interior dos blastocistos (embrião em estágio inicial), enquanto que as células-tronco adultas são encontradas em tecidos já desenvolvidos do feto, recém-nascido, jovem e adulto. Outra forma de caracterização de tais células é pelo seu potencial de originar um ou mais tipos de progênie especializada: totipotentes, pluripotentes, multipotentes, oligopotenes e unipotentes (KRABBE, ZIMMER, MEYER, 2005; SERAKINCI, KEITH, 2006).

As células-tronco embrionárias são encontradas na massa celular interna do blastocisto (embrioblasto) e vão dar origem aos mais de 200 tipos celulares diferentes pertencentes aos três folhetos embrionários (ectoderma, mesoderma e endoderma) (SLACK, 2000). A capacidade dessas células de se multiplicarem em cultura sem perder a pluripotência, assim como a possibilidade de diferenciação em tipos celulares específicos, tornou as células-tronco embrionárias uma poderosa ferramenta de pesquisa e uma promissora fonte de tecidos para transplantes. No entanto, a pesquisa com células-tronco embrionárias levanta conflitos éticos, religiosos e políticos afiados. A derivação de linhagens de células-tronco pluripotentes a partir de embriões é repleta de controvérsias sobre o início da personalidade e da reprodução humanas. Em pesquisas há dilemas difíceis, incluindo o consentimento para doar materiais, o que vem restringindo os avanços de estudos com esta fonte primária de células totipotentes e pluripotentes (LO, PARHAM, 2009).

Além da questão ética pela falta de consenso sobre a origem da vida e a moralidade do seu uso, estas células embrionárias apresentam como desvantagens a dificuldade de controle do seu potencial proliferativo e de diferenciação, o que pode resultar na formação de

teratomas justamente por descontrolo dessas propriedades (GRONTHOS et al., 2000; MURRAY, GARCIA-GODOY, HARGREAVES, 2007).

As chamadas células-tronco mesenquimais (CTM) são consideradas multipotentes, isto é, são células indiferenciadas (não especializadas) que podem renovar-se e diferenciar-se em diversas linhagens de células e apresentam um controle melhor dos processos de diferenciação e proliferação *in vitro*. Podem ser encontradas entre as células diferenciadas dentro de um tecido ou órgão (ex. tecido adiposo, tecido ósseo, cartilagem, polpa dental, ligamento periodontal) com evidência de se reprogramarem geneticamente (GRONTHOS et al., 2000; BIANCO et al., 2001; KOLYA, CASTANHO, 2007). Essas células são autogênicas e responsivas aos fatores de crescimento inerentes ao hospedeiro e sua manipulação não implica em conflitos éticos ou morais (LO, PARHAM, 2009). No entanto, o fato de não serem pluripotentes e a sua presença em menor quantidade nos tecidos representam suas principais desvantagens (SONG, BAKSH, TUAN, 2004; SOARES et al., 2007).

Segundo da Silva Meirelles, Caplan e Nardi (2008), as células-tronco estão localizadas ao longo de todo organismo. Nos casos de injúria, ocorre a ruptura dos vasos sanguíneos próximos do próprio tecido lesado e há a liberação de CTM. Elas se dividem e secretam fatores bioativos com função de proteger ou reparar/regenerar o tecido danificado. Os produtos secretados pelas CTMs no tecido lesado causam imunossupressão e inibem as células T e B, que mediam a destruição tecidual. Essa imuno-proteção evita que o tecido perca sua resiliência, além de eliminar a questão autoimune. Além disso, os produtos secretados têm efeito no local da injúria, limitando sua extensão, estimulando a angiogênese/ vasculogênese, e tem efeito mitótico sobre as células progenitoras intrínsecas do tecido.

As células-tronco praticamente não expressam ou expressam poucos marcadores de superfície específicos, por isso sua caracterização não é tão simples. Em 2006, a Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT) propôs um painel de marcadores de superfície celular para identificação de células-tronco mesenquimais (CTM). Pelo menos 95% da população de CTMs devem ser positivas para os seguintes marcadores: CD73, CD90 e CD105; e negativas para CD34 (células endoteliais e progenitores hematopoiéticos), CD45 (leucócitos), CD11b ou CD14 (monócitos/ macrófagos), CD19 ou CD79 α (linfócitos B), e HLA-DR (células apresentadoras de antígenos). Outro aspecto importante que caracteriza as células-tronco mesenquimais é a capacidade de diferenciação em osteoblastos, condroblastos e adipócitos em condições de cultivo celular (DOMINICI et al., 2006).

As células-tronco têm demonstrado ser um biomaterial promissor na medicina regenerativa (CAPLAN, 2005). A melhora da taxa de proliferação e o sucesso da diferenciação de células transplantadas representa um grande desafio para o futuro desenvolvimento de engenharia de tecidos (LEONIDA, et al., 2013).

2.2 Células-tronco da polpa de dentes permanentes (DPSCs)

No âmbito odontológico, as células-tronco mesenquimais têm sido isoladas de diferentes porções do dente, como a polpa de dentes permanentes (DPSCs), a polpa de dentes decíduos (SHED) e o ligamento periodontal (PDLSC) (GRONTHOS et al., 2000; MIURA et al., 2003; SEO et al., 2004; KRAMER et al., 2004, SOARES et al., 2013).

A hipótese das DPSCs serem mesenquimais e originadas das células da crista neural é fortalecida pelo fato destas células apresentarem diversos marcadores semelhantes ao das células derivadas da medula óssea, como CD146, α -actina de músculo liso, fosfatase alcalina, colágeno tipo I, osteonectina, osteopontina, osteocalcina, colágeno tipo III e fator de crescimento de fibroblasto II. Além desses marcadores, há também a expressão de marcadores neurais (Nestina, β III-tubulina, NeuN, GFAP, NFM e CNPase) (GRONTHOS et al., 2002; MIURA et al., 2003). Outro aspecto que aponta para uma origem dessas células a partir das cristas neurais é a sua morfologia fibroblastóide. Quando células da crista neural de embriões humanos foram isoladas, observou-se que elas apresentavam morfologia semelhante à de fibroblastos, o que também se verifica nas células-tronco embrionárias (THOMAS et al., 2008).

O primeiro relato da identificação de células-tronco derivadas da polpa dental permanente ocorreu no ano de 2000 por Gronthos et al. Nesse estudo *in vitro*, foi isolada uma população de células clonogênicas com rápida capacidade proliferativa comparável com a das células-tronco da medula óssea. Além disso, os autores demonstraram que elas tinham a capacidade de regenerar tecidos. A partir dessas características, foi possível concluir que essa população celular se tratava de CTMs adultas. Após esse estudo, passou-se a utilizar a definição de células-tronco da polpa dentária (DPSCs: *dental pulp stem cells*). Também se verificou que tais células mantinham uma alta taxa de proliferação mesmo após subcultura extensiva e que compartilhavam diversos marcadores com células derivadas da medula óssea e não houve detecção de marcadores hematopoéticos (CD14; CD45; CD34) (GRONTHOS et al., 2000).

Gronthos et al. (2002), Batouli et al. (2003), Nakashima e Akamine, (2005), Shi et al. (2005) e Eduardo et al. (2008) também isolaram e expandiram células progenitoras odontogênicas de polpa de dente permanente humano (DPSCs) e observaram que elas têm potencial altamente proliferativo mesmo após subcultivo extensivo, além da capacidade de auto-renovação e diferenciação.

Um estudo utilizando a técnica de DNA *microarray* comparou as DPSCs com células-tronco derivadas da medula óssea. Os autores constataram que os grupos celulares avaliados possuem um nível similar de expressão gênica de mais de 4000 genes. Além do mais, alguns dos genes comuns são aqueles relacionados com o início do processo de mineralização, homeostase óssea e dentinogênese. Por fim, sugeriram que os mecanismos envolvidos para o desenvolvimento dentário são similares aos envolvidos com o desenvolvimento ósseo (SHI, ROBEY, GRONTHOS, 2001).

Gronthos et al. (2002) afirmaram que as células-tronco dos dentes permanentes (DPSC) transplantadas juntamente com hidroxiapatita associada a fosfatotricálcio (HA/TPC) no dorso de ratos imunocomprometidos demonstraram uma forte capacidade de induzir formação óssea, sendo capazes de diferenciar-se em odontoblastos e adipócitos. Enquanto isso, as células-tronco dos dentes decíduos (SHED) demonstraram uma forte capacidade de induzir formação óssea *in vivo*; apesar de não se diferenciarem diretamente em osteoblastos nos transplantes, essas células foram capazes de induzir nova formação óssea atraindo células osteogênicas hospedeiras. Desta forma se supõe também que tais células podem estar envolvidas na indução da formação de osso durante a erupção de dentes permanentes. (MIURA et al., 2003).

Batouli et al. (2003) realizaram estudos experimentais *in vivo* transplantando DPSCs no dorso de ratos onde demonstram que células-tronco da polpa requerem um meio indutor apropriado e um arcabouço composto por hidroxiapatita e fosfato tricálcico (HA/TCP) para induzir a formação de osso, cimento e dentina.

Shi et al. (2005) analisaram DPSC, SHED e PDLSC humanas e observaram *in vitro* que as três linhagens celulares formaram uma variedade de tecidos associados ao complexo dentina/polpa, osso, músculo liso, tecido neural, e endotélio. Transplantes xenógenos com carreador HA/TCP com DPSC ou SHED geraram, no leito receptor, tecidos com diferentes camadas odontoblásticas e uma estrutura de matriz dentinária mineralizada. Dessa forma, sugeriram que o potencial para regenerar estruturas dentárias é possível se essas populações distintas de células-tronco dentárias estiverem associadas a carreadores específicos.

Takeda et al. (2008) caracterizaram as DPSCs humanas. Estas células foram extraídas do germe de dentes com a formação coronária completa. Foi observado que as células extraídas tinham um grande potencial de proliferação e de formação de matriz dentinária.

As células-tronco de polpa dentária isoladas de dentes hígidos, expandidas em cultura, têm mostrado potencial proliferativo. Dessa forma, elas têm sido estudadas para diversos propósitos regenerativos, não só na medicina dentária, como também em várias aplicações médicas (GRONTHOS et al., 2000; GRONTHOS et al., 2002; ARTHUR et al., 2008; DE MENDONÇA-COSTA et al., 2008; KERKIS et al., 2008).

Huang et al. (2010) obtiveram sucesso na tentativa de regenerar tecido pulpar e dentinário através de terapia com células-tronco. Células-tronco da polpa e da papila dentária de humanos foram isoladas, caracterizadas e cultivadas em *scaffolds* sintéticos. O conjunto formado foi inserido em fragmentos de canais radiculares que foram, então, transplantados em camundongos. A partir da análise dos resultados, foi observada a formação de tecido semelhante a polpa, vascularização e deposição de um tecido compatível com a dentina. Esse estudo comprovou ser possível a obtenção da regeneração do tecido pulpar através de CTMs dentro do canal radicular.

Wang et al. (2010) compararam DPSC de dentes hígidos com a de dentes com pulpíte irreversível. As células do grupo com pulpíte demonstraram uma diminuição da capacidade de formação de colônias e uma baixa taxa de proliferação celular, mas exibiram um percentual semelhante de indução osteogênica. Este resultado sugere que as células de polpa dental clinicamente comprometida também podem apresentar propriedades de células-tronco e a caracterização dessas células pode contribuir com o conhecimento acerca da possibilidade delas representarem uma fonte de células multipotentes endógenas.

2.3 Laser de Baixa Intensidade

Os lasers podem ser classificados em duas categorias: lasers de alta potência ou cirúrgicos, que apresentam efeitos térmicos, propriedades de corte, vaporização e hemostasia; e lasers de baixa intensidade (LBI), baixa potência ou terapêuticos, os quais promovem efeitos analgésicos, antiinflamatórios e cicatrizantes (PINHEIRO et al. 2010).

Os lasers de alta potência são capazes de aumentar a temperatura do tecido o suficiente para cortar e vaporizá-lo (POGREL, 1991). Em contraste, os lasers de baixa intensidade (LBI) transmitem energia em níveis baixos e, portanto, não emite som, calor, ou vibrações. Suas

reações não são térmicas, porque não há aumento imediato de temperatura do tecido irradiado. Experimentos após exposição do LBI têm mostrado que o aumento imediato do calor do tecido alvo é insignificante ($\pm 1^\circ \text{C}$) (QUICKENDEN, DANIELS, 1993).

A geração de energia, o metabolismo celular e a integração entre as organelas e o núcleo necessitam das mitocôndrias para sua manutenção (CARNEVALLI et al., 2003; SILVEIRA et al., 2009; GAO, XING, 2009). Atualmente as mitocôndrias têm sido bastante citadas em pesquisa sobre mecanismo de ação do LBI, dessa forma, a avaliação da atividade mitocondrial em células submetidas à irradiação tornou-se tema de estudo. Karu e Kolyakov (2005) revelaram que existe uma associação entre o aumento da funcionalidade mitocondrial e a maior capacidade de regeneração e cicatrização dos tecidos, além da ausência de efeitos degenerativos nos espécimes irradiados.

A irradiação do LBI refere-se à utilização de prótons que são absorvidos por fotorreceptores na célula para alterar sua atividade biológica (HAWKINS, ABRAHAMSE, 2006; HAWKINS, ABRAHAMSE, 2007). Dessa forma, irá intensificar a formação de um gradiente eletromecânico de prótons transmembrantar na mitocôndria. Assim, a eficiência da força motriz protônica (PMF) é maior, resultando em maior liberação de cálcio para o citoplasma da célula. Em doses baixas de LBI, este cálcio adicional transportado para o citoplasma desencadeia a mitose e aumenta a proliferação celular (FRIEDMANN et al., 1991).

Além da ação mitogênica de cálcio liberado para o citoplasma pela PMF, uma elevação a curto prazo do pH intracelular através da criação de um gradiente eletromecânico de prótons, dispara sinais mitogênicos nas células. Além disso, é bem sabido que a PMF aumenta a produção de ATP, que ativa o sódio, a K-ATPase e outros transportadores de íons. Assim, o nível de K^+ intracelular aumenta e a concentração de Na^+ e o potencial de membrana são diminuídos. Esses fatores também parecem influenciar a proliferação celular (FRIEDMANN et al., 1991; EDUARDO et al., 2007).

Existem algumas teorias que tentam explicar o mecanismo de ação do LBI, que resulta na fotobioestimulação. Uma das principais teorias é a da ativação da cadeia respiratória mitocondrial, que tem início através da ativação do citocromo C oxidase. Esta é uma enzima terminal da cadeia de transporte de elétrons que funciona como fotoreceptor de citocromo C, pois absorve a luz e acelera o transporte de elétrons, resultando em aumento de ATP. A partir disso ocorre aumento de síntese de DNA e RNA e síntese de proteínas (HUANG et al., 2009).

Várias áreas da Odontologia tem utilizado o LBI com muito sucesso, sendo utilizado tanto como auxiliar em tratamentos convencionais ou de forma alternativa como ferramenta

terapêutica única em algumas patologias, além disso, sua metodologia é simples e o aparelho possui baixo custo (NAMMOUR, 2012).

Um efeito analgésico foi observado em dentes expostos ao LBI, que resultaram em menores níveis de dor pulpar em relação aos dentes exposto ao tratamento placebo (KOTLOW, 2009). O LBI também acelerou a regeneração da dentina depois de um exposição pulpar (GODOY et al., 2007; PRETEL et al., 2009).

A estomatite aftosa recorrente, as úlceras traumáticas, as lesões herpéticas, o pênfigo, a pericoronarite, a mucosite e a disfunção temporomandibular são exemplos de patologias que apresentam reparação tecidual rápida e menos dolorosa quando utilizado LBI no tratamento clínico (CARVALHO et al., 2011; VESCOSI et al., 2012; SANCHEZ et al., 2012; GAUTAM et al., 2012).

O LBI também tem sido eficaz em pacientes submetidos à radioterapia na região orofacial, transplante de células-tronco hematopoiéticas e quimioterapia, quando mucosites orais se desenvolvem, cicatrizando as mesmas com relatos de redução da duração, da severidade e da dor dessas lesões (CARVALHO et al., 2011; GAUTAM et al., 2012).

O LBI tem sido relatado como sendo responsável pela promoção de efeitos bioestimuladores e biomoduladores *in vivo* e *in vitro*, estimulando o crescimento de células, aumentando o metabolismo celular, melhorando a regeneração de células e provocando uma resposta tecidual (KNEEBONE, CNC, FIAMA, 2006). Além disso a capacidade de induzir a diferenciação em tipos celulares específicos também vem sendo estudada (TUBY, MALTZ, ORON, 2007; HOU et al., 2008; MVULA et al., 2008).

Em função dos resultados satisfatórios alcançados com cultura de células, também tem sido discutida a capacidade do laser em contribuir com cicatrização de feridas, a regeneração óssea e consolidação de fraturas, prevenção de osteoporose, reparação de nervos e músculos esqueléticos após lesão (FERRARI et al., 2011; YAZDANI et al., 2012).

O LBI tem sido utilizado para estimular a cicatrização de feridas devido as suas características de estimular a proliferação e migração de células que são essenciais para a reepitelização, angiogênese e formação de tecido de granulação, como ceratinócitos, fibroblastos e células endoteliais (PEPLOW, CHUNG, BAXTER, 2010).

Para efeitos biológicos, o comprimento de onda do laser pode ser vermelho ou infravermelho (600-1200 nm) (ALGHAMDI, KUMAR, MOUSSA, 2012), porém sabe-se que os lasers com comprimentos de onda diferentes produzem diferentes efeitos sobre células em cultura. Na literatura, os estudos que comparam os efeitos do laser utilizando comprimentos de onda visível e infravermelho indicaram que os melhores resultados foram obtidos quando

comprimento de onda visível foi utilizado (ALMEIDA-LOPES et al. 2001; MVULA, MOORE, ABRAHAMSE, 2010).

Alghamdi, Kumar, Moussa (2012) revisaram a literatura disponível sobre os detalhes sobre a terapia com laser de baixa intensidade (LBI) utilizada para o estímulo a proliferação de várias linhagens de células cultivadas incluindo as células-tronco. Foi observado que em vários estudos o LBI melhora a proliferação celular, porém os resultados podem variar de acordo com a densidade de energia aplicada e o comprimento de onda a que as células são submetidas. Esta avaliação sugeriu que um valor de densidade de energia de 0,5 a 4,0 J/cm² e comprimento de onda de 600 a 700 nm são muito úteis na melhoria da taxa de proliferação de várias linhagens celulares, incluindo as células-tronco. Enquanto que as densidades de energia maiores do que 5 J/cm² parecem promover efeito antiproliferativo.

2.4 Uso de Laser de Baixa Intensidade em Células-Tronco

As células-tronco da medula óssea podem ser expandidas em cultura, podendo se diferenciar em osteoblastos, condrócitos, adipócitos, mioblastos, células neuronais, células hematopoiéticas, na presença de um adequado microambiente e/ou estímulo. Dessa forma, tornou-se uma promissora fonte de células-tronco adultas para medicina regenerativa devido à sua disponibilidade e capacidade de expansão (DENNIS, CHARBORD, 2002; CAPLAN, 2005). Abramovitch-Gottlib et al. (2005) e Hou et al. (2008) usaram o LBI para irradiar células-tronco de medula óssea. Não foram encontradas diferenças significativas de citotoxicidade entre os grupos não irradiados e irradiados. Por outro lado, a taxa de proliferação e os níveis de formação de tecido mineralizado foram significativamente mais elevados no grupo irradiado. Portanto, sugere-se que o LBI têm efeitos bioestimulador sobre a conversão de células-tronco em células formadoras de osso e na indução de ossificação em biomateriais.

Em um estudo utilizando laser diodo com densidade de energia de 1 e 3J/cm² para irradiar células-tronco mesenquimais e cardíacas, foi observado que o número de células-tronco mesenquimais e cardíacas aumentou significativamente após a laserterapia quando comparado com as células do grupo controle, sendo este crescimento superior para dose de 1.0J/cm² em ambos os tipos celulares (TUBY, MALTZ, ORON, 2007).

A este respeito, vários outros estudos têm mostrado que o LBI melhora a proliferação de células-troncos (células mesenquimais, células-tronco adiposas, células-tronco da polpa

dentária), numa densidade de $0,5 \text{ J/cm}^2$ a 5 J/cm^2 (MVULA et al., 2008; EDUARDO et al., 2008; HORVÁ T-KARAJZ, BALOGH, 2009).

Também é notável que a proliferação celular máxima ocorreu com comprimento de onda 665-675 nm, enquanto que a irradiação com comprimentos de onda de 810 nm ou superior inibiu a divisão celular (ALGHAMDI, KUMAR, MOUSSA, 2012).

Nesse mesmo sentido, Stein et al. (2005) avaliaram o efeito da laserterapia em osteoblastos humanos. Foi observado que o laser promoveu proliferação, diferenciação e maturação de osteoblastos *in vitro* quando comparado com células não irradiadas. Além disso, para os autores, essa habilidade do laser sugere que ele seja capaz de aumentar a reparação óssea em humanos. Em 2008, Stein et al. verificaram que a laserterapia de baixa intensidade teve um efeito bioestimulador positivo no crescimento e na diferenciação celulares em osteoblastos humanos durante as primeiras 72h após irradiação. Destaca-se ainda o fato de melhores resultados terem sido obtidos com dose de 1 J/cm^2 , enquanto que a dose de 2 J/cm^2 apresentou efeito inibitório nas primeiras 24 horas.

Diante da laserterapia mostrando-se efetiva na promoção da proliferação de diferentes linhagens de células-tronco, Eduardo et al. (2008) foram os primeiros a submeter DPSC à irradiação laser e verificaram uma maior atividade proliferativa de células-tronco da polpa dental humana submetidas à irradiação laser (InGaAlP) de 660nm, densidade de energia de 3 J/cm^2 e 20mW em relação ao controle não irradiado nas mesmas condições de nutrição, através da análise da viabilidade celular pelo método MTT.

Fatores relacionados aos tecidos ou células irradiadas como propriedades ópticas, tipos de células irradiadas, além das características fisiológicas das células no momento da irradiação e de parâmetros relacionados ao laser, como comprimento de onda, densidade de energia, potência, número de pontos irradiados, diâmetro do feixe, tempo e número de irradiações podem influenciar nos resultados de proliferação de células irradiadas com LBI (ALGHAMDI, KUMAR, MOUSSA, 2012).

A irradiação de células-tronco mesenquimais com 660nm mostrou que células irradiadas com dose de $1,9 \text{ J/cm}^2$ revelaram aumento da taxa de proliferação, enquanto que a dose de $11,7 \text{ J/cm}^2$ causou inibição do crescimento celular (HORVÁ T-KARAJZ et al., 2009). O aumento da dose pode provocar um dano nos fotorreceptores e como resultado, o efeito bioestimulador do laser é reduzido devido à inibição do metabolismo e consequentemente morte celular (KARU, 1987).

Os resultados do estudo de Soares et al. (2013) mostraram que a potência de 30 mW em combinação com uma densidade de energia de $1,0 \text{ J/cm}^2$ apresentaram efeitos positivos

com maiores taxas de proliferação de células-tronco do ligamento periodontal nos dois últimos intervalos de tempo (48 e 72 h), após a segunda irradiação, podendo ser observada uma curva de crescimento ascendente nas doses testadas e um efeito cumulativo ao longo do tempo. Uma dose mais baixa ($0,5 \text{ J/cm}^2$) pareceu ter pouca influência sobre a taxa de proliferação desse tipo celular. No que diz respeito ao intervalo entre aplicações do laser, o intervalo de 48 horas entre as aplicações pareceu exercer um efeito positivo sobre a proliferação celular.

PROPOSIÇÃO

3- Proposição

3.1- Objetivo Geral

O presente estudo tem como objetivo avaliar, através de experimentos *in vitro*, a influência do laser de baixa intensidade sobre a atividade biológica de células-tronco da polpa de terceiros molares permanentes humanos hígidos.

3.2- Objetivos Específicos

Caracterizar as células-tronco e observar o potencial de diferenciação osteogênica e adipogênica;

Avaliar a influência do laser de baixa intensidade sobre a capacidade de proliferação *in vitro* das células-tronco das polpas de dentes terceiros molares hígidos, nos períodos de 24, 48, 72 e 96 horas;

Avaliar a influência do laser de baixa intensidade sobre a viabilidade e morte celular, nos intervalos de 24 e 72 horas;

Avaliar a influência do laser de baixa intensidade sobre o ciclo celular, nos intervalos de 24, 48, 72 e 96 horas.

METODOLOGIA

4- Metodologia

4.1- Implicações Éticas

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Onofre Lopes (CEP/HUOL), da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) obtendo parecer de aprovação 227/341 (ANEXO A).

Todos os voluntários ou responsáveis pelos voluntários da pesquisa receberam um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE A), explicando a realização do estudo, os objetivos, os riscos e os benefícios aos quais estiveram expostos, de acordo com as Diretrizes e Normas Regulamentadoras do Conselho Nacional de Saúde (Resolução nº 196/96). Os estudos foram iniciados somente após a aprovação do CEP e as assinaturas pelos voluntários dos Termos de Consentimento Livre e Esclarecido.

4.2- Tipo de Estudo

Este estudo caracterizou-se por uma investigação experimental *in vitro*.

4.3- População

Dentes permanentes humanos hígidos.

4.4- Amostra

Foram utilizados no experimento 5 (cinco) dentes permanentes (terceiros molares) humanos hígidos, que obedecem aos critérios de inclusão do estudo, para obtenção das células-tronco adultas.

4.4.1- Critérios de Inclusão

Foram incluídos na amostra dentes terceiros molares de pacientes de ambos os sexos, independente de raça, com idade entre 16 e 30 anos, em bom estado de saúde sistêmica e bucal e que desejaram participar doando os elementos dentários mediante assinatura de TCLE. Os terceiros molares deveriam ter indicação cirúrgica e/ou ortodôntica de exodontia.

4.4.2- Critérios de Exclusão

Foram excluídos do estudo os dentes anteriores, pré-molares, primeiros molares, segundos molares, terceiros molares não hígidos (cariados, restaurados ou periodontalmente comprometidos), terceiros molares de pacientes com idade inferior a 16 anos e superior a 30 anos e terceiros molares de pacientes com saúde bucal e/ou sistêmica comprometida.

4.4.3- Perdas

As perdas do estudo foram os casos de intercorrência que impossibilitaram o uso do elemento dentário (ex. fratura do dente durante exodontia) e ainda os casos onde os pacientes, no decorrer da pesquisa, desistiram de participar do estudo.

4.5- Local da Pesquisa

A remoção cirúrgica dos dentes e o seu processamento inicial foram executados na Clínica de Cirurgia do Departamento de Odontologia da UFRN. O estudo experimental foi conduzido no laboratório de cultura de células do Departamento de Bioquímica da UFRN.

4.6- Obtenção das células-tronco

4.6.1- Obtenção e processamento dos dentes

Após a exodontia, foi feito um desgaste na linha amelo-cementária do dente em questão com ponta diamantada nº 2134 (KG Sorensen, Brasil) sob irrigação abundante, impedindo aquecimento da polpa com a broca, evitando, dessa forma, a desnaturação do tecido pulpar (Figura 1). Com o uso de alicate ortodôntico nº104 (Zatty, Brasil) foi feita a separação da coroa e da raiz, evitando o contato direto da ponta diamantada com a polpa.



Figura 1. Desgaste do dente na linha amelo-cementária com ponta diamantada.

Cada elemento dental com sua coroa seccionada e polpa exposta, foi imediatamente mantido em tubo tipo Falcon de 15ml (TTP, USA), contendo 5ml de meio alfa-MEM (Cultilab, Brasil). Os tubos foram mantidos em condições hipotérmicas (em isopor contendo gelo) para serem transportados ao laboratório de cultura de células do Departamento de Bioquímica do Centro de Biociências da UFRN, onde foram adequadamente processados.

Em câmara de fluxo laminar, os dentes seccionados apresentando a polpa exposta foram submetidos a 3 (três) lavagens de 10 minutos cada, com uma solução contendo meio alfa-MEM enriquecido com 10.000 U.I./ml de Penicilina, 10.000µg/ml de Estreptomicina, 100mg/ml de Gentamicina e 250µg/ml de Anfotericina B (todos da Gibco, USA), objetivando eliminar uma possível contaminação. Depois de processado, o extrato estava apto para a obtenção e o cultivo das células-tronco.

4.6.2- Cultura das células-tronco

A polpa dentária foi cuidadosamente retirada do canal radicular utilizando uma lima Hedstroem (Dentisply, Brasil) (Figura 2) e o extrato foi submetido à digestão enzimática com

3mg/mL de colagenase I (Gibco, USA) e 4mg/mL de dispase (Gibco, USA), por 1 hora a 37°C, em incubadora com 5% de CO₂, rompendo a matriz extracelular e permitindo o isolamento das células-tronco. Após este processo, a solução foi aspirada e processada em filtro de 70µm (BD, USA); a suspensão foi centrifugada a 1200 rpm durante 8 minutos e o sobrenadante retirado com bomba a vácuo. As células precipitadas foram ressuspensas e cultivadas em placas de Petri de 35 mm de diâmetro (TTP®, USA), contendo meio básico α -MEM (Cultilab, Brasil) suplementado com 15% de soro fetal bovino – FBS (Cultilab, Brasil). As culturas foram mantidas em incubadora a 37°C em 5% de CO₂, com troca de meio a cada três dias. O crescimento celular foi monitorado diariamente em microscópio de luz invertida (NIKON – CF160, Spectrum – São Paulo, Brasil). Após atingir 70 a 90% de confluência as células foram subcultivadas.

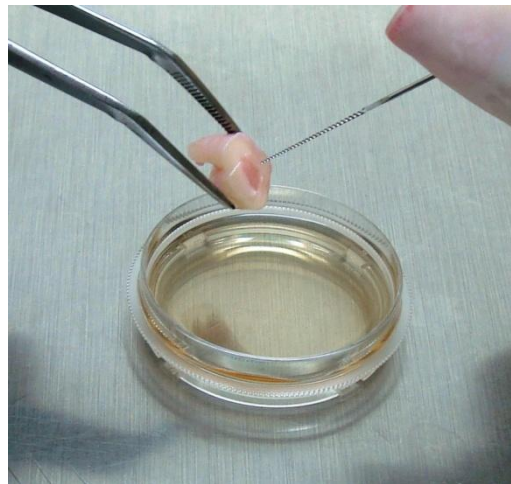


Figura 2. Remoção do tecido pulpar.

No subcultivo o meio básico foi removido da placa, a monocamada celular lavada com solução PBS, pH 7,2. Em seguida 2 ml de tripsina/EDTA (0,25% de Tripsina contendo 1mM de EDTA – Cultilab, Brasil) foi adicionado durante 3 a 5 minutos a 37°C para desprendimento das células das placas. A suspensão celular foi então colocada em um tubo cônico de 15 mL com o mesmo volume de meio α -MEM suplementado com 15% de FBS com o objetivo de inativar a tripsina. A suspensão foi centrifugada a 1200 rpm durante 8 minutos, à temperatura ambiente e o sobrenadante foi retirado, as células ressuspensas em 1mL de meio α -MEM, e então no terceiro subcultivo (P3) foram realizados os experimentos.

4.6.3- Caracterização das células-tronco

Com o objetivo de caracterizar as células-tronco oriundas do tecido pulpar, uma alíquota foi submetida à análise em citometria de fluxo para avaliar os marcadores de superfície celular que, em conjunto, identificam as células-tronco mesenquimais. Para isso foi utilizado o Human MSC Analysis Kit (BD Stemflow™, USA) que contém dois coquetéis de anticorpos para detectar expressões positivas (CD105 PerCP-Cy5.5, CD73-APC, CD90-FITC) e negativas (CD45, CD34, CD11b, CD19, HLA-DR, PE).

Para avaliar a capacidade de diferenciação multipotencial, uma alíquota de células foi cultivada em meios de diferenciação osteogênico e adipogênico (StemPro® Differentiation Kits, InvitrogenCorp., Carlsbad, CA, USA) durante 21 dias. Após este período, as células foram analisadas em microscopia de luz a fim de visualizar as características morfológicas de células osteoblásticas (deposição de matriz mineralizada) e de adipócitos (vacúolos de lipídeos no citoplasma), comprovando a natureza multipotencial dessas células.

A formação de nódulo ósseo foi avaliada através dos métodos histoquímicos de von Kossa para detecção de matriz extracelular mineralizada e Oil Red para detecção de vacúolos lipídicos. Para o estudo histoquímico, uma parte das culturas foram fixadas com glutaraldeído a 1,5% e lavadas em água deionizada. No método de Von Kossa, as culturas foram encubadas com solução de nitrato de prata a 1% e mantidas por 1 hora sob luz ultravioleta (UV). Em seguida, as placas foram lavadas, encubadas em tiosulfato de sódio por 2 minutos e lavadas novamente. Os depósitos de fosfato foram corados em preto. No método de Oil Red, as células foram fixadas em paraformaldeído a 4% durante 30 minutos, lavadas, desidratadas em isopropanol a 60% por 2 a 5 minutos, e coradas com solução de Oil Red O a 0,5% (S-0625, Sigma) em isopropanol a 100%, previamente diluído em água.

4.7- Delineamento do Estudo

Nos experimentos foram criados 3 (três) grupos de estudo após a obtenção das células-tronco em câmara de fluxo laminar:

Grupo I (controle): cultivo de células-tronco sem aplicação do laser de baixa intensidade; 4 poços de cultivo celular em cada intervalo de tempo (24, 48, 72 e 96 horas).

Grupo II: cultivo de células-tronco com laser de baixa intensidade diodo InGaAlP, utilizando-se densidades de energia de $0,5\text{J}/\text{cm}^2$, comprimento de onda de 660nm, potência de

30mW, durante 16 segundos; 4 poços de cultivo celular em cada intervalo de tempo (24, 48, 72 e 96 horas).

Grupo III: cultivo de células-tronco com irradiação de laser de baixa intensidade diodo InGaAlP, utilizando-se densidades de energia de $1,0\text{J}/\text{cm}^2$, comprimento de onda de 660nm, potência de 30mW, durante 33 segundos; 4 poços de cultivo celular em cada intervalo de tempo (24, 48, 72 e 96 horas).

As células dos três grupos foram caracterizadas e avaliadas quanto à capacidade proliferativa através do método de exclusão por Azul de Tripán e do Ensaio de MTT e quanto aos eventos relacionados ao ciclo celular e à morte celular como mostra a figura 3.

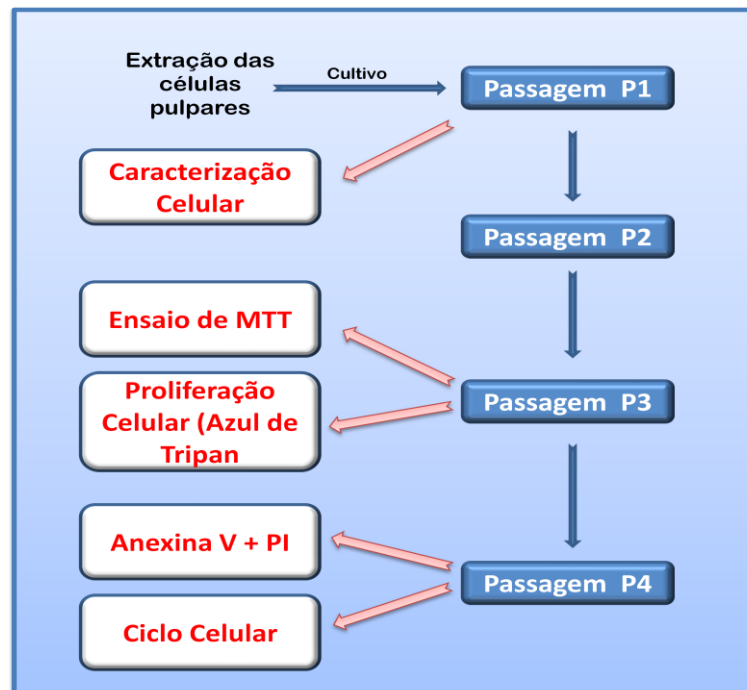


Figura 3. Desenho experimental: P1 – primeiro subcultivo; P2 – segundo subcultivo; P3 – terceiro subcultivo; P4 – quarto subcultivo.

4.8- Aplicação de laser de baixa intensidade

Na terceira passagem (P3), as células de cada grupo foram cultivadas e apenas aquelas dos grupos II e III foram irradiadas com um aparelho de Laser diodo InGaAlP (Kondortech – Bio Wave LLLT Dual, Brazil), seguindo os parâmetros apresentados no Quadro 1. A irradiação foi realizada parcialmente no escuro a fim de evitar a influência de outras fontes de luz.

Quadro 1 - Parâmetros do Laser utilizado*	
Meio Ativo	InGaAlP
Potência	30mW
Comprimento de onda	660nm
Modo de ação	Contínuo
Diâmetro da ponta	0,01 cm ²
Doses utilizadas	0,5 (grupo II) e 1,0J/cm ² (grupo III)
Tempo de irradiação	16 s (grupo II) e 33 s (grupo III)
Modo de aplicação	sonda de irradiação perpendicular à placa, a 0,5 cm das células

*Os parâmetros utilizados neste estudo seguiram a metodologia empregada por Soares et al. (2013).

Em todos os ensaios, as irradiações foram efetuadas nos intervalos de 0 e 48 horas, onde o tempo 0 corresponde ao momento imediatamente após o plaqueamento celular (Figura 4). A análise de proliferação celular pelo método Azul de Tripán, ensaio de MTT e a análise do ciclo celular foram realizadas nos seguintes intervalos de tempo: 24, 48, 72 e 96 horas após a primeira aplicação do laser, num período de 4 dias. A análise da viabilidade e da morte celular foi realizada apenas nos intervalos de 24 e 72 horas que corresponderam as primeiras 24 horas após as aplicações do laser de baixa intensidade.

Em todos os intervalos (T24, T48, T72, T96), haviam placas destinadas a cada análise específica (Azul de Tripán, MTT, Anexina/PI e Ciclo Celular). A seguir serão descritos com detalhes cada análise separadamente.

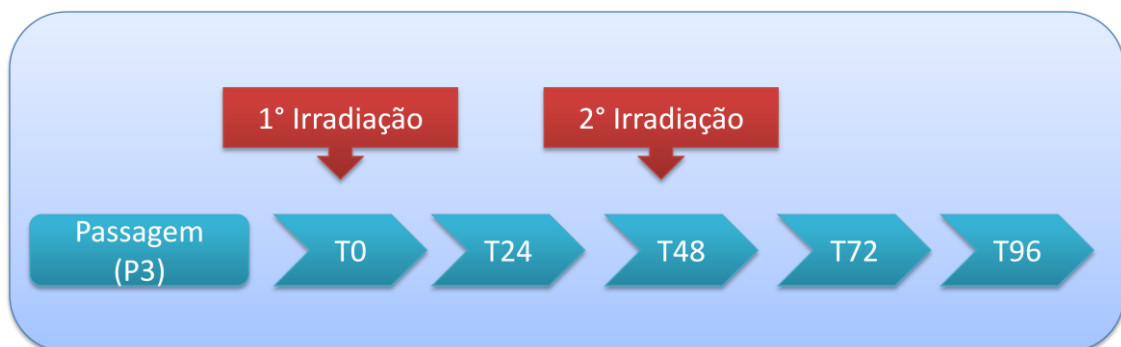


Figura 4. Desenho experimental da irradiação das células com laser de baixa intensidade.

4.9- Análise da proliferação celular

Na análise da proliferação celular, o método de contagem celular utilizando o corante Azul de Tripán foi realizado em quadruplicata (n= 4 para cada grupo) e a disposição dos

poços foi feita de forma que entre os poços semeados havia sempre um poço vazio, impedindo a dispersão de luz não intencional entre os poços durante a aplicação do laser. O cultivo celular foi feito em 2 (duas) placas de 24 poços, na densidade de 3×10^4 células/poço, para cada intervalo de tempo, totalizando 8 placas. (Figura 5).

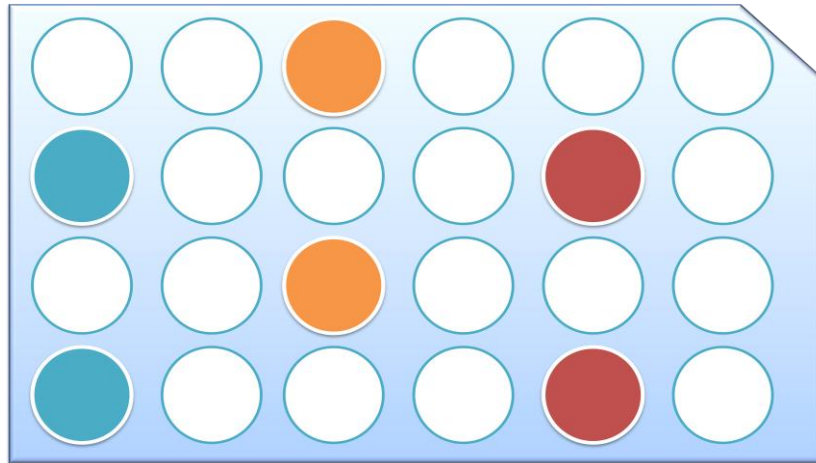


Figura 5. Disposição dos grupos em placa de 24 poços para Contagem com Azul de Tripán: Azul (grupo I), Laranja (grupo II), Vermelho (grupo III).

Para obtenção da curva de crescimento nos diferentes grupos foram utilizados os dados obtidos a partir das contagens de células aderidas às superfícies de plástico dos quatro poços de cultivo celular ($n=4$) para cada grupo nos intervalos de 24, 48, 72 e 96 horas após o plaqueamento.

Para isso, o meio foi removido dos poços e as células lavadas com PBS (solução salina tamponada com sais de fosfato). Em seguida foram adicionados aos poços 500 μL de tripsina/EDTA (Gibco, USA) por 5 minutos e a suspensão celular foi colocada em um tubo cônico tipo Falcon com o mesmo volume de meio α -MEM a fim de inativar a tripsina. A suspensão foi centrifugada a 1200 rpm durante 8 minutos, o sobrenadante retirado e as células ressuspensas em 1 mL de meio. Uma alíquota dessa suspensão foi separada para a contagem celular.

O número de células colhidas de cada poço foi obtido pela contagem de células viáveis através do uso do hemocitômetro (Câmara de Neubauer) e do corante Azul de Tripán. Alíquotas foram misturadas a uma solução do corante que penetra nas células não viáveis corando-as em azul, enquanto que as células viáveis permanecem sem coloração. O método da exclusão de células coradas pelo Azul de Tripán foi realizado obedecendo a seguinte equação matemática:

$$\frac{\text{Número de células viáveis contadas} \times \text{diluição} \times 10^4}{\text{Número de quadrantes usados para contagem}}$$

Finalmente, o percentual de viabilidade celular foi obtido de acordo com o seguinte cálculo:

$$\frac{\text{Número de células viáveis}}{\text{Número total de células contadas}} \times 100$$

Para controlar possíveis vieses de aferição que poderiam ocorrer durante a contagem com a Câmara de Neubauer, apenas um pesquisador realizou a contagem celular em todos os intervalos de tempo, nos três grupos analisados.

A análise da atividade mitocondrial também foi realizada para obtenção da viabilidade celular e traçar a curva de crescimento celular através do ensaio de MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]. Este método quantifica a redução metabólica do MTT, que resulta na produção de cristais de formazano pela atividade das desidrogenases mitocondriais, apresentando-se intensamente coloridos no interior das células.

Para este método MTT, as células foram cultivadas em placas de 96 poços, na densidade de 5×10^3 células/poço (Figura 6). Em cada intervalo de tempo (24, 48, 72 e 96 h), sendo quatro poços para cada um dos grupos (controle, 0.5 J/cm^2 e 1.0 J/cm^2), totalizando 4 placas. Nos intervalos de tempo referidos acima, as células foram incubadas a 37°C , em 5% de CO_2 , com $100 \mu\text{l}$ de meio de cultura contendo 1 mg/ml de MTT, por 4 horas, e em seguida o produto colorimétrico (formazano) foi solubilizado com $100 \mu\text{l}$ de dimetilsufóxido (DMSO). A absorbância das amostras foi monitorada em um leitor de ELISA utilizando filtro de 570 nm .

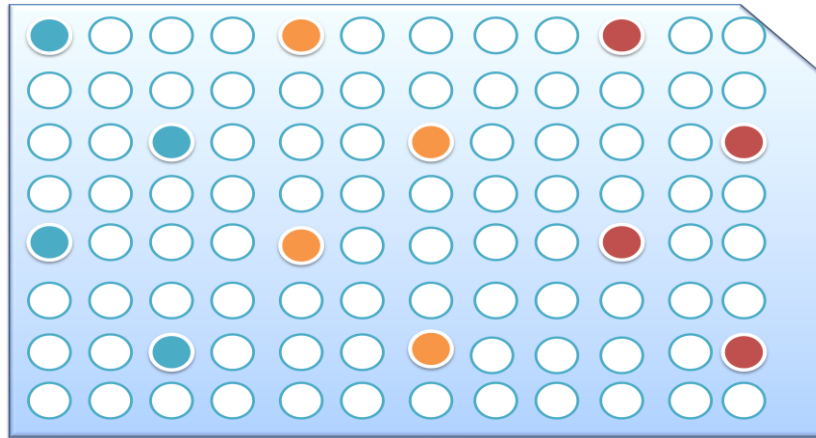


Figura 6. Disposição dos grupos em placa de 96 poços para Ensaio de MTT: Azul (grupo I), Laranja (grupo II), Vermelho (grupo III).

4.10- Avaliação da viabilidade e da morte celular

Para avaliar os efeitos do laser de baixa intensidade utilizado sobre a morte celular, foi utilizado o kit FITC Annexin V/ Dead Cell Apoptosis Kit with FITC Annexin and PI, for Flow Cytometry (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA). O marcador anexina V-FITC permite detectar os estágios iniciais de apoptose celular devido ao fato de se ligar preferencialmente aos fosfolipídios negativamente carregados (fosfatidilserina) expostos no início do processo apoptótico, enquanto o iodeto de propídeo (PI) permite avaliar os momentos finais deste processo de morte celular, por ser um marcador que interage com o DNA, mas não é capaz de atravessar a membrana plasmática, devido ao seu alto peso molecular. Assim, a marcação positiva para o PI indica que há poros na membrana, fenômeno característico de processos de necrose ou estágio final de apoptose.

Para isso, as células foram cultivadas em placas de 6 (seis) poços na densidade de 2×10^5 células/poço. Nos intervalos de 24 e 72 horas de cultivo, correspondentes as primeiras 24 horas após cada uma das irradiações, as células foram tripsinizadas, coletadas e lavadas com tampão PBS gelado. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 200 μ L de Binding Buffer 1X. Foi adicionado 3 μ L de Annexin V – FITC e 1 μ L da solução de PI a 100 μ g/mL. As células foram incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente e mantidas sob proteção de luz. Após o período de incubação, foram adicionados 400 μ L de tampão de ligação para anexina V 1X e as células foram analisadas em citômetro de fluxo, medindo a emissão de fluorescência a 530 nm e 575 nm. A população foi separada em três grupos: células viáveis (baixos níveis de fluorescência), células apoptóticas (fluorescência verde) e

células em necrose (fluorescência em verde e vermelho). Os dados foram analisados a partir do software FlowJo v. 7.6.3 (Tree Star, Inc.).

4.11- Análise do Ciclo Celular

Para a avaliação dos efeitos do laser de baixa intensidade sobre o ciclo celular, os tubos de citometria utilizados no ensaio anterior foram reutilizados. Após a análise com Anexina V-FITC/ PI, as células foram lavadas com tampão PBS gelado e o sobrenadante descartado. A alíquota com as células foi então incubado com paraformaldeído 2%, lavado com PBS gelado e permeabilizado com saponina 0,01% por 15 minutos. Após este procedimento, as células foram incubadas com 10 µL de RNase (4 mg/mL) a 37°C por 40 minutos. Foram adicionados 5 µL de Iodeto de Propídeo (25 mg/mL), juntamente com 200 µL de PBS gelado às células e levadas ao citômetro de fluxo para análise do ciclo celular (585/42 nm). Para análise dos dados, o software FlowJo v. 7.6.3 (Tree Star, Inc.) foi utilizado.

4.12- Análise Estatística

Cada dado das contagens das células nos 4 (quatro) poços por grupo correspondeu à média das amostras em cada intervalo de tempo. Tais médias foram submetidas à análise não paramétrica. A diferença entre os grupos para cada um dos tempos estudados (24, 48, 72 e 96 horas) foi analisada pelo teste estatístico de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, considerando um intervalo de confiança de 95%.

RESULTADOS

5- Resultados

5.1- Caracterização das células-tronco

A análise dos marcadores de superfície em citometria de fluxo confirmou a natureza multipotencial das células extraídas da polpa dental, com marcação positiva para os anticorpos CD105 PerCP-Cy5.5, CD73 APC e CD90 FITC em todas as amostras avaliadas. O contrário também foi verificado, obtendo-se marcação extremamente fraca para os principais marcadores hematopoiéticos conjugados (CD45, CD11b, CD34, CD19, HLA-DR PE) em todas as amostras analisadas (Figura 7).

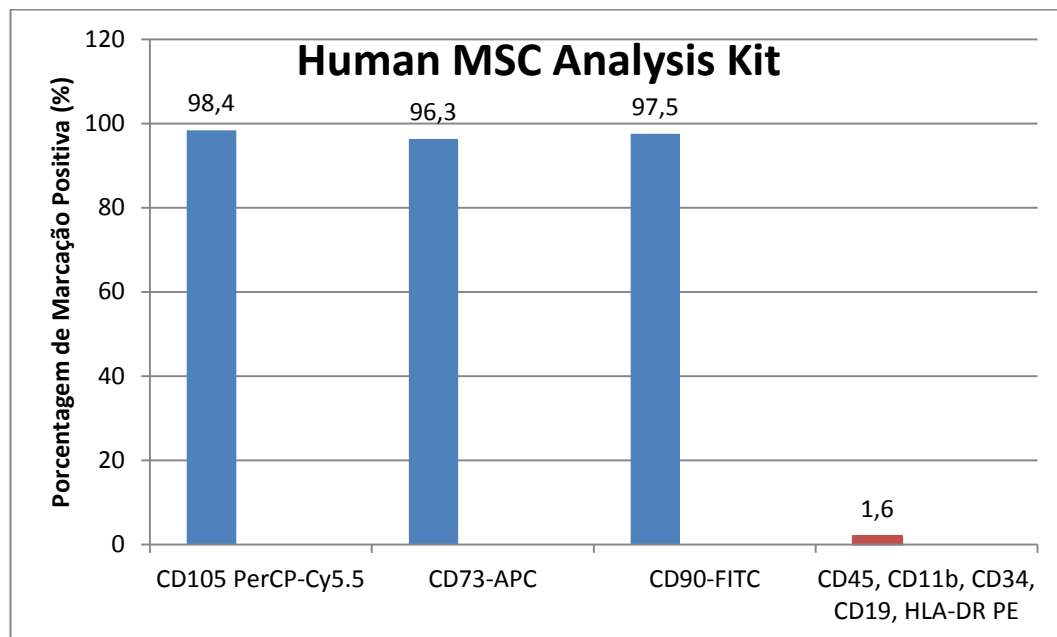


Figura 7: Percentual de células positivas para os marcadores de células-tronco, em citometria de fluxo.

A Figura 8A ilustra a morfologia das DPSCs indiferenciadas. Após 21 dias de cultivo em meio de diferenciação osteogênica, as exibiram uma matriz extracelular mineralizada corada em negro pelo von Kossa, comprovando a capacidade de diferenciação das células em osteoblastos (Figura 8B). Do mesmo modo, quando as células indiferenciadas foram cultivadas com meio indutor adipogênico por 21 dias, houve a formação de gotículas lipídicas no citoplasma, coradas pelo Oil Red, o que caracteriza sua diferenciação em adipócitos (Figura 8C).

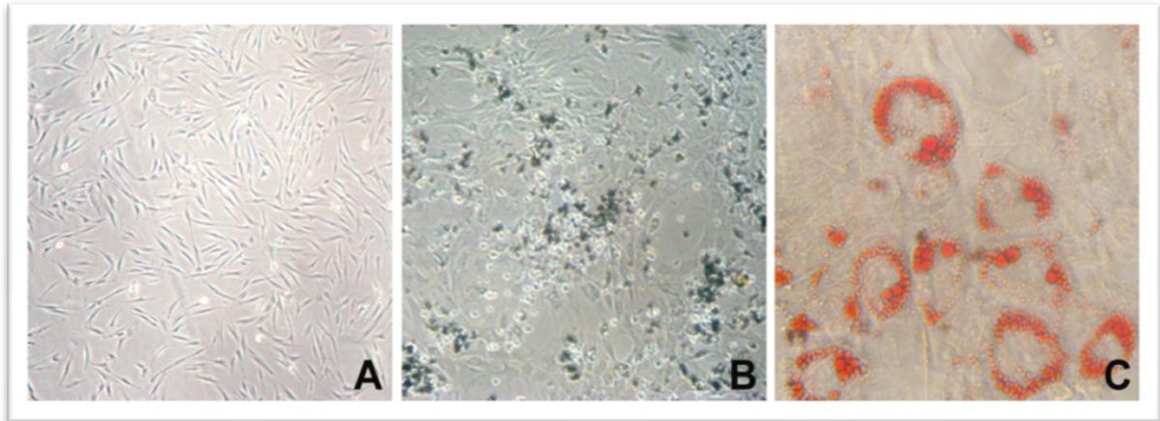


Figura 8 – DPSCs no estágio indiferenciado (A) e submetidas à diferenciação osteogênica (B) e adipogênica (C). (Microscopia de luz, A: x40; B: coloração Von Kossa, x40; C: coloração Oil Red, x100).

5.2- Proliferação e Viabilidade Celular

O potencial proliferativo das células-tronco da polpa de dentes permanentes (DPSCs) foi avaliado através da construção de curvas de proliferação, utilizando o Método de Exclusão do Azul de Tripán, com o qual também foi possível avaliar a viabilidade das DPSCs submetidas à irradiação de baixa intensidade (0.5 ou $1.0\text{J}/\text{cm}^2$) ou não.

A curva de crescimento das DPSCs nos diferentes grupos estudados é ilustrada na figura 9. Todos os grupos apresentaram um aumento no número de células no decorrer do experimento, sendo o grupo Laser 1.0, aquele que exibiu maior índice proliferativo, a partir do intervalo de 48 horas.

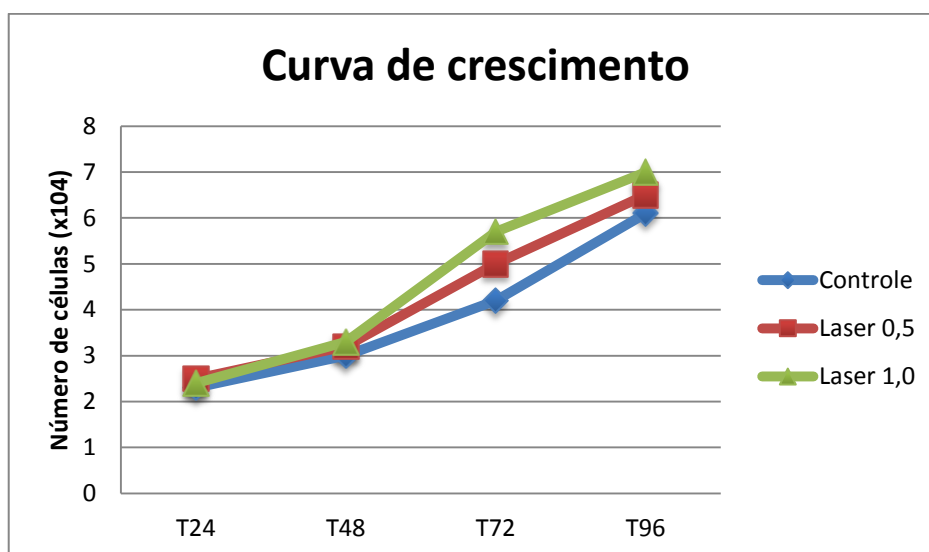


Figura 9. Curva de crescimento das DPSCs durante os intervalos de tempo analisados.

Comparando-se a media dos grupos estudados, observa-se que houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) nos intervalos de 72 e 96 horas, mostrando uma tendência à proliferação mais evidente após a segunda aplicação do laser de baixa intensidade (Tabela 1). Especificamente no intervalo T72 a taxa proliferativa tanto do grupo II (Laser 0,5) quanto o grupo III (Laser 1,0) apresentaram-se significativamente maiores do que o grupo I (controle) ($p < 0,05$), porém não houve diferença estatisticamente significativa entre as doses utilizadas (grupos II e III) ($p = 0,1646$). Com relação ao intervalo T96, houve diferença estatisticamente significativa apenas entre os grupos I e III (controle e Laser 1.0) ($p = 0,014$).

Tabela 1. Análise do crescimento das DPSCs em cada intervalo de tempo após a lasertapia nos diferentes grupos estudados. Natal, RN – 2013.

	Grupo I	Grupo II	Grupo III	p*		
	(Controle)	(Laser 0.5)	(Laser 1.0)	I vs. II	I vs. III	II vs. III
	Média ± DP	Média ± DP	Mean ± SD			
T24	2,3 ± 0,6	2,5 ± 0,6	2,4 ± 0,6	0,5303	0,8671	0,6753
T48	3,0 ± 0,6	3,2 ± 0,6	3,3 ± 0,5	0,2479	0,0548	0,3823
T72	4,2 ± 0,5	5,0 ± 1,1	5,7 ± 1,6	0,0099	0,0056	0,1646
T96	6,1 ± 0,8	6,5 ± 1,0	7,0 ± 1,3	0,2026	0,0146	0,1835

*Teste *Mann Whitney*. Os valores em negrito representam diferença estatisticamente significativa. ($p < 0,05$)

A atividade proliferativa também foi analisada através do método MTT. O índice de absorbância das DPSCs nos diferentes grupos estudados (grupos I, II e III) é ilustrado na figura 10 e na tabela 2. Todos os grupos apresentaram um aumento no nível de absorbância no decorrer do experimento, apresentando, dessa forma, a mesma tendência proliferativa observada na curva de crescimento. Os grupos II e III foram aqueles que exibiram maior índice de absorbância a partir do intervalo de 48 horas. No intervalo T72 o nível de absorbância tanto do grupo II (Laser 0,5) quanto o grupo III (Laser 1,0) apresentaram-se significativamente maiores que o grupo I (controle) ($p < 0,05$), porém não houve diferença estatisticamente significativa entre as doses utilizadas (grupos II e III) ($p = 0,7075$).

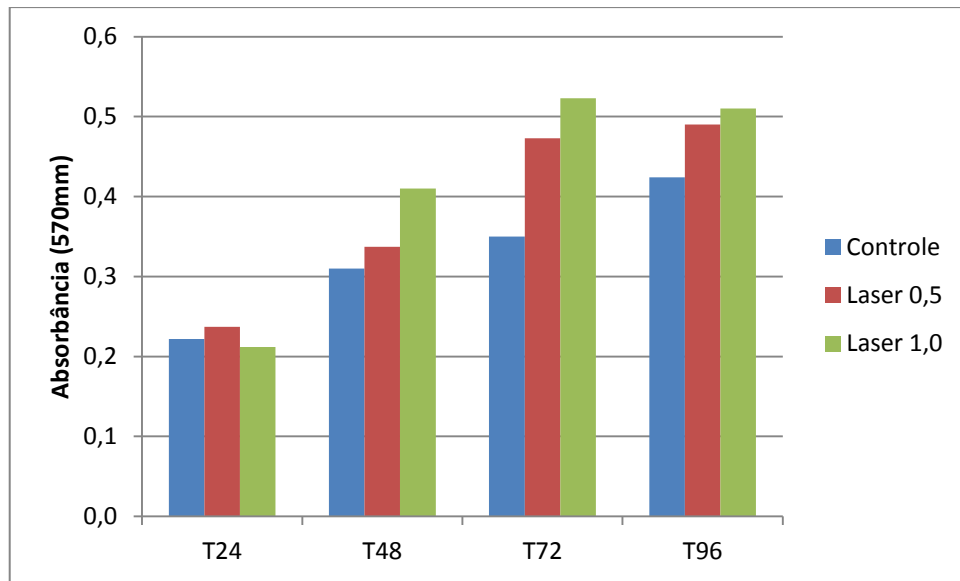


Figura 10. Nível de absorbância do MTT das DPSCs durante os intervalos de tempo analisados.

Tabela 2. Análise do nível de absorbância do MTT das DPSCs em cada intervalo de tempo após a lasertapia nos diferentes grupos estudados. Natal, RN – 2013.

	Grupo I (Controle)	Grupo II (Laser 0.5)	Grupo III (Laser 1.0)	p^*		
	Média \pm DP	Mean \pm SD	Média \pm DP	I vs. II	I vs. III	II vs. III
T24	0,22 \pm 0,07	0,23 \pm 0,08	0,21 \pm 0,08	0,9539	0,8398	0,7508
T48	0,31 \pm 0,10	0,33 \pm 0,11	0,41 \pm 0,13	0,9310	0,0998	0,1841
T72	0,35 \pm 0,11	0,47 \pm 0,12	0,52 \pm 0,19	0,0351	0,0403	0,7075
T96	0,42 \pm 0,2	0,49 \pm 0,12	0,51 \pm 0,15	0,2602	0,1124	0,4357

*Teste *Mann-Whitney*. Os valores em negrito representam diferença estatisticamente significante. ($p < 0,05$)

A avaliação da Viabilidade celular (Tabela 3) mostra que não houve alteração significativa no percentual das DPSCs viáveis ($p > 0,05$) durante o experimento, independente do grupo analisado, variando de 92% (Grupo I) a 99,2% (Grupo III). Destaca-se que as maiores porcentagens de viabilidade foram observadas nos grupos irradiados (II e III).

Tabela 3. Análise do percentual de viabilidade celular das DPSCs em cada intervalo de tempo.

	Grupo I (Controle)	Grupo II (Laser 0.5)	Grupo III (Laser 1.0)	p*
T24	92%	92,5%	96%	>0,05
T48	97,5%	98,4%	99,2%	
T72	95%	97,5%	97,4%	
T 96	96,8%	98,4%	98%	

*Teste Kruskal-Wallis

5.3- Efeitos do laser de baixa intensidade sobre a viabilidade e morte celular por Anexina V /PI

A partir dos dot-plots obtidos na citometria foi possível observar que as células tiveram baixa marcação positiva para a Anexina V e para o Iodeto de Propídeo (PI), marcadores de morte celular. No intervalo de 24 horas as células representaram 94,9%, 93,8% e 96% de células viáveis nos grupos I, II e III, respectivamente (Figura 11). No intervalo de 72 horas, as células representavam 98.5%, 98,2% e 98,7% de células viáveis nos grupos I, II e III, respectivamente (Figura 12).

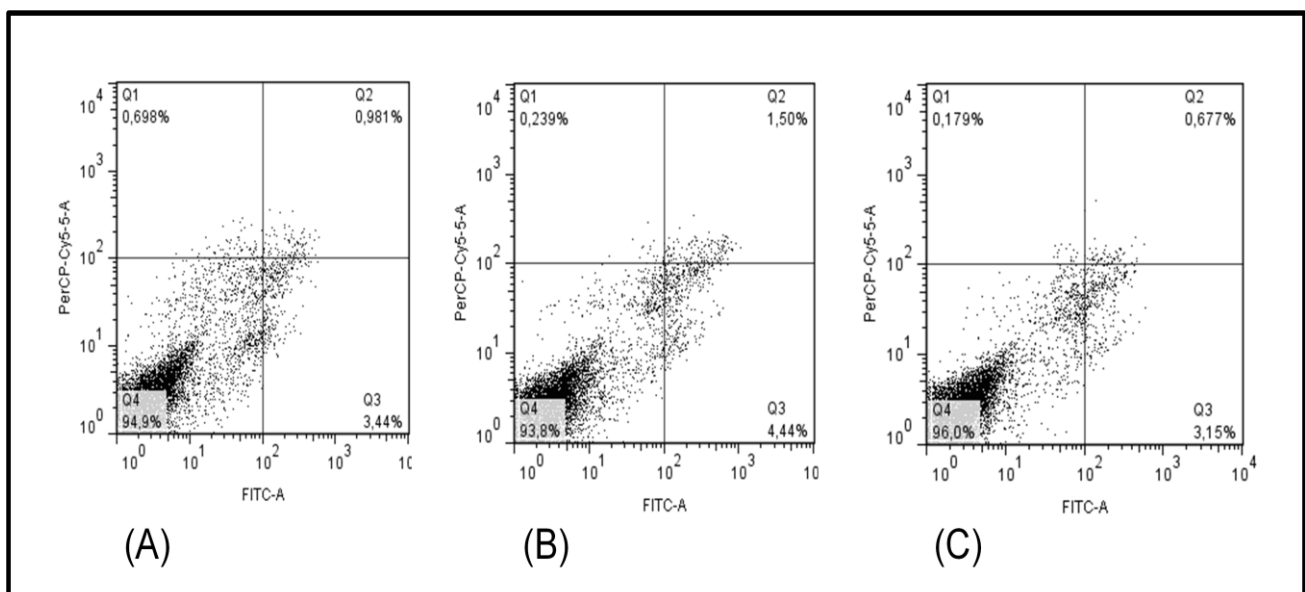


Figura 11. Imunomarcção das DPSCs com Anexina V/PI. Q1:Anexina V negativo/PI positivo; Q2: Anexina V/PI positivos; Q3:Anexina V positivo/PI negativo; Q4: Anexina V/PI negativos. (A) Grupo I (controle), intervalo de 24 horas; (B) Grupo II (Laser 0,5 J/cm²), intervalo de 24 horas; (C) Grupo III (Laser 1,0 J/cm²), intervalo de 24 horas.

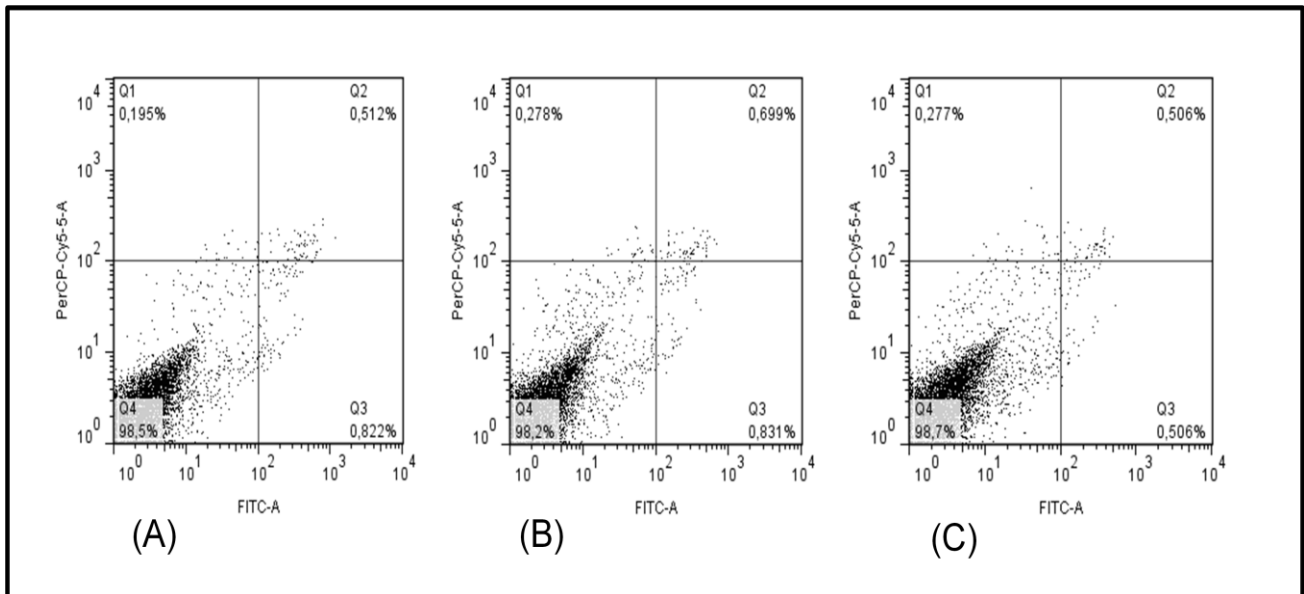


Figura 12. Imunomarcagem das DPSCs com Anexina V/PI. (A) Grupo I (controle), intervalo de 72 horas; (B) Grupo II (Laser $0,5 \text{ J/cm}^2$), intervalo de 72 horas; (C) Grupo III (Laser $1,0 \text{ J/cm}^2$), intervalo de 72 horas.

5.4- Efeitos do laser de baixa intensidade sobre o ciclo celular

A análise do ciclo celular para as DPSCs nos diferentes grupos e intervalos de tempo encontra-se representada na figura 13, que ilustra a porcentagem de células em cada fase do ciclo. Como demonstrado nesta figura, 24 horas após o plaqueamento, os três grupos experimentais apresentaram um percentual maior de células na fase G₀/G₁ (mais de 50%), porém sem diferença estatística significativa entre eles ($p > 0,05$). No intervalo de 48 horas (T48), o percentual de células em S aumentou nos três grupos demonstrando que as células estavam em fase de duplicação de material genético, ou seja, proliferando. Por fim, nos últimos intervalos de tempo analisados foi possível observar que aproximadamente 85% das células estavam distribuídas nas fases S e G₂/M.

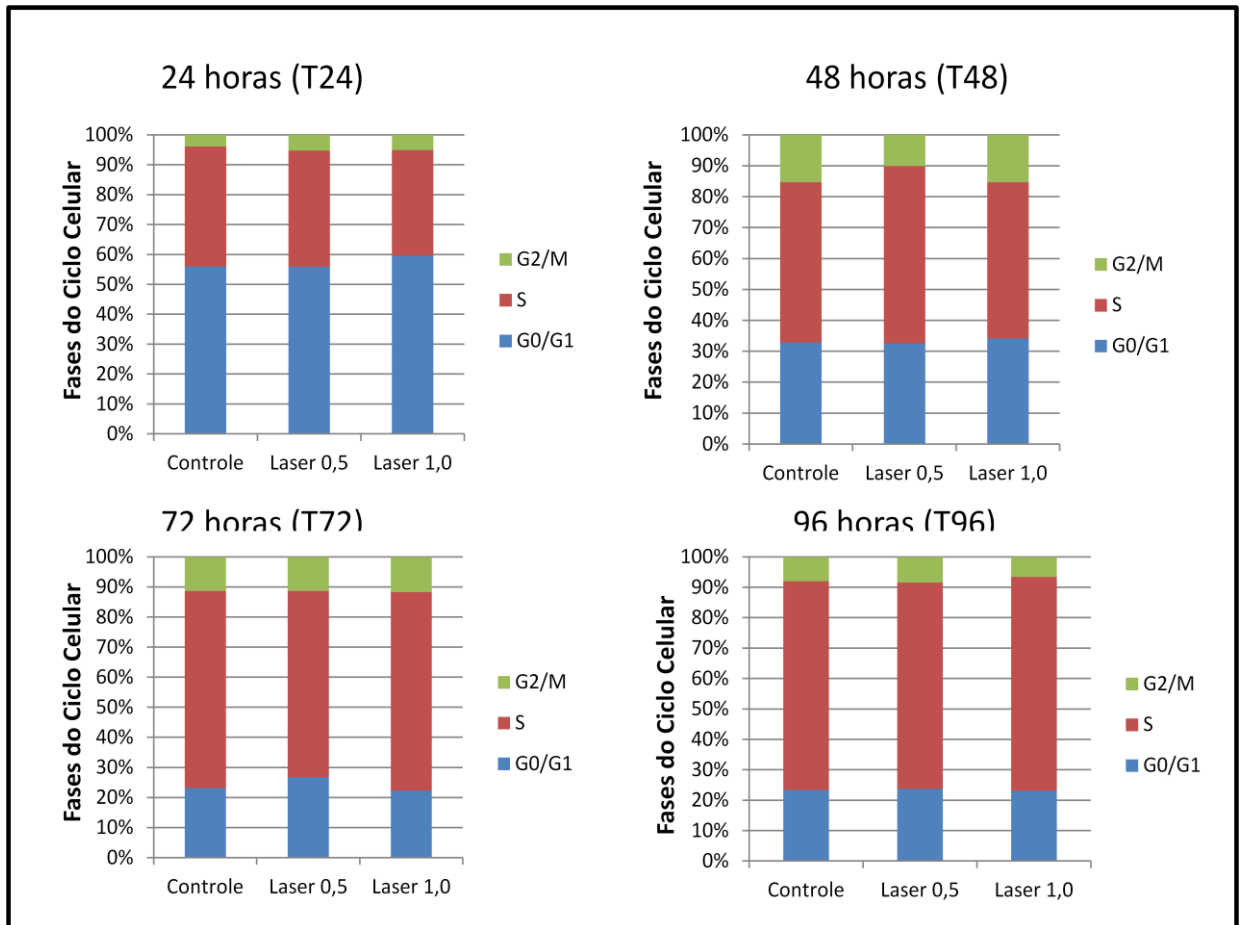


Figura 13. Distribuição das DPSCs nas fases do ciclo celular para os diferentes grupos estudados, nos intervalos de tempo analisados.

DISCUSSÃO

6- Discussão

O uso de células-tronco mesenquimais (CTMs) para o futuro da engenharia de tecidos e medicina regenerativa para substituir modalidades terapêuticas convencionais tem sido objeto de crescente interesse em diferentes áreas. O papel destas células na reparação de tecidos tem sido muito estudado, devido as suas propriedades de auto-renovação, além da capacidade de diferenciar-se em um ou vários tipos de células especializadas em diferentes condições controladas *in vitro* (CAPLAN, 1991; TUBY, MALTZ, ORON, 2007). Dessa forma, o conhecimento de terapias capazes de melhorar as condições de crescimento de células-tronco têm se tornado tema de muitas pesquisas na atualidade.

As células-tronco dentais foram identificadas em primeiro lugar em polpa de dentes permanentes (GRONTHOS et al., 2000) e mais tarde em outras fontes dentárias e periodontais, incluindo o ligamento periodontal (SEO et al., 2004). Neste estudo optou-se por utilizar células-tronco da polpa dentária humana (DPSC), pois estas representam um modelo útil para estudos de biologia celular, podendo ser facilmente isoladas e expandidas em cultura, além de mostrar plasticidade multipotencial *in vitro* e *in vivo* (GRONTHOS et al., 2000; SHI et al., 2005; KERKIS et al., 2006; DE MENDONÇA-COSTA et al.; 2008).

Dominici et al. (2006) afirmam que, de acordo com a Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT), as células-tronco mesenquimais devem expressar $\geq 95\%$ de positividade para CD105, CD73 e CD90, por meio da citometria de fluxo. Além disso, estas células deve apresentar ausência de expressão ($\leq 2\%$ positivo) de CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 α ou CD19 e de HLA-DR de classe II, uma vez que são marcadores de células-tronco hematopoiéticas. Ademais, as células devem ser capazes de diferenciar-se em osteoblastos, adipócitos e condroblastos sob condições de diferenciação *in vitro* padrão. Neste contexto e baseado na caracterização celular evidenciada na presente pesquisa, pode-se confirmar a origem mesenquimal das células isoladas da polpa de dentes permanentes, pois a porcentagem de positividade para os marcadores e a capacidade de diferenciação em duas linhagens celulares (osteoblastos e adipócitos) estão de acordo com os critérios propostos para a definição de CTMs.

O estímulo à proliferação tem sido indicado como o efeito biológico mais importante do laser de baixa intensidade (LBI) (WU et al., 2012). Este efeito tem sido observado em estudos com cultura de fibroblastos (HAWKINS, ABRAHAMSE, 2006), células endoteliais (MOORE et al., 2005), osteoblastos (FUJIHARA, HIRAKI, MARQUE, 2006), células epiteliais (EDUARDO et al., 2007) e linfócitos (BENEDICENTI et al., 2008).

No que diz respeito à proliferação de células-tronco mesenquimais, um efeito positivo do LBI em medula óssea (WU et al., 2012) e células-tronco do tecido adiposo têm sido relatado na literatura (MVULA, MOORE, ABRAHAMSE, 2010; DE VILLIERS, HOUREL, ABRAHAMSE, 2011). No entanto, pouco se sabe sobre o efeito do laser em células-tronco adultas derivadas de outras fontes. Portanto, torna-se importante a investigação do LBI sobre a taxa de proliferação de células-tronco da polpa dentária humana (DPSC).

A laserterapia baseia-se em efeitos fotobiológicos nas células e tecidos. O processo pelo qual o laser influencia nas funções celulares começa quando fótons entram no tecido e são absorvidos por fotorreceptores localizados nas mitocôndrias. Esses fotorreceptores interagem fortemente com o comprimento de onda do laser. A energia fotônica é convertida em energia química dentro da célula, sob a forma de ATP, o que conduz ao aumento das funções celulares, o alívio da dor e a cura. Ocorrem alterações na permeabilidade da membrana celular, e em seguida, podem ocorrer alterações fisiológicas. Estas mudanças fisiológicas podem afetar os macrófagos, fibroblastos, células endoteliais, mastócitos, a liberação de mediadores da inflamação e taxas de condução nervosa (SCHINDL et al. 2003). Baseando-se na relação direta entre a proliferação celular e atividade mitocondrial, tornou-se relevante, no presente estudo, a análise de ensaio do MTT, representando outro parâmetro de análise de viabilidade celular além do método de exclusão de Azul de Tripán.

Peplow, Chung, Baxter (2010) afirmam que a comparação entre os resultados de pesquisa anteriores torna-se difícil devido à grande variação de parâmetros de irradiação, metodologias utilizadas e tipos de células. Portanto, um levantamento da literatura foi fundamental para a determinação dos parâmetros utilizados na presente pesquisa.

Na literatura observa-se que o comprimento de onda, a potência e a densidade de energia são fatores que influenciam a terapia a laser para obter os resultados desejados ou para maximizar estes resultados. Estudos *in vitro* demonstraram que tanto o espectro de luz visível quanto o invisível podem estimular a proliferação celular. No entanto, a maioria dos estudos que relataram resultados satisfatórios tem usado o espectro de luz visível (EDUARDO et al., 2008; HORVÁT-KARAJZ et al., 2009; MVULA, MOORE, ABRAHAMSE, 2010). Com base nos artigos revisados, o espectro de luz visível também foi utilizado neste estudo.

O comprimento de onda da laserterapia parece influenciar o seu efeito em culturas de células. Estudos anteriores demonstraram que comprimentos de onda no espectro de luz visível (600 a 700 nm), promovem um aumento de proliferação e diferenciação celulares (TUBY, MALTZ, ORON, 2007; STEIN et al. 2008). Em contraste, a luz no espectro infravermelho (810-830 nm), tem sido associada à inibição de proliferação de alguns tipos de

células (MOORE et al. 2005). Com base nestes resultados, optou-se por um comprimento de onda de 660 nm, que promoveu efeitos estimulantes positivos, semelhantes aos relatados por Eduardo et al. (2008), Horvat-Karajz et al. (2009) e Soares et al. (2013).

Tunér e Hoder (2007) sugerem que a bioestimulação pode ser alcançada com densidades de energia que variam de valores tão baixo como 0,001 até 10 J/cm². Os autores ressaltam que a diferença relevante entre as doses utilizadas para a bioestimulação pode ocorrer devido à variação dos estudos *in vitro*, em que as células são irradiadas em apenas uma camada, e estudos *in vivo*, com sobreposição de camadas de células. A resposta celular à irradiação a laser de baixa intensidade também está relacionada como tipo de tecido, o estado do tecido irradiado e também com os métodos experimentais utilizados na cultura de células. Além disso, as diferentes condições de irradiação a laser incluindo as características do feixe de laser, a dispersão da luz, a potência de saída, a calibração do equipamento, as condições nutricionais das células irradiadas, entre outros fatores também devem ser considerados (LI et al., 2010).

Recentemente AlGuamdi, Kumar, Moussa (2012), em uma revisão sistemática, sugeriram que um valor de densidade de energia de 0,5- 4,0 J/cm² são muito úteis na melhoria da taxa de proliferação de várias linhagens celulares. Com o uso adequado de LBI a taxa de proliferação de células em cultura, incluindo as células-tronco, pode ser aumentada, o que seria muito útil em engenharia de tecidos e medicina regenerativa. O LBI é capaz de aumentar o número de células, a síntese de DNA e RNA e a produção de colágeno. Além disso, é capaz de iniciar a mitose celular em cultura. Tais achados também sugerem que as densidades de energia superiores a 5 J/cm² geralmente não são benéficos para a proliferação de células. Assim, o desafio das pesquisas atuais é identificar qual seria a menor densidade de energia capaz de promover a proliferação celular, visando estudos posteriores de reparação tecidual.

Eduardo et al.(2008) foram os primeiros a analisar o efeito de LBI em células-tronco derivadas da polpa de dentes permanentes (DPSCs). Inicialmente as DPSC foram cultivadas em diferentes condições nutricionais (5, 10, 12.5 e 15% de FBS) para determinar a concentração ideal. Foi observado que a proliferação das células em cultivos com suplementação de 15% de FBS foi significativamente maior que as outras condições nutricionais. Diante dos melhores resultados obtidos em cultivos utilizando 15% de FBS, na presente pesquisa, também foi utilizada esta mesma condição nutricional.

Com relação ao LBI, ainda no estudo realizado por Eduardo et al. (2008), parte dos poços de cultivo foram irradiados e a outra metade não foi irradiada (controle). O LBI do tipo diodo InGaAIP foi utilizado com duas configurações de energias diferentes (20 mW / 6

segundos e 40 mW / 3 segundos), com comprimento de onda de 660 nm e uma densidade de energia de 3,0 J/cm². Foi relatado sucesso significativamente maior na proliferação celular das DPSCs irradiadas no grupo com 20mW de potência. No presente estudo, foram estabelecidos parâmetros diferentes para a análise da proliferação, quanto à potência (30mW) e à densidade de energia (0,5 e 1,0 J/cm²), mantendo-se o mesmo comprimento de onda (660nm).

De acordo com Karu (1987), um aumento da densidade de energia pode danificar os fotorreceptores, com a consequente redução no efeito biomodulador do laser. Seguindo este princípio, Soares et al. (2013) utilizou as densidade de energia 0,5 a 1,0 J/cm² para promover a bioestimulação de células-tronco derivadas do ligamento periodontal. No presente estudo, a escolha da densidade de energia também baseou-se nestes princípios, uma vez que a finalidade da pesquisa foi obtenção de efeito biomodulatórios positivos. De acordo com a potência, a densidade de energia e o comprimento de onda determinados, utilizando em modo de ação contínuo, o aparelho de laser, tipo diodo InGaAlP (Kondortech – Bio Wave LLLT Dual, Brazil) calculava o tempo de irradiação necessário para atingir as duas densidades de energia 0,5 e 1,0 J/cm² (16 e 33 segundos, respectivamente).

A literatura mostra que além da densidade de energia, da potência e do comprimento de onda, o número ideal de aplicações de laser para diferentes situações também é um fator que influencia os resultados. Li et al. (2010) irradiaram células-tronco da medula óssea numa única sessão ou em múltiplas sessões, com um intervalo de 48 horas, durante um período de 13 dias. As células que foram irradiadas em única sessão apresentaram aumento da proliferação nos dois primeiros dias após a irradiação, com diminuição ou estabilização da curva de crescimento após este período.

Hawkins e Abrahamse em 2006 irradiaram fibroblastos com LBI, utilizando várias densidades de energia, em dois dias consecutivos, observando que a segunda aplicação do LBI acelerou o processo de proliferação e aumentou a viabilidade celular. Resultados semelhantes foram vistos no presente trabalho, onde diferenças estatísticas entre os dois grupos irradiados e o grupo controle foi observada somente após a segunda irradiação. Além disso, foi possível identificar, na presente pesquisa, que o laser, nas duas densidades de energia, não interferiu na viabilidade das células irradiadas. De fato, através das contagens celulares e através da análise em citometria de fluxo para os eventos relacionados à morte celular (apoptose e necrose) comprovou-se que a maioria das células mantiveram-se viáveis e o percentual de viabilidade até aumentou tanto para o grupo controle como nos grupos irradiados após as duas aplicações de LBI.

Os resultados do estudo de Soares et al. (2013) mostraram que a potência de 30 mW em combinação com uma densidade de energia de $1,0 \text{ J/cm}^2$ apresentaram efeito positivo e cumulativo ao longo do tempo, após duas irradiações com intervalo entre elas de 48 horas. Uma dose mais baixa ($0,5 \text{ J/cm}^2$) pareceu ter pouca influência sobre a taxa de proliferação de células-tronco do ligamento periodontal. Nos resultados deste experimento, seguindo os mesmo parâmetros de Soares et al (2013), porém irradiando DPSCs, observou-se resultados significativos para densidade de energia de $0,5 \text{ J/cm}^2$ em apenas um intervalo de tempo (72 h), demonstrando que não houve efeito cumulativo nesta densidade, concordando, dessa forma, com a afirmação de Soares et al. (2013) sobre a pouca influência da irradiação com $0,5 \text{ J/cm}^2$, enquanto que a dose de $1,0 \text{ J/cm}^2$ apresentou curva ascendente de proliferação até o último intervalo analisado (96 h).

De acordo com Huang et al. (2009), a terapia a laser exerce um efeito dose dependente sobre respostas biológicas e parece ter um efeito cumulativo em cada nova dose aplicada. Este efeito cumulativo foi confirmado no presente estudo, o qual exibiu uma curva de crescimento ascendente a partir da segunda irradiação (48h), comprovado tanto pela marcação com Azul de Tripán quanto pelo ensaio MTT. A aceleração da proliferação foi mais evidente no intervalo de 72h (24h após a segunda irradiação), apresentando um aumento significativo do número de células nos dois grupos irradiados com relação ao grupo controle (não irradiado) e um aumento da atividade mitocondrial, não havendo diferença entre as duas densidades de energia ($0,5$ e $1,0 \text{ J/cm}^2$). Porém, foi observado, na análise com Azul de Tripán que no intervalo de 96 horas apenas o grupo III ($1,0 \text{ J/cm}^2$) apresentou diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo controle.

De fato, a densidade de energia parece influenciar os efeitos promovidos pelo laser de baixa intensidade. Para Huang et al. (2009) se uma densidade de energia insuficiente é aplicada, não ocorre resposta celular por que o limite mínimo não foi atingido. Segundo os autores, para que ocorra bioestimulação, o limite mínimo deve ser alcançado aplicando-se mais energia. A partir dos resultados positivos relacionados à dose de $1,0 \text{ J/cm}^2$ associado ao aumento da viabilidade das células após as duas aplicações do LBI, pode-se afirmar que a está dose representa a menor densidade de energia necessária que apresenta a capacidade de promover o aumento da proliferação celular, visando estudos posteriores de medicina regenerativa.

Com a finalidade de confirmar o possível efeito do laser de baixa intensidade na proliferação das DPSCs foi avaliado o ciclo celular, por meio da citometria de fluxo. Segundo Scharfetter et al. (2011), a diminuição da porcentagem de células na fase G0/G1 associado a

aumento de células nas fases S e G2/M, indica que houve transferência da fase G1 para S e G2/M, indicando proliferação. Esta transição foi observada no presente estudo, onde um aumento do percentual de células que se encontravam nas fases proliferativas do ciclo (S, G2/M) foi observado com o decorrer do tempo. Destacando-se que, nos últimos intervalos de tempo analisados, foi possível observar que aproximadamente 85% das células estavam distribuídas nas fases S e G2/M, porém sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados.

Os dados encontrados na presente pesquisa apresentam-se todos concordantes, pois o grande percentual de células na fase proliferativa do ciclo celular (S e G2/M), nos últimos intervalos analisados, está de acordo com a curva ascendente de crescimento e as análises morte celular, onde o aumento da proliferação e viabilidade foram alcançados em 72 e 96 horas. Dessa forma, diante destes dados e achados na literatura pode-se sugerir que a combinação da terapia a laser à engenharia de tecidos com células-tronco da polpa de dentes permanentes podem melhorar ainda mais os resultados de regeneração tecidual em estudos clínicos, uma vez que a laserterapia pode influenciar significativamente na melhora da cicatrização tecidual.

CONCLUSÕES

7- Conclusões

- A natureza multipotencial das células analisadas foi confirmada através da marcação por anticorpos de CTM e pela capacidade de diferenciação em osteoblastos e adipócitos observados.

-O protocolo de laserterapia proposto (30mW, 660nm, 0,5 ou 1,0J/cm²) alterou positivamente a capacidade proliferativa *in vitro* das DPSCs. Os efeitos biomoduladores positivos foram superiores quando a dose de 1,0J/cm² foi utilizada.

-A laserterapia não interferiu sobre o ciclo celular nem sobre a viabilidade e morte das DPSCs *in vitro* mesmo após duas aplicações de LBI.

-Os resultados da curva de crescimento, MTT, Anexina/PI e Ciclo celular foram concordantes, dessa forma é possível concluir que o LBI, principalmente com dose de 1,0J/cm², representa uma terapia de grande importância para o futuro da engenharia tecidual e medicina regenerativa envolvendo DPSCs, uma vez que neste estudo o LBI contribuiu com o crescimento e viabilidade celular.

REFERÊNCIAS

Referências Bibliográficas:

ABRAMOVITCH-GOTTLIB, L. et al. Low-level laser irradiation stimulates osteogenic phenotype of mesenchymal stem cells seeded on a threedimensional biomatrix. **Lasers Med Sci.** v.20, p.138–146, 2005.

ALGHAMDI, K.M.; KUMAR, A.; MOUSSA, N.A. Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. **Lasers Med Sci.** v.27, p.237–249, 2012.

ALMEIDA-LOPES, L. et al. Comparison of the Low Level Laser Therapy Effects on Cultured Human Gingival Fibroblasts Proliferation Using Different Irradiance and Same Fluence. **Laser Surg Med.** v. 29, p.179-184, 2001.

ARTHUR, A. et.al. Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues. **Stem Cells.** v.26, n.7, p.1787–95, 2008.

BATOULI, S. et al. Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis. **J Dent Res.** v.82, n.12, p.976-81, 2003.

BENEDICENTI, S. et al. Intracellular ATP level increases in lymphocytes irradiated with infrared laser light of wavelength 904 nm. **Photomed Laser Surg.** v.26, n.5, p.451-3, 2008.

BIANCO, P. et al. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. **Stem Cells.** v.19, n.3, p.180-92, 2001.

BROWN, M.C. An evidence-based approach to patient selection for laser vision correction. **J Refract Surgv** v.25, p.S661-67, 2009.

CAPLAN, A.I. Mesenchymal stem cells. **J Orthop Res.** v.9, p.641–650, 1991

CAPLAN, A.I. Review: mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics. **Tissue Eng,** v.11, n.7-8, p.1198-1211, 2005.

CARNEVALLI, C.M. et al. Laser light prevents apoptosis in Cho K-1 cell line. *J Clin Laser Med Surg*.v.21, n.4, Aug, p.193-6, 2003.

CARVALHO, P.A. et al. Evaluation of low-level laser therapy in the prevention and treatment of radiation-induced mucositis: a double-blind randomized study in head and neck cancer patients. **Oral Oncology**, v.47, n.12, p.1176-81, 2011.

CORDEIRO, M.M. et al. Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. **J Endod** . v.34, n.8, p.962-9, 2008.

DA SILVA MEIRELLES, L.; CAPLAN, A.I.; NARDI, N.B. In search of the in vivo identify of mesenchymal stem cells. **Stem Cells**. v.26, n.9, p.2287-99, 2008.

DE MENDONÇA COSTA, A.M. et al. Reconstruction of large cranial defects in non-immunosupressed rats with human stem cells A preliminary report. **J Craniofac Surg**. v.19, n.1, p.204–210, Jan, 2008.

DENNIS, J.E.; CHARBORD ,P. Origin and differentiation of human and murine stroma. **Stem Cells**. v.20, p.205–214, 2002.

DE VILLIERS, J.A.; HOURELD, N.N.; ABRAHAMSE, H. Influence of low intensity laser irradiation on isolated human adipose derived stem cells over 72 hours and their differentiation potential into smooth muscle cells using retinoic acid. **Stem Cell Rev and Rep**. v.7, p.869-82, 2011.

DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotentmesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**. v.8, n.4, p.315-7, 2006.

EDUARDO, F.P. et al. Cultured epithelial cells response to phototherapy with low intensity laser. **Lasers Surg Med**. v. 39, p.365–72, 2007.

EDUARDO, F.P. et al. Stem cell proliferation under low-intensity laser irradiation: a preliminary study. **Lasers Surg Med**. v. 40, p.433–438, 2008.

FERRARI, R.A.M. et al. Effects of low-level laser therapy on expression of TNF- α and TGF- β in skeletal muscle during the repair process. *Lasers Med Sci.* v.26, p.335-340, 2011.

FRIEDMANN, H. et al. A possible explanation of laser-induced stimulation and damage of cell cultures. *J Photochem Photobiol B* . v.11, p.87–91, 1991.

FUJIHARA, N.A.; HIRAKI, K.R.; MARQUES, M.M. Irradiation at 780 nm increases proliferation rate of osteoblasts independently of dexamethasone presence. *Lasers Surg Med*, v.38, n.4, p.332-6, 2006.

GAO, X.; XING, D. Molecular mechanisms of cell proliferation induced by low power laser irradiation. *J Biomed Sci.* v.12, p.16:4, Jan, 2009.

GAUTAM, A.P. et al. Low level helium neon laser therapy for chemoradiotherapy induced oral mucositis in oral cancer patients - a randomized controlled trial. *Oral Oncology*, v.48, p.893-7, 2012.

GODOY, B.M. et al. Effects of low-power red laser on dentine-pulp interface after cavity preparation. An ultrastructural study. *Arch Oral Biol*, v.52, n.9, p.899–903, 2007.

GRONTHOS, S. et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. v.97, n.25, p.13625-30, 2000.

GRONTHOS, S. et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res*. v.81, n.8, p.531-5, 2002.

GRONTHOS, S. et al. Ovine periodontal ligament stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Calcif Tissue Int*. v.79, p.310-317; 2006.

HAWKINS, D.H.; ABRAHAMSE, H. Effect of multiple exposures of low-level laser therapy on the cellular responses of wounded human skin fibroblasts. *Photomedicine and Laser Surgery*. v.24, p.705–14, 2006.

HAWKINS DH, ABRAHAMSE H. Time-dependent responses of wounded human skin fibroblasts following phototherapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology**. v.88, p.147–55, 2007.

HORVAT-KARAJZ, K.; BALOGH, S. In vitro effect of carboplatin, cytarabine, paclitaxel, vincristine, and low-power laser irradiation on murine mesenchymal stem cells. **Lasers Surg Med**. v. 41, p.463–469, 2009.

HOU, J.F. et al. In vitro effects of low-level laser irradiation for bone marrow mesenchymal stem cells: proliferation, growth factors secretion and myogenic differentiation. **Lasers Surg Med**. v. 40, p.726–733, 2008.

HUANG, Y.Y. et al. Biphasic dose response in low level light therapy. **Dose-Response**, v.7, p.358-83, 2009.

HUANG, X. et al. Smad4-Shh-Nfic signaling cascade-mediated epithelial-mesenchymal interaction is crucial in regulation tooth root development. **J Bone Miner Res**. v.25, n;5, p.1167-78, 2010.

KAMALI, F. et.al. The therapeutic effect of low-level laser on repair of osteochondral defects in rabbit knee. **J Photochem Photobiol B**. v.88, p.11–15, 2007.

KARU, T.I. Photobiological fundamentals of low-power laser therapy. **J Quantum Electron**. V.23, p.1703-17, 1987.

KARU, T.I.; KOLYAKOV, S.F. Exact action spectra for cellular responses relevant to phototherapy. *Photomed Laser Surg*. v.23, n.4, p.355-61, Aug, 2005.

KERKIS, I. et al. Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cells markers. **Cell Tissues Organs**. v.184, n.3–4, p.105–116, 2006.

KERKIS, I. et al. Early transplantation of human immature dental pulp stem cells from baby teeth to golden retriever muscular dystrophy(GRMD) dogs: local or

systemic? **J Transl Med**, v.6, n.35, p.1–13, 2008.

KNEEBONE, W.J.; CNC, D.I.H.; FIAMA, D. Practical applications of low level laser therapy. **Pract Pain Manage**. v.6, n.8, p.34–40, 2006.

KOLYA, C.L.; CASTANHO, F.L. Células-tronco e a Odontologia. **ConScientiae Saúde**. v.6, n.1, p.165-71, 2007.

KOTLOW L. Photobiomodulating lasers and children's dental care. **J Laser Dent**. v.17, n.3. p.125–30, 2009.

KRABBE, C.; ZIMMER, J.; MEYER ,M. Neural transdifferentiation of mesenchymal stem cells- a critical review. **APMIS**. v.113, n.11-12, p.831-44, 2005.

KRAMER, P.R. et al. Mesenchymal stem cells acquire characteristics of cells in the periodontal ligament in vitro. **J Dent Res**. v.83, n.1, p.27-34, 2004.

KREISLER, M. et al. Low level 809nm diode laser induced in vitro stimulation of the proliferation of human gingival fibroblasts. **Lasers Surg Med**. v.30, n.5, p.365-9, 2002.

LEONIDA, A. et al. Effects of low-level laser irradiation on proliferation and osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells seeded on a three-dimensional biomatrix: in vitro pilot study. **Lasers Med Sci**. v.28, p.125–132, 2013.

LI, W.T.; LEU, Y.C.; WU, J.L. Red-light light-emitting diode irradiation increases the proliferation and osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells. **Photomed Laser Surg**. v.28, p.S157-S165. 2010.

LO B; PARHAM L. Ethical Issues in Stem Cell Research. **Endocr Rev**. v.30, n.3, p. 204–213, May. 2009.

MIURA, M. et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Proc Natl Acad Sci USA** . v.100, n.10, p.5807-12, 2003.

MOORE, P. et al. Effect of wavelength on low-intensity laser irradiation stimulated cell proliferation in vitro. **Lasers Surg Med.** v.36, p.8-12, 2005.

MOORE, T.J. Stem cell Q and A—an introduction to stem cells and their role in scientific and medical research. **Medical Technology AS.** v.21, n.1, p.3–6, 2007.

MURRAY, P.E.; GARCIA-GODOY, F.; HARGREAVES, K.M. Regenerative endodontics: a review of current status and a call for action. **J Endod.** v.33, n.4, p.377-90, 2007.

MVULA, B. e al. The effect of low-level laser irradiation on adult human adipose erived stem cells. **Lasers Med Sci.** v. 23, p.277–282, 2008.

MVULA, B.; MOORE, T.J.; ABRAHAMSE, H. Effect of low-level laser irradiation and epidermal growth factor on adult human adipose-derived stem cells. **Lasers Med Sci.** v.25, n.1, p.33-9, 2010.

NAKASHIMA M, AKAMINE A. The application of tissue engineering to regeneration of pulp and dentin in endodontics. **J Endod.** v.31, n.10, p.711-8, 2005.

NAMMOUR, S. Laser dentistry, current advantages, and limits. **Photomed Laser Surg.** v.30, p.1-4, 2012.

PEPLOW, P.V.; CHUNG, T.Y.; BAXTER, G.D. Laser photobiomodulation of proliferation of cells in culture: a review of human and animal studies. **Photomed Laser Surg.** v.28, Suppl. 1, p.S3–40, 2010.

PINHEIRO, A.L.B. et al. Aplicação do laser na Odontologia. São Paulo: Santos, 2010, 428p.

POGREL, M.A. Application of laser and cryosurgery in oral and maxillofacial surgery. **Curr Opin Dentistry.** v.1, p.263–270, 1991.

PRETEL, H. et al. Evaluation of dental pulp repair using low level laser therapy (688 nm and 785 nm) morphologic study in capuchin monkeys. **Laser Phys Lett.** v. 6, n.2, p.149–58, 2009.

QUICKENDEN, T.; DANIELS, L. Attempted biostimulation of division in *Saccharomyces cerevisiae* using red coherent light. **Photochem Photobiol.** v.57, p.272–278, 1993.

ROY, D. Ablative facial resurfacing. **Dermatol Clin.** v.23, p.549-559, 2005.

SANCHEZ, P.J.M. et al. The effect of 670 nm low laser therapy on herpes simplex type 1. **Photomed Laser Surg.** v.30, p.37-40, 2012.

SCHARTINGER, V H. et al. Differential responses of fibroblasts, non-neoplastic epithelial cells, and oral carcinoma cells to low-level laser therapy. **Support Care Cancer.** v.20, p.523-9, 2011.

SCHINDL, A. et al. Direct stimulatory effect of low-intensity 670 nm laser irradiation on human endothelial cell proliferation. **Br J Dermatol.** v.148, p.334-6, 2003.

SECCO, M. et al. Multipotent stem cells from umbilical cord: Cord is richer than blood. **Stem Cells.** v.26, n.1, p.146–150, Jan, 2008.

SEO, B.M. et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. **Lancet** . v.364, n.9429, p.149-55, 2004.

SERAKINCI, N.; KEITH, W.N. Therapeutic potential of adult stem cells. **Eur J Cancer.** v.42, n.9, p.1243-6, 2006.

SHI, S., ROBEY, P.G., GRONTHOS, S. Comparasion of human dental pulp and bone marrow stromal stem cells by cDNA microarray analisys. **Bone.** v.29, n.6, p.11-8, 2001.

SHI, S. et al. The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. **OrthodCraniofac Res.** v.8, n.3, p.191-9, 2005.

SILVEIRA, P.C. et al. Evaluation of mitochondrial respiratory chain activity in muscle healing by low-level laser therapy. **J Photochem Photobiol B.** v.95, n.2, May, p.89-92, 2009.

SLACK, J.M. Stem cells in epithelial tissues. **Science**, Washington, v.287, n.5457, p.1431-1433, 2000.

SLOAN, A.J., SMITH, A.J. Stem cells and the dental pulp: potential roles in dentine regeneration and repair. **Oral Diseases**. v.13, p.151-57, 2007.

SOARES, AP. et al. Células-tronco em odontologia. **R Dental Press OrtodonOrtop Facial**. v.12, n.1, p.33-40, 2007.

SOARES, D.M. et al. Effects of laser therapy on the proliferation of human periodontal ligament stem cells. **Lsers Med Sci**. DOI 10.1007/s10103-013-1436-9, 2013.

SONG, L.; BAKSH, D.; TUAN ,R.S. Mesenchymal stem cell-based cartilage tissue engineering: cells, scaffold and biology. **Cytotherapy**. v.6, n.6, p.596-601, 2004.

STEIN, A. et al. Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. **Photomed Laser Surg**. v.23, p.161–66, 2005.

STEIN, E. et al. Initial effects of low-level laser therapy on growth and differentiation of human osteoblast-like cells. **Wien Klin Wochenschr**. v.120, n.3-4, p.112-7, 2008.

TAKEDA, T. et al. Characterization of dental pulp stem cells of human tooth germs. **J Dent Res**. v.87, n.7, p.676-81, 2008.

TEMMERMAN, L. et al. Influence of cryopreservation on human periodontal ligament cells in vitro. **Cell Tissue Bank**. v. 9, n.1, p.11-8, 2008.

THOMAS, S. et al. Human neural crest cells display molecular and phenotypic hallmarks of stem cells. **Hum Mol Genet**. v.17, n.21, p.3411-25, 2008.

TUBY, H.; MALTZ, L.; ORON, U. Low-level laser irradiation (LLLI) promotes proliferation of mesenchymal and cardiac stem cells in culture. **Lasers Surg Med**. v.39, p.373–378, 2007.

TUNÉR, J.; HODE, L. **The laser therapy handbook**. Swedish: Prima Books, 2007.

VASCONCELOS, R.G. et al. In vitro comparative analysis of cryopreservation of undifferentiated mesenchymal cells derived from human periodontal ligament. **Cell Tissue Bank**. v.20, Jul, 2011.

VESCOSI, P. et al. Surgical approach and laser applications in BRONJ osteoporotic and cancer patients. **J. Osteoporos**. DOI: 10.1155/2012/585434, 2012.

VIEIRA, N.M. et al. Human multipotent adipose derived stem cells restore dystrophin expression of Duchenne skeletal muscle cells in vitro. **Biol Cell**. v.100, n.4, p.231– 241, Apr, 2008.

WANG, Z.W. et al. Putative stem cells in human dental pulp with irreversible pulpitis: an exploratory study. **J Endod**. v.36, p.820–825, 2010.

WU, Y.H. et al. Effects of low-level laser irradiation on mesenchymal stem cell proliferation: a microarray analysis. **Lasers Med Sci**, v.27, p.509-19, 2012.

YAZDANI, S.O. et al. Effects of low level laser therapy on proliferation and neurotrophic factor gene expression of human schwann cells in vitro. **J Photochem Photobiol B**. v.6, p.107:9-13, 2012.

ANEXO

ANEXO A - Aprovação do comitê de Ética em Pesquisa (CEP/HUOL)

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
ONOFRE LOPES-HUOL/UFRN



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ATIVIDADE BIOLÓGICA DE CÉLULAS-TRONCO DA POLPA DENTAL HUMANA SUBMETIDAS À IRRADIAÇÃO LASER DE BAIXA INTENSIDADE

Pesquisador: Carlos Augusto Galvão Barboza

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 14132413.4.0000.5292

Instituição Proponente: Pós-Graduação em Saúde Coletiva

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 227.341

Data da Relatoria: 22/03/2013

Apresentação do Projeto:

O projeto é decorrente de um TCC mestrado com o objetivo de avaliar, através de experimentos in vitro, a influência da irradiação de laser de baixa intensidade na atividade biológica de células-tronco da polpa de terceiros molares permanentes humanos hígidos.

Objetivo da Pesquisa:

O presente estudo tem como objetivo avaliar, através de experimentos in vitro, a influência da irradiação de laser de baixa intensidade na atividade biológica de células-tronco da polpa de terceiros molares permanentes humanos hígidos.

2.2- Objetivos Específicos:

Avaliar a influência do laser de baixa intensidade na capacidade de adesão e proliferação in vitro das células-tronco da polpa de dente terceiro molar permanente, nos períodos de 6, 24, 48, 72 e 96 horas;

Avaliar influência do laser de baixa intensidade na capacidade de diferenciação osteogênica in vitro das células-tronco da polpa de dente terceiro molar permanente, nos intervalos de 7, 14 e 21 dias;

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
ONOFRE LOPES-HUOL/UFRN



Avaliação dos Riscos e Benefícios:

São adequadamente expressos os riscos e benefícios da referida pesquisa além da possibilidade de ressarcimento e dano decorrente da pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A proposta busca esclarecer o papel do laser na estimulação de células tronco e a possibilidade de conhecimento sobre estes aspectos na odontologia, com a utilização do material decorrente de uma extração dentária definida por outra necessidade.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Há adequada apresentação no TCLE dos principais aspectos e objetivos da pesquisa clarificando o participante para uma tomada de decisão informada.

Recomendações:

Sugere-se no projeto (Critérios de Inclusão e Exclusão) supressão da expressão raça. O cronograma pode ser mais detalhado incluindo período em meses de forma que o leitor possa relacionar as etapas ao tempo previsto.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não são observadas alterações que gerem pendencias no projeto

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

NATAL, 23 de Março de 2013

Assinador por:
Joao Carlos Alchieri
(Coordenador)

APÊNDICE

APÊNDICE A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E DESPORTO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE COLETIVA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos você para participar da pesquisa sobre **“Atividade biológica de células-tronco da polpa dental humana submetidas à irradiação laser de baixa intensidade”** que tem por objetivo avaliar o efeito do laser no crescimento das células-tronco da polpa dental (interior do dente), o que pode no futuro contribuir para o avanço no tratamento de várias doenças.

A sua participação terá risco mínimo, nada além daquele que o procedimento cirúrgico para extração dentária oferece, como inchaço, dor e sangramento. Você não será submetido a nenhum procedimento (extra) além da cirurgia de remoção do dente, que pode ter sido indicada porque o dente não erupcionou, por razões ortodônticas ou para prevenir reabsorção das raízes do dente vizinho. Nós utilizaremos nesta pesquisa apenas terceiros molares (sisos) que estejam sadios, porém você deve autorizar os pesquisadores a examinarem os seus fragmentos teciduais (dentes removidos), que seriam tirados de sua boca e desprezados após a cirurgia. Depois da remoção da polpa dental, seu dente será descartado de modo adequado (lixo biológico), seguindo os mesmos procedimentos das extrações convencionais. Depois de realizar os testes para avaliar como as células do dente reagem ao laser, todas elas serão descartadas, assim não haverá armazenamento de material biológico. Todas as informações confidenciais serão guardadas em local seguro e somente usadas com o propósito científico, sem divulgação do seu nome.

Sua participação é voluntária, caso queira, você poderá desistir a qualquer momento, sem que isso lhe traga prejuízo ou penalidade, basta que retire o seu consentimento em participar.

A pesquisa deverá contribuir para o aumento do conhecimento na área de engenharia de tecidos, que abrange um campo interdisciplinar onde princípios de engenharia e ciências biológicas são utilizados para o desenvolvimento de substitutos biológicos capazes de recuperar a função do ser vivo. A importância desta pesquisa, portanto, está no fato da necessidade do desenvolvimento e aprimoramento, assim como, um melhor entendimento para facilitar na escolha de tratamentos mais eficazes em regeneração tecidual, trazendo assim, benefícios para a sociedade de um modo geral.

Você não terá nenhum gasto financeiro por qualquer procedimento executado por essa pesquisa e terá direito a reembolso (ressarcimento) de qualquer gasto comprovadamente que você tenha feito para a realização desse estudo, bem como será indenizado em caso de dano comprovadamente ocorrido por sua participação na mesma.

Você receberá uma cópia desse termo no seu endereço via correio com aviso de recebimento e qualquer dúvida a respeito da pesquisa poderá perguntar a Carlos Augusto Galvão Barboza, no Campus Universitário S/N no Departamento de Morfologia do Centro de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Lagoa Nova, Natal/RN, fone (84) 3215-3431, celular (84) 9401-5955 e E-mail: carlosaugusto2000@hotmail.com

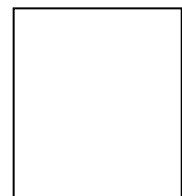
Consentimento Livre e Esclarecido

Declaro que compreendi os objetivos desta pesquisa, como ela será realizada, os riscos e benefícios envolvidos e concordo em participar voluntariamente da pesquisa **“Atividade biológica de células-tronco da polpa dental humana submetidas à irradiação laser de baixa intensidade”**.

Assinatura ou impressão

Digital do voluntário: _____ Data: ___/___/___

Assinatura do pesquisador: _____ Data: ___/___/___



Quanto à ética dessa pesquisa poderá ser questionada ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Onofre Lopes CEP/HUOL, pelo telefone 3342-5003.