

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

PAULA CORRÊA SILVEIRA DA SILVA

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE DÉFICIT NUTRICIONAL E
DENSIDADE DE ENERGIA NA BIOMODULAÇÃO COM LASER DE BAIXA
INTENSIDADE DE CÉLULAS-TRONCO DE DENTES DECÍDUOS ESFOLIADOS
HUMANOS (SHED)**

Alfenas/MG

2017

PAULA CORRÊA SILVEIRA DA SILVA

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE DÉFICIT NUTRICIONAL E
DENSIDADE DE ENERGIA NA BIOMODULAÇÃO COM LASER DE BAIXA
INTENSIDADE DE CÉLULAS-TRONCO DE DENTES DECÍDUOS ESFOLIADOS
HUMANOS (SHED)**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia pela Faculdade de Odontologia da Universidade Federal Alfenas. Área de concentração: Biologia dos tecidos do complexo bucomaxilofacial

Orientadora: Prof^a Dr^a Vivien Thiemy Sakai

Coorientadora: Prof^a Dr^a Nádya Carolina Teixeira Marques

Alfenas/MG

2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central – Campus Sede

Silva, Paula Corrêa Silveira da
S586i Influência de diferentes protocolos de déficit nutricional e densidade de energia na fotobiomodulação de células-tronco de dentes decíduos esfoliados humanos (SHED) / Paula Corrêa Silveira da Silva. -- Alfenas/MG, 2017.
40 f.: il. -

Orientadora: Vivien Thiemy Sakai.
Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas) - Universidade Federal de Alfenas, 2017
Bibliografia.

1. Células-Tronco. 2. Técnicas de Cultura de Células. 3. Terapia a Laser de Baixa Intensidade. I. Sakai, Vivien Thiemy. II. Título.

CDD-617.6



PAULA CORRÊA SILVEIRA DA SILVA

“Influência de diferentes protocolos de déficit nutricional na fotobiomodulação de células-tronco de dentes decíduos esfoliados humanos (SHED)”

A Banca Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Odontologia.

Aprovado em: 18/12/2017

Profa. Dra. Vivien Thiemy Sakai
Instituição: Universidade Federal de Alfenas
UNIFAL-MG

Assinatura: Vivien T. Sakai

Profa. Dra. Gérsika Bittencourt Santos
Instituição: Universidade José do Rosário Vellano
UNIFENAS

Assinatura: Gérsika

Profa. Dra. Marina Lara Carli Dias
Instituição: Universidade Federal de Alfenas
UNIFAL-MG

Assinatura: Marina

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por iluminar sempre meu caminho e tornar tantos sonhos possíveis.

Meus pais, Katia e Rodrigo, agradeço pela educação, formação, carinho, conselhos e ajuda de cada momento.

Minha avó Ruth, obrigada pelo companheirismo de sempre, pelos conselhos, pelos mimos quando precisava, pela comida maravilhosa, que só você sabe fazer!

Meus avós, Martha e Aécio, obrigada pela ajuda, conselhos, por sempre me apoiarem e acreditarem em meu potencial.

Minhas tias Michelle e Thalita, me aconselharam ao longo da vida, em várias decisões, cada uma completamente diferente da outra, cada uma com seu jeitinho, que sempre me incentivaram a ESTUDAR!

Meu priminho Felipe, que com essa inocência e doçura, alegra meus dias, mesmo quando estão sobrecarregados.

Raphael, agradeço por estar sempre ao meu lado, acreditar sempre no meu potencial, me animando. Mesmo quando o nervosismo tomava conta de mim, você conseguia me tirar um sorriso, tornando tudo mais leve.

À todos que me ajudaram no laboratório a realizar a pesquisa, obrigada!
Aos professores e colegas que contribuíram para meu crescimento profissional, obrigada!

Em especial, agradeço às melhores pessoas que poderiam ter aparecido nessa etapa de minha vida, com toda calma, paciência e sabedoria: Vivien e Nádia. Vocês me ajudaram, ensinaram, mostraram esse novo caminho de pesquisa, que não fazia parte de meus estudos antes do Programa de Mestrado. Sou muito grata à todo conhecimento e crescimento que me foi atribuído. Obrigada!

E agradeço a FAPEMIG pelo auxílio à pesquisa.

RESUMO

Estas células, cultivadas em meio de cultura MEM α suplementado com soro fetal bovino (SFB) 10%, entre a 10^a e 15^a passagem, foram submetidas a déficit nutricional com SFB 1% a 1 hora ou 24 horas antes da irradiação (protocolos A ou B, respectivamente). O meio foi mantido com suplementação de SFB 1% durante a irradiação e ao longo do tempo experimental nos grupos de I a IV, enquanto que para os grupos de V a VIII, o meio foi trocado para MEM α suplementado com SFB 10%. As células foram irradiadas com laser vermelho (660 nm) nas seguintes dosimetrias: 2,5 J/cm² (grupos I e V), 5,0 J/cm² (grupos II e VI) e 7,5 J/cm² (grupos III e VII). As células não irradiadas constituíram os controles negativo (grupo IV) e positivo (grupo VIII). A avaliação da citotoxicidade/integridade da membrana celular foi realizada pela quantificação da desidrogenase láctica (LDH) no meio de cultura após a irradiação. A viabilidade celular foi avaliada pelo método MTT 24, 48 e 72 horas após a irradiação. Os dados foram submetidos ao teste ANOVA a 2 critérios seguido pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Os níveis de LDH no meio de cultura em que as SHED eram mantidas foram semelhantes quando comparados os protocolos A e B para a mesma densidade de energia e mesma concentração de SFB no momento da irradiação. No protocolo A, as células estavam mais viáveis 24 horas após a irradiação independente da densidade de energia, já no protocolo B, não houve alteração na viabilidade celular nos grupos IV (controle negativo), V, VI, VII e VIII (controle positivo) ao longo do tempo. Portanto, a indução de estresse celular por meio da suplementação do meio de cultura com SFB 1%, uma hora antes da irradiação, foi mais favorável para a manutenção da viabilidade de SHED após a irradiação, sem alterar os níveis de LDH extracelular, em comparação com os resultados após déficit nutricional por 24 horas.

Palavras-chave: Células-tronco, Técnicas de Cultura de Células, Terapia com Luz de Baixa Intensidade

ABSTRACT

The purpose of the present study was to analyze *in vitro* the effects of different nutritional deficit conditions to induce the state of cellular stress, prior to irradiation with different dosimetries of Low Level Laser Therapy (LLLT), on the biomodulation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED). These cells, cultured in MEM α culture medium supplemented with 10% FBS, between the 10th and 15th passage, were subjected to nutritional deficit with 1% FBS one hour or 24 hours prior to irradiation (protocols A or B, respectively). In both protocols, cells were irradiated with red laser (660 nm) in the following dosimetries: 2.5 J/cm² (groups I and V), 5.0 J/cm² (groups II and VI) and 7.5 J/cm² (groups III and VII). Non-irradiated cells constituted the negative (group IV) and positive (group VIII) controls. Evaluation of cytotoxicity/integrity of cellular membrane was performed by the quantification of lactate dehydrogenase (LDH) in the culture medium after irradiation. Cell viability was assessed by MTT method 24, 48 and 72 hours after irradiation. Data were submitted to two-way ANOVA followed by Tukey test ($P < 0.05$). The levels of LDH at the culture medium where SHED were grown were similar when compared protocols A and B for the same energy density and same concentration of FBS during irradiation. In protocol A, cells were more viable 24 hours after irradiation, irrespective of the energy density, while in protocol B, there was no alteration in cell viability in groups IV (negative control), V, VI, VII and VIII (positive control) over time.

Therefore, the induction of cellular stress by culture medium supplementation with 1% FBS, one hour prior to irradiation, was more favorable for maintaining SHED viability after irradiation, with no alteration in the levels of extracellular LDH, in comparison with the results after 24-hour nutritional deficit.

Key words: Stem Cells, Cell Culture Techniques, Low Intensity Light Therapy

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 -** Layout do plaqueamento das células em placas de 96 poços para os protocolos A e B de acordo com os grupos experimentais (GI a GVIII). Poços marcados como Blank, continham apenas meio de cultura sem células para normalização dos resultados..... 23
- Gráfico 1 -** Níveis de desidrogenase láctica (LDH) no meio de cultura de SHED cultivadas por 1 hora sob déficit nutricional previamente à irradiação laser com diferentes dosimetrias (protocolo A)..... 27
- Gráfico 2 -** Níveis de desidrogenase láctica (LDH) no meio de cultura de SHED cultivadas por 24 horas sob déficit nutricional previamente à irradiação laser com diferentes dosimetrias (protocolo B)..... 27
- Gráfico 3 -** Avaliação da viabilidade celular pelo método MTT nos diferentes grupos de estudo do protocolo A, após 24, 48 e 72 horas da irradiação com LBI..... 29
- Gráfico 4 -** Avaliação da viabilidade celular pelo método MTT nos diferentes grupos de estudo do protocolo B, após 24, 48 e 72 horas da irradiação com LBI..... 29

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

LBI	- Laser de baixa intensidade
SFB	- Soro fetal bovino
SHED	- Células-tronco de dentes decíduos esfoliados humanos
MEM α	- Minimum Essential Medium Eagle alpha modification
LDH	- Desidrogenase láctica
MTT	- Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
DPSC	- Células-tronco derivadas da polpa dentária de dentes permanentes
IDPSC	- Dentes permanentes imaturos
PDLSC	- Células-tronco derivadas de ligamento periodontal dentário
SCAP	- Células-tronco derivadas da papila apical dentária
DFSC	- Células-tronco derivadas de folículo dentário
DE	- Densidade de energia
MEV	- Microscopia eletrônica de varredura
InGaAlP	- Índio-Gálio-Alumínio-Fósforo
%	- Porcentagem
J	- Joules
s	- Segundos
W	- Watts
mw	- Milliwatts
DMEM	- Dulbeccos's modified Eagle's medium
nm	- Nanômetro
min	- Minutos
CO ₂	- Dióxido de carbono
°C	- Graus Celsius
PBS	- Tampão fosfato-salino
ml	- Mililitro
∞	- Infinito

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Grupos experimentais divididos de acordo com os parâmetros de irradiação do laser de baixa intensidade e a concentração de soro fetal bovino (SFB) utilizada no momento da irradiação de SHED. 22

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1	CÉLULAS-TRONCO.....	13
2.2	LASER.....	14
3	PROPOSIÇÃO	20
4	MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1	SHED UTILIZADAS NOS ESTUDOS.....	22
4.2	DETERMINAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	22
4.3	IRRADIAÇÃO COM LASER DE BAIXA INTENSIDADE.....	23
4.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA DESIDROGENASE LÁTICA (LDH).....	24
4.5	AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO MTT.....	25
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	25
5	RESULTADOS	26
5.1	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE DESIDROGENASE LÁTICA (LDH).....	26
5.2	AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO MTT.....	28
6	DISCUSSÃO	30
7	CONCLUSÕES	33
	REFERÊNCIAS	34

1 INTRODUÇÃO

Pesquisas com células-tronco ganharam força no Brasil na virada do século XXI, a partir de uma promessa de uma medicina regenerativa, através de uma fonte ilimitada de tecidos para transplantes (PEREIRA, 2008). A capacidade de diferenciação dessas células em diversos tecidos gerou expectativas de uma fonte renovável de saúde por acreditar em uma medicina personalizada, genética e imunologicamente direcionadas para cada indivíduo, com objetivo final de ampliar a eficácia de tratamentos celulares (WALDBY, 2002).

As células-tronco mesenquimais são células com propriedades significativas de autorrenovação e grande capacidade de se diferenciarem em vários tipos de células especializadas quando submetidas a condições controladas *in vitro*. Devido a essas características, o uso das células-tronco tem sido propagado na engenharia tecidual e medicina regenerativa como recursos substitutos para terapias convencionais (CASTRO-SILVA et al., 2009).

É atribuída às células-tronco mesenquimais a responsabilidade de reposição de tecidos danificados no local em que habitam. Estudos têm demonstrado que quanto maior a proliferação destas células, maiores as capacidades regenerativa e cicatricial do tecido correspondente (BARBOZA et al., 2014). Para que haja aumento da capacidade de proliferação de diversas células, o laser de baixa intensidade tem sido utilizado, causando um aumento da capacidade regenerativa frente a esta modalidade terapêutica.

O raio laser é um tipo particular de radiação eletromagnética, e o laser de baixa intensidade (LBI) refere-se a uma luz situada no espectro vermelho ou infravermelho. Os efeitos terapêuticos descritos compreendem a ação anti-inflamatória, analgésica e de reparação tecidual, sendo ainda mencionado o seu grande potencial de uso em todas as especialidades odontológicas (ALGHAMDI; KUMAR; MOUSSA, 2012; HENRIQUES; CAZAL; CASTRO, 2010).

Para que a irradiação laser seja mais eficaz, diversos estudos mostraram que diferentes tipos de células em condições de estresse são mais sensíveis aos efeitos biomoduladores do laser, sendo que tal estresse pode ser induzido pelo estabelecimento de déficit nutricional no meio de cultura (diminuição do soro fetal bovino - SFB) (NARA; MATONO; MORIOKA, 1991; STEINLECHNER; DYSON, 1993; TAGLIANI et. al., 2010). Contudo, de acordo com uma revisão sistemática, a

padronização dos parâmetros de irradiação é indispensável para melhorar os efeitos da aplicação clínica desta terapia (GINANI et al., 2015). Os parâmetros variáveis do LBI são: comprimento de onda, potência, energia, densidade de energia (fluência), densidade de potência (irradiância), tempo de aplicação e área de saída do feixe do laser, para que este induza a bioestimulação (ALMEIDA-LOPES et al., 2001; PEREIRA et al., 2002).

Os trabalhos publicados apresentam, de maneira geral, deficiências no protocolo de cultivo e irradiação, como variações no comprimento de onda, densidade de energia, tempo de radiação e estado de polarização da luz (GINANI et al., 2015; HADIS et al., 2016). Desta maneira, esta investigação procurou trazer contribuições importantes para tornar a metodologia de irradiação LBI em cultura de células mais precisa, além de esclarecer os efeitos de dosimetrias variadas na estimulação da viabilidade de SHED em diferentes situações. A finalidade dos resultados de estudos *in vitro* é orientar parâmetros a serem aplicados em pesquisas seguintes empregando modelos *in vivo* e ensaios clínicos (PEREIRA et al., 2002; TAGLIANI et al., 2010). Portanto, estabelecer protocolos que buscam melhores efeitos da aplicação desta tecnologia diretamente sobre células-tronco é fundamental para que estratégias clínicas guiadas de regeneração biológica do complexo dentino-pulpar possam futuramente ser praticadas com o auxílio da fototerapia.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CÉLULAS-TRONCO

As células-tronco podem ser classificadas como células-tronco embrionárias ou células-tronco adultas. As embrionárias derivam da massa celular de um embrião, com quatro ou cinco dias de fecundação e podem ser obtidas de óvulos fertilizados *in vitro* e doados às pesquisas. São chamadas de totipotentes, pois são capazes de dar origem a qualquer tecido do corpo humano, incluindo placenta e anexos embrionários. Contudo, questões éticas e legais vinculadas ao uso de embriões criados para fins de reprodução assistida vêm limitando os estudos com esse tipo de célula (DINIZ, AVELINO, 2009).

Células-tronco adultas são consideradas multipotentes, podendo se diferenciar em alguns tipos celulares apenas (SLACK, 2000; REHEN, PAULSEN, 2007). Sua principal função é manter ou reparar o tecido no qual se encontram. Atualmente, são conhecidas várias fontes de células-tronco adultas, tais como medula-óssea, sangue, córnea e retina, fígado, pele, trato intestinal, pâncreas e polpa dental (SLACK, 2000). Estas células podem ser classificadas ainda como hematopoiéticas ou mesenquimais.

As células-tronco hematopoéticas são células que possuem a capacidade de se diferenciar e autorrenovar em células especializadas do tecido sanguíneo e células do sistema imune. São constituídas de células-tronco adultas melhores caracterizadas até hoje. A sua obtenção é feita a partir da medula óssea, do sangue periférico e do cordão umbilical (SILVA JUNIOR, ODONGO, DULLEY, 2009). Já as células-tronco mesenquimais estão presentes em regiões perivasculares de todos os tecidos adultos, em pequenas quantidades, como na medula-óssea, tecido adiposo, periósteo, tecido muscular e órgãos parenquimatosos. São células multipotentes, capazes de se diferenciar ou produzir alguns tipos celulares. Estas células agem como um reservatório de células indiferenciadas para suprir a demanda por células do tecido ao qual pertencem, adquirindo as características fenotípicas do local (MEIRELES et al., 2006).

Quando isoladas a partir do tecido dentário, células-tronco mesenquimais são caracterizadas como: células-tronco da polpa dentária de dentes permanentes (DPSC), células-tronco de dentes decíduos esfoliados humanos (SHED) e de dentes permanentes imaturos (IDPSC); células-tronco de ligamento periodontal dentário

(PDLSC); células-tronco da papila apical dentária (SCAP); e células-tronco de folículo dentário (DFSC) (DEMARCO et al., 2011; GRONTHOS et al., 2000; MIURA et al., 2003). Evidências recentes sugerem a possível utilidade do uso de células-tronco pulpares para o reparo ósseo, em cartilagem, células neurais, adipócitos e até mesmo no próprio tecido pulpar (CHEN et al 2014; FAREA et al., 2014; HARA et al., 2011; KOYAMA et al., 2009; SEO et al., 2008). Pela facilidade de obtenção, os dentes decíduos esfoliados podem ser considerados como uma fonte ideal de células-tronco para reparar estruturas dentárias comprometidas, induzir regeneração óssea e possivelmente, tratar injúrias de tecido nervoso ou doenças degenerativas (HAU et al., 2006).

Há evidências de que SHED são similares àquelas encontradas no cordão umbilical. Comparando as células-tronco provenientes da medula óssea e as SHED, notou-se que as SHED apresentam uma maior taxa de proliferação. Além disso, as SHED possuem habilidade de se diferenciarem em células odontoblásticas funcionais, adipócitos e células neurais, além de estimularem a osteogênese após implantação *in vivo* (MIURA et al., 2003).

A terapia celular com células-tronco da polpa dentária consiste em um conjunto de métodos e abordagens tecnológicas para tratamento de doenças e tem despertado grande interesse na comunidade científica devido a capacidade dessas células indiferenciadas em preservar sua própria população e de diferenciar em células de diversos tecidos (GRONTHOS et al., 2002; MIURA et al., 2003).

Os avanços na engenharia tecidual na Odontologia apontam para a terapia pulpar com células-tronco como meio de substituição dos tecidos inflamados ou necróticos, por tecido funcional saudável, capaz de formar uma nova dentina para reparos ósseos e osseointegração de implantes (TELLES et al., 2011).

2.2 LASER

Laser (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation), que significa Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação, é uma forma de radiação não ionizante, altamente concentrada, eletromagnética, coerente e unidirecional (ALSTER; BETTERCOURT, 1998). Essa radiação resulta de um salto quântico de um elétron ou molécula previamente estimulada, passando de um estado de baixa energia

para alta energia, emitindo ondas de mesma frequência e direção (KITCHEN; PATRIDGE, 1991; ORTIZ et al., 2001).

O primeiro laser foi projetado por Maiman e sua equipe, por volta de 1959-1960, a partir de um trabalho (On The Quantum Theory of Radiation) de Albert Einstein, em 1916. Esse laser era pulsado de alta potência. Em 1963, foi utilizado pela primeira vez em pele humana, e em 1967 descobriu-se a bioestimulação a laser quando um camundongo foi exposto à luz laser (MESTER; SZENDE; TOTA, 1967).

A definição de laser baseia-se em qualquer dispositivo feito para produzir ou ampliar a radiação eletromagnética na faixa do comprimento de onda de 180nm a 1 mm, através do processo de emissão estimulada (MVULA, 2008), que possui três elementos chave: o meio que gera a luz laser, a fonte de energia (que entrega a energia ao meio de forma a excitá-la para emitir luz) e a cavidade óptica ou ressonante (onde a luz se concentra para estimular a radiação a laser) (HECHT, 1992).

A potência do laser é medida em watts (W) ou miliwatts (mW). A densidade de potência, ou intensidade de luz, é a potência de saída da luz por unidade de área do alvo que está sendo iluminado pela luz laser, sendo medida em watts por centímetro quadrado (W/cm^2) ou miliwatts por centímetro quadrado (mW/cm^2) (TUNER; HODE, 2002). A densidade de energia (DE) é definida pelo produto da densidade de potência do aparelho fotoativador e o tempo de exposição (T). Já o comprimento de onda está relacionado com a transmissão de radiação do laser, que é a distância entre dois picos de uma onda, em nanômetros (BASFOR, 1995).

Os lasers de baixa potência possuem baixa energia, e não possuem potência fototérmica, sendo utilizados para biomodulação, estado em que a célula procura restabelecer a normalidade da região afetada, que por sua vez, sua ação varia de acordo com o espectro eletromagnético (LOPES; MAS; ZANGARO, 2006).

Em geral, os aparelhos usados na terapia laser de baixa potência emitem luz na faixa do vermelho e infravermelho – luz nos comprimentos de 660 e 1000 nm (RIGAU, 1996). Esses aparelhos são constituídos principalmente pelo cristal de arseneto de gálio (AsGa), emitindo λ de 904 nm, e pelo arseneto de gálio e alumínio (AsGaAl), emitindo λ de 780 a 870 nm, sendo os principais lasers de diodos empregados na biomodulação, estado em que a célula procura restabelecer a normalidade da região afetada (ORTIZ et al., 2001; RIGAU, 1996).

Visto que os lasers são classificados de acordo com a interação da luz e o tecido alvo, o LBI oferece baixa densidade de energia para que a célula alvo a utilize

de maneira a estimular membranas ou organelas, induzindo a biomodulação (KARU, 1989; OLIVI; GENOVESE; CAPRIOGLIO, 2009).

A ação de bioestimulação do LBI pode aumentar o metabolismo celular e acelerar a proliferação, migração e remodelação celular, bem como promover aumento da síntese de proteínas, liberação de fatores de crescimento, aumento da síntese e proliferação de colágeno, estímulo da formação de RNA e DNA, formação de capilares, ativação de linfócitos e aumento da atividade leucocitária (BASSO et al., 2012; KARU, 1989; WAGNER et al., 2013).

Muitos estudos têm investigado os parâmetros ideais para aumentar a efetividade da terapia LBI na bioestimulação de diferentes tipos celulares (ALMEIDA-LOPES et al., 2001; BASSO et al., 2012; KREISLER et al., 2003; MENEGUZZO et al., 2008), pois os efeitos clínicos favoráveis são alcançados através da dosagem de energia adequada sobre células específicas (ALMEIDA-LOPES et al., 2001; ALGHAMDI; KUMAR; MOUSSA, 2012; AZEVEDO et al., 2006; ; BASSO et al., 2012; EDUARDO et al., 2008; GINANI et al., 2015; HADIS et al., 2016; KARU, 1989; MENEGUZZO et al., 2008; PELOW; CHUNG; BAXTER, 2010; PELOW et al., 2011; PELOW; BAXTER, 2012; POURZARANDIAN et al., 2005).

Em 2001, ALMEIDA-LOPES et al. compararam os efeitos de diferentes parâmetros de irradiação na proliferação *in vitro* de fibroblastos gengivais. As células foram mantidas sob déficit nutricional (SFB a 5%) ou em condição ideal (SFB a 10%) durante 12 horas antes da irradiação. Lasers diodo com diferentes comprimentos de onda 670 nm, 780 nm, 692 nm e 786 nm foram utilizados com fluência de 2 J/cm². No entanto, os resultados mostraram discreto crescimento de células sob déficit nutricional em comparação às células em condições nutricionais regulares, independente do comprimento de onda.

Em outro estudo, células-tronco pulpares de dentes humanos foram cultivadas com SFB a 15% e foram submetidas déficit nutricional (SFB a 10%), irradiadas com laser diodo *InGaAlP* com diferentes potências e tempos de irradiação (20 mW, 6 s e 40 mW, 3 s) e o grupo controle. O ensaio realizado após as irradiações foi o MTT e concluiu-se que as células irradiadas com menor potência (20 mW) durante maior tempo (6 s) revelaram maior atividade metabólica no período de 72 horas em comparação aos demais grupos (EDUARDO et al, 2008).

Em 2010, Tagliani et al. avaliaram os efeitos da irradiação LBI (1,5 J/cm², 100 mW, 1 min e 20 s) em odontoblastos sob estresse celular. As células foram incubadas

por 24 horas em condições nutricionais ideais, e posteriormente, o meio de cultura (DMEM) foi suplementado com menores concentrações de SFB (2% e 5%), induzindo condições de estresse celular. A irradiação foi realizada com laser infravermelho (808nm) três vezes com intervalos de 24 horas. Os ensaios utilizados após a irradiação para analisar o metabolismo e morfologia celular foram o MTT e MEV (microscopia eletrônica de varredura), respectivamente. Os autores concluíram que houve um leve aumento do metabolismo celular de células mantidas em condição de déficit nutricional com 5% de SFB, sendo considerado um método adequado para a bioestimulação do tipo celular avaliado.

Volpato et al. (2011) analisaram a viabilidade de fibroblastos sob estresse celular irradiados com lasers vermelho (660 nm, 40 mW, 1 W/cm²), infravermelho (780 nm, 40 mW, 1 W/cm²) e LED (637 ± 15 nm, 40 mW, 1 W/cm²). Os parâmetros utilizados mostraram que a fototerapia estimulou a viabilidade de fibroblastos cultivados em déficit nutricional especialmente no grupo irradiado com o laser infravermelho.

Em 2014, Miura et al. utilizaram as SHED cultivadas sob déficit nutricional e em condições ideais para avaliar o efeito do LBI vermelho *InGaAIP* (660 nm, 40 mW e 10 J/cm²) e infravermelho (780 nm, 40 mW e 10 J/cm²) durante 4 e 8 segundos, nos períodos de 24, 48 e 72 horas. A fototerapia com LBI foi empregada com energia total ou fracionada com intervalo de 6 horas entre as irradiações. Células não irradiadas mantidas em meios de cultura (DMEM) suplementado com 10% de SFB e 5% de SFB foram consideradas controle positivo e negativo, respectivamente. Os ensaios MTT e “Busatti e Gomes” mostraram que o LBI (660 nm e 780 nm) estimulou significativamente a viabilidade e proliferação das SHED em ambas condições nutricionais nos períodos de 24, 48 e 72 horas.

Zaccara et al. (2015) identificaram a menor densidade de energia para promover a proliferação e manter a viabilidade de células-tronco de polpa dentária. As células foram isoladas de terceiros molares saudáveis e na terceira passagem foram irradiadas ou não (controle) com o LBI *InGaAIP* em 0hr e 48hr usando duas densidades diferentes de energia (0,5 J/cm² e 1,0 J/cm²). A proliferação e viabilidade celular e a atividade mitocondrial foram avaliadas nos intervalos de 24, 48, 72 e 96 horas depois da primeira irradiação. O grupo irradiado com a densidade de energia 1,0 J/cm² apresentou um aumento na proliferação das células. Concluíram que o LBI, particularmente na dose de 1,0 J/cm², contribuiu para o crescimento e manutenção da viabilidade de células-tronco de polpa dentária. Esse fato indica que a terapia a laser

é uma importante ferramenta para o futuro da engenharia tecidual e regeneração envolvendo células-tronco.

Fernandes et al. (2016) realizaram um estudo utilizando a terapia com laser de baixa intensidade com diferentes densidades de energia (grupos: I ($1,2 \text{ J / cm}^2 - 0,5 \text{ mW} - 10 \text{ s}$), II ($2,5 \text{ J / cm}^2 - 10 \text{ mW} - 10 \text{ s}$), III ($3,7 \text{ J / cm}^2 - 15 \text{ mW} - 10 \text{ s}$), IV ($5,0 \text{ J / cm}^2 - 20 \text{ mW} - 10 \text{ s}$), V ($6,2 \text{ J / cm}^2 - 25 \text{ mW} - 10 \text{ s}$) e VI (não irradiado - grupo controle) para estimular a proliferação e viabilidade de SHED. Como resultado obteve-se que as diferentes densidades de energia de laser de baixa intensidade utilizadas não causaram perda de viabilidade celular e estimularam a proliferação de SHED nos parâmetros descritos neste estudo.

Castro-Silva et al. (2009) verificaram *in vitro* a influência da fototerapia a laser na biomodulação da proliferação de células derivadas de polpa dental decídua humana. As células foram divididas em dois grupos experimentais: laser (irradiação diária de laser de GaAIs na dose de $2,5 \text{ J/cm}^2$) e controle (sem irradiação). O ensaio de proliferação multiparamétrico foi realizado com três técnicas consecutivas de avaliação da viabilidade celular: XTT (atividade mitocondrial), vermelho neutro (integridade lisossomal) e cristal violeta (inclusão em DNA), nos períodos de 12 horas, 1, 3, 5 e 7 dias. Concluiu-se que o laser de baixa intensidade biomodula positivamente a atividade mitocondrial de células derivadas de polpa dental decídua humana, porém sem afetar a taxa de proliferação celular.

Nos diversos estudos com laser e cultura de células, o processo de subcultivo envolve etapas que expõem as células a diversos estímulos e podem sensibilizá-las de diferentes maneiras aos efeitos da irradiação (KARU, 1989). O LBI visa promover biomodulação das atividades celulares a fim de normalizar funções em situações de desequilíbrio, como no estresse celular, diante disso, em condições ideais a fototerapia tende a não promover benefícios (AZEVEDO et al., 2006; DAMANTE et al., 2009; VOLPATO et al., 2011). A sensibilidade celular aos efeitos estimulatórios do laser são inversamente proporcionais ao pH celular (KARU, 1989; KARU, 1999). Segundo Karu (1989), as células devem encontrar-se fisiologicamente alteradas para que a luz seja absorvida de maneira satisfatória. O mecanismo de estresse celular ocorre devido a alterações desencadeadas por agentes oxidativos, temperatura e deficiência nutricional do meio de cultura (TAGLIANI et al., 2010). A diminuição da concentração de soro fetal bovino (SFB), déficit nutricional, no meio de cultivo celular tem mostrado bastante eficácia para avaliar os efeitos da irradiação do LBI no

metabolismo celular (ALMEIDA-LOPES et al., 2001; EDUARDO et al., 2008; DAMANTE et al. 2009; OLIVEIRA et al., 2011). É importante salientar que a linhagem celular influencia na resposta ao déficit nutricional e, conseqüentemente, à ação do LBI (FERREIRA et al., 2006). Assim, é necessário investigar antecipadamente o método mais adequado de se atingir o estado de estresse celular previamente à irradiação LBI, com o intuito de garantir o melhor efeito da fototerapia nas células.

Na atualidade, as modernas técnicas de laserterapia tem auxiliado na reposta reparadora após procedimentos odontológicos e, conseqüentemente, proporcionado maior conforto aos pacientes. Algumas tecnologias desenvolvidas com o auxílio da óptica são utilizadas em diversas aplicações, enquanto que outras ainda se encontram em estágio de testes e experimentação (PEPLOW; CHUNG; BAXTER, 2010; PEPLOW et al., 2011; ALGHAMDI; KUMAR; MOUSSA, 2012; PEPLOW; BAXTER, 2012; BECKMANN; MEYER-HAMME; SCHRÖDER, 2014; GINANI et al., 2015). Para torná-las seguras e acessíveis aos pacientes e profissionais, previamente às indicações clínicas, são necessários incentivos às pesquisas que almejam determinar protocolos de irradiação.

3 PROPOSIÇÃO

O presente estudo teve como objetivo analisar *in vitro* a influência de diferentes protocolos de indução de estresse celular (déficit nutricional) previamente à utilização do LBI com diferentes parâmetros de irradiação para a biomodulação de SHED.

Os objetivos específicos foram:

- a) quantificar a enzima desidrogenase láctica no meio de cultura de SHED mantidas sob déficit nutricional por 1 ou 24 horas previamente a irradiação LBI;
- b) avaliar a viabilidade de SHED mantidas sob déficit nutricional por 1 ou 24 horas previamente a irradiação LBI.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 SHED UTILIZADAS NOS ESTUDOS

As SHED foram fornecidas pela Faculdade de Odontologia de São Jose dos Campos - UNESP, SP, Brasil), pelo Prof. Dr. Bruno das Neves Cavalcanti após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) daquela instituição (protocolo número 46420 – anexo 1), foram mantidas em meio de cultura MEM α (Minimum Essential Medium, Gibco, Invitrogen, Grand Island, NY, EUA), suplementado com soro fetal bovino 10% (SFB) (Fetal Bovine Serum, Certified, Heat- Inactivated, Gibco, Invitrogen, Grand Island, NY, EUA) e solução de penicilina e estreptomicina 1% (Penicillin-Streptomycin, Gibco, Invitrogen, Grand Island, NY, EUA). As células foram mantidas em incubadora a 37°C e 5% de CO₂, sendo o meio trocado a cada dois dias. Foi seguida a metodologia para a cultura de células conforme estabelecida por Sakai et al. (2010). Para todos os experimentos, as SHED foram utilizadas entre a 10^a e 15^a passagem.

4.2 DETERMINAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

As doses da irradiação e energia foram baseadas em estudos prévios (DAMANTE et al., 2009; VOLPATO et al., 2011; FERNANDES et al., 2016). Os grupos foram divididos de acordo com os parâmetros de irradiação LBI e a concentração de SFB utilizada no momento da irradiação das SHED e para a manutenção das culturas ao longo do tempo experimental, conforme pode ser observado na tabela 1.

Adicionalmente, foram estabelecidos dois protocolos distintos de déficit nutricional. No protocolo A, as SHED foram mantidas por uma hora em meio de cultura suplementado com SFB 1% previamente à irradiação LBI, enquanto que no protocolo B, as SHED foram mantidas por 24 horas em meio de cultura suplementado com SFB 1% previamente à irradiação LBI.

Para os grupos I a IV, após o período de déficit nutricional, novo meio de cultura suplementado com SFB 1% foi adicionado, enquanto que para os grupos V a VIII, foi adicionado meio de cultura suplementado com SFB 10% imediatamente antes da irradiação LBI.

Os grupos que não receberam irradiação (IV e VIII) constituíram os controles negativo e positivo, respectivamente.

Grupo	SFB (%) no meio de cultura durante a irradiação	Densidade de Energia [J/cm ²]	Potência [mW]	Tempo [s]	Energia total [J]
I		2,5 J/cm ²	10 mW	10	0,10 J
II		5,0 J/cm ²	20 mW	10	0,20 J
III	1%	7,5 J/cm ²	30 mW	10	0,30 J
IV		Não irradiadas	—	—	—
V		2,5 J/cm ²	10 mW	10	0,10 J
VI		5,0 J/cm ²	20 mW	10	0,20 J
VII	10%	7,5 J/cm ²	30 mW	10	0,30 J
VIII		Não irradiadas	—	—	—

Tabela 1 – Grupos experimentais divididos de acordo com os parâmetros de irradiação do laser de baixa intensidade e a concentração de soro fetal bovino (SFB) utilizada no momento da irradiação de SHED e ao longo do tempo experimental.

(Fonte: Da autora)

4.3 IRRADIAÇÃO COM LASER DE BAIXA INTENSIDADE

Após o plaqueamento com meio MEM α suplementado com SFB 10% e penicilina e estreptomicina 1%, as células foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂, por 24h, para se aderirem e se multiplicarem.

Sabendo-se que a distância entre a fonte de laser e o caminho percorrido até a superfície de aplicação é crítica, nos experimentos propostos o LBI foi aplicado através do fundo da placa de 96 poços transparentes. Desta forma, o feixe de laser não transpõe o meio de cultura, sendo aplicado diretamente sobre as células, seguindo a metodologia adotada por estudos prévios (AZEVEDO et al., 2006; EDUARDO et al., 2008; MARQUES et al., 2004; PELOW; CHUNG; BAXTER, 2010; PEREIRA et al., 2002; VOLPATO et al., 2011). Foram utilizadas placas fabricadas em poliestireno transparente (Corning Incorporated, Corning, NY, EUA). A distância entre o feixe de laser e a monocamada celular foi mantida constante a 1 mm (DAMANTE et

al., 2009; EDUARDO et al., 2008; VOLPATO et al., 2011). As placas de cultura foram posicionadas de modo que a ponta ativa do laser ficou totalmente em contato com o fundo do poço a ser irradiado. As placas de cultura transparentes foram envolvidas por uma máscara confeccionada em cartolina negra com orifícios localizados na posição dos poços dos grupos experimentais. Cada orifício foi vedado individualmente por uma portinhola, também em cartolina negra que permitiu que apenas o orifício do poço que fosse irradiado permanecesse aberto. Os orifícios da máscara possuíam o diâmetro compatível com a ponta ativa do dispositivo do Laser (VOLPATO, 2009).

A irradiação foi realizada com Laser de Baixa Potência (Twin Flex Evolution, MMOptics®, São Carlos, SP, Brasil), meio ativo Índio gálio alumínio fósforo (InGaAlP), no comprimento de onda de 660 nm (laser vermelho), área do feixe de saída 0,04 cm² e densidade de energia de 2,5, 5,0 e 7,5 J/cm², conforme os grupos estabelecidos previamente (Tabela 1). Antes e após as irradiações, a potência da emissão Laser foi aferida por um medidor de potência (Laser Check, MMOptics®, São Carlos, SP, Brasil). As células não irradiadas permaneceram fora da incubadora o mesmo tempo que as células irradiadas com diferentes densidades de energia, sendo que para estes poços o dispositivo laser foi mantido desligado durante o experimento. Sendo assim, todas as amostras foram submetidas às mesmas condições ambientais como em estudos prévios (DAMANTE et al. 2009; PACHECO et al., 2013; VOLPATO et al. 2011). Os grupos foram plaqueados em triplicata (Figura 1) e os experimentos repetidos três vezes (DAMANTE et al., 2009; FRESHNEY, 2000; VOLPATO et al., 2011).

Protocolo A - Déficit nutricional 1 hora antes da irradiação												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	GIV	GIV	GIV	GIV	GIV		GVIII	GVIII	GVIII	GVIII	GVIII	
B	Blank	Blank	Blank	Blank					Blank	Blank	Blank	Blank
C												
D	GI		GII		GIII			GV		GVI		GVII
E												
F	GI		GII		GIII			GV		GVI		GVII
G												
H	GI		GII		GIII			GV		GVI		GVII

Protocolo B - Déficit nutricional 24 horas antes da irradiação												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	GIV	GIV	GIV	GIV	GIV		GVIII	GVIII	GVIII	GVIII	GVIII	
B	Blank	Blank	Blank	Blank					Blank	Blank	Blank	Blank
C												
D	GI		GII		GIII			GV		GVI		GVII
E												
F	GI		GII		GIII			GV		GVI		GVII
G												
H	GI		GII		GIII			GV		GVI		GVII

Figura 1 - Layout do plaqueamento das células em placas de 96 poços para os protocolos A e B de acordo com os grupos experimentais (GI a GVIII). Poços marcados como Blank, continham apenas meio de cultura sem células para normalização dos resultados.

(Fonte: Da autora)

4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA DESIDROGENASE LÁTICA (LDH)

Os níveis da enzima da Desidrogenase Lática (LDH) liberada no meio de cultura foram avaliados imediatamente após a irradiação em células mantidas em déficit nutricional por 1 ou 24 horas previamente à irradiação. Esta enzima é utilizada na avaliação de processos que resultam em intensa destruição celular em um órgão ou tecido, visto que nestes casos há aumento dos níveis séricos da enzima (HALLIWELL B, WHITEMAN M, 2004). Para isso, foi utilizado o kit Desidrogenase Lática LDH UV Bioclin® e os valores foram obtidos em U/L.

Para este teste, 1×10^4 células foram plaqueadas em 200 μ L de meio de cultura por poço em placas de 96 poços, como previamente descrito (Tabela 1) e seguindo os protocolos A e B de indução de estresse celular. Em seguida, foram retirados de cada poço 20 μ L de meio de cultura sobrenadante, correspondente à 60 μ L de cada grupo (3 poços/grupo) e adicionados em um microtubo Eppendorf (J Prolab, São José dos Pinhais, Brasil) juntamente com 1,0 mL do reagente de trabalho. O microtubo foi mantido em cubeta a 37°C por 1 min. Em seguida, foram realizadas leituras do nível de atividade LDH em 1, 2 e 3 minutos em espectrofotômetro com comprimento de onda ajustado para 340 nm e caminho óptico de 1 cm. Através da somatória das leituras nos diferentes tempos, foram calculadas as médias das absorbâncias por

minuto ($\Delta A/\text{min.}$) e realizado o cálculo determinado pelo fabricante do kit [$\Delta A/\text{min.} \times 8016 = \text{LDH (U/L)}$] para resultado final do nível de atividade LDH.

4.5 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO MTT

No intuito de avaliar a viabilidade das SHED irradiadas com diferentes densidades de energia do LBI e submetidas aos protocolos A e B de indução de estresse celular, realizou-se o ensaio MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio). As SHED plaqueadas em densidade de 1×10^4 células por poço de placas de 96 poços e, após as irradiações, foram incubadas a 37°C com 5% de CO_2 por 24, 48 ou 72 horas, de acordo com o período experimental. Para o ensaio MTT, ao final da incubação nos respectivos tempos, os sobrenadantes foram descartados e uma solução de MTT, responsável por corar a clivagem da atividade mitocondrial (MOSMANN, 1983), foi adicionada às células. A solução de MTT foi dissolvida em MEM α na proporção de 0,5 mg/mL, filtrada e esterilizada utilizando filtro Millipore 0,22 μm . A solução foi adicionada em cada poço (110 $\mu\text{L}/\text{poço}$) onde as células permaneceram incubadas por 4h a 37°C em 5% de CO_2 . Posteriormente, a solução de MTT foi retirada dos poços e descartada. Em seguida, dimetil sulfóxido (DMSO - FISHER SCIENTIFIC, HAMPTON, VA, EUA) foi adicionado aos poços (200 $\mu\text{L}/\text{poço}$) e mantido por 30 minutos, em temperatura ambiente, para dissolver os cristais azuis que coram as mitocôndrias. A leitura da absorbância foi determinada em aparelho de espectrofotômetro (ANTHOS ZENYTH 200 RT, BIOCHROM LTD, CAMBRIDGE, REINO UNIDO) com comprimento de onda ajustado em 570 nm.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após a coleta e tabulação dos dados em planilha Excel, os resultados foram submetidos à análise estatística pelo programa R utilizando-se o teste ANOVA a 2 critérios, seguido pelo teste de Tukey. Foi adotado nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA DESIDROGENASE LÁTICA (LDH)

Os níveis de LDH no meio de cultura em que as SHED eram mantidas foram semelhantes quando comparados os protocolos A e B para a mesma densidade de energia e mesma concentração de SFB no momento da irradiação (Gráficos 1 e 2).

No protocolo A, observaram-se menores níveis de LDH em todos os grupos irradiados e mantidos com SFB 1% no momento da irradiação (grupos I a III) em comparação ao grupo não irradiado e mantido sob a mesma condição durante a irradiação (grupo IV – controle negativo), sendo esta diferença significativa apenas quando os grupos I e III foram comparados ao grupo IV. Não houve diferença significativa entre os grupos mantidos com SFB 10% no momento da irradiação (grupos V a VII) e o grupo VIII (controle positivo). Quando comparados os grupos irradiados com a mesma densidade de energia, observou-se uma atividade de LDH significativamente maior em GVII do que em GIII (Gráfico 1).

No protocolo B, observaram-se menores níveis de LDH em todos os grupos irradiados e mantidos com SFB 1% no momento da irradiação (grupos I a III) em comparação ao grupo não irradiado e mantido sob a mesma condição durante a irradiação (grupo IV – controle negativo), sendo essas diferenças estatisticamente significativas. Quando comparados os grupos mantidos com SFB 10% durante a irradiação, o nível de LDH no grupo VII foi significativamente maior que nos demais (grupos V, VI e VIII). Na comparação dos grupos irradiados com a mesma densidade de energia, observou-se que a atividade LDH foi significativamente menor nos grupos mantidos com SFB 1% do que SFB 10% durante a irradiação (Gráfico 2).

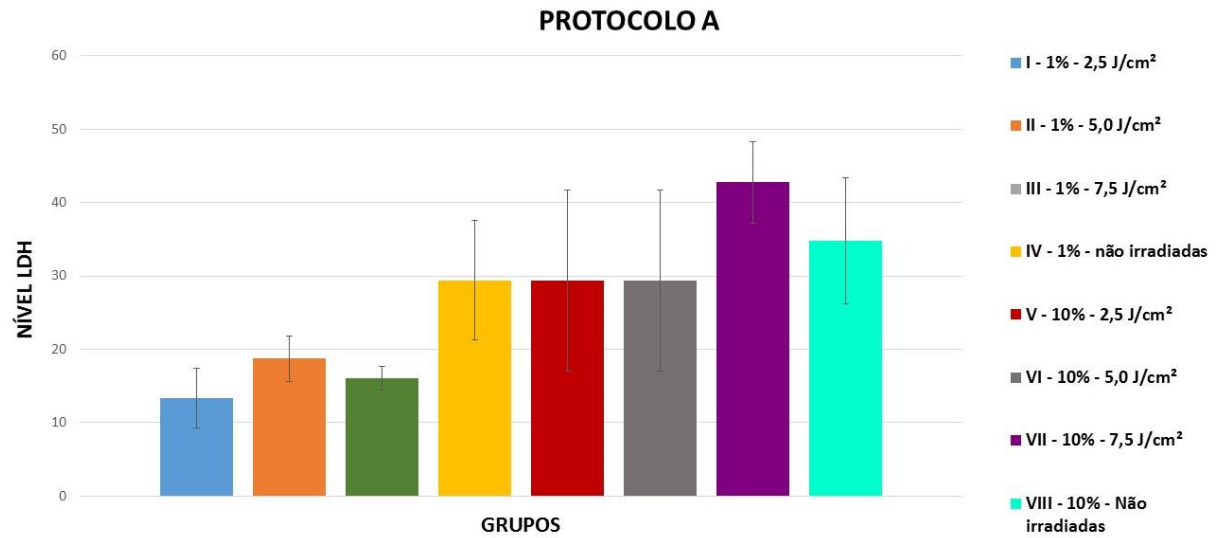


Gráfico 1 - Níveis de desidrogenase láctica (LDH) no meio de cultura de SHED cultivadas por 1 hora sob déficit nutricional previamente à irradiação laser com diferentes dosimetrias (protocolo A).

(Fonte: Da autora)

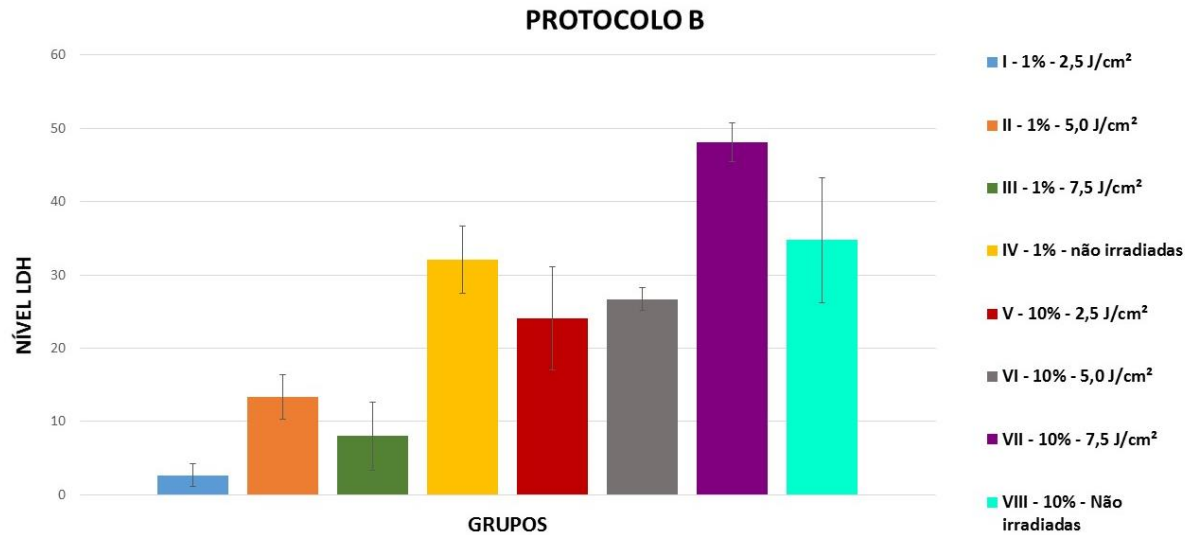


Gráfico 2 - Níveis de desidrogenase láctica (LDH) no meio de cultura de SHED cultivadas por 24 horas sob déficit nutricional previamente à irradiação laser com diferentes dosimetrias (protocolo A).

(Fonte: Da autora)

5.2 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO MTT

Após 24 horas da irradiação, o valor de absorvância do grupo VII foi semelhante ao controle positivo (grupo VIII) e estatisticamente maior do que do grupo III no protocolo A. Para o protocolo B, não houve diferenças estatísticas entre os valores de absorvância de todos os grupos. Contudo, os valores de absorvância dos grupos IV (controle negativo), V, VI, VII e VIII (controle positivo) no protocolo A foram estatisticamente maiores quando comparados aos respectivos grupos do protocolo B para a mesma densidade de energia.

Após 48 horas de irradiação, não houve diferenças estatisticamente significantes entre os diferentes grupos tanto no protocolo A quanto no protocolo B. Também não houve diferença quando comparados os grupos irradiados com os mesmos parâmetros nos dois protocolos.

Após 72 horas de irradiação, o valor de absorvância do grupo VIII (controle positivo) foi estatisticamente maior que os valores do grupo II e III, e o valor do grupo VI foi estatisticamente maior que o do grupo II no protocolo A. Não houve diferenças estatisticamente significativas para os diferentes grupos no protocolo B.

Para o protocolo A, quando os valores de absorvância foram comparados ao longo do tempo, observou-se que as células estavam significativamente mais viáveis às 24 horas do que às 48 e 72 horas em todos os grupos, com exceção do grupo II, no qual as células estavam significativamente mais viáveis às 24 horas quando comparadas às 72 horas.

Para o protocolo B, observou-se que as células estavam significativamente mais viáveis às 24 horas do que às 72 horas no grupo I e III, enquanto que para o grupo II houve diferença estatisticamente significativamente às 48 horas em comparação às 72 horas, sendo a viabilidade maior às 48 horas. Nos demais grupos (IV, V, VI, VII, VIII) não houve diferenças estatisticamente significativas da viabilidade celular ao longo do tempo.

PROTOCOLO A

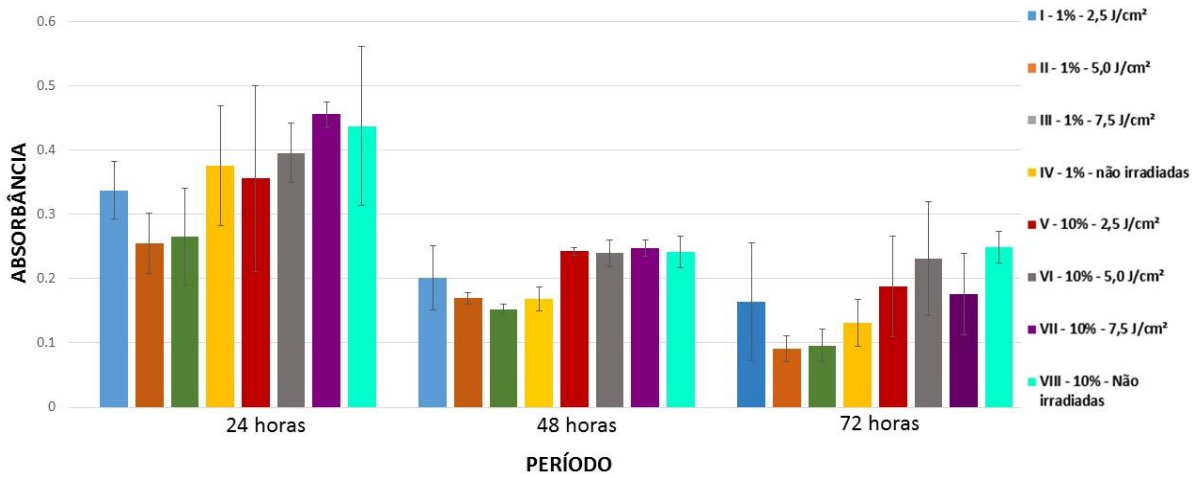


Gráfico 3 - Avaliação da viabilidade celular pelo método MTT de SHED cultivadas por 1 hora sob déficit nutricional e irradiadas com diferentes dosimetrias (protocolo A) nos diferentes tempos experimentais (24, 48 e 72 horas após a irradiação com LBI).

(Fonte: Da autora)

PROTOCOLO B

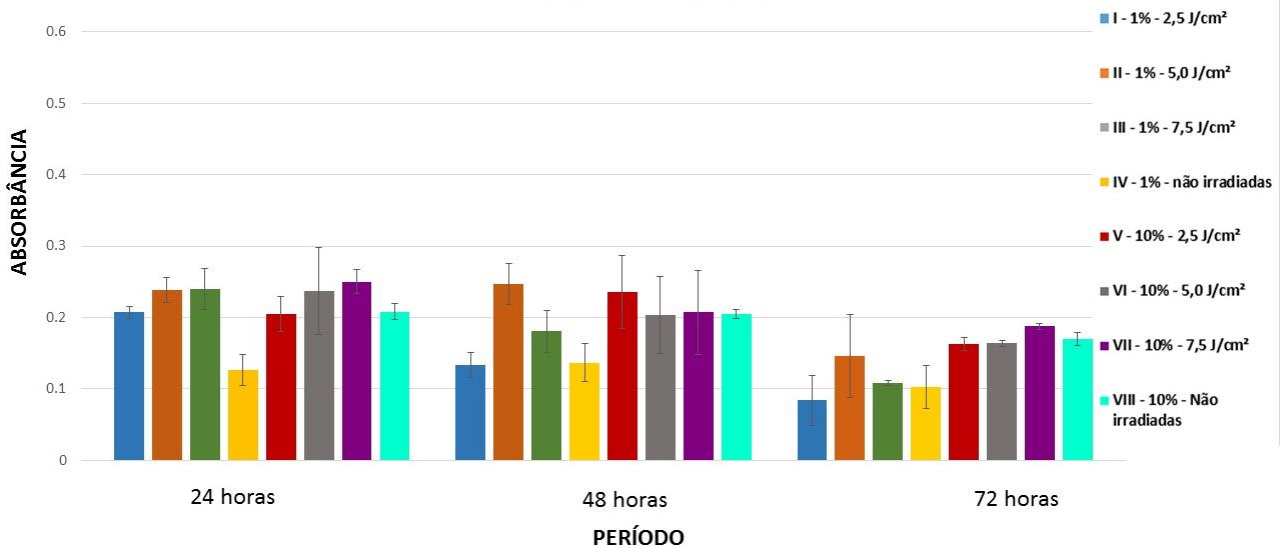


Gráfico 4 - Avaliação da viabilidade celular pelo método MTT de SHED cultivadas por 24 horas sob déficit nutricional e irradiadas com diferentes dosimetrias (protocolo A) nos diferentes tempos experimentais (24, 48 e 72 horas após a irradiação com LBI).

(Fonte: Da autora)

6 DISCUSSÃO

Diversos estudos têm sido realizados para avaliar os efeitos de terapias fotobiomoduladoras sobre tipos celulares distintos e em diferentes processos de reparo celular, analgesia, epitelização e síntese de proteínas, por meio de ensaios *in vitro* (ALMEIDA-LOPES et al., 2001; BASSO, 2012; EDUARDO et al., 2008; PEREIRA et al., 2002), *in vivo* (SAITO et al., 1997; WAGNER et al., 2013) e casos clínicos (MARQUES et al., 2015). Neste trabalho, foi proposto o uso LBI, meio ativo Índio gálio alumínio fósforo (InGaAlP), no comprimento de onda de 660 nm (laser vermelho), área do feixe de saída 0,04 cm², densidade de energia de 2,5, 5,0 e 7,5 J/cm² a fim de comparar seu efeito na liberação de LDH extracelular e na viabilidade celular de SHED cultivadas sob estresse celular (SFB 1%) durante 1 hora ou 24 horas previamente à irradiação bem como mantidas em meio suplementado com SFB 1% ou 10% no momento da irradiação e ao longo do período experimental.

A diminuição da concentração de SFB no meio de cultura, como empregado no presente estudo, tem sido efetivamente utilizada para induzir o estresse celular e posteriormente avaliar os efeitos do LBI no metabolismo das células (ALMEIDA-LOPES et al., 2001; DAMANTE et al., 2009; EDUARDO et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2011; SILVA et al., *in press*). Meio de cultura suplementado com SFB 1% já vem sendo utilizado rotineiramente por nosso grupo de pesquisa para alterar a homeostasia de SHED (FERNANDES et al., 2016; SILVA et al., *in press*). Outros estudos empregaram meio de cultura suplementado com SFB a 0,5% (POURZARANDIAN et al., 2005), 2,5% (PEREIRA et al., 2002); 5% (ALMEIDA-LOPES et al., 2001; FERREIRA et al., 2006; MARQUES et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2016; TAGLIANI et al., 2010; VOPATO et al., 2011) e até mesmo 10% (EDUARDO et al., 2008) para a mesma finalidade, mas em diferentes tipos celulares.

LDH é uma enzima citoplasmática encontrada extensivamente em tecidos do corpo humano e está relacionada à injúria celular (YU et al., 2016), sendo a sua quantificação uma forma de se avaliar a citotoxicidade/integridade da membrana celular (SUMANASEKERA et al., 2014). A fim de investigar se o déficit nutricional por 1 ou 24 horas seguido da irradiação LBI sob diferentes dosimetrias causaria efeitos deletérios à membrana celular das SHED, foi realizada a avaliação da liberação de LDH no meio de cultura.

Observou-se que, na ausência de irradiação LBI (grupos IV e VIII), as SHED liberaram quantidades semelhantes de LDH quer estivessem submetidas a estresse celular de 1 ou 24 horas (protocolos A e B, respectivamente), quer estivessem em meio de cultura suplementado com SFB 1% ou 10% no momento da irradiação. Tal fato sugere que a concentração de SFB, na ausência da irradiação, não altera a quantidade de LDH liberado pelas SHED no meio de cultura. Contudo, quando as SHED foram submetidas à irradiação laser, em comparação com as células não irradiadas, houve uma redução nos níveis de LDH liberado pelas células que estavam em meio suplementado com SFB 1%, mas não em meio suplementado a 10%, no momento da irradiação independente do período de estresse celular (protocolo A ou B). Interessante notar que, na comparação dos grupos irradiados com a mesma densidade de energia, a liberação de LDH no meio de cultura foi significativamente maior quando as SHED foram irradiadas com densidade de energia de $7,5 \text{ J/cm}^2$ em meio contendo SFB 10% do que SFB 1% para o protocolo A. Já para o protocolo B, os níveis de LDH foram significativamente maiores quando as SHED foram irradiadas com as três densidades de energia estudadas em meio contendo SFB 10% do que SFB 1%. Assim, parece ocorrer um efeito protetor para a manutenção da integridade da membrana celular causado pela irradiação laser em SHED mantidas em meio de cultura suplementado com SFB 1% no momento da irradiação. Silva et al. (2016) observaram que tanto o laser vermelho (685 nm) como o infravermelho (830 nm) causaram inibição da liberação de LDH por mioblastos (C2C12) expostos a veneno de cobra, sugerindo que o laser apresenta um efeito protetor contra a citotoxicidade causada pelo veneno de cobra.

A verificação da viabilidade celular após estimulação laser em diferentes condições de cultura é essencial para determinar quão saudáveis as células estão para realizar atividades importantes, tais como proliferação, diferenciação e síntese protéica, e para responder às injúrias (SILVA et al., *in press*). Em nosso trabalho, a indução do estresse celular por 24 horas (protocolo B) pareceu comprometer a viabilidade das SHED. Tal fato torna-se evidente quando comparados os grupos não irradiados (grupo IV e VIII) do protocolo A em relação aos do protocolo B, visto que os valores de absorbância por MTT foram maiores em A do que em B.

Analisando-se os resultados referentes apenas ao protocolo A, a viabilidade de SHED foi maior às 24 horas, independente das condições da cultura e densidades de energia empregadas. Já para o protocolo B, a viabilidade de SHED foi maior às 24

horas em comparação às 72 horas apenas para as células mantidas em meio suplementado com SFB 1% após a irradiação, enquanto que não foi observada, ao longo do tempo experimental, alteração na viabilidade das SHED cultivadas em meio suplementado com SFB 10% após a irradiação.

Na comparação dos grupos irradiados com a mesma densidade de energia, observou-se que as SHED estavam significativamente mais viáveis quando irradiadas com densidade de energia de $7,5 \text{ J/cm}^2$ e mantidas em meio contendo SFB 10% do que SFB 1% às 24 horas de avaliação para o protocolo A. Interessante notar que para estes mesmos grupos (III e VII) houve uma liberação significativamente diferente de LDH. Nossa hipótese é de que, embora possa haver um efeito protetor para a manutenção da integridade da membrana celular causado pela irradiação laser em SHED mantidas em meio de cultura suplementado com SFB 1% no momento da irradiação, tais células tornam-se menos responsivas aos efeitos do laser quando submetidas ao protocolo A. Assim, mesmo ocorrendo maior liberação de LDH no grupo VII do que no grupo III, as células do grupo VII estariam metabolicamente mais ativas após 24 horas da irradiação, enquanto que as do grupo III estariam quiescentes.

Diferentemente do trabalho de Fernandes et al. (2016), não foram verificadas diferenças significativas na viabilidade das células submetidas ao déficit nutricional de 1 hora e irradiadas em meio de cultura suplementado com SFB 10% com $5,0 \text{ J/cm}^2$ em comparação às aquelas irradiadas com $2,5 \text{ J/cm}^2$ ou não irradiadas. Vale ressaltar que as variações nos parâmetros da terapia laser tem sido um dos maiores obstáculos para a comparação dos estudos sobre fotobiomodulação. Considerando o número limitado de experimentos e heterogeneidade dos métodos empregados, mais estudos são necessários para estabelecer os parâmetros ideais de déficit nutricional e do LBI para a biomodulação de SHED.

7 CONCLUSÃO

A indução de estresse celular por meio da suplementação do meio de cultura com SFB 1%, uma hora antes da irradiação, foi mais favorável para a manutenção da viabilidade de SHED após a irradiação, sem alterar os níveis de LDH extracelular, em comparação com os resultados após déficit nutricional por 24 horas. Além disso, as células.

Além disso, parece haver um efeito protetor do laser para manutenção da integridade da membrana celular em SHED mantidas sob déficit nutricional.

REFERÊNCIAS

- 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.**, [S.l.], v. 27, n. 1, p. 237-49, Jan. 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. **Lasers Surg. Med.**, [S.l.], v. 29, n. 2, p. 179-84, 2001.
- ALSTER, T. S.; BETTENCOURT, M. S. Review of cutaneous lasers and their application. **South. Med. J.**, [S.l.], v.91, n.9, p. 806-814, 1998.
- AZEVEDO L. H et al. Influence of different power densities of LILT on cultured human fibroblast growth: a pilot study. **Lasers Med. Sci.**, [S.l.], v. 21, n. 2, p. 86-89, Jul. 2006.
- BARBOZA C. A. et al. Low-level laser irradiation induces in vitro proliferation of mesenchymal stem cells. **Einstein.**, [S.l.], v.12, n.1, p.75-81, 2014.
- BASFORD, J. R. Low intensity laser therapy: still not an established clinical tool. **Lasers Surg- Med.**, [S.l.], v.91, n.4, p.331-342, 1995.
- BASSO F. G. et al. In vitro wound healing improvement by low-level laser therapy application in cultured gingival fibroblasts. **Int. J. Dent.**, [S.l.], 2012:719452.
- BECKMANN K. H.; MEYER-HAMME G.; SCHRÖDER S. Low level laser therapy for the treatment of diabetic foot ulcers: a critical survey. **Evid Based Complement Alternat Med.**, 2014. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1155/2014/626127>> Acesso em: 30 nov. 2017.
- CASTRO-SILVA I. L. et al. Preliminary analysis of the influence of low intensity laser (GaAlAs) in proliferation of human deciduous dental pulp derived cells. **Innov Implant J, Biomater Esthet**, [S.l.], v. 4, n. 2, p. 48-52, 2009.
- CHENG C. C. et al. Cell-autonomous heparanase modulates self-renewal and migration in bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **J Biomed Sci.**, [S.l.], v. 21, n. 1, p. 21, 2014.
- DAMANTE C. A. et al. Effect of laser phototherapy on the release of fibroblast growth factors by human gingival fibroblasts. **Lasers Med Sci.**, [S.l.], v. 24, n. 6, p. 885-91, Nov. 2009.
- DEMARCO F. F. et al. Dental pulp tissue engineering. **Braz Dent J.**, [S.l.], v. 22, n. 1, p. 3-13, 2011.
- DINIZ D.; AVELINO D. Cenário internacional da pesquisa em células-tronco embrionárias. **Revista Saúde Pública.**, [S.l.], v. 42, n. 3, p. 541-547, 2009.

EDUARDO F. P. et al. Stem cell proliferation under low intensity laser irradiation: a preliminary study. **Lasers Surg Med.**, [S.I.], v. 40, n. 6, p. 433-438, 2008.

FAREA M. et al. Synergistic effects of chitosan scaffold and TGF β (1) on the proliferation and osteogeni differentiation of dental pulp stem cells derived from human exfoliated deciduous teeth. **Arch Oral Biol.**, [S.I.], v. 59, n. 12, p. 1400-1411, 2014.

FERNANDES A. P. et al. Effects of low-level laser therapy on stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **J. Appl. Oral Sci.**, [S.I.], v. 24, n. 4, p. 332-337, 2016.

FERREIRA A. N. et al. Effect of GaAlAs laser on reactional dentinogenesis induction in human teeth. **Photomed Laser Surg.**, [S.I.], v. 24, n. 3, p. 358-365, Jun. 2006.

FRESHNEY R. I. **Culture of animal cells: a manual of basic techniques.** 5th Ed. New York: Wiley-Liss, 2005. 728 p.

GINANI F. et al. Effect of low-level laser therapy on mesenchymal stem cell proliferation: a systematic review. **Lasers Med Sci.**, [S.I.], v. 30, n. 8, p. 2189-2194, Nov. 2015.

GRONTHOS S. et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, [S.I.], v. 97, n. 25, p. 13625-13630, 2000.

HADIS M.A. et al. The dark art of light measurement: accurate radiometry for low-level light therapy. **Lasers Med Sci.**, [S.I.], v. 31, n. 4, p. 789-809, 2016.

HALLIWELL B, WHITEMAN M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **Br J Pharmacol.**, [S.I.], v. 142, n. 2, p. 231-255, 2004.

HARA K. et al. Potential characteristics of stem cells from human exfoliated deciduous teeth compared with bone marrow derived mesenchymal stem cells for mineralized tissue-forming cell biology. **J Endod.**, [S.I.], n. 37, v. 12, p. 1647-1652, 2011.

HAU G. R. et al. A preliminary review on the viability of the utilization of stem-cells derived from deciduous and permanent human teeth for tissue regeneration. **Publ. UEPG Ci. Biol. Saúde.**, [S.I.], v. 12, n. 1, p. 47-55, 2006.

HECHT, Y. J. **The laser guidebook.** 2th ed. New York: McGraw-Hill. 1992. 514 p.

HENRIQUES, A. C. G.; CAZAL, C.; CASTRO J. F. L. Efeitos de baixa intensidade da terapia a laser na proliferação e diferenciação celular :revisão da literatura. **Rev. Col. Bras. Cir.**, [S.I.], v. 37, n. 4, p. 295-302, 2010.

KARU T. Photobiology of low-power laser effects. **Health Phys.**, [S.I.], v. 56, n. 5, p. 691-704, May.1989.

KARU T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. **J Photochem Photobiol B.**, [S.I.], v. 49,n. 1, p. 1-17, 1999.

KITCHEN, S. S; PARTRIDGE, C. H. A review of low intensity laser therapy. **Physiotherapy.**, [S.I.], v. 77, n. 3, p. 166-170, 1991.

KOYAMA N. et al. Evaluation of pluripotency in human dental pulp cells. **J Oral Maxillofac Surg.**, [S.I.], v. 67, n. 3, p. 501-506, 2009.

KREISLER M. et al. Low level 809-nm diode laser-induced in vitro stimulation of the proliferation of human gingival fibroblasts. **Lasers Surg Med.**, [S.I.], v. 30, n. 5, p. 365-369, 2002.

LOPES, C. O; MAS, J. R. I; ZANGARO, R. A. Prevenção da xerostomia e da mucosite oral induzidas por radioterapia com uso de laser de baixa potência. **Radiol. Bras.**, [S.I.], v. 39, n. 2, p. 131-136, 2006.

MARQUES M. M. et al. Effect of low power laser irradiation on protein synthesis and ultrastructure of human gingival fibroblasts. **Lasers Surg Med.**, [S.I.], v. 34, n. 3, p. 260-265, 2004.

MARQUES N. C. T. et al. Low-level laser therapy as an alternative for pulpotomy in human primary teeth. **Med Sci.**, [S.I.], v. 30, n. 7, p. 1815-1822, 2015.

MENEGUZZO D. T. et al. Influence of the fractionated irradiation energy in the phototherapy with low intensity laser on the growth of human dental pulp fibroblasts. **Proc. of SPIE.** Disponível em: < <https://www.spiedigitallibrary.org/conference-proceedings-of-spie/6846/1/Influence-of-the-fractioned-irradiation-energy-in-the-phototherapy-with/10.1117/12.761220.short?SSO=1> > Acesso em: 30 nov.2017

MEIRELLES, L. S. et al. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of Cell Science.**, 2006; Disponível em:<<http://jcs.biologists.org/content/119/11/2204.long>> Acesso em 30 nov. 2017.

MESTER, E.; MESTER, A. F.; MESTER, A. The biomedical effects of laser application. **Lasers Surg. Med.**, [S.I.], v. 5, n. 1, p. 31-39, 1985.

MIURA, C. A. S. **Efeito do laser de baixa potência sobre células tronco de polpa de dentes decíduos esfoliados humanos (SHED)**. 2014. 53f. Tese (Doutorado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2014.

MIURA M. et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Proc Natl Acad Sci U S A.** [S.I.], v. 100, n. 10, p. 5807-5012, 2003.

MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods.**, [S.I.], v. 65, n. 1, p. 55-63, Dec.1983.

NARA, Y.; MATONO, S.; MORIOKA, T. Regulatory action of low intensity laser on mitogenesis of cultured lymphocytes using concanavalin. **Lasers in Surgery and Medicine**. [S.l], v. 3, p. 293-298, 1991.

OLIVEIRA C. F. et al. In vitro effect of low-level laser on odontoblast-like cells. **Laser Phys.**, [S.l], v. 8, n. 2, p. 155-163, 2011.

OLIVI G; GENOVESE M. D.; CAPRIOGLIO C. Evidence-based dentistry on laser pediatric dentistry: review and outlook. **Eur J Paediatr Dent.**, [S.l], v. 10, n. 1, p. 29-40, 2009.

ORTIZ, M. C. S. et al. Laser de baixa intensidade: princípios e generalidades. **Fisioterapia Brasil**. [S.l], v. 2, n. 4, p. 221-240, 2001.

PACHECO P. S. et al. Laser phototherapy at high energy densities do not stimulate pre-osteoblast growth and differentiation. **Photomed Laser Surg.**, [S.l], v. 31, n. 5, p. 225-229, 2013.

PEPLOW P. V.; BAXTER G. D. Gene expression and release of growth factors during delayed wound healing: a review of studies in diabetic animals and possible combined laser phototherapy and growth factor treatment to enhance healing. **Photomed Laser Surg.**, [S.l], v. 30, n. 11, p. 617-636, 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**. 2010. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20666617>> Acesso em: 30 nov. 2017.

PEPLOW P. V. et al. Laser photobiomodulation of gene expression and release of growth factors and cytokines from cells in culture: a review of human and animal studies. **Photomed Laser Surg.**, [S.l], v. 29 n. 5, p. 285-304, 2011.

PEREIRA N. A. et al. Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. **Lasers Surg Med.**, [S.l], v. 31, n. 4, p. 263-267, 2002.

PEREIRA, L. V. A importância do uso das células-tronco para a saúde pública. **Ciência E Saúde Coletiva**. [S.l], v. 13, n. 1, p. 7-14, 2008.

POURZARANDIAN A. et al. Effect of lowlevel Er:YAG laser irradiation on cultured human gingival fibroblasts. **J Periodontol.**, [S.l], v. 76, n. 2, p. 187-193, Feb. 2005.

REHEN, S; PAULSEN, B. **Células-tronco: o que são? Para que servem?** 1. ed. Rio de Janeiro: Vieira e Lent. 2007.

RIGAU, J. **Acción de la luz laser a baja intensidad em la modulacion de la function celular**. 1996. 103f.. Tese (Doutorado em Histologia) – Faculdade de Medicina e Ciências da Saúde – Universidade Rovira I Virgili, 1996.

SAITO M. et al. Single column high – performance liquid chromatographic – fluorescence detection of immature, mature and senescent cross-links of collagen. **Anal. Biochem**. [S.l], v. 253, n. 1, p. 26-32, 1997.

SEO B. M. et al. SHED repair critical-size calvarial defects in mice. **Oral Dis.**, [S.I.], v. 14, n. 5, p. 428-434, 2008.

SILVA L. M. et al. Photobiomodulation Protects and Promotes Differentiation of C2C12 Myoblast Cells Exposed to Snake Venom. **PLoS One**. 2016. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0152890>> Acesso em 30 nov. 2017.

SILVA, et al. Effect of low-level laser therapy on viability and proliferation of stem cells from exfoliated deciduous teeth under different nutritional conditions. **PLoS One**. In press.

SILVA JUNIOR. et al. Células-tronco hematopoéticas: utilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. [S.I.], v. 31, n. 1, p. 53-58, 2009.

SKOPIN M. D.; MOLITOR S. C. Effects of near-infrared laser exposure in a cellular model of wound healing. **Photodermatol Photoimmunol Photomed.**, [S.I.], v. 25, n. 2, p. 75-80, 2009.

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

STEINLENCHNER, C; DYSON, M. The effects of low level laser therapy on the proliferation of keratinocytes. **Laser Therapy**, [S.I.], v. 5, p. 65-73, 1993.

SUMANASEKERA W. K. et al. Cigarette smoke adversely affects functions and cell membrane integrity in c-kit⁺ cardiac stem cells. **Cell Biol Toxicol.**, [S.I.], v. 30, n. 2, p. 113-25, Apr. 2014.

TAGLIANI M. M. et al. Nutritional stress enhances cell viability of odontoblastlike cells subjected to low level laser irradiation. **Laser Physics Letters**, [S.I.], v. 7, n. 3, p. 247-251, 2010.

TELLES P. D. et al. Pulp tissue from primary teeth: new source of stem cells. **J Appl Oral Sci**. [S.I.], v. 19, n. 3, p. 189-194, 2011.

TUNER, J.; HODE, L. **Laser therapy, clinical practice and scientific background**. 1 ed. Sweden: Prima Books. 2002.

VOLPATO L. E. et al. Viability of fibroblasts cultured under nutritional stress irradiated with red laser, infrared laser, and red light-emitting diode. **J Biomed Opt.**, [S.I.], v. 16, n. 7:075004, 2011.

VOLPATO L.E.R. **Avaliação do uso do laser de baixa intensidade e do light-emitting diode (LED) no comportamento de fibroblastos e na redução da incidência da mucosite bucal em crianças sob tratamento quimioterápico**.

2009.Tese (Doutorado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2009.

WAGNER V.P. et al. Influence of different energy densities of laser phototherapy on oral wound healing. **J Biomed Opt.**, [S.l], v. 18, n. 12:128002, 2013.

WALDBY, C. Stem cells, tissue cultures and the production of biovalue. **Health.**, [S.l], v. 6, n. 3, p. 305-323.

ZACCARA, I. M. et al. Effect of low-level laser irradiation on proliferation and viability of human dental pulp stem cells. **Lasers in medical science.**, [S.l], v. 30, n. 9, p. 2259-2264, 2015.

YU L. et al. Antioxidant and antitumor activities of Capparis spinosa L. and the related mechanisms. **Oncol Rep.**, [S.l], v. 37, n. 1, p. 357-367, Jan.2017.

ANEXO

ANEXO A – Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa.

Plataforma Brasil - Ministério da Saúde

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos-UNESP

PROJETO DE PESQUISA

Título: Estabelecimento e caracterização de linhagens de células tronco de dentes permanentes e decíduos

Área Temática:

Pesquisador: Bruno das Neves Cavalcanti

Versão: 2

Instituição: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos

CAAE: 02210312.1.0000.0077

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 46420

Data da Relatoria: 26/06/2012

Apresentação do Projeto:

Com o advento da engenharia tecidual e busca de novas alternativas no que diz respeito ao tratamento e regeneração de tecidos perdidos, o uso de células-tronco tem ganhado espaço na ciência em geral. Mais precisamente na Odontologia, são de interesse os estudos envolvendo células-tronco adultas obtidas a partir de dentes humanos, sejam esses decíduos ou permanentes. Nesse contexto, de forma a garantir o avanço das pesquisas e equiparação das condições de competitividade entre nosso grupo e grupos de pesquisas internacionais, o objetivo deste estudo será o de isolar e caracterizar células-tronco da polpa dentária de dentes permanentes e decíduos, bem como o de caracterizar o potencial de diferenciação destas células. Para isso, tecido pulpar humano obtido a partir de um terceiro molar extraído por razões terapêuticas serão processados para obtenção de fibroblastos por explante (grupo controle). Outros 3 tecidos pulpares obtidos da mesma forma serão processados para obtenção das células-tronco (DPSC) por digestão enzimática. E finalmente, 3 tecidos pulpares humanos serão obtidos a partir da raspagem de molares decíduos exfoliados naturalmente e processados também por digestão enzimática para o isolamento das células-tronco (SHED). As células obtidas (fibroblastos, DPSC e SHED) serão submetidas a ensaios de diferenciação adipogênica, condrogênica e osteogênica com o uso de suplementos específicos em seus meios de cultivo, bem como estimuladas a diferenciação dentinogênica com o uso de BMP-2, de modo a serem caracterizadas como células-tronco. Dessa forma, espera-se constituir um banco validado de células-tronco pulpares para a execução de futuros experimentos na área de engenharia tecidual.

Objetivo da Pesquisa:

o objetivo deste estudo será o de isolar e caracterizar células-tronco da polpa dentária de dentes permanentes e decíduos, bem como o de caracterizar o potencial de diferenciação destas células para garantir o avanço das pesquisas e equiparação das condições de competitividade frente os grupos de pesquisas internacionais

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos para os participantes. Os dentes selecionados são dentes que seriam exfoliados/extraídos, tendo em vista os períodos de troca dentária (dentes decíduos) ou a necessidade terapêutica (terceiros molares inclusos). Os benefícios poderão ser observados na independência da Instituição de Pesquisa à qual o projeto está vinculado, de modo que de receptora de doações de linhagens, passaremos a doadores, técnica

dominada por poucos centros no Brasil. Além disso, o potencial de pesquisas com estes tipos celulares é altamente promissor, fazendo com que a expansão e arquivamento das linhagens permita a geração de pesquisa de alto impacto no futuro.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é relevante e está adequada para realização

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foi atendido a solicitação de mudança do title

Recomendações:

nada a declarar

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Tendo atendido as considerações anteriores, o projeto está aprovado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO JOSE DOS CAMPOS, 28 de Junho de 2012

Assinado por:
JANETE DIAS ALMEIDA