

OSMAR SHIZUO OKUDA

**Avaliação *in vitro* da fotobiomodulação das células tronco
de dentes decíduos esfoliados semeadas em um *scaffold* de
osso bovino mineral desproteínizado e colagenado**

São Paulo

2022

OSMAR SHIZUO OKUDA

**Avaliação *in vitro* da fotobiomodulação das células tronco
de dentes decíduos esfoliados semeadas em um *scaffold* de
osso bovino mineral desproteínizado e colagenado**

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Diagnóstico Bucal, Radiologia Odontológica e Imagiologia e Odontologia Hospitalar) para obter o título de Doutor em Ciências

Orientador: Prof. Dr Luiz Antonio Pugliesi
Alves de Lima

São Paulo
2022

Okuda, Osmar Shizuo.

Avaliação *in vitro* da fotobiomodulação das células troncos de dentes decíduos esfoliados semeadas em um *scaffold* de osso bovino mineral desproteínizado e colagenado / Osmar Shizuo Okuda; orientador Luiz Antonio Pugliesi Alves de Lima -- São Paulo, 2022.

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

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de concentração: Diagnóstico bucal, Radiologia odontológica, Imagiologia. e Odontologia Hospitalar. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida.

1. Células tronco. 2. Célula-Tronco Mesenquimal. 3. Regeneração óssea. 4. Enxerto ósseo. 5. Terapia com luz de baixa intensidade. 6. Bioestimulação a laser. I. Lima, Luiz Antonio Pugliesi Alves de. II. Título.

Okuda OS. Avaliação *in vitro* da fotobiomodulação das SHEDs semeadas em um *scaffold* de osso bovino mineral desproteínizado e colagenado. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: 03/10/2022

Banca Examinadora

Profa. Dra. Ana Clara Pedroni

Instituição: UNIB- Universidade Ibirapuera

Julgamento: Aprovado

Profa. Dra. Marcia Martins Marques

Instituição: Universidade de São Paulo

Julgamento: Aprovado

Prof. Dr. Victor Arana Chavez

Instituição: Universidade de São Paulo

Julgamento: Aprovado

A minha mãe **Miyoko** e ao meu pai **Tetuo** pelo amor, apoio e carinho que vocês sempre tiveram por mim e desde sempre me inculcaram os valores e princípios éticos e morais dos quais jamais me afastei.

Especialmente, a minha esposa **Jenny**. Nos conhecemos desde crianças e casados há 12 anos e desejo estar sempre ao seu lado.

As minhas filhas **Emilie** e **Julie**. Vocês estão me ensinando a ser pai e me trouxeram muitas alegrias e uma nova razão de vida.

Ao meu irmão **Marcelo** e a minha irmã **Márcia**, pelo companheirismo e apoio.

A minha Tia **Toyoko**, pelo carinho e atenção.

Aos meus familiares.

Aos leitores desta tese que se interessaram em conhecer o nosso trabalho.

Aos meus **mestres**, que em cada etapa da minha trajetória ensinaram-me através da palavra e do exemplo que a busca do conhecimento deve ser contínua.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**

Prof. Dr. Luiz Antônio Pugliesi Alves de Lima, meu orientador, amigo e excelente professor que desde o mestrado me acompanha, transmitindo muito conhecimento de forma exigente, crítica e criativa.

A **profa. Dra. Márcia Martins Marques**, uma pessoa incrível que o prof. Luiz me apresentou e me recebeu no laboratório, dando todo o apoio necessário para realização desta tese.

A **profa. Dra. Ana Clara Pedroni** uma professora dedicada e que esteve presente em todas as etapas dessa tese. Compartilhou seus profundos conhecimentos com destreza e paciência.

A **profa. Dra. Maria Stella Moreira** que acompanhou os experimentos e gentilmente doou as células para realização desse trabalho.

Prof. Dr. Victor Elias Arana Chavez responsável pelas orientações e análises de microscopia eletrônica de varredura.

Profa. Dra. Emanuela Prado Ferraz pela orientação no experimento de fosfatase alcalina.

Giovanna Sarra, minha amiga de laboratório que realizou os experimentos piloto.

Gabriela Torres Schröter, minha amiga de laboratório que auxiliou no cultivo das células para realização dos experimentos.

Elisangela Chinen que orientou o preparo das amostras para o MEV.

Cintia Taniguti Lima, que preparou lâminas para microscopia além de organizar os materiais de laboratório.

A **profa. Dra. Márcia Martins Marques** e ao **prof. Dr. Jamil Shibli** que participaram do exame de qualificação.

As secretárias do Departamento de Estomatologia, **Maria Aparecida Pinto** e **Ivone Ferreira da Silva** pelo apoio em toda a parte administrativa da pós-graduação.

A **profa. Dra. Silvia Vanessa Lourenço**, **profa. Dra. Emiko Saito Arita**, **prof. Dr. Paulo Braz da Silva** e **prof. Dr. Claudio Costa** pela disponibilidade e apoio durante a pós-graduação.

Vânia Martins Bueno de Oliveira Funaro e **Glauci Elaine Damásio Fidelis** na revisão da tese (em nome da Biblioteca da FOU SP)

As amigas da pós-graduação **Daniela Takahashi** e **Debora Nomoto**, **Karin Apaya Bedoya**, **Karina Amorim**, **Diana Marques**, ao amigo **Mauro Marutaka** e a toda **equipe de periimplantite** pela amizade e companheirismo

Aos professores de todas as disciplinas que cursei para aprimorar meu conhecimento.

Jenny Chu pela paciência, colaboração e disponibilidade em ajudar a formatar a tese.

À **FOUSP**, pelo apoio acadêmico da pós-graduação e infraestrutura

À **UNIB** que permitiu a utilização do laboratório para realização desse trabalho

À **Geistlich** pela doação dos *scaffolds* de Bio-Oss® Collagen para realização desse estudo

Monica Misawa e **Valéria Roma** da Geistlich pelo suporte prestado

Ao **CEFAP- ICBUSP** e aos funcionários, **Natália**, **Yuri** e **Mário** que ajudaram a realizar os experimentos de microscopia confocal e de fluorescência.

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (**CAPES**) – Código de Financiamento 001”

Considero que a elaboração de uma tese de doutorado é um produto coletivo. Várias pessoas contribuíram para que este trabalho chegasse a bom termo. A todas elas registro minha gratidão.

RESUMO

Okuda OS. Avaliação *in vitro* da fotobiomodulação das SHEDs semeadas em um *scaffold* de osso bovino mineral desproteínizado e colagenado [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2022. Versão Corrigida.

A regeneração óssea é um processo importante para oferecer tratamentos reconstrutivos mais rápidos e eficientes, no entanto, limitações técnicas continuam sendo um desafio, assim como a velocidade de formação e maturação óssea. Portanto, as pesquisas têm se voltado para técnicas alternativas na regeneração óssea e atualmente, a engenharia tecidual tem estudado o uso de células tronco para tratamento de perdas ósseas. A eficácia e a taxa de sucesso das diferentes técnicas e *scaffolds* foram avaliadas. Porém, há pouca informação sobre a eficácia combinada de carreadores xenógenos, células tronco de dentes decíduos esfoliados humano (SHEDs) e a terapia de fotobiomodulação (PBMT) na regeneração de defeitos ósseos. Baseado em estudos prévios, a proposta deste estudo foi avaliar, *in vitro*, a ação da PBMT, uma técnica com propriedades imunomodulatórias, angiogênicas e com capacidade de aumentar a adesão, proliferação e migração celular ao biomaterial tridimensional de osso bovino mineralizado desproteínizado com colágeno suíno a 10% (OBMDC), semeado com SHEDs, para acelerar e aumentar a taxa de formação óssea. Foi utilizado o laser de diodo, com comprimento de onda de 660nm; 40mW de potência; 3J/cm² de densidade de energia e 2 segundos de tempo de aplicação após 24h e 72h do plaqueamento. Para avaliar a proliferação, as SHEDs foram descongeladas cultivadas, plaqueadas, semeadas no *scaffold* de OBMDC e divididas em 8 grupos: 1) Controle 15%; 2) Controle 5%; 3) OBMDC 15%; 4) OBMDC 5%; 5) Laser 15%; 6) Laser 5%; 7) OBMDC-L 15%; 8) OBMDC-L 5% e a análise de proliferação foi realizada por MTT. Para avaliar diferenciação celular, as amostras foram divididas em quatro grupos: 1) Grupo Controle clonogênico: SHEDs cultivadas em meio clonogênico; 2) Grupo Controle mineralizante: SHEDs cultivadas em meio mineralizante; 3) Grupo laser clonogênico: SHEDs cultivadas em meio clonogênico com aplicação de laser; 4) Grupo laser mineralizante: SHEDs cultivada em meio mineralizante com aplicação de laser. Para o grupo laser, as células foram irradiadas

no período de 24h e 72h após o plaqueamento e todas as amostras fixadas para análise da formação dos depósitos de cálcio, através do ensaio de vermelho de alizarina após 23 dias de cultivo celular e os dados foram tratados estatisticamente ($p \leq 0,05$). Para avaliar a morfologia celular das SHEDs em todos os grupos, utilizou-se o microscópio invertido de fase em 24h e 72h após o plaqueamento. O grupo OBMDL 5% SFB em 72h, demonstrou maior proliferação celular que o grupo Controle ($p=0.0286$). O grupo laser no meio mineralizante apresentou maior formação de depósito de matriz mineralizada em comparação ao grupo controle em meio clonogênico, controle em meio mineralizante e laser em meio clonogênico ($p < 0,0001$). Considerando as condições experimentais deste estudo, concluiu-se que, *in vitro*, as SHEDs, semeadas em *scaffold* OBMDL, proliferaram mais após 2 aplicações de PBMT e houve diferenciação osteogênica das células após 23 dias em meio mineralizante.

Palavras-chave: Células tronco. Célula-Tronco Mesenquimal. Regeneração óssea. Enxerto Ósseo. Terapia com Luz de Baixa Intensidade. Bioestimulação a Laser

ABSTRACT

Okuda OS. *In vitro* evaluation of photobiomodulation of Stem cells from human exfoliated deciduous teeth seeded in a deproteinized bovine bone mineral with 10% collagen scaffold [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2022. Versão Corrigida.

Bone regeneration is an important process provide faster and more efficient reconstructive treatments. However, technical limitations remain a challenge, such as the speed of bone formation and maturation. Therefore, this research has focused on current alternative techniques in bone regeneration such as tissue engineering stem cells to treat bone loss. The effectiveness and success rate of different techniques and scaffolds were evaluated. However, there is little information about the combined efficacy of xenogeneic carriers, human exfoliated deciduous teeth stem cells (SHEDs) and photobiomodulation therapy (PBMT) in the regeneration of bone defects. Based on previous studies, the hypothesis arose of applying PBMT, a technique with immunomodulatory, angiogenic properties to increase cell adhesion, proliferation and migration on deproteinized bovine bone mineral with 10% porcine collagen (OBMDC), seeded with SHEDs, in order to investigate the acceleration and increase the rate of bone formation. The purpose of this study is to evaluate, *in vitro*, PBMT in a three-dimensional scaffold of OBMDC, seeded with SHEDs. The laser used was the diode, with a wavelength of 660nm; 40mW of power; 3J/cm² of energy density in 2 seconds after 24h and 72h of plating. To assess proliferation, SHEDs were thawed, cultured, plated, seeded on the OBMDC scaffold and divided into 8 groups: 1) Control 15%; 2) Control 5%; 3) OBMDC 15%; 4) OBMDC 5%; 5) Laser 15%; 6) Laser 5%; 7) OBMDC-L 15%; 8) OBMDC-L 5%. In the laser group, PBMT was applied at 24h and 72h after plating and the analysis was performed by MTT. To evaluate cell differentiation, the samples were divided into four groups: 1) Clonogenic Control Group: SHEDs cultivated in clonogenic medium; 2) Mineralizing Control Group: SHEDs grown in mineralizing medium; 3) Clonogenic laser group: SHEDs grown in clonogenic medium with laser application; 4) Mineralizing laser group: SHEDs cultivated in mineralizing medium with laser application. For the laser group, the cells were irradiated within 24h and 72h after plating and all samples were fixed for analysis of calcium deposit formation, using the

alizarin red based assay after 23 days of cell culture. To assess the cell morphology of SHEDs, samples from the groups were analyzed under the inverted phase microscope at 24h and 72h after plating. The laser applied at SHEDs in an OBMDC scaffold with 5% FBS in 72h showed greater cell proliferation compared to the control group ($p=0.0286$). The mineral laser group showed greater formation of mineralized matrix deposits compared to the clonogenic control, mineralized control and clonogenic laser group ($p<0.0001$). Considering the experimental conditions of this study, it was concluded that, in vitro, SHEDs, seeded in an OBMDC scaffold, proliferated more after 2 applications of PBMT and there was osteogenic differentiation of cells after 23 days in mineralizing medium.

Keywords: Stem cells. Bone regeneration. Tissue Scaffold. Low Level Light Therapy. Photobiomodulation Therapy

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 4.1- Fotografia do criotubo e da capela de fluxo laminar.....	40
Figura 4.2 - Fotografia do biomaterial.....	41
Figura 4.3 - Fotografia representativa da estufa.....	42
Figura 4.4 - Fotografia do microscópio invertido de fase; fotomicrografia das SHEDs em subconfluência, microscópio de fluorescência e da Calceína-AM.....	43
Figura 4.5 - Fotografia representativa do aparelho de espectrofotômetro.....	44
Quadro 4.1 - Descrição dos grupos de experimento de proliferação celular.....	45
Figura 4.6 - Fotografia representativa do fundo do tubo Falcon após a centrifugação, contendo as SHEDs placas de cultivo dentro do fluxo laminar e semeando as SHEDs dentro do poço	45
Quadro 4.2 - Descrição dos grupos de experimento de diferenciação celular	47
Figura 4.7 - Fotografia da placa com as amostras incubadas com vermelho de alizarina e com Hidróxido de amônio.....	47
Quadro 4.3 -Descrição dos parâmetros de irradiação aplicados na PBMT das SHEDs	48
Figura 4.8 - Fotografia do equipamento laser; Área do feixe; Laser Check e aplicação das irradiações dos grupos experimentais.....	49
Figura 5.1 - Fotomicrografia das SHEDs em microscópio invertido de fase.....	51
Figura 5.2 - Fotomicrografia das SHEDs em microscópio de fluorescência.....	52

Gráfico 5.1 - Representação gráfica das médias da absorbância no ensaio de MTT no período de 24h e 72h.....	53
Gráfico 5.2 - Representação gráfica das médias da absorbância no ensaio de MTT do grupo Controle e Laser no período de 24h e 72h.....	54
Gráfico 5.3 - Representação gráfica das médias da absorbância no ensaio de MTT do grupo OBMDL e OBMDL-L no período de 24h e 72h	55
Figura 5.3 - Fotografia representativa do ensaio de vermelho de alizarina. Fotografias das placas de cultura. Fotomicrografia de fase, avaliação da deposição de matriz mineralizada pela coloração de vermelho de alizarina. Representação gráfica das médias da absorbância no ensaio de vermelho de alizarina no período de 23 dias .	56
Figura 5.4 - Fotomicrografia avaliação da deposição de matriz mineralizada pela coloração de vermelho de alizarina.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AlGaAs	Laser de diodo de Arseneto de Gálio-Alumínio
ANOVA	Do inglês <i>Analysis of Variance</i> (Análise de Variância)
ATP	Adenosina trifosfato
BMMSC	Do inglês <i>Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells</i> (células-tronco mesenquimais da medula óssea)
BMP-2	Do inglês <i>bone matrix -2</i>
CAAE	Certificado de Apresentação de Apreciação Ética
CEFAP-USP	Centro de Facilidades de Apoio a Pesquisa
CEP	<i>Comitê</i> de Ética em Pesquisa
CO ²	Dióxido de carbono
DMEM	Do inglês <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNM	Do inglês <i>Denutrition medium</i> (5% de soro fetal bovino)
DNA	Do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucéico)
DPSC	Do inglês <i>dental pulp stem cells</i> (células tronco da polpa dental)
ECM	Matrix extracelular
SFB	Soro fetal bovino
FDA	Do inglês <i>Food and Drug Administration</i>
FGF	Do inglês <i>fibroblastic growth factor</i>
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
GMSC	Do inglês <i>mesenchymal stem cells derived from human gingiva</i> (células tronco da gengiva)
HA	Hidroxiapatita
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
InGaAlP	Do inglês <i>Indium Gallium Aluminum Phosphide</i> (Fosfeto de Índio Gálio-Alumínio)

LLLT	Laser de baixa potência
LED	Do inglês <i>Light Emitting Diode</i>
MA	Estado de Massachusetts, EUA
MSC	Do inglês <i>mesenchymal stem cells</i> (células-tronco mesenquimais)
MTT	Do inglês 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NBR	Normas de segurança
OBMDC	Osso bovino mineral desproteínizado com 10% de colágeno suíno
OBMD	Osso bovino mineral desproteínizado
P4	Passagem 4
P5	Passagem 5
P6	Passagem 6
PBMT	Do inglês <i>photobiomodulation therapy</i> (terapia por fotobioestimulação)
PDLSC	Células tronco do ligamento periodontal
PRP	Plasma rico em plaquetas
RM	Do inglês <i>regular medium</i> (15% de soro fetal bovino)
RNA	Do inglês <i>ribonucleic acid</i> (ácido ribonucléico)
RUNX- 2	Do inglês <i>runt-related transcription factor 2</i>
SHED(s)	Do inglês <i>dental pulp derived from exfoliated deciduous teeth</i> (células tronco de dentes decíduos esfoliados humano)
TC	Tomografia computadorizada
TCP	Tricálcio fostato
TGF- β	Do inglês <i>transforming growth factor-β</i> (fator de crescimento transformador β)
UCMSC	Células tronco do cordão umbilical
UNIB	Universidade Ibirapuera
USP	Universidade de São Paulo
VEGF	Do inglês <i>vascular endothelial growth factor</i>
β -TCP	Beta tricálcio fostato
γ	Gama
3D	Tridimensional

LISTA DE SÍMBOLOS

®	Marca registrada
mm	Milímetros
mW/cm ²	Mili Watts por centímetro cuadrado
J/cm ²	Joules por centímetro cuadrado
Nm	nanômetro
±	Mais ou menos
J	Joules
cm ²	Centímetros cuadrado
mW	Mili Watts
U/ml	Unidade por mililitro
mM	Milimolar
CO ₂	gás carbônico
Mg	miligramas
H	Hora
x	Vezes
W/cm ²	Watts por centímetro cuadrado
s	Segundos
ml	Mililitro
µL	Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	25
3	PROPOSIÇÃO	37
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	39
5	RESULTADOS	51
6	DISCUSSÃO	59
7	CONCLUSÃO.....	63
	REFERÊNCIAS	65
	ANEXOS.....	79

1 INTRODUÇÃO

Lesões ósseas com perda de tecido podem levar a alterações na qualidade de vida (Caran et al., 2014). Pacientes que necessitam de cirurgia reconstrutiva geralmente descrevem perda funcional, distúrbios físicos, emocionais, sociais, trabalhistas e desafios financeiros associados (Malard et al., 2007). O processo fisiológico de remodelação óssea é naturalmente coordenado, contudo, podem ocorrer desequilíbrios entre a deposição e remoção óssea. Em defeitos teciduais extensos, o reparo pode ser um desafio, exigindo o uso de enxertos ósseos, implantes ou biomateriais.

A regeneração óssea na odontologia evoluiu muito nas últimas décadas, através do desenvolvimento de novos produtos e avanços nas técnicas cirúrgicas. Entretanto, a reconstrução de defeitos ósseos é um grande desafio. Defeitos esses, que podem ser de origem diversas, tais como malformações congênitas, trauma, infecções periapicais, doenças periodontais e peri-implantares e extrações dentárias.

As fissuras lábio palatinas são defeitos ósseos que podem ser enxertadas para estabelecer a continuidade do esqueleto craniofacial, porém, a reabsorção óssea do enxerto varia entre 10% a 36% dos casos, tornando necessárias outras intervenções cirúrgicas (Bayerlein et al., 2006; Hibi et al., 2006).

A alteração da dimensão alveolar ocorre após a extração dentária, como resultado da perda da parede óssea cortical, a qual é uma estrutura relacionada ao dente. Observa-se que, principalmente, na região anterior, a parede óssea vestibular do alvéolo é muito fina (Huynh-Ba et al., 2010), além de ser, em grande parte, de formação óssea cortical. Dessa maneira, a extração dentária ocasiona a redução da dimensão vertical e horizontal do rebordo alveolar. Independente da técnica, o osso cortical vestibular, é sempre reabsorvido após a extração dentária (Araújo; Lindhe, 2005) e em média, a reabsorção vertical é de 2,2mm (Cardaropoli et al., 2003; Cardaropoli et al., 2005). O uso de um biomaterial de preenchimento como OBMDC pode compensar a reabsorção óssea vestibular do alvéolo (Araújo et al., 2008; Fickl et al., 2008).

Na cicatrização óssea, a substituição do tecido removido ou perdido no organismo pode ocorrer tanto por regeneração como por reparo. Na regeneração, a

estrutura e a função são restauradas por completo. Por outro lado, o reparo ósseo, leva a formação de um tecido diferente na morfologia ou função do tecido ósseo original.

Considerado o padrão ouro para reparação, o enxerto ósseo autógeno oferece um substrato osteocondutor, fatores osteoindutores obtidos através da presença de fatores de crescimento, vascularização e células com potencial osteogênico. No entanto, apresenta desvantagens como morbidade do sítio doador (Cordaro et al., 2008), limitação do ganho efetivo de volume ósseo ao longo do tempo (Salata et al., 2002), quantidade limitada de osso da área doadora, reabsorção óssea, complicações no trans-cirúrgico como lesões vasculares, além do custo clínico elevado. Desse modo, outros biomateriais foram pesquisados como os aloenxertos e os xenoenxertos. A desvantagem do uso de enxertos alogênicos é a resposta imunológica, rejeição tecidual, dificultando a integração com a área receptora, transmissão de infecções e taxas elevadas de falha ao longo do tempo (Winkler et al., 2018). O xenoenxerto é um biomaterial obtido de outras espécies, sendo o osso bovino, o mais utilizado. Eles apresentam desafios biológicos como propriedades osteoindutivas reduzidas relacionadas ao processo de fabricação e a falta de células viáveis. Todos esses biomateriais apresentam limitações no tempo de reparo e substituição por novo osso. Dessa maneira, avanços recentes em biotecnologia permitiram o desenvolvimento da engenharia tecidual.

A engenharia de tecido ósseo tem como objetivo, o desenvolvimento de materiais que podem ser usados para regenerar tecido ósseo *in vivo*. Estratégias de regeneração óssea podem incluir o uso de carreadores, fatores de crescimento, células ou uma combinação dos três (Szpalski et al., 2011). Assim, o uso de células com potencial osteogênico em combinação com carreadores é uma alternativa promissora aos enxertos ósseos autógenos.

As SHEDs têm atraído a atenção científica como uma fonte de células tronco alternativa. Essas células apresentam uma série de vantagens para regeneração óssea como uma alta taxa de proliferação, potencial de diferenciação osteogênica e propriedades imunomodulatórias. Por originarem de dentes decíduos esfoliados, a obtenção das células é fácil e de baixo risco de complicações. Além disso, a associação das SHEDs com biomateriais mostrou ser efetivos na reconstrução de defeitos ósseos (Seo et al., 2008; Zheng et al., 2009; Tanikawa et al., 2020).

Com o desenvolvimento científico, pesquisas têm utilizado a terapia de

fotobiomodulação na engenharia tecidual para acelerar o processo de formação e qualidade óssea (Marques et al., 2016), através da proliferação celular (Mvula et al., 2010) do aumento da capacidade de diferenciação celular, do processo de angiogênese e da síntese de fatores de crescimento VEGF (do inglês *vascular endothelial growth factor*) e FGF (do inglês *fibroblastic growth factor*) (Eduardo et al., 2008; Damante et al., 2009; AlGhamdi et al., 2012; Moreira et al., 2011; Cury et al., 2013; Arany et al., 2014; Pedroni et al., 2018; Ferreira et al., 2019), prevenção da morte celular e melhor condição ambiental de células em estresse oxidativo, o qual pode ocorrer durante o transplante das células. Desta forma, a PBMT pode favorecer o pré-condicionamento de células tronco mesenquimais *in vitro* antes de seu transplante (Mvula; Abrahamse, 2016), aumentando a proliferação celular, sem ocasionar danos moleculares e conservando suas características específicas (Barboza et al., 2014).

Atualmente, as pesquisas têm se voltado para técnicas alternativas na regeneração óssea com uso de células tronco. A eficácia e a taxa de sucesso de diferentes técnicas e tipos de materiais foram avaliadas. No entanto, há pouca informação sobre a eficácia combinada de carreadores xenógenos, SHEDs e a PBMT na regeneração de defeitos ósseos.

Foi realizado um trabalho clínico de fase 1 para tratamento de lábio leporino e fenda palatina em crianças com o uso das SHEDs semeadas em um *scaffold* de OBMD. Esse trabalho, realizado por Tanikawa et al. (2020) mostrou por tomografia computadorizada (TC), no período de 6 e 12 meses, o fechamento de 75,6% do defeito alveolar, estatisticamente semelhante ao tratamento tradicional com o uso de enxerto autógeno de crista ilíaca após 6 meses da cirurgia. Porém, um ponto discutido pelas autoras, é a alta taxa de ocorrência de impactação do dente canino, na região próxima a fenda alveolar, o que pode estar relacionado a um fator predisponente, a reabsorção lenta da hidroxiapatita do biomaterial.

Baseado na hipótese de melhorar a regeneração óssea, surgiu a possibilidade de aplicar a PBMT, uma técnica com propriedades imunomodulatórias, angiogênicas e capacidade de aumentar a proliferação e migração celular ao biomaterial de OBMD, semeado com SHEDs, aperfeiçoando a adesão e a diferenciação celular e assim acelerar e melhorar a qualidade de formação óssea.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Células tronco de dentes decíduos esfoliados

As SHED, são células tronco mesenquimais ectodérmicas, originárias da crista neural do embrião, que normalmente são descartadas (Gronthos et al., 2000; de Sá Silva et al., 2012) e contornam os problemas éticos associados ao uso de células embrionárias, o que torna permitido o seu uso e apresentam características semelhantes as células tronco da medula óssea (BMMSC) (An et al., 2018). Miura e colaboradores, foram os primeiros pesquisadores a isolar e descrever essas células (Miura et al., 2003) e posteriormente, descritas por outros autores (Seo et al., 2008; Suchánek et al., 2010; Vishwanath et al., 2013). Sua morfologia celular, é muito semelhante as células tronco da polpa de dentes adultos (DPSC) assim como a expressão de marcadores de superfície celular. Apresentam alta capacidade de proliferação, por apresentar alta atividade da telomerase durante a fase de troca dos dentes decíduos pelos permanentes, o qual os tornam indicados para técnicas de regeneração tecidual (Miura et al., 2003; Annibali et al., 2014).

A análise da morfologia da SHED mostrou que elas consistem em células com formas achatadas, poligonais ou semelhantes a fibroblastos, que podem gerar colônias aderentes clonogênicas e alta taxa de proliferação quando cultivadas e expandidas (Rizk; Rabie, 2013; Young et al., 2013). As SHEDs foram identificadas como células-tronco multipotentes que foram capazes de se diferenciar em uma variedade de tipos celulares, incluindo células osteogênicas, condrogênicas e adipogênicas, bem como células neurais, odontoblastos e células endoteliais (Miura et al., 2003; Kaneko et al., 2018) e mais imaturas do que as DPSC (Miura et al., 2003).

A polpa de dentes permanentes e decíduos possui células com característica fenotípica semelhante as células tronco mesenquimal adulta (Gronthos et al., 2000; Miura et al., 2003; Wang et al., 2012). As DPSCs e as SHEDs diferem no perfil gênico, sendo que as SHEDs exibem maior expressão de genes ligados à proliferação celular, matriz extracelular, citocinas e fatores de crescimento, como fator de crescimento de FGF e fator de crescimento tumoral β (TGF- β) (Rosa et al., 2016).

As SHEDs demonstraram vantagens por originar de um órgão não vital e de serem células facilmente obtidas através do esfoliamento natural dos dentes decíduos

sem envolver um método invasivo ou de extração, isto é, sem ocasionar trauma ou morbidade ao paciente (Seo et al., 2008). A transição dos dentes decíduos para os dentes permanentes é um processo único e dinâmico que pode levar cerca de sete anos nos seres humanos (Parner et al., 2002). Desta forma, os dentes decíduos esfoliados são uma fonte importante de tecido viável. Outro aspecto importante, apresentam funções imunomoduladoras (Liu et al., 2015). São células com maior capacidade de proliferação em comparação as BMMSC, células tronco do cordão umbilical (UCMSC), células tronco da gengiva (GMSC), tornando-a um candidato ideal para tratamento celular relacionada à regeneração de tecidos (Miura et al., 2003; Annibali et al., 2014), facilitando a sua proliferação *in vitro* antes da implantação no biomaterial (Miura et al., 2003). E estudos que avaliaram a quantificação da osteogênese e adipogênese indicaram que as SHEDs têm melhor capacidade de diferenciação em comparação as DPSCs (Shi et al., 2020).

As SHEDs são uma fonte de células-tronco com potencial para armazenamento em banco de tecidos, que tem interessado para terapia celular alogênica e autóloga. O uso das próprias células-tronco apresenta baixo risco para o desenvolvimento de reações imunes ou rejeição após transplante e também diminui o risco de transmissão de doenças. Assim, dentes decíduos esfoliados podem ser uma fonte viável de células para terapia baseada na engenharia tecidual (Taguchi et al., 2019), principalmente no tratamento de malformações craniofaciais (Seo et al., 2008). Um estudo mostrou que o uso das SHEDs criopreservadas ou recém isoladas e implantadas, apresentaram formação óssea semelhantes, e que a longo prazo, a criopreservação é inócua e não afetou as características biológicas das SHEDs, possibilitando o armazenamento em banco de células-tronco. Behnia et al. (2014) avaliaram o transplante das SHEDs, criopreservadas há cinco anos em defeitos ósseos de mandíbula de cães e observaram a formação de novo osso sem apresentar reação adversa. Durante o período de cultura, não foram encontradas alterações na viabilidade celular ou sinal de degeneração da cultura celular e capacidade de diferenciação, permanecendo indiferenciado e estável após a criopreservação, com a manutenção da estabilidade citogenética das SHEDs (Suchánek et al., 2010; Behnia et al., 2014) e nenhuma resposta imune foi observada durante os três meses de implantação celular, mostrando que o tempo de isolamento não teve efeito sobre as propriedades imunomoduladoras das SHEDs. Já um outro trabalho, conduzido por Lee et al. (2021) compararam SHEDs criopreservadas e armazenadas por um período de 1 à 8 meses

com SHEDs recém coletadas. *In vitro*, não foram observadas diferenças significativas entre os dois grupos nas análises de proliferação, na expressão de marcadores de células-tronco mesenquimais (MSC), ou na diferenciação adipogênica e osteogênica. Após o transplante *in vivo*, ambos os grupos produziram tecido duro, mas a quantidade de tecido duro recém-formado foi ligeiramente menor nas SHEDs criopreservadas.

Wang et al. (2012) avaliaram *in vitro* a proliferação e a unidade formadora de colônia das SHEDs, capacidade de mineralização das células com osso bovino e cerâmico na região subcutânea de camundongos imunocomprometidos por 8 semanas. *In vitro*, a proliferação e a capacidade de diferenciação foram maiores que as DPSCs e *in vivo* teve uma maior mineralização que as DPSCs.

Yamaza et al. (2010) avaliaram a diferenciação das SHEDs que mostraram capacidade de diferenciar em células osteogênicas e adipogênicas. As SHEDs alteraram os efeitos imunomoduladores que levam a terapia bem-sucedida para doenças imunológicas, sendo capaz de reverter efetivamente os distúrbios do Lúpus eritematoso.

2.2 Descrição de estudos das SHED na regeneração óssea

A polpa dentária tem representado uma fonte promissora para terapia da engenharia de tecido ósseo. Muitos experimentos foram realizados, utilizando SHEDs para regeneração de defeitos ósseos em modelo animal (Seo et al., 2008; Zheng et al., 2009; Alkaisy et al., 2013; Omori et al., 2015; Nakajima et al., 2018; Lee YC et al., 2019). A partir destes estudos, é possível pressupor que as SHEDs podem desempenhar um papel fundamental em cirurgias reconstrutivas maxilofaciais.

Em um estudo conduzido por Seo et al. (2008) as SHEDs foram transplantadas em camundongos imunocomprometidos e repararam com sucesso defeitos do osso parietal através da formação de tecido ósseo, após se diferenciarem em células semelhantes a osteoblastos.

Um outro estudo, em defeitos críticos na região de parassínfise da mandíbula de 10 mini porcos foram regenerados após 6 meses da cirurgia e 2 defeitos menores bilateralmente foram acompanhados por 2 e 4 semanas, utilizando as SHEDs. Através da TC foi possível verificar uma regeneração quase total. A regeneração óssea foi

significativamente maior no grupo tratado com células tronco de dentes decíduo de mini porco/ beta tricálcio fostato (β -TCP) em comparação com o grupo β -TCP. No grupo controle, foi observada regeneração óssea limitada na área do defeito, que foi preenchido predominantemente com tecido conjuntivo (Zheng et al., 2009).

Alkansi et al. (2013) realizaram um trabalho de distração osteogênica na mandíbula de 18 coelhos, transplantando SHEDs no local da cirurgia. Foi observado radiograficamente e histologicamente, que o osso formado no grupo SHEDs era mais maduro que no grupo controle e na análise histomofológica, a porcentagem de novo osso formado foi estatisticamente significativa para o grupo SHEDs em comparação ao grupo controle, no período de 2 semanas (35,97% e 18.41%), 4 semanas (59.69% e 31.45%) e 6 semanas (52.61% e 65.28%) respectivamente.

Pesquisas de células tronco incorporadas aos *scaffolds*, com o objetivo de reparar defeito de tecido duro em fendas palatinas estão sendo realizadas. Lee JM et al. (2019) pesquisaram película de duas fontes de células osteogênicas, células-tronco mesenquimal humana (hMSC) e SHEDs para reparo ósseo de fenda palatina, resultando em calcificação *in vitro*, o que indicou o potencial osteogênico dessas células. Além disso, as hMSC e SHEDs expressaram os marcadores osteogênicos específicos do osso, como osterix, osteocalcina e osteopontina, após a inserção em fenda palatinas embrionárias cultivadas *ex vivo* e cultura em ovo.

Nakajima et al. (2018) compararam 3 tipos de células tronco: SHEDs, DPSC e BMMSC associados a uma membrana de ácido polilático coglicólico em defeitos com 4mm de diâmetro em calvária de rato e observaram após 12 semanas a equivalência no potencial de regeneração óssea das SHEDs com as DPSC e BMMSC, suficiente para a reparação do defeito ósseo. Esse estudo demonstrou que as SHEDs são uma das melhores fontes celulares, com capacidade de mineralização e reconstrução de fissura lábio palatina.

Tanikawa et al. (2020) associaram o Bio-Oss®Collagen com SHEDs para fechamento de defeitos alveolares de pacientes com lábio leporino e fenda palatina e compararam com um grupo que usou enxerto de crista ilíaca. Ambos os grupos apresentaram a união progressiva do osso alveolar, porém estudos mostraram que as SHEDs apresentaram um desempenho favorável na reconstrução de grandes defeitos maxilofaciais, mesmo para reconstrução orofacial em futuros ensaios clínicos em humanos.

Miura et al. (2003) associaram SHEDs à biomateriais de hidroxiapatita beta

tricálcio fostato (HA/ β -TCP) e enxertaram na região subcutânea de camundongos imunossuprimidos. Após 8 semanas eles observaram a formação de ilhas ósseas no interior dos poros do biomaterial. Para verificar a origem da neoformação óssea, eles utilizaram sondas específicas e observaram que as células humanas estavam localizadas no tecido conjuntivo que preenchia os poros do biomaterial.

2.3 Arcabouço de Osso Bovino mineral desproteínizado com colágeno à 10%

Na engenharia de tecidos, o *scaffold* atua como um modelo de crescimento e alternativa a matriz extracelular (ECM), não apenas orientando a regeneração dos tecidos, mas também controlando a forma do tecido ou órgão. O *scaffold* determina o comportamento biológico e a proliferação das células. Sendo assim, o desenvolvimento e preparação tridimensional (3D) do *scaffold* com boa compatibilidade celular, biodegradável e propriedades de absorção, alta resistência, boa estabilidade, radiopacidade, porosidade, distribuição uniforme dos poros, boa conectividade, fácil manipulação e custo aplicável são características fundamentais.

Até o momento, não existe um modelo único de biomaterial que possa ser utilizado em todas as situações clínicas. Desta forma, o desenvolvimento de biomateriais com características, osteocondutoras, osteoindutoras e osteogênicas é fundamental para resultar na regeneração óssea (Sittinger et al., 2004).

Bio-Oss[®] Collagen (Geistlich AG, Wollhusen, Switzerland), é um biomaterial composto por matriz óssea bovina mineralizada desproteínizada com adição de 10% de colágeno suíno, em forma de bloco e esterilizada por irradiação gama (γ). Esse biomaterial é indicado para preenchimento de alvéolos de extração e defeitos periodontais. É um produto tridimensional com características que permitem ser modelável e aparado de acordo com a necessidade clínica (Miyamoto et al., 2019).

O colágeno possui qualidade pró-angiogênica, o qual acelera o crescimento, proliferação e maturação de células endoteliais, o que favorece a regeneração fisiológica (Heinemann et al., 2012). Também apresenta uma flexibilidade e consistência que permite uma diversidade de formas como esponja, membrana e hidrogel (Patino et al., 2002), permitindo que ele tome a forma do defeito. Outra importância do colágeno, é a melhora no manuseio das partículas do enxerto e atua

para manter o biomaterial no local desejado. E clinicamente, não apresentou efeitos colaterais imunológicos (Cordaro et al., 2008; Heberer et al., 2008).

De acordo com o fabricante, o Bio-Oss® tem em sua composição menos de 8% de água, uma porcentagem de Cálcio de 38% a 42% e Fósforo de 12,5% a 17,5%, uma ação capilar que permite uma permeação rápida e eficiente de 76mm em um período de 22 segundos e a capacidade de absorção total de 328mg em 22 segundos de líquido. A capacidade de permeação eficiente proporciona uma osseointegração e a presença dos poros, aumenta a área de superfície do material, favorecendo a osteocondução e o crescimento de células ósseas nos poros. Os componentes orgânicos do osso bovino são removidos, através do tratamento térmico à 300°C. O Bio-Oss® apresenta micro e macroporos o que contribui para elevada hidrofília. Os microporos garantem a elevada ação capilar e conseqüentemente, a rápida absorção do líquido e os macroporos interligados permitem a entrada de células sanguíneas e das proteínas nas partículas para uma osseointegração efetiva.

Em seus estudos, Araújo et al. (2008) dividiram os alvéolos de extração em 3 porções, sendo elas apical, central e coronal. Pela análise dos autores, o terço coronal foi o que sofreu maior reabsorção, sendo o mais crítico. Entretanto, quando o alvéolo pós extração foi preenchido com OBMDc a 10%, observou-se a preservação do volume ósseo no terço coronal. Por outro lado, o volume da porção coronal diminuiu em aproximadamente 30% nos casos em que não foi utilizado o Bio-Oss® Collagen. Desta forma, o biomaterial foi capaz de substituir a estrutura óssea coronal (Araújo et al., 2008; Araújo; Lindhe, 2009).

Em um experimento em animais, Araújo et al. (2011), avaliaram o processo de reparo ósseo após a instalação de implantes imediatos somados ao osso bovino mineralizado com adição de 10% de colágeno suíno. Após 6 meses, as biópsias foram coletadas e a análise histológica realizada. Os pesquisadores concluíram que o Bio-Oss® Collagen inserido no *gap* peri-implantar modificou o processo de cicatrização do tecido duro, favorecendo a região de contato osso/implante.

Wong e Rabie (2010) examinaram o novo osso produzido por Bio-Oss® Collagen enxertado em defeitos ósseo em coelhos e compararam com enxerto de matriz de colágeno (controle positivo) e sem enxerto (controle negativo) para avaliar se ele aumenta a cicatrização de um defeito ósseo, aumentando a quantidade de formação de novo osso local. A matriz de colágeno (Colágeno fibrilar absorvível purificado) foi utilizada neste estudo para transportar fatores de crescimento como

bone matrix -2 (BMP-2) e induzir a formação óssea em animais e em seres humanos. De acordo com o fabricante, a matriz de colágeno foi derivada do tendão bovino, na forma fibrilar (Collagen Matrix, Inc NJ, EUA) para fornecer células e fatores de crescimento. No total de 18 defeitos ósseos de 5mm por 10mm no osso parietal de 9 coelhos, 6 defeitos foram preenchidos com Bio-Oss® Collagen, 6 defeitos preenchidos com matriz de colágeno e 6 não foram preenchidos. Após 14 dias, realizaram a análise histológica que resultou em 339% mais formação óssea no defeito preenchido com Bio-Oss® Collagen em comparação ao grupo controle positivo. Por outro lado, o grupo controle negativo não teve formação óssea.

Thaller et al. (1994) utilizaram Bio-Oss® em forma de partículas versus Bio-Oss® Collagen em defeitos intra-ósseo de calvária de coelho. Eles encontraram uma nova formação óssea significativa em ambos os grupos em comparação ao grupo controle em 2, 4, 6, 8, 12 e 16 semanas após a cirurgia.

O Bio-Oss® Collagen apresenta uma estrutura esponjosa e sistema de poros interligados que podem facilitar aderência celular e crescimento vascular (Payer et al., 2010; Bose et al., 2012). Em um estudo experimental com mini porcos, que empregaram TC, análise histológica, histomorfométrica, e imuno-histoquímica, existe evidências que os *scaffolds* de hidroxiapatita com colágeno semeados com SHEDs são mais proficientes do que *scaffolds* não semeados com SHEDs para osteogênese e formação de novo osso (Zheng et al., 2009).

Na avaliação com microscopia eletrônica de varredura, foi possível observar que as SHEDs tiveram uma boa interação e adesão ao biomaterial de osso bovino com colágeno (Tanikawa et al., 2020).

Khorsand et al. (2013) investigaram o efeito das células tronco da polpa dental na regeneração de modelos de defeitos em cães. As DPSC do animal associado com Bio-Oss® particulado foi implantado em um dos defeitos, enquanto no lado oposto foi usado apenas o Bio-Oss® (grupo controle). Após 8 semanas, o defeito periodontal foi avaliado histologicamente e histomorfologicamente. Nos 10 animais do grupo teste, teve a formação de cemento, osso e ligamento periodontal. Já no grupo controle, ocorreu a formação de cemento e osso em 9 cães. Já a formação de ligamento periodontal ocorreu em 8 animais. Histomorfologicamente, a regeneração de cemento e ligamento periodontal no grupo teste foi significativamente maior que no grupo controle.

Novos métodos reconstrutivos e menos invasivos foram pesquisados para

otimizar a formação óssea, osseointegração de implantes dentários e a elevação do assoalho do seio maxilar. Sauerbier et al. (2010) realizaram um estudo de boca dividida em ovinos e compararam o osso bovino mineral desproteínizado (OBMD) sozinho e em combinação com MSC, buscando acelerar o potencial na técnica de elevação do assoalho do seio maxilar em seis ovelhas adultas. OBMD e MSC foram colocados no lado teste e apenas OBMD no lado controle, contralateral de cada ovelha. Os animais eram sacrificados após 8 e 16 semanas. As áreas de aumento foram analisadas por TC, histologia e histomorfometria. Os volumes iniciais de ambos os lados foram semelhantes e não mudaram significativamente com o tempo. Uma conexão próxima entre as partículas de OBMD e o novo osso foi observada histologicamente. A formação óssea foi significativamente mais rápida em 49% no lado teste, o que poderia permitir a instalação de implantes precocemente.

Khojasteh et al. (2008) compararam 2 biomateriais, Bio-Oss® e o β -TCP, associados com plasma rico em plaquetas (PRP) ou com BMMSC em defeitos de 5mm de diâmetro no osso parietal de ratos. Após 6 semanas da cirurgia, foi avaliado histometricamente que a associação do BMMSC foi melhor que do PRP com Bio-Oss® ou β -TCP. E a formação óssea foi maior no grupo BMMSC com β -TCP em comparação ao grupo BMMSC com Bio-Oss®.

Park et al. (2016) avaliaram duas concentrações de hidroxiapatita com TCP (60% HA + 40% TCP ou 20% HA + 80% TCP) como carreador para células tronco do osso alveolar, obtido durante a osteotomia em comparação com um biomaterial de reabsorção lenta como o Bio-Oss® *in vitro* e *in vivo*. Todos os grupos resultaram alta proporção de adesão celular maior que 90%. A formação de osteócito, osteoclasto e de novo osso ocorreu em todos os grupos de HA/TCP, enquanto no Bio-Oss® foi mínimo. A imunomarcagem para fosfatase alcalina, RUNX-2, osteocalcina e osteopontina foi maior no grupo HA/TCP e uma marcação limitada com Bio-Oss®.

Yu et al. (2014) reconstruíram defeito crítico de ratos com MSC associados com Bio-Oss®. No trabalho, foi comparado o efeito osteogênico das células tronco do ligamento periodontal (PDLSC) com BMMSC combinado com o Bio-Oss® em defeito crítico e subcutâneo de rato imunodeficiente. Após oito semanas, foi constatado que BMMSC e PDLSC com Bio-Oss® promoveram osteogênese superior em comparação ao grupo controle positivo (Bio-Oss®) e controle negativo (sem biomaterial), enquanto que o grupo PDLSC+ Bio-Oss® foi superior ao BMMSC + Bio-Oss®.

2.4 Terapia de fotobiomodulação (PBMT)

A PBMT é baseada na exposição de tecidos biológicos em baixas densidades de potência, da ordem de miliwatts/cm² (mW/cm²) a formas não ionizantes de fontes de luz, incluindo lasers, LED (do inglês Light Emitting Diode) e luzes de banda larga, tanto no espectro visível, quanto no infravermelho, levando a modulação das funções celulares. Apresenta efeitos térmicos de baixo nível que é caracterizada como “não-térmica”, devido não emitir calor, som ou vibrações. Nesse processo, ocorre reações fotoenergéticas que atuam nas células, alterando suas funções metabólicas. Os efeitos da PBMT estão relacionados principalmente ao citocromo C oxidase, que, por absorção de fótons com reações mitocondriais, gera aumento de adenosina trifosfato (ATP) (Angeletti et al., 2010; Morries et al., 2015). Os efeitos da PBMT nos tecidos são modulações dos processos biológicos para diferenciação e proliferação celular (Pyo et al., 2013). A PBMT é indicada para tratar condições de tecidos patológicos, auxiliar na analgesia, controle de processos inflamatórios, reduzindo citocinas inflamatórias e também promover a cicatrização (Eduardo et al., 2008) e a regeneração de tecidos (Anders et al., 2015), reparando lesões musculares (De Paiva et al., 2016), queimaduras (Brassolatti et al., 2016), tecido nervoso (Rosso et al., 2017) e ósseo (Pomini et al., 2019).

A avaliação da PBMT nas células e tecidos foram realizadas e mostraram que de acordo com o microambiente e os parâmetros de irradiação é capaz de influenciar o metabolismo e a fisiologia celular (Pereira et al., 2002; Fujihara et al., 2006; Eduardo et al., 2008; Damante et al., 2009; Sousa et al., 2009; Moreira et al., 2011; Diniz, 2015). Dessa forma, existe a possibilidade desta terapia ser usada na engenharia tecidual com o objetivo de melhorar as respostas das células tronco, favorecendo a regeneração dos tecidos.

Muitos estudos *in vitro* e *in vivo*, em diferentes densidades de energia, demonstraram resultados da função da PBMT no estímulo de proliferação celular e cicatrização de feridas. Foi observado aumento na síntese de DNA (Do inglês *deoxyribonucleic acid*), RNA (Do inglês *ribonucleic acid*) e ATP com produção de proteínas constituintes da matriz extracelular (fibronectina e colágeno), aumento na proliferação, oxigenação, nutrição e migração celular, melhor efeito das propriedades

de regeneração celular, imunomodulatórias, angiogênicas e neurotróficas (Tadakuma et al., 1993; Garavello et al., 2004; Eduardo et al., 2008; Damante et al., 2009; Moreira et al., 2011).

Nos estudos experimentais e clínicos, a PBMT auxilia no processo de regeneração tecidual, demonstrando efeitos modulatórios biológicos na diferenciação celular (Khadra et al., 2004; Zheng et al., 2009; Pyo et al., 2013), na indução de síntese de VEGF, promovendo condições de nutrição para as células, bem como induzir a síntese ou ativar outros fatores de crescimento latentes (Damante et al., 2009; Arany et al., 2014). Embora tenham poucos estudos clínicos, a PBMT tem sua aplicação clínica com o objetivo de auxiliar a cicatrização após cirurgia de reconstrução óssea com ou sem o uso de biomateriais (da Silva et al., 2010; Soares et al., 2013; Leja et al., 2013; Basso et al., 2014; Yildirimturk et al., 2017; de Oliveira et al., 2018), no reparo de fraturas (Lopes et al., 2010) e do tecido periodontal (Aykol et al., 2011) e na osseointegração de implantes (Kim et al., 2009).

Ferreira et al. (2019) analisaram o efeito da PBMT na proliferação e no status de indiferenciação das SHEDs, devido observarem uma controvérsia dos resultados com uma variedade de protocolos para uso da PBMT. Pelos resultados obtidos, elas observaram que $5\text{J}/\text{cm}^2$ é capaz de aumentar a proliferação celular em estresse oxidativo e sem interferir no status de indiferenciação das SHEDs.

Bosco et al. (2016) analisaram histomorfometricamente o efeito da terapia com laser de baixa potência (LLLT) no processo de formação óssea e reabsorção das partículas do enxerto em defeitos crítico de 10mm de diâmetro, criado cirurgicamente na calvária de 64 ratos machos, que foram distribuídos em 4 grupos experimentais, sendo grupo 1: controle, apenas coágulo sanguíneo; grupo 2: LLLT (GaAlAs, 660nm) e coágulo sanguíneo; grupo 3: enxerto ósseo bovino e o grupo 4: enxerto ósseo bovino + LLLT. Aos 30 e 60 dias de pós-operatório, o grupo LLLT ($5,82 \pm 2,05$; $7,34 \pm 1,01$) apresentou porcentagem de área óssea recém-formada significativamente maior quando comparado ao grupo controle ($1,61 \pm 0,30$; $5,59 \pm 0,94$). O grupo enxerto ósseo bovino/LLLT ($7,39 \pm 1,45$; $9,44 \pm 2,36$) apresentou porcentagem de área óssea recém-formada significativamente maior do que o grupo enxerto ósseo bovino ($3,85 \pm 1,56$; $8,02 \pm 0,63$) aos 30 e 60 dias de pós-operatório respectivamente. Não houve diferença significativa na porcentagem média da presença de partículas remanescentes do biomaterial de osso bovino entre os grupos enxerto ósseo bovino e enxerto ósseo bovino/LLLT. O laser de baixa potência pode melhorar o processo de formação óssea

em defeito crítico de calvária de rato preenchido ou não com enxerto ósseo bovino em calvária de ratos, mas não é capaz de acelerar a reabsorção de partículas deste material no interior do defeito ósseo.

O uso de células-tronco apresentou algumas dificuldades na regeneração tecidual, dentre elas, a diminuição da quantidade de células viáveis após o transplante. As principais causas estão relacionadas, a deficiência de suprimento sanguíneo e estresse nutricional, levando a morte das células transplantadas prematuramente, atrasando ou prejudicando o processo regenerativo. Outra limitação é a falta de homing de células exogenamente infundidas, e a incapacidade de conduzi-los ao tecido danificado (Xinaris et al., 2013).

Diante dessas situações, a PBMT, poderia otimizar as condições ambientais para as novas células implantadas, como aumentar o suprimento sanguíneo, prevenir a morte celular (Moreira et al., 2011) e prolongar a longevidade celular *in vitro* (Pedroni et al., 2018) e *in vivo* (Park et al., 2016), induzindo a proliferação, migração celular e a síntese do fator de crescimento ou sua ativação. A PBMT permitiria, o aumento significativo do número primário de células-tronco antes da diferenciação, aumentando assim o número de células diferenciadas para engenharia de tecidos e o processo de regeneração. Além disso, já foi demonstrado que a PBMT é capaz de recrutar células-tronco do próprio hospedeiro para colaborar no processo regenerativo.

Havlucu et al. (2015) analisaram histopatologicamente e histomorfometricamente os efeitos da fotobiomodulação na cicatrização óssea em defeitos femorais preenchidos com Bio-Oss[®] em trinta e seis ratos Wistar e dividido em 4 grupos: grupo defeito ósseo vazio, sem aplicação da PBMT, grupo defeito ósseo preenchido com Bio-Oss[®], sem aplicação de PBMT, grupo defeito ósseo vazio, com aplicação de PBMT e grupo defeito ósseo preenchido com Bio-Oss[®], com aplicação de PBMT. Um dispositivo LED com comprimento de onda de 618nm; densidade de potência de 20 mW/cm² foi iniciado 24 horas pós-cirurgia e realizada a cada 24 horas por 7, 14 e 21 dias. A PBMT modulou o processo de metabolismo celular, aumentando o potencial regenerativo dos tecidos biológicos. Os resultados mostraram que a aplicação da PBMT em defeitos preenchidos com Bio-Oss[®] apresentaram maior quantidade de formação óssea e presença de trabéculas. Esses defeitos apresentaram valores estatisticamente mais baixos no grau da inflamação e menos fragmentos do biomaterial presentes, apresentando histopatologicamente e

histomorfometricamente efeitos positivos na cicatrização óssea para os defeitos preenchidos com Bio-Oss®.

A pesquisa realizada por Garrido et al. (2019) avaliaram diversos parâmetros de PBMT com laser de diodo vermelho 660nm sobre a membrana celular das hDPSC que pode gerar uma grande quantidade de células organizadas em uma matriz extracelular. O parâmetro que demonstrou melhor resultado foi a potência de 20mW com densidade de energia de 3J/cm² e 0,08J por ponto e 4 segundos de aplicação.

Moreira et al. (2011) realizaram a PBMT com laser de diodo 780nm com área do feixe de 0.004cm², potência de 40mW, densidade de energia de 3J/cm² por 3 segundos em lesões direta criogênicas na cortical, avaliando a inflamação e o reparo no sistema nervoso central de ratos. Esse parâmetro resultou em um controle do dano cerebral e prevenção da morte de neurônios.

3 PROPOSIÇÃO

Avaliar, *in vitro*, os efeitos da PBMT na proliferação e diferenciação de células tronco de dentes decíduos esfoliados cultivadas em um substituto ósseo de osso bovino mineral desproteínizado contendo colágeno suíno a 10% (Bio-Oss® Collagen).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP) através do Certificado de Apresentação de Apreciação Ética (CAAE): 87866518.8.0000.0075, da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (Anexo A). Os experimentos *in vitro* foram realizados no Laboratório de Pesquisa Básica da Universidade Ibirapuera (UNIB).

Parte 1: Estudo *in vitro*

4.1 Descongelamento e Cultivo celular

Células da linhagem SHED isoladas da polpa de dentes decíduos esfoliado humano e criopreservadas no Banco de Células do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Maria Stella Moreira. Essas células foram previamente caracterizadas imunofenotipicamente de acordo com Carvalho et al. (2022). Alíquotas congeladas dessas células (P4; 10^6 células por criotubo) foram descongeladas para os experimentos deste trabalho.

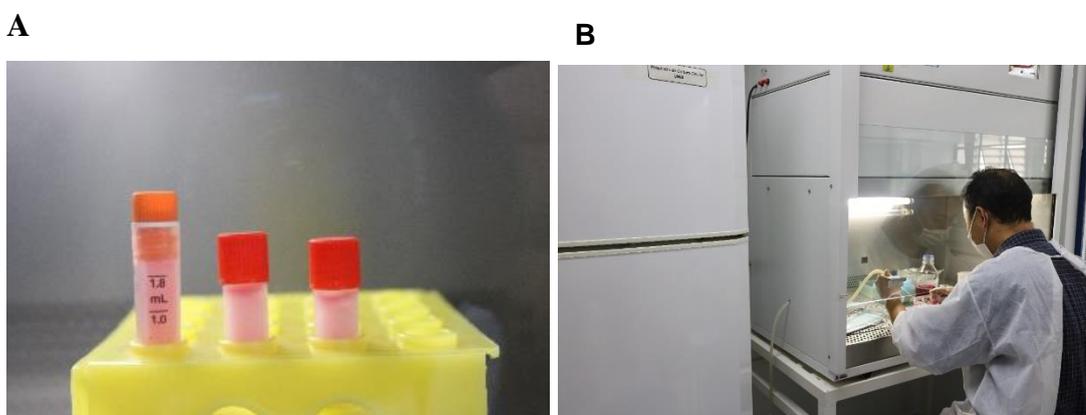
As células foram cultivadas em meio de cultura clonogênico (Mclono) composto por: DMEM (GIBCO/*Life Technologies*, Grand Island, NY, EUA) suplementado com concentrações finais de 15% de soro fetal bovino (MSC-FBS, Gibco), 100 U/ml de solução de antibióticos (penicilina + estreptomicina; Pen Strep, Gibco), 2 mM de L-glutamina (Gibco). As células foram então incubadas a 37°C numa atmosfera úmida, contendo 95% de ar e 5 % de dióxido de carbono (CO₂).

A monitorização do crescimento celular foi realizada diariamente em microscópio invertido de fase e o meio de cultivo trocado a cada 2 ou 3 dias, de acordo com o metabolismo celular. Os subcultivos foram feitos quando as células atingiram a subconfluência (aproximadamente 70-80% do fundo da placa ocupado por células). As células foram destacadas com enzima proteolítica, por exemplo solução de tripsina

a 0,25% (LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil), transferidas para um tubo de ensaio e centrifugadas. As células foram ressuspensas e replaqueadas em novos frascos, criando novas passagens da cultura. As células foram expandidas até no máximo passagem 6 (P6).

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

Figura 4.1 – Fotografia do criotubo após o descongelamento das SHEDs (A); capela de fluxo laminar (B)

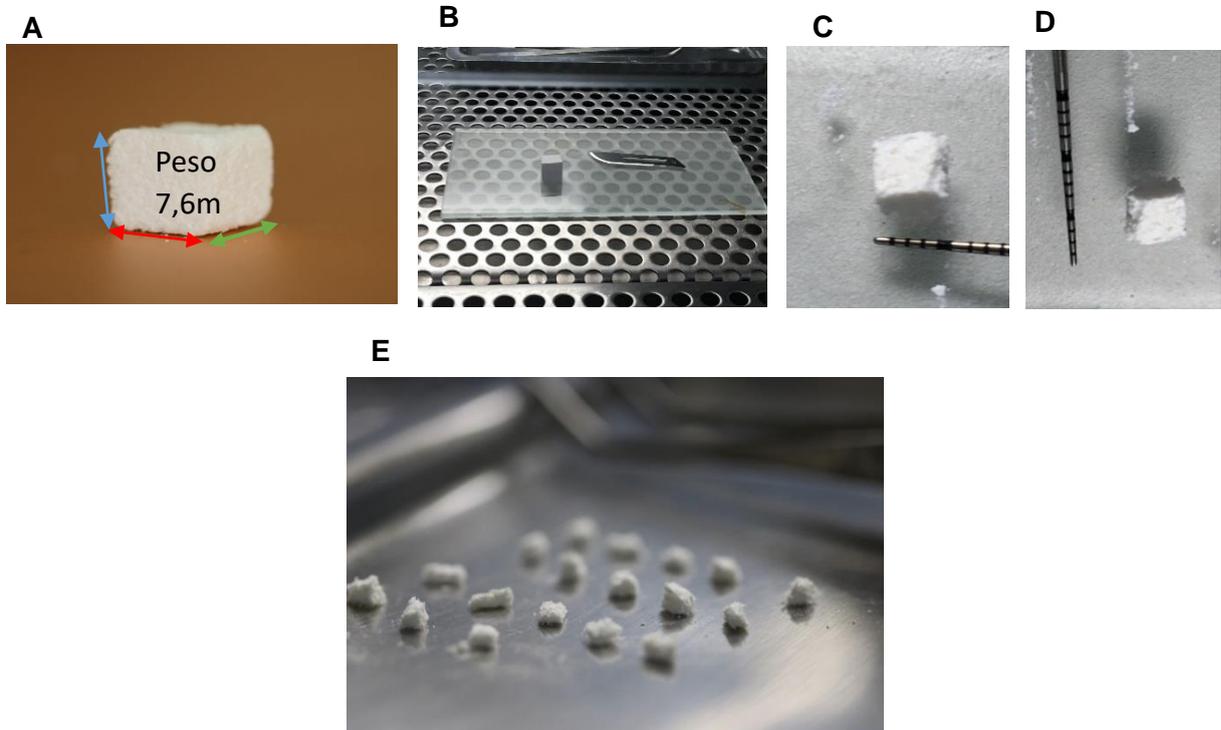


Fonte: O autor.

4.2 Preparo do *scaffold* de osso bovino desproteinizado mineralizado com colágeno a 10%

O Biomaterial foi cortado em formato de cubos de 4mm^3 de diâmetro e 4mm de altura dentro do fluxo laminar com uma lâmina de bisturi número 21 estéril. Em seguida, os cubos foram pesados em uma balança de precisão para que as amostras tivessem o mesmo peso (aproximadamente 7,6 mg).

Figura 4.2 – Fotografia do biomaterial do osso bovino desproteínizado mineralizado com colágeno a 10% (A); biomaterial com a lâmina de bisturi número 21 sobre a placa de vidro (B); bloco de biomaterial após o corte (C); diversos blocos cortados (D)



Fonte: O autor.

4.3 Semeadura

Para os experimentos que se seguem foi realizado em quintuplicata, sob capela de fluxo laminar o mesmo padrão de semeadura da área dos espécimes. Após a contagem, as células foram semeadas em placas de cultura de 24 poços (5×10^4 células por poço) sobre os *scaffolds*. As placas foram mantidas em cultivo em estufa à 37°C em atmosfera úmida contendo 5% CO₂, até o momento das análises.

Figura 4.3 – Fotografia representativa da estufa

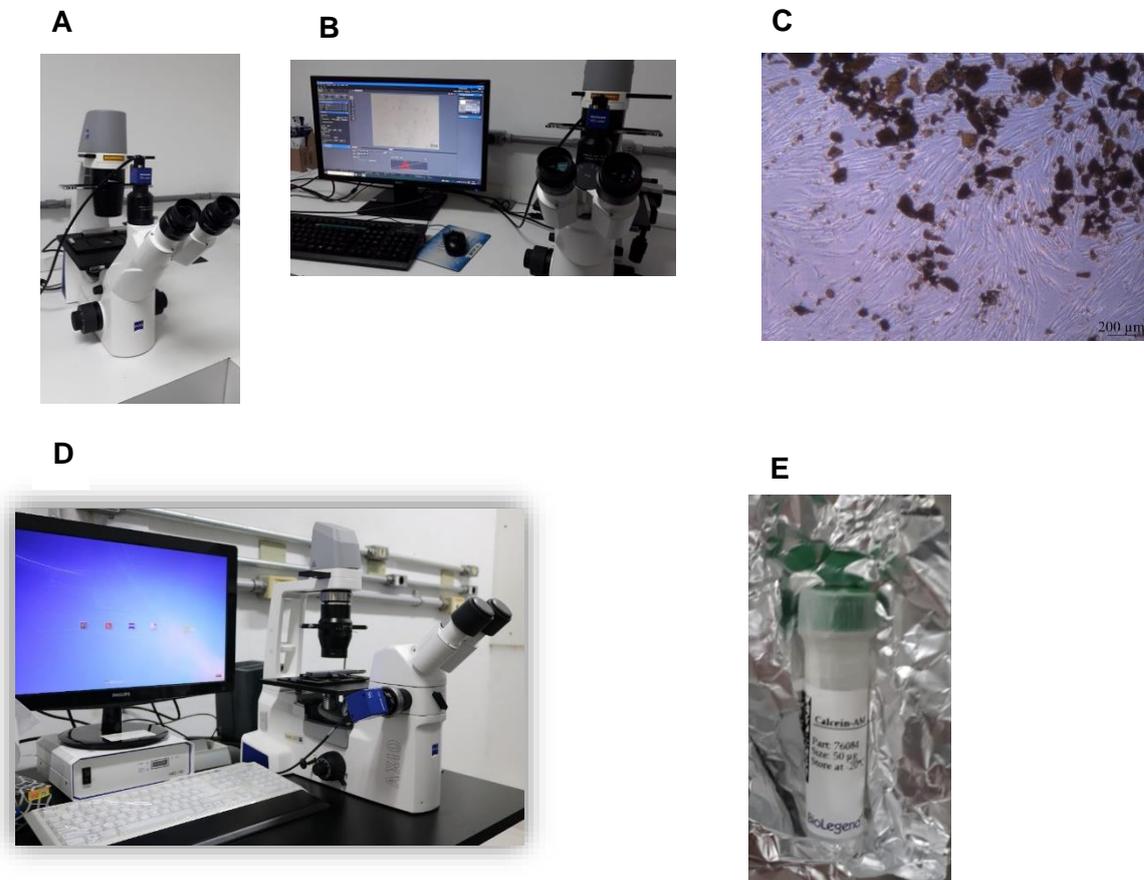


Fonte: O autor.

4.4 Ensaio com uso de Calceína cell trace

A conformação celular foi avaliada utilizando Calceína-AM, uma sonda fluorescente fluorogênica, permeável às células que indica a saúde celular e marca a membrana plasmática (BioLegend, San Diego, CA, EUA). As células foram semeadas sobre o *scaffold* de OBMDC em placas de 24-poços em quintuplicata. O grupo II (Laser), as células foram irradiadas no período de 24h e 72h após o plaqueamento e visualizadas em um microscópio de fluorescência AxioVert.A1 (Carl Zeiss, Germany) no período de 48h e 96h após o plaqueamento no Centro de Facilidades para a Pesquisa (CEFAP) do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP). O sistema está em microscópio invertido, adaptado para examinar células no biomaterial.

Figura 4.4 – Fotografia microscópio invertido de fase para monitorar o crescimento celular (A e B); fotomicrografia das SHEDs em subconfluência (C); microscópio de fluorescência AxioVert.A1 (D); Calceína-AM (E)



Fonte: O autor.

4.5 Ensaio de proliferação com MTT

Para avaliar a viabilidade celular, as amostras foram divididas em grupos experimentais (Quadro 4.1) e foi utilizado o ensaio da redução do MTT (do inglês, *3,4,5-dimethylthiazol-2-yl-2, 5-diphenyl- tetrazolium bromide*; Molecular Probes/Life Technologies) em microplacas de 96-poços. Para avaliar a ação da PBMT *in vitro*, a quantidade de soro fetal bovino no meio de cultura foi reduzida de 15% para 5% induzindo ao estresse nutricional. O modelo experimental *in vitro* mais aceito para avaliar a ação da PBMT é o de redução da porcentagem de SFB disponível no meio de cultura (Almeida-Lopes et al., 2001; Pereira et al., 2002). Após 48h e 96h do

plaqueamento, 30 μ l de MTT e 170 μ l DMEM foi adicionado às culturas, as quais foram incubadas à 37°C por 4h. Em seguida, os cristais de formazan foram dissolvidos utilizando 100 μ l de dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich). Após 15min, a absorbância foi medida em espectrofotômetro (Biotek II Biochrom Ltd., Eugendorf, Austria) utilizando o filtro de 570nm.

Figura 4.5 – Fotografia representativa do aparelho de espectrofotômetro



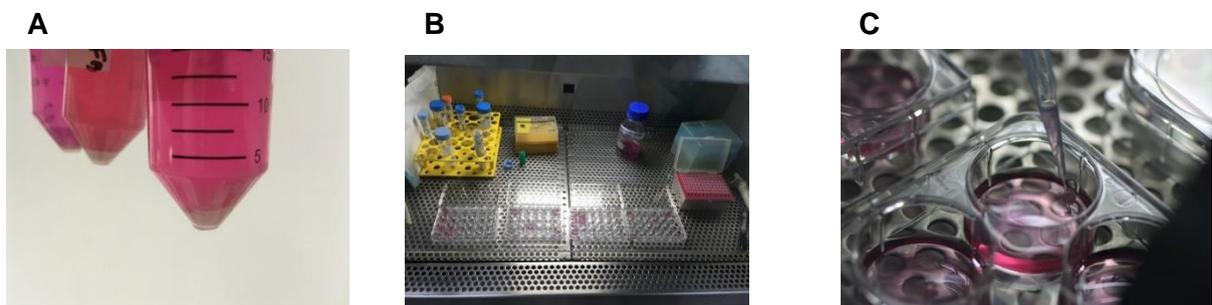
Fonte: O autor.

Quadro 4.1: Descrição dos grupos experimentais de proliferação celular

Grupo	Descrição
1. Controle 15%	meio DMEM com 15% de SFB
2. Controle 5%	meio DMEM com 5% de SFB
3. OBMDC 15%	meio DMEM condicionado de OBMDC com 15% de SFB
4. OBMDC 5%	meio DMEM condicionado OBMDC com 5% SFB
5. Laser 15%	meio DMEM com 15% de SFB com aplicação de laser
6. Laser 5%	meio DMEM com 5% de SFB e aplicação de laser
7. OBMDC-L 15%	meio DMEM condicionado de OBMDC com 15% de SFB e aplicação de laser
8. OBMDC-L 5%	meio DMEM condicionado de OBMDC com 5% de SFB e aplicação de laser

Fonte: O autor.

Figura 4.6 – Fotografia representativa do fundo do tubo Falcon após a centrifugação (A), contendo as SHEDs placas de cultivo dentro do fluxo laminar (B); semeando as SHEDs dentro do poço (C)



Fonte: O autor.

4.6 Ensaio de diferenciação celular (Vermelho de Alizarina)

O ensaio de Vermelho de Alizarina visa identificar depósitos de cálcio dentro dos *scaffolds*, para tanto as células foram ressuspensas e plaqueadas em placa de 24 poços diretamente no fundo da placa, na densidade de 5×10^4 células com meio clonogênico (meio convencional de cultivo). Após 24h do plaqueamento e observado no microscópio a adesão das células no fundo do poço, foi trocado o meio clonogênico (meio convencional de cultivo) pelo meio indutor de mineralização (DMEM + 15% de soro fetal bovino + 1% de antibiótico + 10mM de glicerofosfato + 50mg de ácido ascórbico) e foram adicionadas o *scaffold* de OBMDc com 7,6mg em cada poço.

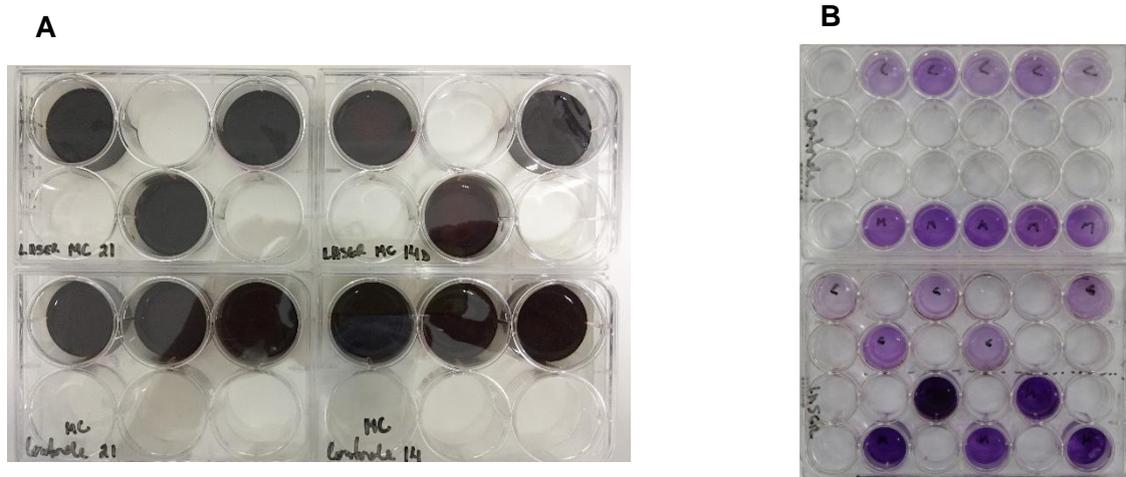
As amostras foram então divididas em quatro grupos experimentais (quadro 4.2). A aplicação de laser foi realizada no período de 24h e 72h após o plaqueamento. Os meios foram trocados a cada 2 dias e as amostras fixadas para análise da formação dos depósitos de cálcio em 23 dias. Foi então procedido o ensaio de vermelho de alizarina de acordo com as instruções do fabricante (Osteogenesis Assay Kit, *EMD Millipore Corporation*, Billerica, MA, EUA). Em resumo, após 23 dias as amostras foram lavadas, fixadas com etanol 70% e incubadas com vermelho de alizarina por 20 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as culturas foram lavadas 4x com água destilada por 5 minutos, seguido de etanol a 70%. Para quantificar a matriz mineralizada, as culturas coradas foram incubadas com Hidróxido de amônio. A absorbância da solução foi medida a 405nm e 570nm, utilizando um espectrofotômetro (Biotek II Biochrom Ltd., Eugendorf, Austria). A análise qualitativa foi feita por meio da captura de imagens dos nódulos de calcificação dispersos nos poços de cultura e fotografados, através de um microscópio invertido de fase.

Quadro 4.2- Descrição dos grupos de experimento de diferenciação celular

Grupo	Descrição
1) Grupo Controle clonogênico	SHEDs cultivadas em meio clonogênico
2) Grupo Controle mineralizante	SHEDs cultivadas em meio mineralizante
3) Grupo laser clonogênico	SHEDs cultivadas em meio clonogênico com aplicação de laser
4) Grupo laser mineralizante	SHEDs cultivada em meio mineralizante com aplicação de laser

Fonte: O autor.

Figura 4.7 – Fotografia da placa de 6 pocos com as amostras incubadas com vermelho de alizarina (A) e da placa de 24 poços com as amostras, incubadas com Hidróxido de amônio (B)



Fonte: O autor.

4.7 Terapia de fotobiomodulação (PBMT)

Para a PBMT foi utilizado um equipamento laser de diodo de fosfato de arsênio índio-gálio-alumínio (InGaAlP) (Photon Lase, DMC Ltda, São Carlos, SP, Brasil), em baixa intensidade e modo de operação contínuo, pontual e em contato. Os parâmetros de irradiação se basearam em estudos prévios do nosso grupo de pesquisa que

apresentaram resultados positivos em estudos *in vitro* (Moreira et al., 2009; 2011; Diniz, 2015; Garrido et al., 2019) (Quadro 4.3).

Quadro 4.3 - Descrição dos parâmetros de irradiação aplicados na PBMT das SHED

Comprimento de onda (nm)	660 nm
Potência (mW)	40 mW
Área do feixe (cm ²)	0,028 cm ²
Densidade de Potência (W/cm ²)	1 W/cm ²
Tempo (s)	2 s
Densidade de energia (J/cm ²)	3 J/cm ²
Energia por ponto (J)	0,08 J

Fonte: O autor.

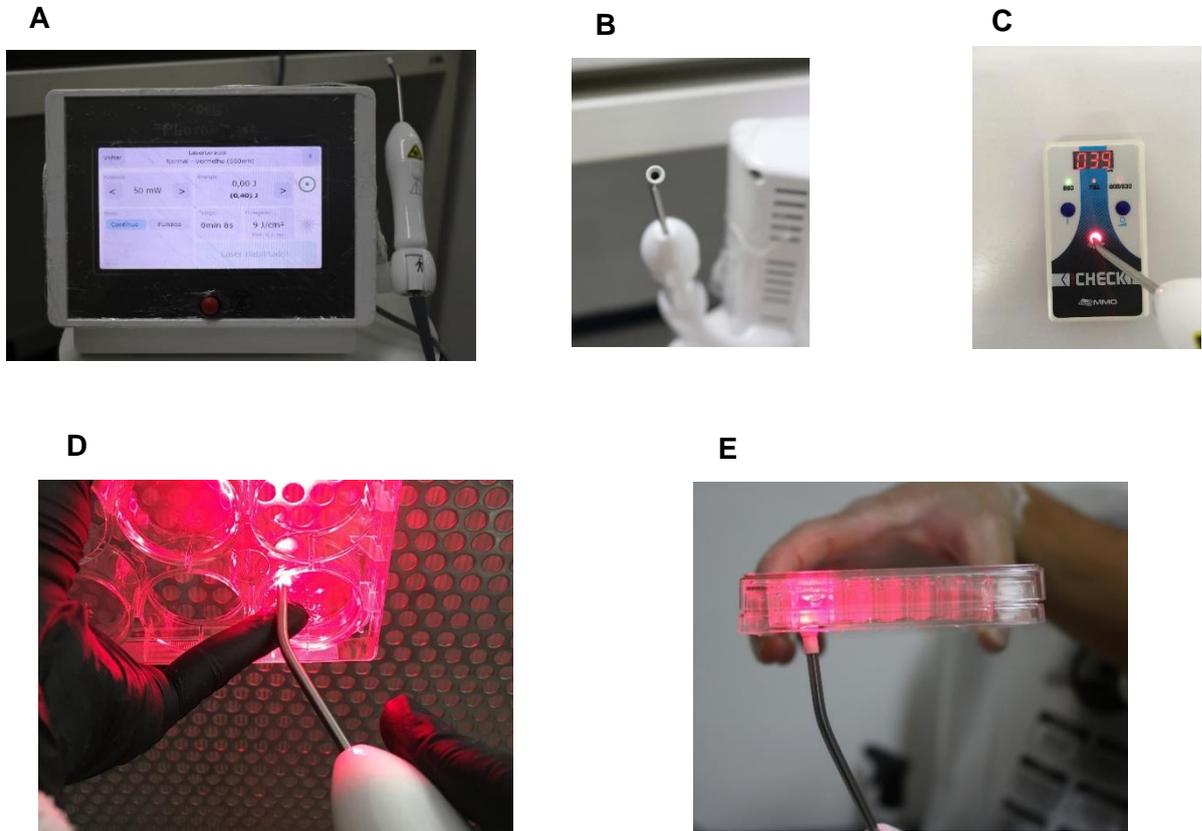
Foram realizadas 2 irradiações com intervalo de 48 horas, iniciando-se em 24 horas e 72 horas após o plaqueamento. As irradiações foram feitas de forma pontual, em 1 ponto em contato na base da placa.

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

Os grupos que não receberam PBMT foram submetidos às mesmas condições experimentais daquele irradiado, porém o equipamento de laser foi mantido desligado.

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

Figura 4.8 – Fotografia do equipamento laser de diodo de fosfato de arsênio índio-gálio-alumínio (InGaAlP) (Photon Lase, DMC Ltda, São Carlos, SP, Brasil) (A); Área do feixe (B); Laser Check, (MM Optics Ltda, São Carlos, SP, Brasil) (C); aplicação das irradiações dos grupos experimentais, os poços intercalados eram mantidos vazios (D e E)



Fonte: O autor.

4.8 Análise Estatística

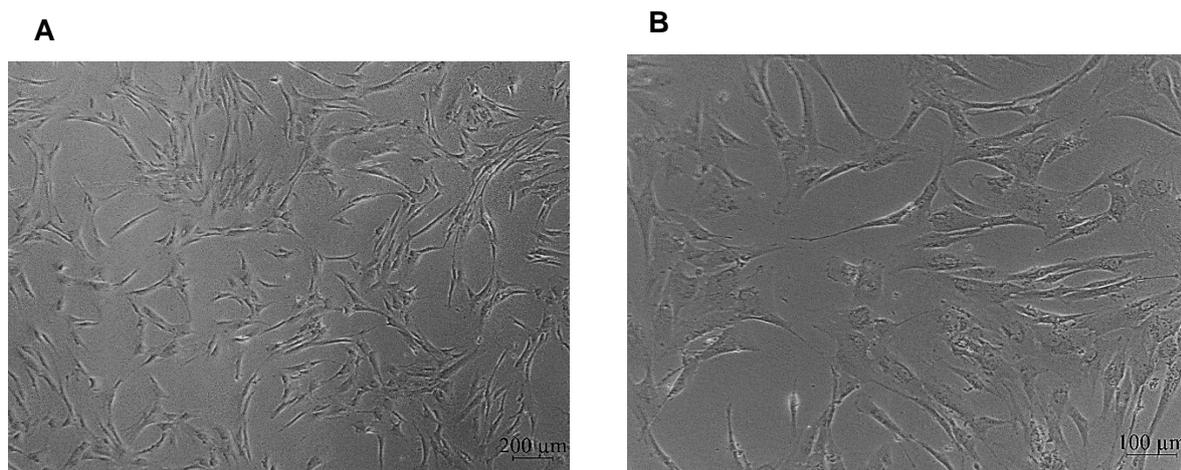
Todos os experimentos foram realizados, no mínimo, em triplicata. Os dados foram tabulados e submetidos aos testes de normalidade. Testes estatísticos posteriores foram aplicados considerando um nível de confiança de 95% para avaliar as diferenças entre os grupos. O programa de GraphPad Prism software versão 7.04 (San Diego, CA, EUA) foi usado para os testes estatísticos.

5 RESULTADOS

5.1 Morfologia das células

As SHEDs após 2 dias de seu descongelamento (P4) apresentaram morfologia heterogênea, fusiformes e espreiadas. Foi possível observar a formação de colônias e sua subconfluência foi observada após 4 dias em cultura. (Figura 5.1).

Figura 5.1 – Fotomicrografias de fase ilustrando a morfologia das SHEDs. Aumento original de 40x (A) e 100x (B)

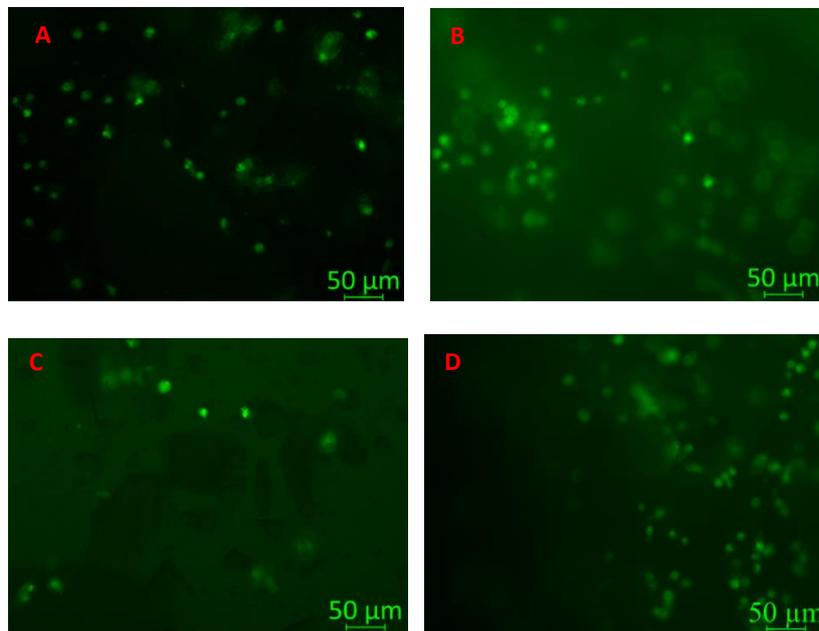


Fonte: O autor.

5.2 Conformação celular pela Calceína cell trace

Com o ensaio com a Calceína foi possível visualizar em um microscópio de fluorescência, a membrana plasmática das células no *scaffold* de OBMDc no período de 48h e 96h após o plaqueamento. Em todos os grupos e tempo avaliados, as células apresentavam em formato arredondado e em diversos planos (Figura 5.2).

Figura 5.2 – Fotomicrografias de fluorescência das SHEDs. Grupo controle 24h (A), grupo laser 24h (B), grupo controle 72h (C) e grupo laser 72h (D). Aumento original de 200x



Fonte: O autor.

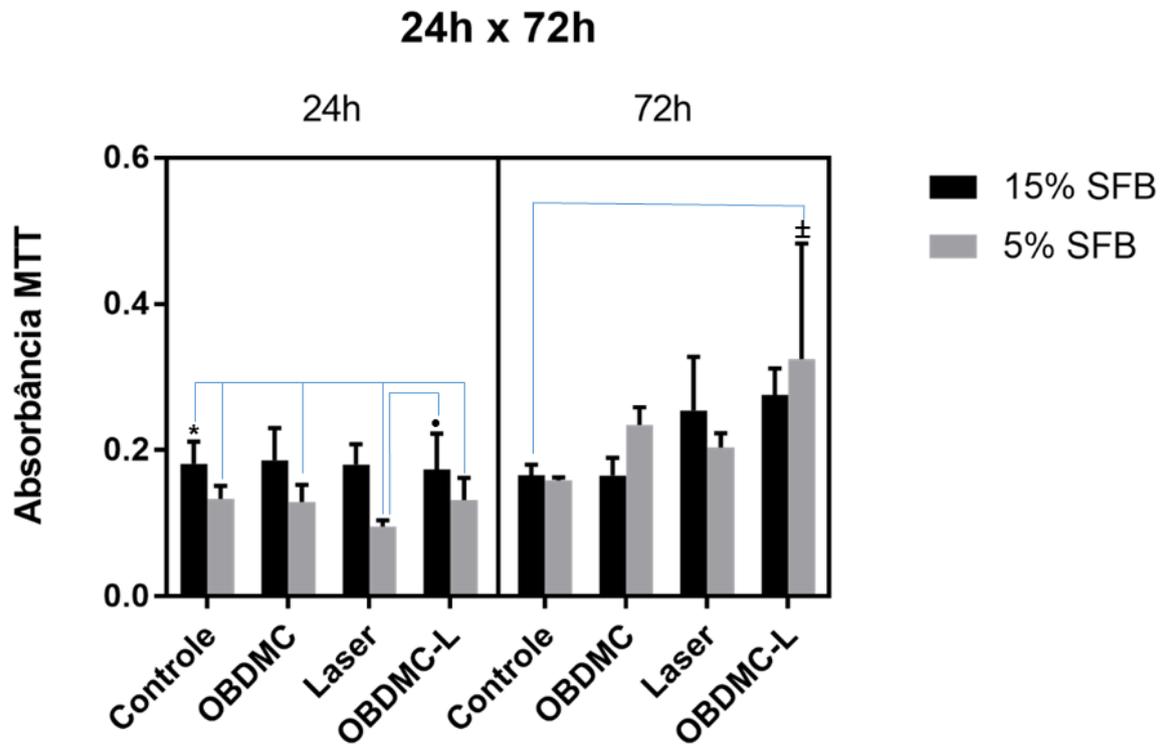
5.3 Proliferação celular pelo método indireto de MTT

Através do ensaio de MTT foi possível avaliar proliferação celular nos grupos experimentais (quadro 4.1) nos dois tempos de aplicação do laser de 24h e 72h após o plaqueamento.

O gráfico 5.1 ilustra os resultados de proliferação celular em 24h e 72h. Em 24h, todos os grupos experimentais apresentaram redução da proliferação quando o SFB foi reduzido de 15% para 5% ($p=0,0004$). E o grupo OBMDL 15% SFB teve maior proliferação celular em comparação ao grupo Laser 5% SFB ($p= 0.0088$).

Em 72h, no grupo OBMDL 5% SFB, as células proliferaram mais que no grupo Controle 15% SFB ($p=0.0286$) (Gráfico 5.1)

Gráfico 5.1 - Representação gráfica das médias da absorbância no ensaio de MTT no período de 24h e 72h



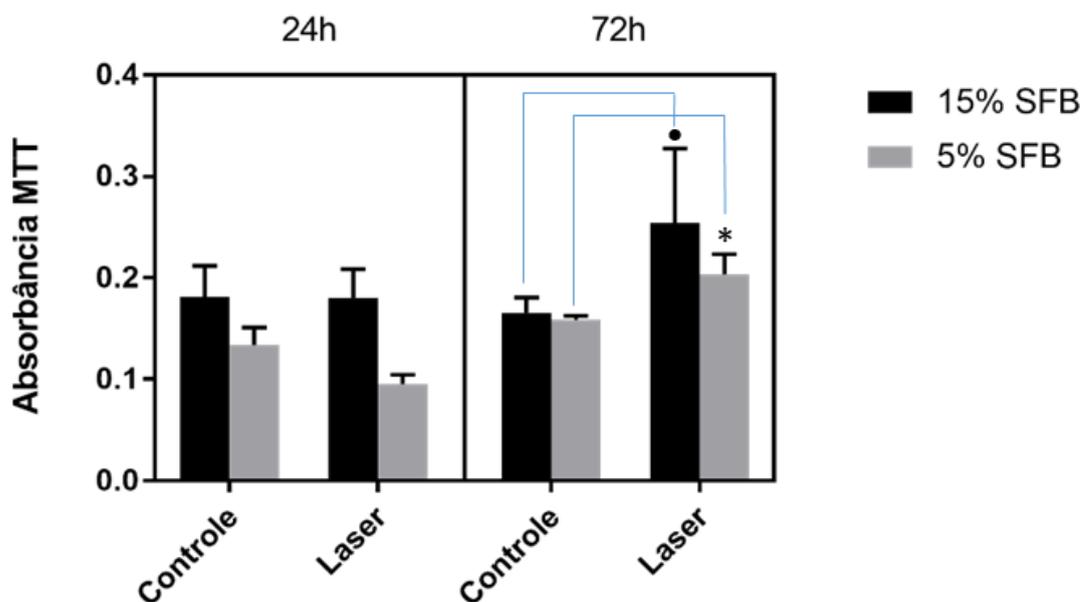
Fonte: O autor.

5.3.1 Impacto do Laser na proliferação das SHEDs em 24h e 72h

O gráfico 5.2 ilustra os resultados do grupo Laser em relação ao grupo Controle no período de 24h e 72h.

Em 72h, quando o meio de cultura apresentava déficit nutricional com 5% SFB, o laser conseguiu aumentar a proliferação celular em comparação ao grupo Controle 5% SFB ($p= 0.0047$, Gráfico 5.2). Também no mesmo tempo, o grupo Laser-15% SFB apresentou maior proliferação que o grupo Controle 15% SFB ($p=0.0023$)

Gráfico 5.2 – Representação gráfica das médias da absorbância no ensaio de MTT do grupo Controle e Laser no período de 24h e 72h



Fonte: O autor.

5.3.2 Impacto do laser sobre as SHEDs cultivadas em meio condicionado por OBMDL em 24h e 72h

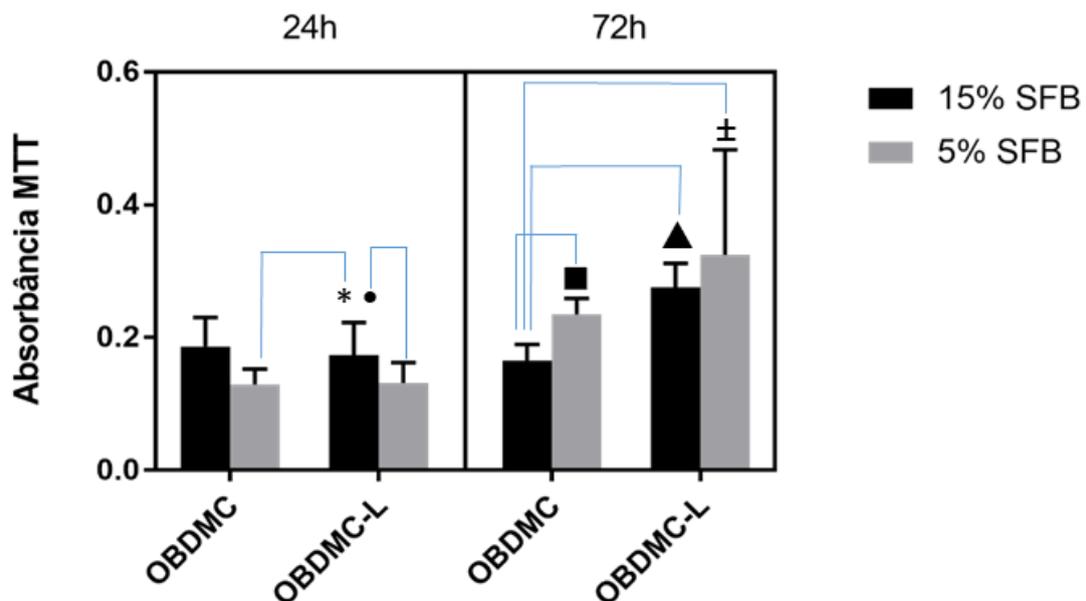
Em 24h, o grupo OBMDL-L 15% SFB apresentou maior proliferação estatisticamente, que o grupo OBMDL-L 5% SFB ($p=0.1390$) e o grupo OBMDL 5% SFB ($p=0.0342$, Gráfico 5.3).

Em 72h, o grupo OBMDL 5% SFB apresentou 42% a mais de proliferação que o OBMDL-15%. ($p= 0.0082$, Gráfico 5.3).

Em 72h, no grupo OBMDL-L 5%SFB, as células proliferaram mais que no grupo OBMDL 15% SFB ($p=0.0480$, Gráfico 5.3).

Em 72h, o grupo OBMDL-L 15%SFB obteve maior proliferação das SHEDs em comparação ao grupo OBMDL 15% SFB ($p=0.0023$, Gráfico 5.3).

Gráfico 5.3 – Representação gráfica das médias da absorbância no ensaio de MTT do grupo OBMDL e OBMDL-L no período de 24h e 72h



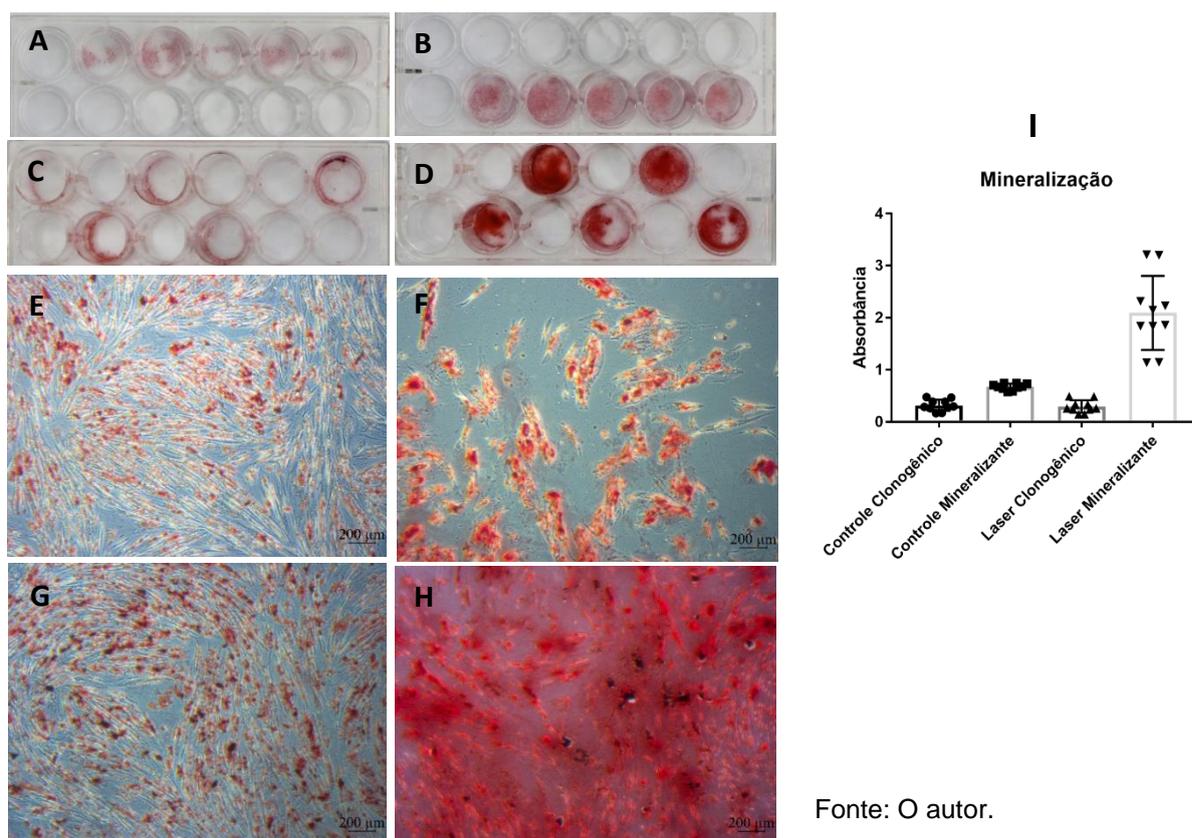
5.4 Diferenciação osteogênica

A avaliação da diferenciação osteoblástica foi realizada através da quantificação da mineralização da matriz extracelular produzida pelos osteoblastos diferenciados *in vitro* por meio da coloração por vermelho de alizarina (Figura 5.3 e 5.4).

Após 21 dias em cultura com o *scaffold* de OBMDc e em meio clonogênico e meio mineralizante com ácido ascórbico e β glicerofosfato, a matriz produzida pelas células mostraram positividade para a coloração vermelho de alizarina (Figura 5.3).

A análise quantitativa foi realizada através do espectrofotômetro, o qual demonstrou uma maior produção de matriz mineralizada no grupo laser mineralizante em comparação ao grupo controle mineralizante e ao grupo laser clonogênico (Figura 5.3).

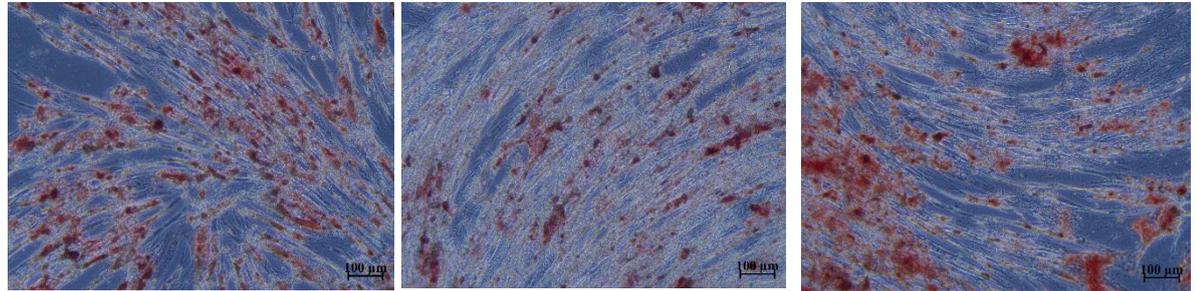
Figura 5.3 - Fotografias representativas do ensaio de vermelho de alizarina. [Fotografias das placas de cultura (A,B,C,D). Grupo controle clonogênico (A), grupo controle mineralizante (B), grupo laser clonogênico (C) e grupo laser mineralizante (D). Fotomicrografias de fase, avaliação da deposição de matriz mineralizada pela coloração de vermelho de alizarina. Grupo controle clonogênico (E), grupo controle mineralizante (F), grupo laser clonogênico (G) e grupo laser mineralizante (H). Aumento original de 40x. Representação gráfica das médias da absorbância no ensaio de vermelho de alizarina no período de 21 dias (I). O grupo Laser mineralizante apresentou significativamente maior deposição de matriz mineralizada que o grupo controle clonogênico, grupo controle mineralizante, grupo laser clonogênico ($p < 0,0001$) teste múltiplo de comparação de Tukey]



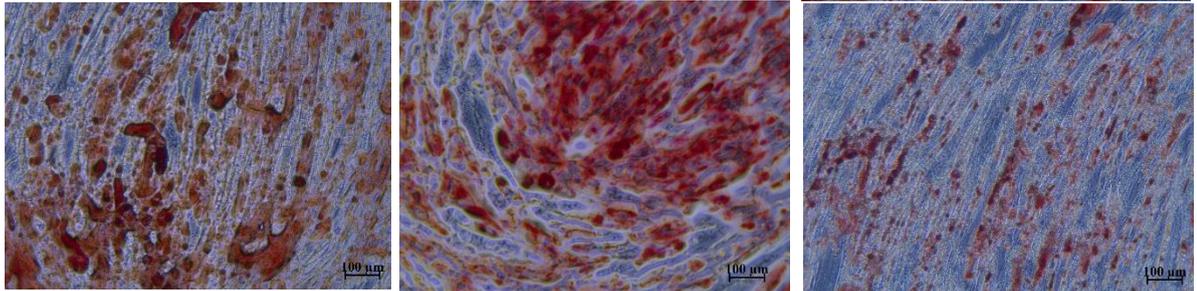
Fonte: O autor.

Figura 5.4 - Fotomicrografias de fase ilustrando a deposição de matriz mineralizada pela coloração de vermelho de alizarina. Grupo controle clonogênico (A), grupo laser clonogênico (B)

**Grupo Controle
(A)**



**Grupo Laser
(B)**



Fonte: O autor.

6 DISCUSSÃO

Dessa forma, a proposição deste estudo foi avaliar o efeito da PBMT na proliferação e diferenciação das células tronco de dentes decíduos esfoliados e cultivadas em um substituto ósseo de osso bovino mineral desproteínizado contendo colágeno suíno a 10%. O resultado mostrou que em 72h, o grupo OBMDL-5% SFB foi o grupo que apresentou maior proliferação celular. Estudos comprovaram que diferentes tipos de células sob estresse possuem condições mais sensíveis para os efeitos biomoduladores da irradiação da PBMT e que o déficit nutricional causado pela diminuição da concentração do SFB no meio de cultura pode ser eficaz para ocasionar o estresse celular (Tagliani et al., 2010; Souza et al., 2018).

A opção de utilizar as SHEDs para esse experimento foi baseado na questão de ser células de origem dentária, que após o esfoliamento natural podem ser armazenadas e utilizadas. Outra característica importante é que são células com alta capacidade de proliferação e diferenciação osteogênica (Shi et al., 2020; Miura et al., 2003; Annibali et al., 2014).

O parâmetro utilizado para aplicação do laser foi de 660nm, 40mW, 3J/cm² e 2 segundos de exposição, determinado através de estudos anteriores, nos quais os mesmos modelos experimentais foram submetidos a diferentes doses e comprimentos de onda (Moreira et al., 2011; Diniz et al., 2015; Garrido et al., 2019). Esses parâmetros resultaram em alta viabilidade celular, diferenciação celular, cicatrização de feridas, formação de colágeno tipo 1 e 3 e fibronectina nas matrizes extracelulares. Outros estudos realizados pelo grupo de pesquisadores do laboratório, com o objetivo de entender o processo de proliferação, adesão e diferenciação celular, avaliou a aplicação da PBMT em células tronco, demonstrando resultados positivos desta terapia na regeneração tecidual (Eduardo et al., 2008; Moreira et al., 2011; Diniz et al., 2015; Pedroni et al., 2019; Ferreira et al., 2019; Garrido et al., 2019).

Um dos principais problemas do uso de células tronco é a viabilidade dessas células após o transplante, por falta de suprimento sanguíneo, estresse nutricional, ocorrendo morte prematura e atrasando ou prejudicando o processo de regeneração. *In vitro*, a função do soro fetal bovino no meio de cultura é estimular o crescimento celular e, apesar de sua composição não ser completamente esclarecida, contém componentes essenciais para a proliferação e manutenção da cultura, como hormônios, vitaminas, proteínas transportadoras, fatores de crescimento e -

espraiamento celular (van der Valk et al., 2018). Já é um consenso científico que o efeito da PBMT se apresenta quando da recuperação de células e tecidos expostos a algum estresse. O modelo experimental *in vitro* mais aceito para avaliar a ação da PBMT é o de redução da porcentagem de SFB disponível no meio de cultura (Almeida-Lopes et al., 2001; Pereira et al., 2002). Nossos resultados de proliferação mostraram que, para as células estudadas, uma redução de 15% para 5% de SFB na composição do meio de cultivo se faz adequada para reduzir estatisticamente a proliferação dessas células, mas ainda permitir a manutenção da cultura *in vitro* (grupo Controle 15% SFB em comparação ao grupo Controle 5% SFB; OBMDL 5% SFB; Laser 5% e OBMDL 5% SFB no período de 24h). Além disso, vimos que de fato, em 72h o tratamento com laser nos grupos experimentais em meio de cultura com 5% SFB, houve um aumento da proliferação celular mesmo quando comparado ao grupo controle 15% SFB ($p=0,0033$, gráfico 5.2).

Células cultivadas em concentração de 5% de SFB apresentaram um efeito contínuo e crescimento exponencial, mas a uma taxa significativamente menor do que as células cultivadas sob suplementação de ideal de 15% SFB (grupo Controle 15% SFB) ($p < 0,05$). Assim, a concentração de 5% foi escolhida para verificar o efeito da PBMT na clonogenicidade das SHEDs (Ferreira et al., 2019).

Para avaliar o efeito da PBMT sob as células em cultura, foram analisadas a PBMT em condições diversas de cultura para melhor entendimento uma vez que a melhora na proliferação de células-tronco pode ser importante no futuro uso dessas células para terapia de regeneração tecidual. A hipótese que a PBMT poderia acelerar a proliferação celular das SHEDs semeadas em um *scaffold* de OBMDL foi constatado através desse estudo. Os resultados observados indicam que o laser aumentou a proliferação celular quando o meio de cultura apresentava 15% e 5% de SFB, isto é, tanto em condições de normalidade como em condição de deficiência de soro fetal bovino, o laser conseguiu aumentar a proliferação celular. O grupo laser 5% teve uma proliferação celular estatisticamente maior que o grupo controle 5% SFB, no período de 72h, corroborando com o estudo de Ferreira et al. 2019, a qual, as SHEDs do grupo com déficit nutricional (5% de SFB), associado com a PBMT com densidade de energia de $5\text{J}/\text{cm}^2$ apresentou crescimento celular semelhante ao grupo controle positivo com 15% de SFB no período de 72h. E em 72h, o grupo OBMDL 5% SFB foi o grupo que apresentou maior proliferação celular, o que condiz com a revisão sistemática realizada por Marques et al. (2016) que a PBMT eleva significativamente

o número primário de células tronco antes da diferenciação, proporcionando uma quantidade maior de células para engenharia de tecidos e para o processo de regeneração.

Ao comparar o tempo de 72h com o de 24h, os grupos que foram irradiados pelo laser (grupo laser e grupo OBDCM-L) obtiveram melhores resultados de proliferação celular que os dos grupos controle 15% e 5% SFB, o que pode ser explicado pelo efeito cumulativo da aplicação do laser nas células. Irradiações múltiplas apresentam melhores resultados de viabilidade e proliferação celular, pois as células que receberam a primeira irradiação entram em divisão celular e as células filhas que foram submetidas a nova irradiação, resultando um maior número de células em comparação as culturas celulares que receberam apenas uma única irradiação (Meneguzzo, et al., 2008). Desta forma, duas aplicações da PBMT podem resultar em crescimento celular a curto prazo, quando comparado com uma única irradiação (Karu, 1989; Meneguzzo, et al., 2008; Fernandes et al., 2018). Porém, o risco de múltiplas aplicações da PBMT é o possível efeito inibitório causado pela alta dose de energia. O tempo de aplicação é um fator a ser considerado, pois o efeito acumulativo pode inibir a proliferação celular ao invés de estimular (Hawkins; Abrahamse, 2006; Fernandes et al., 2018). E outro ponto planejado foi o intervalo entre as aplicações de 48h para que a dose acumulada não ultrapassasse a faixa bioestimulatória até a bioinibitória (Hawkins, Abrahamse, 2006).

As células tronco necessitam de um ambiente específico para ancoragem, o qual pode ser um biomaterial para as células aderirem e ocorrer o seu crescimento (Vahabi et al., 2012). Desta forma, buscamos um *scaffold* com característica tridimensional, biocompatível, osteocondutor, bem estabelecido para reconstrução óssea e aprovado para uso clínico pela *Food and Drug Administration* (FDA). E selecionamos o osso bovino desproteínizado mineralizado com 10% de colágeno suíno. Esse *scaffold* melhorou a taxa de proliferação celular quando as células estavam em estresse nutricional, como o resultado de 72h mostrou que o grupo OBMD 5% SFB obteve uma proliferação estatisticamente maior que o grupo OBMD 15% ($p=0.0082$), porém em 24h o grupo OBMD 15% SFB apresentava uma taxa de proliferação estatisticamente maior que o grupo OBMD 5% SFB ($p= 0.0342$).

O potencial osteogênico das SHEDs foi avaliado pela formação de nódulos de mineralização, através da análise de vermelho de alizarina após 23 dias. Nesse experimento, o grupo laser mineralizante mostrou diferença estatisticamente maior na

formação de matriz mineralizada em comparação aos grupos controle e laser clonogênico (figura 5.3), o que também foi observado após aplicar a PBMT em células tronco da polpa dental associadas a um fator de crescimento BMP-4 (Diniz et al., 2017) e BMP-2 (Ferreira, 2011) e um efeito bioestimulador da produção e organização das fibras de colágeno (Rosso et al., 2019). O potencial osteogênico pode estar relacionado a fatores genéticos, local e sistêmicos e o laser pode atuar como um fator indutor das células mesenquimais diferenciarem em osteoblastos (AboElsaad et al., 2009). No estudo de Wang et al. (2012) observaram a diferenciação osteogênica após 14 dias das SHEDs serem cultivadas em meio mineralizante. E essa diferenciação osteoblástica, *in vitro*, foi maior nas SHEDs do que nas DPSCs. E em um período mais longo de cultura de 7 semanas, Vahabi et al. (2012) realizaram o ensaio de vermelho de alizarina em placas de cultura com meio de indução osteogênica e também observaram estruturas nodulares. Esses resultados diferem do trabalho de Miura et al. (2003), que sugeriram que SHEDs não se diferenciaram diretamente em osteoblastos, mas apenas induzia a formação de novo osso.

Este estudo mostrou resultados de proliferação e diferenciação *in vitro* interessantes que nos traz interesses em realizar o estudo *in vivo* para avaliarmos outros efeitos que no animal podemos esclarecer.

7 CONCLUSÕES

A PBMT aplicada nas SHEDs semeada em um *scaffold* de osso bovino desproteinizado mineralizado com 10% de colágeno suíno, *in vitro* e com a densidade de energia de $3\text{J}/\text{cm}^2$ aumentou a proliferação tanto no meio cultura com 15% de SFB como em déficit nutricional com 5% de SFB em 72h.

A fotobiomodulação contribuiu para a indução da diferenciação osteogênica das SHEDs associada ao *scaffold* de osso bovino desproteinizado mineralizado com 10% de colágeno suíno, através da maior quantidade de matriz mineralizada, formando nódulos de mineralização no tempo avaliado.

REFERÊNCIAS¹

AboElsaad NS, Soory M, Gadalla LM, Ragab LI, Dunne S, Zalata KR, Louca C. Effect of soft laser and bioactive glass on bone regeneration in the treatment of infra-bony defects (a clinical study). *Lasers Med Sci*. 2009 May;24(3):387-95. doi:10.1007/s10103-008-0576-9.

AlGhamdi KM, Kumar A, Moussa NA. Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. *Lasers Med Sci*. 2012 Jan;27(1):237-49. doi: 10.1007/s10103-011-0885-2.

Alkaisi A, Ismail AR, Mutum SS, Ahmad ZA, Masudi S, Abd Razak NH. Transplantation of human dental pulp stem cells: enhance bone consolidation in mandibular distraction osteogenesis. *J Oral Maxillofac Surg*. 2013 Oct;71(10):1758.e1-13. doi: 10.1016/j.joms.2013.05.016. PMID: 24040948.

Almeida-Lopes L, Rigau J, Zângaro RA, Guidugli-Neto J, Jaeger MM. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. *Lasers Surg Med*. 2001;29(2):179-84. doi: 10.1002/lsm.1107.

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

Angeletti P, Pereira MD, Gomes HC, Hino CT, LM. Effect of low-level laser therapy (GaAlAs) on bone regeneration in midpalatal anterior suture after surgically assisted rapid maxillary expansion. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010 Mar;109(3):e38-46. doi: 10.1016/j.tripleo.2009.10.043. PMID: 20219584.

Annibali S, Cristalli MP, Tonoli F, Polimeni A. Stem cells derived from human exfoliated deciduous teeth: a narrative synthesis of literature. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2014 Oct;18(19):2863-81.

An Z, Sabalic M, Bloomquist RF, Fowler TE, Streelman T, Sharpe PT. A quiescent cell population replenishes mesenchymal stem cells to drive accelerated growth in mouse incisors. *Nat Commun*. 2018 Jan 25;9(1):378. doi: 10.1038/s41467-017-02785-6. PMID: 29371677; PMCID: PMC5785476.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Arany PR, Cho A, Hunt TD, Sidhu G, Shin K, Hahm E, Huang GX, Weaver J, Chen AC, Padwa BL, Hamblin MR, Barcellos-Hoff MH, Kulkarni AB, J Mooney D. Photoactivation of endogenous latent transforming growth factor- β 1 directs dental stem cell differentiation for regeneration. *Sci Transl Med*. 2014 May 28;6(238):238ra69. doi: 10.1126/scitranslmed.3008234.

Araújo M, Linder E, Wennström J, Lindhe J. The influence of Bio-Oss Collagen on healing of an extraction socket: an experimental study in the dog. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2008 Apr;28(2):123-35.

Araújo MG, Lindhe J. Ridge preservation with the use of Bio-Oss collagen: A 6-month study in the dog. *Clin Oral Implants Res*. 2009 May;20(5):433-40. doi: 10.1111/j.1600-0501.2009.01705.x.

Araújo MG, Linder E, Lindhe J. Bio-Oss collagen in the buccal gap at immediate implants: a 6-month study in the dog. *Clin Oral Implants Res*. 2011 Jan;22(1):1-8. doi: 10.1111/j.1600-0501.2010.01920.x.

Associação Brasileira de Normas Técnicas. Equipamento eletromédico. Parte 2: Prescrições particulares para a segurança de equipamento terapêutico e de diagnóstico a laser. São Paulo: ABNT, 1997, (NBR IEC 601.2.22:1997).

Aykol G, Baser U, Maden I, Kazak Z, Onan U, Tanrikulu-Kucuk S, Ademoglu E, Issever H, Yalcin F. The effect of low-level laser therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment. *J Periodontol*. 2011 Mar;82(3):481-8. doi: 10.1902/jop.2010.100195.

Barboza CA, Ginani F, Soares DM, Henriques AC, Freitas Rde A. Low-level laser irradiation induces in vitro proliferation of mesenchymal stem cells. *Einstein (Sao Paulo)*. 2014 Jan-Mar;12(1):75-81. doi: 10.1590/s1679-45082014ao2824. PMID: 24728250;

Basso FG, Turrioni AP, Soares DG, Bagnato VS, Hebling J, de Souza Costa CA. Low-level laser therapy for osteonecrotic lesions: effects on osteoblasts treated with zoledronic acid. *Support Care Cancer*. 2014 Oct;22(10):2741-8. doi: 10.1007/s00520-014-2267-3.

Bayerlein T, Proff P, Heinrich A, Kaduk W, Hosten N, Gedrange T. Evaluation of bone availability in the cleft area following secondary osteoplasty. *J Craniomaxillofac Surg*. 2006 Sep;34 Suppl 2:57-61. doi: 10.1016/S1010-5182(06)60013-9.

Behnia A , Haghghat A, Talebi A , Nourbakhsh N , Heidari F. Transplantation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth for bone regeneration in the dog mandibular defect. *World J Stem Cells*. 2014 Sep 26;6(4):505-10. doi: 10.4252/wjsc.v6.i4.505.

Brassolatti P, Bossini PS, Oliveira MC, Kido HW, Tim CR, Almeida-Lopes L, De Avó LR, Araújo-Moreira FM, Parizotto NA. Comparative effects of two different doses of low-level laser therapy on wound healing third-degree burns in rats. *Microsc Res Tech*. 2016 Apr;79(4):313-20. doi: 10.1002/jemt.22632.

Bosco AF, Faleiros PL, Carmona LR, Garcia VG, Theodoro LH, de Araujo NJ, Nagata MJ, de Almeida JM. Effects of low-level laser therapy on bone healing of critical-size defects treated with bovine bone graft. *J Photochem Photobiol B*. 2016 Oct;163:303-10. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2016.08.040.

Bose S, Roy M, Bandyopadhyay A. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends Biotechnol*. 2012 Oct;30(10):546-54. doi: 10.1016/j.tibtech.2012.07.005.

Caran EMM, Barone TR, Barone JR, Lopes NNF, Alves MTS, França CM. Facial reconstruction surgery 10 years after treatment for hemangiopericytoma: Planning considerations and clinical outcomes. *J Cosmet Laser Ther*. 2014;16(4):201–4.

Cardaropoli G, Araújo M, Lindhe J. Dynamics of bone tissue formation in tooth extraction sites. An experimental study in dogs. *J Clin Periodontol*. 2003 Sep;30(9):809-18. doi: 10.1034/j.1600-051x.2003.00366.x.

Cardaropoli G, Araújo M, Hayacibara R, Sukekava F, Lindhe J. Healing of extraction sockets and surgically produced - augmented and non-augmented - defects in the alveolar ridge. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol*. 2005 May;32(5):435-40. doi: 10.1111/j.1600-051X.2005.00692.x.

Carvalho GL, Sarra G, Schröter GT, Silva LSRG, Ariga SKK, Gonçalves F, Caballero-Flores HV, Moreira MS. Pro-angiogenic potential of a functionalized hydrogel scaffold as a secretome delivery platform: An innovative strategy for cell homing-based dental pulp tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med*. 2022 May;16(5):472-483. doi: 10.1002/term.3294.

Cordaro L, Bosshardt DD, Palattella P, Rao W, Serino G, Chiapasco M. Maxillary sinus grafting with Bio-Oss or Straumann Bone Ceramic: histomorphometric results from a randomized controlled multicenter clinical trial. *Clin Oral Implants Res.* 2008 Aug;19(8):796-803. doi: 10.1111/j.1600-0501.2008.01565.x.

Cury DP, Dias FJ, Sosthenes MC, Dos Santos Haemmerle CA, Ogawa K, Da Silva MC, Mardegan Issa JP, Iyomasa MM, Watanabe IS. Morphometric, quantitative, and three-dimensional analysis of the heart muscle fibers of old rats: transmission electron microscopy and high-resolution scanning electron microscopy methods. *Microsc Res Tech.* 2013 Feb;76(2):184-95. doi: 10.1002/jemt.22151

Damante CA, De Micheli G, Miyagi SP, Feist IS, Marques MM. Effect of laser phototherapy on the release of fibroblast growth factors by human gingival fibroblasts. *Lasers Med Sci.* 2009 Nov;24(6):885-91. doi: 10.1007/s10103-008-0582

da Silva JP, da Silva MA, Almeida AP, Lombardi Junior I, Matos AP. Laser therapy in the tissue repair process: a literature review. *Photomed Laser Surg.* 2010 Feb;28(1):17-21. doi: 10.1089/pho.2008.2372. PMID: 19764898.

de Oliveira GJPL, Aroni MAT, Medeiros MC, Marcantonio E Jr, Marcantonio RAC. Effect of low-level laser therapy on the healing of sites grafted with coagulum, deproteinized bovine bone, and biphasic ceramic made of hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate. In vivo study in rats. *Lasers Surg Med.* 2018 Jan 13. doi: 10.1002/lsm.22787.

de Paiva PR, Tomazoni SS, Johnson DS, Vanin AA, Albuquerque-Pontes GM, Machado CD, Casalechi HL, de Carvalho PT, Leal-Junior EC. Photobiomodulation therapy (PBMT) and/or cryotherapy in skeletal muscle restitution, what is better? A randomized, double-blinded, placebo-controlled clinical trial. *Lasers Med Sci.* 2016 Dec;31(9):1925-1933. doi: 10.1007/s10103-016-2071-z..

de Sá Silva F, Almeida PN, Rettore JV, Maranduba CP, de Souza CM, de Souza GT, Zanette Rde S, Miyagi SP, Santos Mde O, Marques MM, Maranduba CM. Toward personalized cell therapies by using stem cells: seven relevant topics for safety and success in stem cell therapy. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:758102. doi: 10.1155/2012/758102.

Diniz IMA, Carreira ACO, Sipert CR, Uehara CM, Moreira MSN, Freire L, Pelissari C, Kossugue PM, de Araújo DR, Sogayar MC, Marques MM. Photobiomodulation of mesenchymal stem cells encapsulated in an injectable rhBMP4-loaded hydrogel directs hard tissue bioengineering. *J Cell Physiol.* 2018 Jun;233(6):4907-4918. doi: 10.1002/jcp.26309. Epub 2018 Jan 15. PMID: 29215714.

Eduardo F de P, Bueno DF, de Freitas PM, Marques MM, Passos-Bueno MR, Eduardo Cde P, Zatz M. Stem cell proliferation under low intensity laser irradiation: a preliminary study. *Lasers Surg Med*. 2008 Aug;40(6):433-8. doi: 10.1002/lsm.20646.

Fernandes A; Neto NL; Marques, NCT; Vitor LLR; Prado MTO; Oliveira RC; Machado MAAM; Oliveira TM. Cellular response of pulp fibroblast to single or multiple photobiomodulation applications. *Laser Phys [Internet]*; 201828(06504). doi:10.1088/1555-6611/aab952.

Ferreira LS. Efeitos da fototerapia com laser em baixa intensidade e dos fatores de crescimento PDGF e BMP-2, isolados ou em associação, na diferenciação ósseo/odontogênica de células-tronco de polpa dentária humana. [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2011.

Ferreira LS, Diniz IMA, Maranduba CMS, Miyagi SPH, Rodrigues MFSD, Moura-Netto C, Marques MM. Short-term evaluation of photobiomodulation therapy on the proliferation and undifferentiated status of dental pulp stem cells. *Lasers Med Sci*. 2019 Jun;34(4):659-666. doi: 10.1007/s10103-018-2637-z.

Fickl S, Zuhr O, Wachtel H, Bolz W, Huerzeler M. Tissue alterations after tooth extraction with and without surgical trauma: a volumetric study in the beagle dog. *J Clin Periodontol*. 2008 Apr;35(4):356-63. doi: 10.1111/j.1600-051X.2008.01209.x.

Fujihara NA, Hiraki KR, Marques MM. Irradiation at 780 nm increases proliferation rate of osteoblasts independently of dexamethasone presence. *Lasers Surg Med*. 2006 Apr;38(4):332-6. doi: 10.1002/lsm.20298.

Garavello I, Baranauskas V, da Cruz-Höfling MA *Histol Histopathol*. 2004 Jan;19(1):43-8. doi: 10.14670/HH-19.43.

Garrido PR, Pedroni ACF, Cury DP, Moreira MS, Rosin F, Sarra G, Marques MM. Effects of photobiomodulation therapy on the extracellular matrix of human dental pulp cell sheets. *J Photochem Photobiol B*. 2019 May;194:149-157. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2019.03.017.

Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Dec 5;97(25):13625-30. doi: 10.1073/pnas.240309797.

Havlucu U, Bölükbaşı N, Yeniyoğlu S, Çetin Ş, Özdemir T. Effects of Light-Emitting Diode Photobiomodulation Therapy and BioOss as Single and Combined Treatment in an Experimental Model of Bone Defect Healing in Rats. *J Oral Implantol*. 2015 Aug;41(4):e110-7. doi: 10.1563/aaid-joi-D-13-00310.

Hawkins D, Abrahamse H. Effect of multiple exposures of low-level laser therapy on the cellular responses of wounded human skin fibroblasts. *Photomed Laser Surg*. 2006 Dec;24(6):705-14. doi: 10.1089/pho.2006.24.705.

Heberer S, Al-Chawaf B, Hildebrand D, Nelson JJ, Nelson K. Histomorphometric analysis of extraction sockets augmented with Bio-Oss Collagen after a 6-week healing period: a prospective study. *Clin Oral Implants Res*. 2008 Dec;19(12):1219-25. doi: 10.1111/j.1600-0501.2008.01617.x.

Heinemann F, Hasan I, Schwahn C, Bourauel C, Mundt T. Bone level change of extraction sockets with Bio-Oss collagen and implant placement: a clinical study. *Ann Anat*. 2012 Nov;194(6):508-12. doi: 10.1016/j.aanat.2011.11.012.

Hibi H, Yamada Y, Ueda M, Endo Y. Alveolar cleft osteoplasty using tissue-engineered osteogenic material. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2006 Jun;35(6):551-5. doi: 10.1016/j.ijom.2005.12.007.

Huynh-Ba G, Pjetursson BE, Sanz M, Cecchinato D, Ferrus J, Lindhe J, Lang NP. Analysis of the socket bone wall dimensions in the upper maxilla in relation to immediate implant placement. *Clin Oral Implants Res*. 2010 Jan;21(1):37-42. doi: 10.1111/j.1600-0501.2009.01870.x.

INTERNATIONAL ELECTROTECHNICAL COMMISSION. Safety of lasers products – Part 1: Equipment classification, requirements and user's guide Geneva: IEC, 2007, (IEC 60.825-1:2007).

Kaneko T, Gu B, Sone PP, Zaw SYM, Murano H, Zaw ZCT, Okiji T. Dental pulp tissue engineering using mesenchymal stem cells: a review with a protocol. *Stem Cell Rev Rep*. 2018 Oct;14(5):668-676. doi: 10.1007/s12015-018-9826-9.

Khadra M, Kasem N, Haanaes HR, Ellingsen JE, Lyngstadaas SP. Enhancement of bone formation in rat calvarial bone defects using low-level laser therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004 Jun;97(6):693-700. doi: 10.1016/j.tripleo.2003.11.008.

Khojasteh A, Eslaminejad MB, Nazarian H. Mesenchymal stem cells enhance bone regeneration in rat calvarial critical size defects more than platelet-rich plasma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008 Sep;106(3):356-62; discussion 363. doi:10.1016/j.tripleo.2007.10.017.

Khorsand A, Eslaminejad MB, Arabsolghar M, Paknejad M, Ghaedi B, Rokn AR, Moslemi N, Nazarian H, Jahangir S. Autologous dental pulp stem cells in regeneration of defect created in canine periodontal tissue. *J Oral Implantol.* 2013 Aug;39(4):433-43. doi: 10.1563/AAID-JOI-D-12-00027.

Kim YD, Song WW, Kim SS, Kim GC, Hwang DS, Shin SH, Kim UK, Kim JR, Chung IK. Expression of receptor activator of nuclear factor κ B ligand, receptor activator of nuclear factor κ B, and osteoprotegerin, following low-level laser treatment on deproteinized bovine bone graft in rats. *Lasers Med Sci.* 2009 Jul;24(4):577-84. doi: 10.1007/s10103-008-0614-7

Lee JM, Kim HY, Park JS, Lee DJ, Zhang S, Green DW, Okano T, Hong JH, Jung HS. Developing palatal bone using human mesenchymal stem cell and stem cells from exfoliated deciduous teeth cell sheets. *J Tissue Eng Regen Med.* 2019 Feb;13(2):319-327. doi: 10.1002/term.2811. Epub 2019 Jan 30. PMID: 30644640.

Lee SH, Looi CY, Chong PP, Foo JB, Looi QH, Ng CX, Ibrahim Z. Comparison of Isolation, Expansion and Cryopreservation Techniques to Produce Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth (SHED) with Better Regenerative Potential. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2021;16(5):551-562. doi: 10.2174/1574888X15666200928110923. PMID: 32988356.

Lee YC, Chan YH, Hsieh SC, Lew WZ, Feng SW. Comparing the Osteogenic Potentials and Bone Regeneration Capacities of Bone Marrow and Dental Pulp Mesenchymal Stem Cells in a Rabbit Calvarial Bone Defect Model *Int J Mol Sci.* 2019 Oct 10;20(20):5015. doi: 10.3390/ijms20205015.

Leja C, Geminiani A, Caton J, Romanos GE. Thermodynamic effects of laser irradiation of implants placed in bone: an in vitro study. *Lasers Med Sci.* 2013 Nov;28(6):1435-40. doi: 10.1007/s10103-012-1215-z.

Liu Y, Chen C, Liu S, Liu D, Xu X, Chen X, Shi S. Acetylsalicylic acid treatment improves differentiation and immunomodulation of SHED. *J Dent Res.* 2015 Jan;94(1):209-18. doi:10.1177/0022034514557672.

Lopes CB, Pacheco MT, Silveira L Jr, Cangussú MC, Pinheiro AL. The effect of the association of near infrared laser therapy, bone morphogenetic proteins, and guided bone regeneration on tibial fractures treated with internal rigid fixation: a Raman spectroscopic study. *J Biomed Mater Res A*. 2010 Sep 15;94(4):1257-63. doi: 10.1002/jbm.a.32800.

Malard O, Espitalier F, Bordure P, Daculsi G, Weiss P, Corre P. Biomaterials for tissue reconstruction and bone substitution of the ear, nose and throat, face and neck. *Expert Rev Med Devices*. 2007 Sep;4(5):729-39. doi: 10.1586/17434440.4.5.729.

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

Meneguzzo, DT; Eduardo, CP; Ribeiro, MS; Marques, MM). Influence of the fractioned irradiation energy in the phototherapy with low intensity laser on the growth of human dental pulp fibroblasts. Mechanisms for Low-Light Therapy III. [Local desconhecido]: Proc. of SPIE Vol. 6846 (2008) doi: 10.1117/12.761220.

Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 May 13;100(10):5807-12. doi: 10.1073/pnas.0937635100.

Miyamoto T, Lang M, Khan S, Kumagai K, Nunn ME.J
The clinical efficacy of deproteinized bovine bone mineral with 10% collagen in conjunction with localized piezosurgical decortication enhanced orthodontics: A prospective observational study. *Periodontol*. 2019 Oct;90(10):1106-15. doi: 10.1002/JPER.18-0737.

Moreira MS, Velasco IT, Ferreira LS, Ariga SK, Barbeiro DF, Meneguzzo DT, Abatepaulo F, Marques MM. Effect of phototherapy with low intensity laser on local and systemic immunomodulation following focal brain damage in rat. *J Photochem Photobiol B*. 2009 Dec 2;97(3):145-51. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2009.09.002.

Moreira MS, Velasco IT, Ferreira LS, Ariga SK, Abatepaulo F, Grinberg LT, Marques MM. Effect of laser phototherapy on wound healing following cerebral ischemia by cryogenic injury. *J Photochem Photobiol B*. 2011 Dec 2;105(3):207-15. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2011.09.005. Morries LD, Cassano P, Henderson TA. Treatments for traumatic brain injury with emphasis on transcranial near-infrared laser phototherapy. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2015 Aug 20;11:2159-75. doi: 10.2147/NDT.S65809.

Mvula B, Abrahamse H. Differentiation potential of adipose-derived stem cells when cocultured with smooth muscle cells, and the role of low-intensity laser irradiation. *Photomed Laser Surg*. 2016 Nov;34(11):509-515. doi: 10.1089/pho.2015.3978.

Mvula B, Moore TJ, Abrahamse H. Effect of low-level laser irradiation and epidermal growth factor on adult human adipose-derived stem cells. *Lasers Med Sci*. 2010 Jan;25(1):33-9. doi: 10.1007/s10103-008-0636-1

Nakajima K, Kunimatsu R, Ando K, Ando T, Hayashi Y, Kihara T, Hiraki T, Tsuka Y, Abe T, Kaku M, Nikawa H, Takata T, Tanne K, Tanimoto K. Comparison of the bone regeneration ability between stem cells from human exfoliated deciduous teeth, human dental pulp stem cells and human bone marrow mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018 Mar 11;497(3):876-82. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.02.156.

Omori M, Tsuchiya S, Hara K, Kuroda K, Hibi H, Okido M, Ueda M. A new application of cell-free bone regeneration: immobilizing stem cells from human exfoliated deciduous teeth-conditioned medium onto titanium implants using atmospheric pressure plasma treatment. *Stem Cell Res Ther*. 2015 Jun 19;6(1):124. doi: 10.1186/s13287-015-0114-1.

Park JC, Oh SY, Lee JS, Park SY, Choi EY, Cho KS, Kim CS. In vivo bone formation by human alveolar-bone-derived mesenchymal stem cells obtained during implant osteotomy using biphasic calcium phosphate ceramics or Bio-Oss as carriers. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2016 Apr;104(3):515-24. doi: 10.1002/jbm.b.33416.

Parner ET, Heidmann JM, Kjaer I, Vaeth M, Poulsen S. Biological interpretation of the correlation of emergence times of permanent teeth. *J Dent Res*. 2002 Jul;81(7):451-4. doi: 10.1177/154405910208100703.

Patino MG, Neiders ME, Andreana S, Noble B, Cohen RE. Collagen as an implantable material in medicine and dentistry. *J Oral Implantol*. 2002;28(5):220-5. doi: 10.1563/1548-1336(2002)028<0220:CAAIMI>2.3.CO;2.

Payer M, Lohberger B, Stadelmeyer E, Bartmann C, Windhager R, Jakse N. Behaviour of multipotent maxillary bone-derived cells on beta-tricalcium phosphate and highly porous bovine bone mineral. *Clin Oral Implants Res.* 2010 Jul;21(7):699-708. doi: 10.1111/j.1600-0501.2009.01856.x.

Pedroni ACF, Diniz IMA, Abe GL, Moreira MS, Sipert CR, Marques MM. Photobiomodulation therapy and vitamin C on longevity of cell sheets of human dental pulp stem cells. *J Cell Physiol.* 2018 Oct;233(10):7026-35. doi: 10.1002/jcp.26626.

Pedroni ACF, Sarra G, de Oliveira NK, Moreira MS, Deboni MCZ, Marques MM. Cell sheets of human dental pulp stem cells for future application in bone replacement. *Clin Oral Investig.* 2019 Jun;23(6):2713-21. doi: 10.1007/s00784-018-2630-8.

Pereira AN, Eduardo Cde P, Matson E, Marques MM. Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. *Lasers Surg Med.* 2002;31(4):263-7. doi: 10.1002/lsm.10107.

Pomini KT, Buchaim DV, Andreo JC, Rosso MPO, Della Coletta BB, German ÍJS, Biguetti ACC, Shinohara AL, Rosa Júnior GM, Cosin Shindo JVT, Alcalde MP, Duarte MAH, de Bortoli Teixeira D, Buchaim RL. Fibrin sealant derived from human plasma as a scaffold for bone grafts associated with photobiomodulation therapy. *Int J Mol Sci.* 2019 Apr 10;20(7):1761. doi: 10.3390/ijms20071761.

Pyo SJ, Song WW, Kim IR, Park BS, Kim CH, Shin SH, Chung IK, Kim YD. Low-level laser therapy induces the expressions of BMP-2, osteocalcin, and TGF- β 1 in hypoxic-cultured human osteoblasts. *Lasers Med Sci.* 2013 Feb;28(2):543-50. doi: 10.1007/s10103-012-1109-0.

Rizk A, Rabie AB. Human dental pulp stem cells expressing transforming growth factor β 3 transgene for cartilage-like tissue engineering. *Cytotherapy.* 2013 Jun;15(6):712-25. doi: 10.1016/j.jcyt.2013.01.012.

Rosa V, Dubey N, Islam I, Min KS, Nör JE. Pluripotency of stem cells from human exfoliated deciduous teeth for tissue engineering. *Stem Cells Int.* 2016;2016:5957806. doi: 10.1155/2016/5957806.

Rosso MPO, Buchaim DV, Pomini KT, Coletta BBD, Reis CHB, Pilon JPG, Duarte Júnior G, Buchaim RL. Photobiomodulation therapy (PBMT) applied in bone reconstructive surgery using bovine bone grafts: A systematic review. *Materials (Basel).* 2019 Dec 5;12(24):4051. doi: 10.3390/ma12244051.

Rosso MPO, Rosa Júnior GM, Buchaim DV, German IJS, Pomini KT, de Souza RG, Pereira M, Favaretto Júnior IA, Bueno CRS, Gonçalves JBO, Ferreira Júnior RS, Barraviera B, Andreo JC, Buchaim RL. Stimulation of morphofunctional repair of the facial nerve with photobiomodulation, using the end-to-side technique or a new heterologous fibrin sealant. *J Photochem Photobiol B*. 2017 Oct;175:20-8. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2017.08.023.

Salata LA, Franke-Stenport V, Rasmusson L. Recent outcomes and perspectives of the application of bone morphogenetic proteins in implant dentistry. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2002;4(1):27-32. doi: 10.1111/j.1708-8208.2002.tb00148.x.
Sauerbier S, Stubbe K, Maglione M, Haberstroh J, Kuschnierz J, Oshima T, Xavier SP, Brunnberg L, Schmelzeisen R, Gutwald R. Mesenchymal stem cells and bovine bone mineral in sinus lift procedures--an experimental study in sheep. *Tissue Eng Part C Methods*. 2010 Oct;16(5):1033-9. doi: 10.1089/ten.TEC.2009.0734.

Seo BM, Sonoyama W, Yamaza T, Coppe C, Kikuri T, Akiyama K, Lee JS, Shi S. SHED repair critical-size calvarial defects in mice. *Oral Dis*. 2008 Jul;14(5):428-34. doi: 10.1111/j.1601-0825.2007.01396.x. Erratum in: *Oral Dis*. 2009 May;15(4):302.

Shi X, Mao J, Liu Y. Pulp stem cells derived from human permanent and deciduous teeth: Biological characteristics and therapeutic applications. *Stem Cells Transl Med*. 2020 Apr;9(4):445-64. doi: 10.1002/sctm.19-0398.

Sittinger M, Hutmacher DW, Risbud MV. Current strategies for cell delivery in cartilage and bone regeneration. *Curr Opin Biotechnol*. 2004 Oct;15(5):411-8. doi: 10.1016/j.copbio.2004.08.010.

Soares LG, Magalhães EB, Magalhães CA, Ferreira CF, Marques AM, Pinheiro AL. New bone formation around implants inserted on autologous and xenografts irradiated or not with IR laser light: a histomorphometric study in rabbits. *Braz Dent J*. 2013;24(3):218-23. doi: 10.1590/0103-6440201302186.

Sousa LR, Cavalcanti BN, Marques MM. Effect of laser phototherapy on the release of TNF-alpha and MMP-1 by endodontic sealer-stimulated macrophages. *Photomed Laser Surg*. 2009 Feb;27(1):37-42. doi: 10.1089/pho.2007.2220

Souza LM de, Rinco UGR, Aguiar DAT, Almeida Junior LA de, Cosme-Silva L, Oliveira TM, Marques NCT, Sakai VT. Effect of photobiomodulation on viability and proliferation of stem cells from exfoliated deciduous teeth under different nutritional conditions [Internet]. *Laser Physics*. 2018.

Suchánek J, Visek B, Soukup T, El-Din Mohamed SK, Ivancaková R, Mokry J, Aboul-Ezz EH, Omran A. Stem cells from human exfoliated deciduous teeth--isolation, long term cultivation and phenotypical analysis. *Acta Medica (Hradec Kralove)*. 2010;53(2):93-9. doi: 10.14712/18059694.2016.66.

Szpalski C, Weichman K, Sagebin F, Warren SM. Need for standard outcome reporting systems in craniosynostosis. *Neurosurg Focus*. 2011 Aug;31(2):E1. doi: 10.3171/2011.6.FOCUS1192.

Tadakuma T. Possible application of the laser in immunobiology. *Keio J Med*. 1993 Dec;42(4):180-2. doi: 10.2302/kjm.42.180.

Tagliani M M, Oliveira C F, Lins E M M, Kurachi C, Hebling J, Bagnato V S; de Souza Costa C A. Nutritional stress enhances cell viability of odontoblast-like cells subjected to low level laser irradiation. *Laser Phys Lett*. 2010 Mar;7(3):247-51. Doi: 10.1002 /lapl.200910137.

Taguchi T, Yanagi Y, Yoshimaru K, Zhang XY, Matsuura T, Nakayama K, Kobayashi E, Yamaza H, Nonaka K, Ohga S, Yamaza T. Regenerative medicine using stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED): a promising new treatment in pediatric surgery. *Surg Today*. 2019 Apr;49(4):316-22. doi: 10.1007/s00595-019-01783-z.

Tanikawa DYS, Pinheiro CCG, Almeida MCA, Oliveira CRGCM, Coudry RA, Rocha DL, Bueno DF. Deciduous dental pulp stem cells for maxillary alveolar reconstruction in cleft lip and palate patients. *Stem Cells Int*. 2020 Mar 12;2020:6234167. doi: 10.1155/2020/6234167.

Thaller SR, Hoyt J, Dart A, Borjeson K, Tesluk H. Repair of experimental calvarial defects with Bio-Oss particles and collagen sponges in a rabbit model. *J Craniofac Surg*. 1994 Sep;5(4):242-6. doi: 10.1097/00001665-199409000-00009.

Vahabi S, Amirizadeh N, Shokrgozar MA, Mofeed R, Mashhadi A, Aghaloo M, Sharifi D, Jabbareh L. A comparison between the efficacy of Bio-Oss, hydroxyapatite tricalcium phosphate and combination of mesenchymal stem cells in inducing bone regeneration. *Chang Gung Med J*. 2012 Jan-Feb;35(1):28-37. doi: 10.4103/2319-4170.106169.

van der Valk J, Bieback K, Buta C, Cochrane B, Dirks WG, Fu J, Hickman JJ, Hohensee C, Kolar R, Liebsch M, Pistollato F, Schulz M, Thieme D, Weber T, Wiest J, Winkler S, Gstraunthaler G. Fetal Bovine Serum (FBS): Past - Present - Future. *ALTEX*. 2018;35(1):99-118. doi: 10.14573/altex.1705101.

Vishwanath VR, Nadig RR, Nadig R, Prasanna JS, Karthik J, Pai VS. Differentiation of isolated and characterized human dental pulp stem cells and stem cells from human exfoliated deciduous teeth: An in vitro study. *J Conserv Dent*. 2013 Sep;16(5):423-8. doi: 10.4103/0972-0707.117509.

Wang X, Sha XJ, Li GH, Yang FS, Ji K, Wen LY, Liu SY, Chen L, Ding Y, Xuan K. Comparative characterization of stem cells from human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells. *Arch Oral Biol*. 2012 Sep;57(9):1231-40. doi: 10.1016/j.archoralbio.2012.02.014.

Winkler T, Sass FA, Duda GN, Schmidt-Bleek K. A review of biomaterials in bone defect healing, remaining shortcomings and future opportunities for bone tissue engineering: The unsolved challenge. *Bone Joint Res*. 2018 May 5;7(3):232-43. doi: 10.1302/2046-3758.73.BJR-2017-0270.R1.

Wong RW, Rabie AB. Effect of bio-oss collagen and collagen matrix on bone formation. *Open Biomed Eng J*. 2010 Mar 9;4:71-6. doi: 10.2174/1874120701004010071.

Xinaris C, Morigi M, Benedetti V, Imberti B, Fabricio AS, Squarcina E, Benigni A, Gagliardini E, Remuzzi G. A novel strategy to enhance mesenchymal stem cell migration capacity and promote tissue repair in an injury specific fashion. *Cell Transplant*. 2013;22(3):423-36. doi: 10.3727/096368912X653246.

Yamaza T, Kentaro A, Chen C, Liu Y, Shi Y, Gronthos S, Wang S, Shi S. Immunomodulatory properties of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Stem Cell Res Ther*. 2010 Mar 15;1(1):5. doi: 10.1186/scrt5. PMID: 20504286; PMCID: PMC2873699.

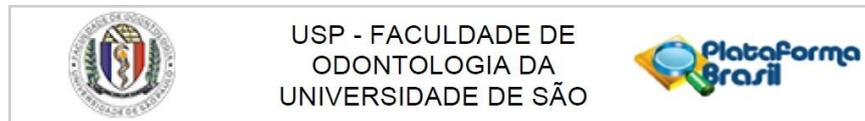
Yildirimturk S, Sirin Y, Soluk Tekkesin M, Gurler G, Firat D. The effects of low-level laser therapy on the healing of bone defects in streptozotocin-induced diabetic rats: A histological and morphometric evaluation. *J Cosmet Laser Ther*. 2017 Nov;19(7):397-403. doi: 10.1080/14764172.2017.1341048.

Young F, Sloan A, Song B. Dental pulp stem cells and their potential roles in central nervous system regeneration and repair. *J Neurosci Res*. 2013 Nov;91(11):1383-93. doi: 10.1002/jnr.23250.

Yu BH, Zhou Q, Wang ZL. Periodontal ligament versus bone marrow mesenchymal stem cells in combination with Bio-Oss scaffolds for ectopic and in situ bone formation: A comparative study in the rat. *J Biomater Appl*. 2014 Aug;29(2):243-253. doi: 10.1177/0885328214521846.

Zheng Y, Liu Y, Zhang CM, Zhang HY, Li WH, Shi S, Le AD, Wang SL. Stem cells from deciduous tooth repair mandibular defect in swine. *J Dent Res*. 2009 Mar;88(3):249-54. doi: 10.1177/0022034509333804.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Utilização de células tronco para regeneração óssea em calvária de rato

Pesquisador: LUIZ ANTONIO PUGLIESI ALVES DE LIMA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 87866518.8.0000.0075

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.635.611

Apresentação do Projeto:

A regeneração óssea é um processo importante e devido suas limitações técnicas, continua sendo um desafio para odontologia. A engenharia tecidual tem estudado as células tronco para tratamento de perdas ósseas. A proposta deste estudo é avaliar o uso de células tronco da polpa dental humana (hDPMSC) associado ao Bio-Oss® Collagen na regeneração de defeito crítico em calvária de ratos. A pesquisa envolve o estudo in vitro, o

qual será analisado a adesão e proliferação das células-tronco da polpa dental cultivadas no scaffold de Bio-Oss® Collagen e no Bio-Oss® sem colágeno. O estudo in vivo com 36 ratos o qual será realizado defeito crítico da calvária de rato e serão tratados de acordo com os seguintes grupos experimentais Grupo I: hDPMSC associado ao Bio-Oss® Collagen; Grupo II: Bio-Oss® Collagen e Grupo III: coágulo (controle negativo). Após 4 e 8 semanas da cirurgia, a calota craniana será dissecada, fixada e submetida às análises por microtomografia computadorizada (MicroCT), histológica (HE) e imunistoquímica (cell tracking-BrDU). Os dados serão tratados estatisticamente (p0,05).

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Avaliar se a adição de células tronco de polpa dentária ao scaffold (Bio-Oss Collagen) promoverá regeneração óssea mais rápida, resultando em osso de melhor qualidade, em defeitos críticos na calvaria de rato. Avaliar a adesão e proliferação, e a diferenciação das células tronco de polpa no scaffold (Bio-Oss Collagen).

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



USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO



Continuação do Parecer: 2.635.611

Objetivo Secundário: Avaliar a quantidade, qualidade e volume ósseo obtido após regeneração óssea com a associação de células tronco de polpa cultivadas em scaffold (Bio-Oss Collagen). Avaliar a resposta inflamatória, a osteocondução e formação óssea junto as partículas do scaffold. Rastrear as células tronco de polpa de modo a verificar e quantificar sua participação no processo de regeneração óssea de defeitos críticos na calvária de rato.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Não haverá risco para o paciente, pois as células já foram cultivadas e estão armazenadas para utilização em outros experimentos. As células a serem utilizadas tem aprovação do CEP através do CAEE 40392114.3.0000.0075.

Benefícios: Não existe benefício diretos aos pacientes que aceitarem doar seus dentes extraídos, no entanto, existe uma contribuição ao conhecimento e a saúde humana, na medida que suas células permitirão a pesquisa em regeneração tecidual baseados em terapias celulares. Este estudo contribuirá para um melhor entendimento da regeneração óssea, e no caso de nossa hipótese ser confirmada, permitirá melhorarmos a técnica de regeneração óssea utilizada na atualidade. Além disso esta pesquisa tem o compromisso de investigar o uso de um carreador, associado as células tronco na regeneração óssea em ratos, o que poderá trazer novas perspectivas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa bem planejada e relevante para a área de estudo.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Folhas de Rosto - OK

Projeto - OK

TCLE - Dispensado

Informações básicas- OK

Recomendações:

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

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

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



USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO



Continuação do Parecer: 2.635.611

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1092455.pdf	17/04/2018 13:45:01		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto.docx	17/04/2018 13:43:47	LUIZ ANTONIO PUGLIESI ALVES DE LIMA	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto_Luiz_Antonio_Alves_de_Lima.pdf	16/04/2018 22:21:21	LUIZ ANTONIO PUGLIESI ALVES DE LIMA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 04 de Maio de 2018

Assinado por:
Maria Gabriela Haye Biazevic
(Coordenador)

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