



UNESP – Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia de Araraquara



TAISA NOGUEIRA PANSANI

**Resposta de Fibroblastos da Gengiva de Pacientes
Jovens e Idosos e Efeito da Laserterapia de Baixa
Potência e de Fator de Crescimento sobre Estas
Células**

Araraquara

2015



UNESP – Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia de Araraquara



TAISA NOGUEIRA PANSANI

**Resposta de Fibroblastos da Gengiva de Pacientes
Jovens e Idosos e Efeito da Laserterapia de Baixa
Potência e de Fator de Crescimento sobre Estas
Células**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral - Área de Prótese, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista, para obtenção do título de Mestre, em Reabilitação Oral.

Orientador: *Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa*

Co-Orientadora: *Dra. Fernanda Gonçalves Basso*

Araraquara

2015

Pansani, Taisa Nogueira

Resposta de fibroblastos da gengiva de pacientes jovens e idosos e efeito da laserterapia de baixa potência e de fator de crescimento sobre estas células / Taisa Nogueira Pansani .-- Araraquara: [s.n.], 2015.

74 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa

Co-orientadora: Profa. Dra. Fernanda Gonçalves Basso

1. Envelhecimento celular 2. Terapia a laser de baixa intensidade
3. Fator de crescimento epidérmico I. Título

TAISA NOGUEIRA PANSANI

**RESPOSTA DE FIBROBLASTOS DE GENGIVA DE
PACIENTES JOVENS E IDOSOS E EFEITO DA
LASERTERAPIA DE BAIXA POTÊNCIA E DE
FATOR DE CRESCIMENTO SOBRE ESTAS
CÉLULAS**

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Co-Orientadora: Prof.^a Dr.^a Fernanda Gonçalves
Basso

2º examinador: Prof. Dr. Gelson Luis Adabo

3º examinador: Prof.^a Dr.^a Carla Raquel Fontana Mendonça

Araraquara, 18 de março de 2015.

DADOS CURRICULARES

Taisa Nogueira Pansani

NASCIMENTO: 07/03/1989, São José do Rio Preto/SP

FILIAÇÃO: Adriana Godoy Nogueira Pansani

Cyneu Aguiar Pansani

2008/2012: Curso de Graduação em Odontologia

Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

2013/2015: Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral
Nível Mestrado

Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

Dedicatória

À Deus pela graça da vida e a minha família que através de seu amor
incondicional me faz vivê-la intensamente.

Agradecimentos

Ao meu pai que sempre me guiou e apoiou nas escolhas de minha vida.

Aos meus irmãos pela alegria, compreensão e carinho dispensados mesmo nos momentos mais difíceis.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa**, professor do Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, por me orientar desde a iniciação científica e contribuir para meu crescimento profissional.

A minha amiga e co-orientadora **Dra. Fernanda Gonçalves Basso**, professora colaboradora do programa de Pós-graduação em Reabilitação Oral da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, pelos ensinamentos transmitidos, dedicação na minha evolução como pesquisadora, além de ser um verdadeiro exemplo como pessoa para mim.

As minhas amigas do Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais com quem convivo diariamente.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, nas pessoas da atual Diretora **Profa. Dra. Andreia Affonso Barretto Montandon** e Vice-diretora **Profa. Dra. Elaine Maria Sgavioli Massucato**.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, representada pela Coordenadora **Profa. Dra. Ana Cláudia Pavarina** e pela Vice-coordenadora **Profa. Dra. Renata Garcia Fonseca**.

Aos **Professores do Programa de Reabilitação Oral** da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, pelos ensinamentos e experiências vividas.

Aos **funcionários da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP**, os quais foram sempre solícitos para comigo.

À **Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** por viabilizar o desenvolvimento dessa pesquisa, através dos auxílios 2012/25070-9 (Bolsa de Mestrado) e 2013/05879-0 (Auxílio Regular).

A todos que de alguma maneira contribuíram para a conquista dessa etapa em minha vida, muito obrigada.

“O cientista não é o homem que fornece
as verdadeiras respostas; é quem faz as
verdadeiras perguntas”.

(Claude Lévi-Strauss)

Pansani TN. Resposta de fibroblastos da gengiva de pacientes jovens e idosos e efeito da laserterapia de baixa potência e de fator de crescimento sobre estas células [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia de Araraquara da UNESP; 2015.

Resumo

A idade do indivíduo e a presença de inflamação podem influenciar o metabolismo celular, retardando o processo de reparo tecidual. Diferentes tratamentos, como a laserterapia de baixa potência (LBP) e a aplicação de fatores de crescimento são capazes promover bioestimulação celular através do aumento de sua proliferação e metabolismo. O objetivo deste estudo foi avaliar as atividades de fibroblastos obtidos da gengiva de indivíduos jovens e idosos (Estudo 1), a capacidade de resposta destas células expostas ao fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (Estudo 2), bem como o efeito da LBP ou do fator de crescimento epidérmico (EGF) sobre a viabilidade e metabolismo destas células em cultura (Estudo 3). Culturas primárias de fibroblastos de gengiva de 6 pacientes (3 jovens – J; e 3 idosos - I) foram obtidas e semeadas em meio de cultura completo (DMEM), de acordo com cada protocolo proposto. No Estudo 1, fibroblastos em DMEM completo foram cultivados em placas de 24 compartimentos pelos períodos de 24, 48 ou 72 horas e submetidos a análise da viabilidade celular (MTT, n=36), produção de proteína total (PT, n=36) e síntese de colágeno Sirius Red (SR, n=36). No Estudo 2, após 24 horas do cultivo celular em placas de 96 compartimentos, o meio de cultura completo foi substituído por DMEM sem soro fetal bovino (SFB) acrescido ou não de TNF- α (100 ng/mL) e mantido em contato com as células por 24 horas adicionais. Então, as células foram analisadas quanto a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs, n=36), produção de óxido nítrico (NO, n=36) e síntese de quimiocina CCL5 (ELISA, n=36). No Estudo 3, fibroblastos cultivados em placas de 24 compartimentos foram tratados com EGF (100 μ M) ou irradiados com laser de baixa potência (LASERTable, InGaAsP - 780 $\pm$ 3nm; 25mW). A viabilidade celular (Alamar Blue[®], n=12), migração celular (Wound Healing, n=12), síntese de colágeno (SR, n=12), e síntese do fator de crescimento vascular endotelial - VEGF (ELISA, n=12) foram avaliados 72

horas após os tratamentos propostos. Os dados foram submetidos ao teste estatístico de Kruskal-Wallis complementado por Mann-Whitney ($p>0,05$). Foi observado que fibroblastos I apresentaram maior viabilidade quando comparados aos J para os períodos de 24 e 48 horas. Os fibroblastos I apresentaram redução gradativa de viabilidade com o decorrer dos períodos de avaliação, porém maior produção de PT no período de 24 horas quando comparado aos J, sendo que ocorreu redução na síntese de colágeno para as células I no período de 48 horas. Quanto à resposta celular ao TNF- α , não foi observado diferença na produção de EROs. Para CCL5 os fibroblastos J e I expostos ao TNF- α tiveram sua expressão aumentada. Houve aumento na produção de NO pelas células J e I em presença de TNF- α , sendo este maior nos fibroblastos J. Tanto as células J quanto I expostas ao EGF e LBP apresentaram aumento de viabilidade, sendo que maior migração ocorreu para os fibroblastos J. Apenas a LBP induziu aumento na migração das células I. Tanto a LBP quanto a aplicação de EGF induziu aumento na síntese de colágeno pelos fibroblastos J e I. A síntese de VEGF foi maior nas células J e I expostas ao EGF, sendo que esta atividade foi reduzida quando os fibroblastos I foram tratados com LBP. De acordo com as metodologias aplicadas e limitações que esse estudo laboratorial apresenta, foi possível concluir, de maneira geral, que existem diferenças funcionais entre os fibroblastos obtidos de gengiva de pacientes jovens e idosos e que a LBP e aplicação de EGF podem bioestimular as funções celulares envolvidas no reparo tecidual.

Palavras-chave: Envelhecimento celular, terapia a laser de baixa intensidade, fator de crescimento epidérmico

Pansani TN. Response of gingival fibroblast obtained from young and elderly patients and effect of low level laser therapy and growth factor in these cells [Dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2015.

Abstract

The age as well as the presence of inflammation can influence the cellular metabolism, slowing the tissue healing process. Different therapies, such as the application of growth factors and low level laser therapy (LLLT) are capable of biostimulating cells by increasing their proliferation and metabolism. The aim of this study was to evaluate: the functions of gingival fibroblasts obtained from young and elderly individuals (Study 1); the response of these cells exposed to tumor necrosis factor alpha - TNF- α (Study 2); and the effect of LLLT or epidermal growth factor - EGF on the viability and metabolism of these connective cell type (Study 3). Primary culture of gingival fibroblasts of 6 patients (3 young - Y and 3 elderly - E) were collected and cultured in complete culture medium (DMEM). In the Study 1 fibroblasts were seeded in 96-well plates in complete DMEM containing 10% of fetal bovine serum (FBS) for 24, 48 or 72 hours and subjected to evaluation of cell viability (MTT, n=36), total protein production (TP, n=36) and collagen synthesis (SR, n=36). In the Study 2, after 24-hour cell seeding, the complete DMEM was replaced by DMEM without FBS supplemented or not with TNF- α (100 ng/mL) which was kept in contact with cells for additional 24 hours. Then, the production of reactive oxygen TNF- α species (ROS, n=36), nitric oxide (NO, n=36) and synthesis of CCL5 chemokine (ELISA, n=36) were assessed. In the Study 3 fibroblasts were seeded in 24-well plates for 24 hours, and then exposed to EGF (100 μ M) or submitted to low power laser irradiation (LASERTable device, InGaAsP - 780 $\pm$ 3nm; 25mW). Cell viability (Alamar Blue®, n=12), cell migration (Wound Healing, n=12), collagen synthesis (SR, n=12), and synthesis of vascular endothelial growth factor - VEGF (ELISA, n=12) were assessed 72 hours after the treatments. The data were statistically Kruskal-Wallis complemented by Mann-Whitney test ($p > 0.05$). It was demonstrated that E-fibroblasts presented higher viability than Y-fibroblasts at 24 and 48-hour periods. Gradual reduction on cell viability was detected for E-cells according to the periods (24, 48, 72 h).

E-fibroblasts showed higher TP production at 24 hours compared to Y-fibroblasts, associated with a decreased collagen synthesis at 48 hours. Regarding the cellular response after TNF- α treatment, no differences were observed for ROS or CCL5 production for Y-fibroblasts and increased NO production was detected for both cells (Y and E) with higher results for Y-fibroblasts. The EGF and LLLT treatments increased the viability of Y-and E-fibroblasts; however, LLLT enhanced the migration of only Y-fibroblasts. Increased collagen synthesis was observed in I-and E-cells exposed to LLLT and EGF. The VEGF synthesis was higher in EGF-treated E-fibroblasts while decreased synthesis of this growth factor was demonstrated for Y-cells submitted to LLLT. According to the methodologies and limitations of this in vitro study, it is possible to conclude that Y-and E-fibroblasts present functional differences and that LLLT and EGF can biostimulate cell functions related to tissue healing.

Key-words: Cellular senescence; low level laser therapy; epidermal growth factor

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
3 PROPOSIÇÃO.....	21
4 MATERIAL E MÉTODO.....	23
5 RESULTADO.....	42
6 DISCUSSÃO.....	53
7 CONCLUSÃO.....	60
 REFERÊNCIAS.....	 62
ANEXO 1.....	73

1 INTRODUÇÃO

O reparo tecidual é dependente de fenômenos locais, tais como proliferação celular e síntese de elementos da matriz extracelular, os quais estão diretamente relacionados com a intensa atividade de células endoteliais, fibroblastos e queratinócitos⁵¹.

O envelhecimento é resultado de uma complexa interação entre processos físicos, biológicos e bioquímicos⁷⁶. Desta maneira, o aumento da idade do indivíduo pode causar perda gradual do potencial replicativo celular e menor resposta aos fatores de crescimento, o que pode reduzir a capacidade de reparo de feridas⁴⁷. Estudos têm demonstrado alterações na capacidade de migração e proliferação celular, bem como na síntese de matriz por células envelhecidas^{47, 95}. Além dessas perdas funcionais, células senescentes também apresentam alterações morfológicas e estruturais, que podem estar relacionadas à sua motilidade^{29, 57, 95, 102}.

O aumento do número de passagens realizadas com fibroblastos de pele em cultura resultou em redução da capacidade de quimiotaxia por estas células, o que pode interferir diretamente no processo de migração celular durante o reparo tecidual¹. Além disto, foi observado que fibroblastos de pele obtidos de indivíduos idosos apresentaram migração mais lenta quando comparados com fibroblastos de indivíduos adultos e fibroblastos fetais⁶⁸.

Stephens et al.¹⁰⁵ (1996) relataram que fibroblastos de gengiva apresentam maior capacidade de reparo quando comparados com fibroblastos de pele, representada pela reorganização da matriz extracelular e contração do colágeno. A rápida cicatrização de feridas em mucosa oral também pode estar relacionada à presença do fluido salivar e à microflora específica da cavidade oral^{41, 51}. Porém, não há estudos que tenham avaliado a influência da idade sobre a capacidade de reparo da mucosa oral, tal como já caracterizado para a pele.

O processo de reparação de feridas depende de uma série de eventos os quais envolvem desde a proliferação e migração celular, até o repovoamento da área agredida⁷⁸. Os processos de migração e proliferação

celular, por sua vez, dependem da liberação coordenada de fatores de crescimento e citocinas na região lesionada²⁸.

A obtenção de um efeito no reparo da mucosa oral também está relacionada à capacidade da resposta celular frente a estímulos inflamatórios agudos, que participam do processo inicial de reparo, induzindo a proliferação e migração celulares, bem como a eliminação de patógenos^{72, 79}. Esta resposta, porém, deve ser modulada, pois se exacerbada ou mantida por períodos prolongados pode causar um retardo deste processo.

Ohshima et al.⁸⁴ (2002) relataram que níveis fisiológicos do fator de crescimento epidérmico (EGF) na saliva estimulam a proliferação e migração de células do epitélio oral. A partir de então, alguns pesquisadores sugeriram como positivo o uso de fatores de crescimento como uma ferramenta para acelerar a proliferação celular e a cicatrização de feridas^{11, 93}. Assim, foi demonstrado que a aplicação tópica de EGF ou por via subcutânea, acelera significativamente a re-epitelização e aumenta a resistência à tração da ferida^{23, 25, 44, 69, 80}. Consequentemente, o uso do EGF para tratamento de feridas dérmicas tem se expandido com o objetivo de acelerar o reparo tecidual através da estimulação da migração celular e síntese de fatores diretamente relacionados ao reparo (Hardwicke et al., 2008).

Há mais de duas décadas, pesquisadores têm demonstrado que a laserterapia de baixa potência (LBP) apresenta importantes efeitos fotofísicos e fotoquímicos sobre as células e tecidos^{17, 59}. A interação do laser com os tecidos depende das características ópticas deste tipo de luz, tais como comprimento de onda, potência, tempo de exposição do tecido, densidade de energia, além da presença e tipo de cromóforos^{60, 74}.

Esses são caracterizados como elementos teciduais capazes de absorver fótons e transformar a energia da luz em energia fotoquímica. Alguns dos efeitos fotobiológicos da LBP relatados na literatura são: aumento do metabolismo e proliferação celular, bem como da síntese protéica, de colágeno, de DNA e RNA, e da expressão de fatores de crescimento^{13, 14, 20, 38, 53, 73, 77}.

Estudos anteriores demonstraram que a LBP, aplicada sobre cultura de fibroblastos e de células epiteliais, causou aumento da proliferação e expressão gênica por parte destas células, com significativo estímulo da

expressão de colágeno tipo I^{4, 9, 13, 14, 32, 37, 64, 66}. Portanto, o uso da LBP, associada ou não à terapia com fatores de crescimento, tal como o EGF, poderia favorecer o processo de reparo de lesões que ocorrem frequentemente na mucosa oral de indivíduos jovens e idosos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O reparo tecidual ocorre de forma complexa e organizada em nível celular e molecular, para que a recuperação da fisiologia do tecido lesionado seja restabelecida. Este processo é constituído, basicamente, das seguintes fases: hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação do tecido, as quais podem se sobrepor^{47, 92}.

Diversos tipos celulares, incluindo células endoteliais, fibroblastos, queratinócitos e células circulatórias, como as do sistema imune, além de moléculas como fatores de crescimento e citocinas, participam de uma infinidade de processos essenciais ao reparo, incluindo migração celular, proliferação e produção de matriz extracelular de maneira coordenada, com a finalidade de restaurar o tecido¹¹. Dentre esses diferentes tipos celulares, as células epiteliais e os fibroblastos exercem papel fundamental no restabelecimento efetivo da homeostasia de um tecido previamente agredido⁵¹.

Os fibroblastos participam ativamente do processo de reparo tecidual através de sua capacidade inerente de proliferação, migração e preenchimento da ferida, bem como de sintetizar fatores de crescimento e moléculas da matriz extracelular⁵¹. No tecido conjuntivo normal, os fibroblastos se apresentam em estado de repouso e com baixa taxa de proliferação e atividade metabólica. Uma mudança fenotípica nos fibroblastos em repouso para células em proliferação e, posteriormente, para células em migração, torna-se necessária para que ocorra a produção de uma matriz estacionária capaz de reparar o tecido lesionado⁵¹. Quando ocorre um ferimento, este evento induz a deposição de matriz extracelular e proteínas que modulam a adesão celular, e dessa forma os fibroblastos migram para o centro da ferida⁵¹.

Durante o reparo tecidual, fibroblastos são expostos a uma variedade de moléculas da matriz extracelular e fatores de crescimento, os quais podem exercer diversos sinais simultaneamente⁵¹. No entanto, apesar de inúmeros eventos estarem ocorrendo simultaneamente e de maneira coordenada, estudos prévios demonstraram que alguns fatores podem influenciar

negativamente no processo de reparto tecidual, tal como a idade do indivíduo^{7, 47, 49}.

O envelhecimento é um processo natural, gradual e contínuo que resulta em inúmeras mudanças celulares e teciduais em nível morfológico, estrutural e funcional⁷⁶. Com o aumento da idade, algumas células podem apresentar alterações morfológicas e funcionais, tais como redução de sua capacidade proliferativa, quantidade de organelas, expressão de fatores de crescimento e síntese de colágeno^{29, 47, 57, 95}.

Albini et al.¹ (1988) avaliaram, comparativamente, a capacidade quimiotática de fibroblastos de pele em cultura com variadas passagens, obtidas de doadores com faixas etárias diferentes. Os autores observaram que o aumento da idade causou declínio na resposta migratória celular e aumento da deposição de fibronectina na matriz extracelular. Além dessas alterações, Schulze et al.⁹⁵ (2010) verificaram in vivo, que durante o envelhecimento ocorre aumento significativo na rigidez de fibroblastos dérmicos. Dessa maneira, uma possível razão para o retardo na motilidade celular relacionada à idade, particularmente no reparo de tecidos dérmicos, está acompanhada por mudanças na organização do citoesqueleto das células, sendo que outras funções celulares, como motilidade e proliferação, podem ser afetadas por essas mudanças⁹¹.

Estudos anteriores demonstraram que fibroblastos de gengiva apresentam maior capacidade de reparo quando comparados a fibroblastos de pele¹⁰⁵. Isto ocorre devido à presença do fluido salivar e microflora específica da cavidade oral, além da rápida capacidade de migração e repovoamento da área da ferida pelos fibroblastos de gengiva, os quais ainda exibem maior potencial de produção de fatores de crescimento e de deposição de matriz circundante mais organizada e efetiva^{36, 41, 51, 106, 108}. Kim et al.⁶³ (2009) relataram que o processo de envelhecimento pode reduzir síntese de proteínas além de induzir alterações na composição de proteoglicanas da matriz extracelular em fibroblastos de gengiva. Assim, alterações celulares podem estar relacionadas ao atraso do processo de reparo das feridas^{47, 91}.

Esse processo de envelhecimento tem sido amplamente estudado e discutido, principalmente quando este está relacionado ao processo de reparo e cicatrização de feridas^{40, 92}.

O atraso do processo de reparo também já foi relacionado à manutenção da fase inflamatória, devido a uma diminuição da capacidade proliferativa das células envolvidas neste processo⁴⁹.

A fase inflamatória é uma consequência direta da lesão e de extrema importância para o início do processo de reparo, cujo objetivo é a recuperação morfológica e funcional do tecido⁷². Além disso, essa fase é essencial para a eliminação de bactérias e microrganismos contaminantes, pois caso essa descontaminação não ocorra de maneira eficaz, o processo de reparo pode ser atrasado, devido à presença de bactérias e endotoxinas, que podem elevar e prolongar a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como a interleucina 1 (IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF) estendendo, portanto a fase inflamatória⁴⁹.

Estudos anteriores demonstraram que a cicatrização em indivíduos idosos apresenta-se retardada, e que estes indivíduos apresentam reduzida resposta inflamatória, devido a uma menor infiltração de células T no local da ferida, bem como alterações na produção de quimiocinas e capacidade fagocitária de macrófagos¹⁰⁷.

Fatores de crescimento apresentam diferentes funções celulares durante o processo de reparo. Como muitos dos fatores de crescimento são transportados pela saliva juntamente com o fluído gengival, acredita-se que a concentração destas proteínas seja mais elevada no tecido gengival quando comparada a qualquer outro sítio da cavidade oral⁵¹.

Dentre todos os fatores de crescimento envolvidos nesse processo, o fator de crescimento epidérmico (EGF) se destaca por apresentar efeitos sobre a proliferação, migração celular e metabolismo da matriz extracelular^{24, 83}. Dessa maneira, o EGF é essencial para a manutenção da mucosa oral, bem como para o processo de reparo deste tipo de tecido⁸³.

O EGF é uma molécula de baixo peso molecular (6 kDa), produzida por glândulas salivares, incluindo parótida e submandibular e também por alguns tipos celulares específicos, tais como plaquetas, células epiteliais e do tecido conjuntivo^{23, 84} e está presente em altas concentrações durante os primeiros estágios do processo de reparação de feridas^{51, 84}. Moléculas da família do EGF e suas características são as mais estudadas quando se quer observar os efeitos de reepitelização¹⁰. Esse fator de crescimento pode desempenhar papel

dominante no início do reparo de feridas, estimulando a proliferação dos queratinócitos e migração dos mesmos com o objetivo de promover a cicatrização local⁴⁶.

Alguns estudos apresentam resultados promissores utilizando o EGF para acelerar o processo de reparo^{44, 69, 93}. Desde que seu uso tópico ou por via subcutânea acelera a re-epitelização de feridas, a terapia com EGF pode ser considerada eficaz para o tratamento de úlceras e estomatites de difícil resolução⁴⁴. Posteriormente, os efeitos positivos do EGF foi relatado por Ryu et al.⁹³ (2009), os quais verificaram aumento da proliferação e quantidade de fibroblastos viáveis tratados com EGF. Portanto, a capacidade deste fator de crescimento de induzir migração celular, torna o EGF uma importante modalidade de terapia para auxiliar e acelerar o processo de reparo tecidual.

Com o objetivo de acelerar a reparação de tecidos agredidos, além da utilização de fatores de crescimento, outras modalidades de tratamento, tal como a fototerapia, tem sido amplamente pesquisada e difundida na área de saúde.

Há mais de 25 anos, pesquisadores demonstraram os efeitos fotofísicos e fotoquímicos, causados pela laserterapia de baixa potência (LBP) aplicada sobre células e tecidos^{17, 59}. Características ópticas desse tipo de luz, como comprimento de onda, potência, tempo de exposição do tecido, densidade de energia e a presença e tipo e cromóforos no tecido a ser irradiado, devem ser levados em consideração para observar o efeito da fototerapia no mesmo^{60, 74}.

Cromóforos são caracterizados como elementos presentes nos tecidos, os quais podem ser enzimas, estruturas de membranas, componentes extracelulares ou outros componentes celulares^{18, 75}, capazes de absorver fótons e transformar a energia da luz em energia fotoquímica^{60, 74}. No entanto, sabe-se que cada cromóforo é excitado em um comprimento de onda específico; dessa forma comprimentos de onda variados podem promover efeitos diversos em diferentes células e tecidos^{74, 94}. Essa luz, quando absorvida pelos elétrons dos cromóforos, faz com que os mesmos passem para um estado mais excitado, mudando sua camada de valência para uma mais energética; ao retornarem para sua camada original, os elétrons liberam energia a qual é utilizada em seus processos metabólicos^{17, 59}.

Alguns pesquisadores têm avaliado os mecanismos moleculares envolvidos nos processos de proliferação celular provenientes da irradiação com laser de baixa potência. Gao, Xing⁴⁵ (2009) relataram que as luzes vermelha e infravermelho-próximo podem ativar componentes da cadeia respiratória nas mitocôndrias, dando início a cascata de sinalizações que levam ao aumento da proliferação celular. Sabe-se que a cadeia respiratória mitocondrial é composta por 5 complexos: NADH desidrogenase (complexo I), succinato desidrogenase (complexo II), citocromo c redutase (complexo III), citocromo c oxidase (complexo IV) e ATP sintase (complexo V)⁵⁶. Segundo Karu⁶¹ (2010), o citocromo c oxidase é bioestimulado nas bandas de comprimento de onda de 620 nm, 680 nm, 760 nm e 825 nm, sendo o maior pico de estimulação em torno de 760-780 nm semelhante à utilizada na pesquisa em questão.

Para os comprimentos de onda do laser vermelho e infravermelho-próximo, o qual foi utilizado no presente estudo laboratorial, o receptor primário é a enzima citocromo c oxidase, que é um fotorreceptor que estimula o complexo IV a produzir maior quantidade de adenosina trifosfato (ATP) para as células, resultando na fotobiomodulação⁵⁶. Quando esse fotorreceptor é ativado, os níveis de respiração, ATP e espécies reativas de oxigênio (EROs) são aumentados, fazendo com que estas mudanças bioquímicas eleve a proliferação celular e acelere o processo de reparo tecidual⁴⁵.

Nas últimas décadas, os seguintes efeitos fotobiológicos da LBP em cultura celular foram demonstrados: aumento do metabolismo e proliferação celular, da síntese protéica, da síntese de colágeno, de DNA e RNA, bem como aumento da angiogênese, da expressão de fatores de crescimento e de diferenciação celular^{6, 20, 38, 53, 64, 73, 77, 81}.

Na Odontologia, a LBP tem sido amplamente investigada, sendo que os resultados positivos têm indicado que este tipo de terapia poderia ser aplicada para acelerar o processo de reparo tecidual, especialmente para o tratamento de lesões ulcerativas da mucosa bucal^{26, 66}.

Em 2009, Damante et al.³² avaliaram parâmetros de irradiação com laser infra-vermelho nas doses de 3,0 e 5,0 J/cm² aplicados sobre fibroblastos. Os autores verificaram que essas doses testadas foram capazes de promover maior síntese de fator de crescimento fibroblástico (bFGF) quando comparado

às células não irradiadas, sendo esse fator importante durante o processo de cicatrização.

Basso et al.¹³ (2012) demonstraram aumento da viabilidade e migração de fibroblastos de gengiva submetidos a LBP, sendo as doses de 0,5 J/cm² e 3,0 J/cm² as mais eficientes para esse tipo de células em cultura. No ano seguinte (2013), Basso et al.¹⁵ demonstraram que a LBP também promoveu efeito bioestimulatório sobre cultura de células epiteliais, aumentando a atividade metabólica, o número de células viáveis, bem como a expressão gênica do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF).

A LBP tem resultado em efeitos bioestimulatórios promissores sobre células da mucosa oral, tanto em pesquisas in vitro quanto in vivo^{5, 13, 32, 42, 111}, o que determinou que este tipo de terapia pudesse ser uma alternativa interessante para o tratamento de alguns tipos de lesões na cavidade oral.

Apesar de diversos estudos terem anteriormente avaliado o processo de senescência e suas alterações celulares, ainda existe a necessidade de se investigar os mecanismos que envolvem o reparo da mucosa oral, particularmente através da análise comparativa entre indivíduos jovens e idosos submetidos ou não a diferentes modalidades terapêuticas^{22, 29}.

Segundo a literatura, pesquisas utilizando cultura celular fornecem respostas adequadas e confiáveis quando se pretende avaliar o comportamento celular e o processo de senescência durante o processo de reparo^{22, 29, 41}. Dessa maneira, o presente estudo pretende avaliar algumas funções celulares dos fibroblastos de gengiva, as quais apresentam importância durante o processo de reparo tecidual da cavidade oral frente à senescência celular e a utilização de terapias como a LBP e fator de crescimento (EGF) com o objetivo de auxiliar esse processo.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Objetivo geral

Baseado na literatura científica, a qual relata a relação entre envelhecimento de fibroblastos de pele e reparo tecidual, esse estudo teve como objetivo principal analisar, de maneira comparativa, o metabolismo dos fibroblastos de gengiva obtidos de pacientes jovens e idosos e a capacidade de resposta destas células frente a diferentes estímulos relacionados à indução ou atraso do processo de reparo da mucosa oral.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Estudo 1 - Diferenças funcionais envolvidas na capacidade de reparo de fibroblastos obtidos da gengiva de indivíduos jovens e idosos

Avaliar diferenças funcionais envolvidas na capacidade de reparo: viabilidade, produção de proteínas e síntese de colágeno dos fibroblastos de gengiva obtidos de pacientes jovens e idosos.

3.2.2 Estudo 2 - Capacidade de reparo e comparação da resposta dos fibroblastos obtidos da gengiva de indivíduos jovens e idosos frente ao TNF alfa

Avaliar a resposta dos fibroblastos de gengiva obtidos de pacientes jovens e idosos quando expostos ao Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) por meio da análise da produção de mediadores inflamatórios.

3.2.3 Estudo 3 - Efeito da laserterapia de baixa potência ou do fator de crescimento epidérmico sobre a atividade de fibroblastos obtidos da gengiva de indivíduos jovens e idosos

Avaliar a viabilidade de fibroblastos da gengiva obtidos de pacientes jovens e idosos, submetidos ou não à laserterapia de baixa potência (LBP) e ao tratamento com fator de crescimento epidérmico (EGF).

Avaliar a migração de fibroblastos da gengiva obtidos de pacientes jovens e idosos, submetidos ou não à laserterapia de baixa potência (LBP) e ao tratamento com fator de crescimento epidérmico (EGF).

Avaliar a síntese de colágeno pelos fibroblastos da gengiva obtidos de pacientes jovens e idosos, submetidos ou não à laserterapia de baixa potência (LBP) e ao tratamento com fator de crescimento epidérmico (EGF).

Avaliar a síntese de fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) pelos fibroblastos da gengiva obtidos de pacientes jovens e idosos, submetidos ou não à laserterapia de baixa potência (LBP) e ao tratamento com fator de crescimento epidérmico (EGF).

4 MATERIAL E MÉTODO

Obtenção das amostras

Foram obtidas amostras de tecido gengival da papila dental de aproximadamente 1 milímetro, de 6 pacientes, sendo 3 deles jovens (18-25 anos) e 3 idosos sem comprometimento intelectual (acima de 65 anos), durante procedimento de extração dentária, instalação de implantes em áreas edêntulas ou regularização de rebordos. Como critérios de exclusão, foram considerados os seguintes fatores: presença de doenças sistêmicas, uso de medicamentos, tabagismo e presença de doença periodontal, sendo que estas informações foram obtidas através de cuidadosa anamnese e avaliação clínica. Todos os procedimentos propostos neste estudo foram realizados de acordo com as normas do Comitê de Ética em pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara FOAr/UNESP, após aprovação do protocolo de pesquisa # CAEE 13514813.6.0000.5416 (Anexo 1) e com prévio consentimento dos pacientes, por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Cultura Celular

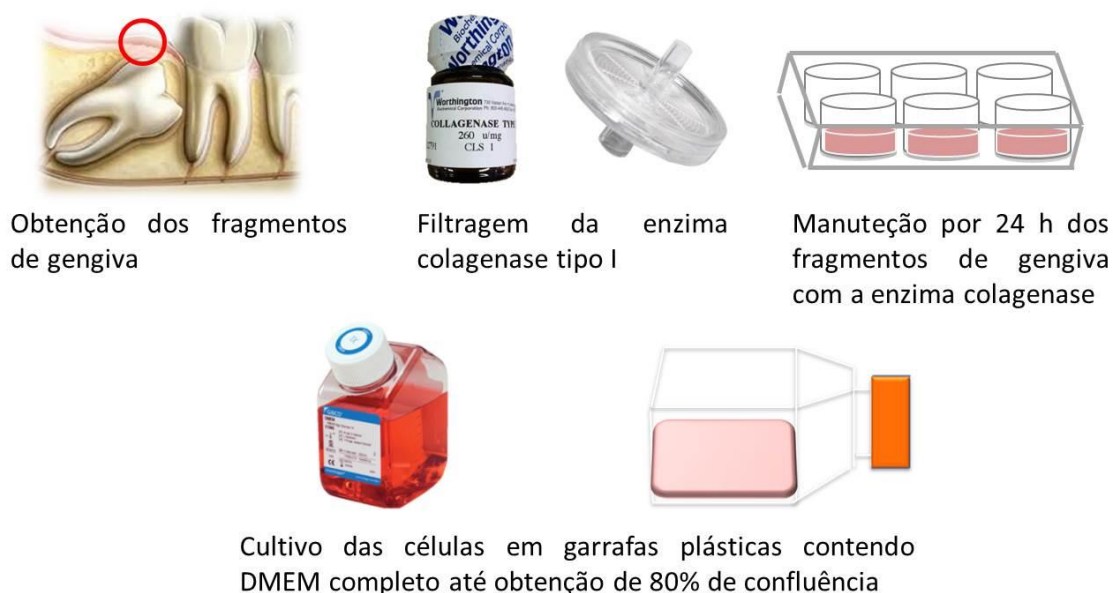
O fragmento de gengiva obtido de cada paciente foi colocado em tubo Falcon de 15 mL, (TPP - Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça), previamente identificado, contendo meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco, Carlsbad, CA, EUA) com corante fenol red e acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco) e solução antibiótica/antimicótica (10.000 unidades/mL de penicillina, 10.000 µg/mL de estreptomicina, e 25 µg/mL de Fungizone® - Gibco).

Os fibroblastos de gengiva foram isolados utilizando dissociação enzimática em collagenase tipo I (Worthington Biochemical Corp, Lakewood, NJ, EUA). Para proceder a digestão enzimática, os fragmentos de gengiva coletados foram colocados em placas de cultura de 6 compartimentos (TPP) contendo 3 mL de DMEM sem SFB e 3 mg/mL de collagenase tipo I.

Após 24 h de incubação à 37°C em atmosfera com 5% de CO₂ (Isotemp Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, EUA), o meio de cultura contendo as células isoladas (fibroblastos) e os fragmentos de tecido foram transferidos para um tubo Falcon de 15 mL (TPP). A seguir, foi realizada a centrifugação por 2 minutos (4.000 x g, Centrífuga Baby Fanem – Guarulhos, SP, Brasil) e o pellet celular formado foi re-suspendido em DMEM (1 mL) contendo 10% de SFB e transferido para um frasco de cultura celular de 75 cm² (TPP).

As células foram mantidas em incubadora à 37°C, em uma atmosfera de 5% de CO₂ até a obtenção de sub-confluência de 80% (Figura 1).

Figura 1 - Esquema representativo da obtenção de culturas primárias de fibroblastos de gengiva humanos.



As substituições do meio de cultura foram realizadas a cada 72 h e o crescimento celular avaliado a cada 24 h. O sub-cultivo celular foi realizado utilizando solução de Tripsina 0,25% (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), a partir da observação da sub-confluência, sendo que este procedimento foi repetido até que se obtivesse o número de células adequado para a realização do estudo.

4.1 Estudo 1 - Diferenças funcionais envolvidas na capacidade de reparo de fibroblastos obtidos da gengiva de indivíduos jovens e idosos

4.1.1 Grupos experimentais

Os grupos experimentais e controle para a comparação das funções celulares entre fibroblastos de gengiva de indivíduos jovens e idosos estão representados na Tabela 1.

Tabela 1 - Definição dos grupos experimentais

Grupos	Idade
Jovem	18-25 anos
Idoso	Acima 65 anos

*n=36 por grupo, sendo 12 amostras de cada indivíduo, realizado em duplicata

4.1.2 Cultivo Celular

Para a comparação das funções celulares e resposta dos fibroblastos de gengiva obtidos de indivíduos jovens as células foram cultivadas por 24 h em placas de 96 compartimentos (TPP) na densidade de 9×10^3 células/compartimento em meio de cultura contendo 10% de SFB por 24, 48 e 72 horas. Foram utilizadas células entre as passagens 3 a 6, sendo que para cada experimento foram utilizadas as mesmas passagens para todos os pacientes.

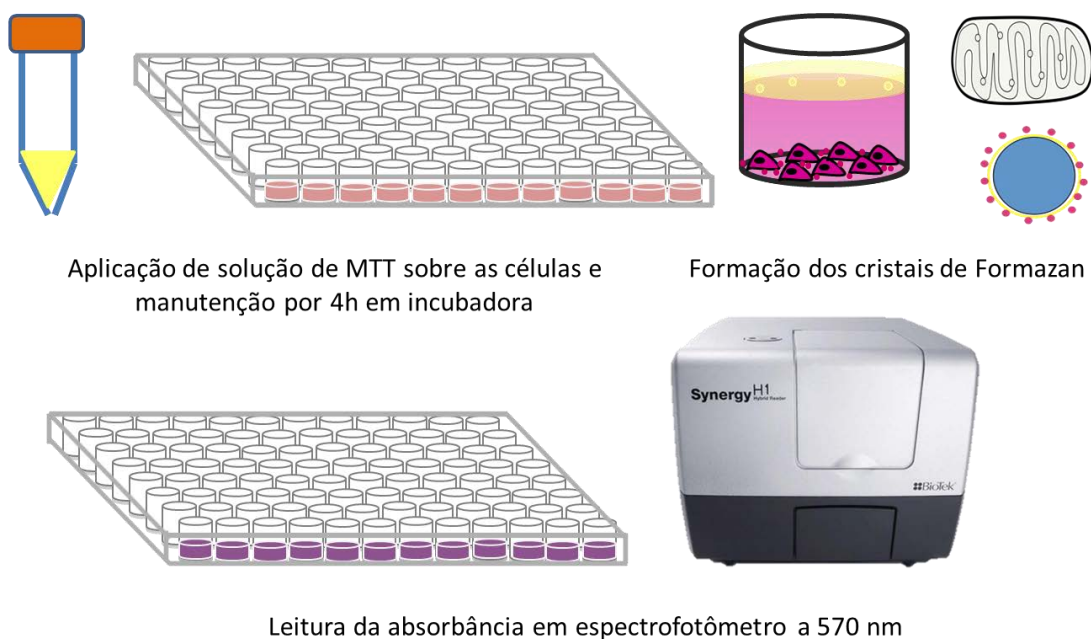
4.1.3 Avaliação da viabilidade celular pelo teste de MTT

A viabilidade celular foi determinada por meio do ensaio colorimétrico de metiltetrazolium (MTT Assay)^{13, 15}. Este método determina a atividade respiratória das células em cultura por meio da clivagem do sal de MTT (3-(4,5-

dimetiltriazol-2yl)-2,5 difenil brometo de tetrazolina – Sigma-Aldrich), pela enzima desidrogenase succínica. Esta clivagem, por sua vez, dá origem ao cristal de formazan. A quantidade de cristais de formazan determina a atividade respiratória das células, a qual corresponde à taxa de viabilidade celular.

Sobre as células cultivadas em placas de 96 compartimentos foram adicionados 90 μ L de meio de cultura (DMEM) sem soro fetal bovino e 10 μ L de solução de MTT (5 mg/mL do sal metiltetrazolium em PBS 1X). As células permaneceram em contato com a solução de MTT em estufa à 37°C por 4h onde observou-se a formação de cristais de formazan. Após este período, a solução de MTT foi aspirada e substituída por 100 μ L da solução de isopropanol acidificada (0,04 N de HCl), para solubilização dos cristais, gerando uma solução homogênea a qual foi submetida a análise de absorbância em espectrofotômetro (Synergy H1 – Biotek, Winooski, VT, EUA) no comprimento de onda de 570nm (Figura 2). A absorbância expressa em valores numéricos foi transformada em porcentagem em função do grupo das células dos indivíduos jovens, considerado como controle, no período de 24h e submetida à análise estatística indicando o efeito da atividade mitocondrial das células^{13, 15}.

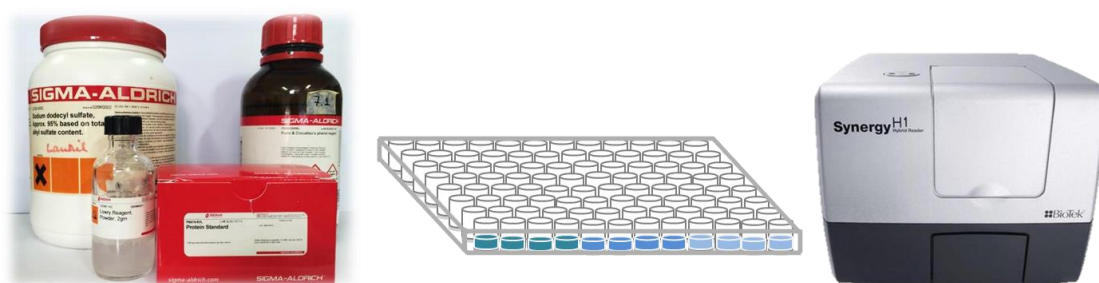
Figura 2 - Esquema representativo do ensaio de viabilidade celular pelo teste de MTT.



4.1.4 Análise da produção de proteína total pelo método de Lowry

A análise da produção de proteína total foi realizada através do método de Lowry⁹⁰. O meio de cultura foi aspirado e 100 μ L da Solução de Lauril Sulfato de Sódio 0,1% (Sigma – Aldrich) foram adicionados em cada amostra, as quais permaneceram incubadas por 40 minutos em temperatura ambiente para promover a lise celular. Em seguida, 100 μ L do reagente de Lowry (Sigma– Aldrich) foram adicionados em cada amostra por um período de 20 minutos. Após esse período, 50 μ L da Solução de Folin e Ciocalteu's Phenol Reagent (Sigma– Aldrich) foram adicionados e mantidos por 30 minutos. A seguir, absorbância das amostras foi avaliada em espectrofotômetro (Synergy H1 – Biotek) a 665 nm¹⁴. A absorbância expressa em valores numéricos foi transformada em porcentagem em função do grupo das células dos indivíduos jovens, considerado como controle, no período de 24 h (Figura 3).

Figura 3 - Esquema representativo do ensaio de produção de proteína total pelo método de Lowry.



Lise celular – lauril sulfato de sódio 0,1%
Reagente de Lowry
Reagente de Folin

Alíquotas de 100 μ L transferidas para placas de 96
compartimento para leitura em espectrofotômetro
a 665 nm

4.1.5 Análise da síntese de colágeno pelo ensaio de Sirius Red

A concentração de colágeno sintetizada pelos fibroblastos de gengiva em cultura foi determinada pelo método de Sirius Red. Este método baseia-se na ligação seletiva do corante Direct Red (Sigma-Aldrich) em ácido pícrico

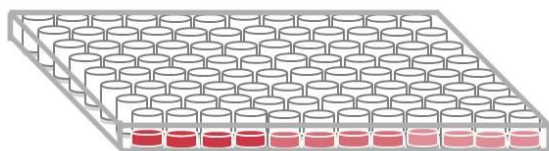
saturado às fibras colágenas dos tipos I a IV, quantificando o colágeno total solúvel presente na amostra¹¹⁰.

Para a realização deste ensaio, o meio de cultura foi coletado e armazenado a -20°C até a realização do teste. Aos 200 µL de meio de cultura coletados em tubos eppendorf de 1,5 mL foram adicionados 200 µL da solução de Direct Red (0,5M em ácido pícrico) sendo esta solução mantida por 60 minutos sob agitação (400 rpm, temperatura ambiente - Thermomixer – Confort – Eppendorf, Hamburg, Alemanha). Em seguida, essa solução foi centrifugada em microcentrifuga refrigerada (Eppendorf 5415R – Hamburg, Alemanha) por 10 minutos a 12000 rcf. O sobrenadante foi dispensado, e 300 µL de ácido clorídrico (HCL - 0,1M) foram adicionados, seguido de centrifugação por 10 minutos a 12000 rcf. O sobrenadante foi novamente descartado e 250 µL de hidróxido de sódio (NaOH - 0,5M) adicionados para a homogeneização das amostras sob agitação vigorosa. Alíquotas de 100 µL em duplicata da solução foram transferidas para placas de 96 compartimentos e a análise da absorbância realizada no comprimento de 555 nm em espectrofotômetro (Synergy H1 – Biotek). A absorbância expressa em valores numéricos foi transformada em porcentagem em função do grupo das células dos indivíduos jovens, considerado como controle, no período de 24h (Figura 4).

Figura 4 - Esquema representativo do ensaio de síntese de colágeno pelo teste de Sirius Red.



Adição de corante Direct Red saturado em Ácido Pícrico e manutenção em shaker por 1h a temperatura ambiente



Leitura da absorbância em espectrofotômetro a 555 nm

4.2 Estudo 2 – Capacidade de resposta de fibroblastos obtidos da gengiva de indivíduos jovens e idosos frente ao TNF alfa

4.2.1 Grupos experimentais

Os grupos experimentais e controle, referentes à análise da produção de mediadores inflamatórios, estão representados na Tabela 2.

Tabela 2 - Definição dos grupos experimentais	
Grupo (Idade)	Tratamento
Jovem	-
Jovem	TNF - α
Idoso	-
Idoso	TNF - α

*n=36 por grupo, sendo 12 amostras de cada indivíduo, realizado em duplicata

4.2.2 Cultivo Celular

Os fibroblastos foram cultivados em placas de 96 compartimentos na densidade de 9×10^3 células/compartimento em meio de cultura completo contendo 10% de SFB por 24 horas.

4.2.3 Aplicação de mediador inflamatório TNF- α

Para a comparação da resposta dos fibroblastos obtidos da gengiva de indivíduos jovens e idosos frente ao mediador inflamatório, 100 ng/mL de TNF- α foram mantidos em contato com as células por 24 h, conforme os grupos estabelecidos (Tabela 2). Este estímulo foi selecionado de acordo com estudo piloto, o qual comparou a expressão de citocinas inflamatórias como resposta dos fibroblastos de gengiva frente a diferentes estímulos com Lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* (*E.coli*), LPS de *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) e mediador inflamatório TNF- α .

Após esse período, foram avaliadas a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), óxido nítrico (NO) e a síntese das quimiocina CCL5.

4.2.4 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)

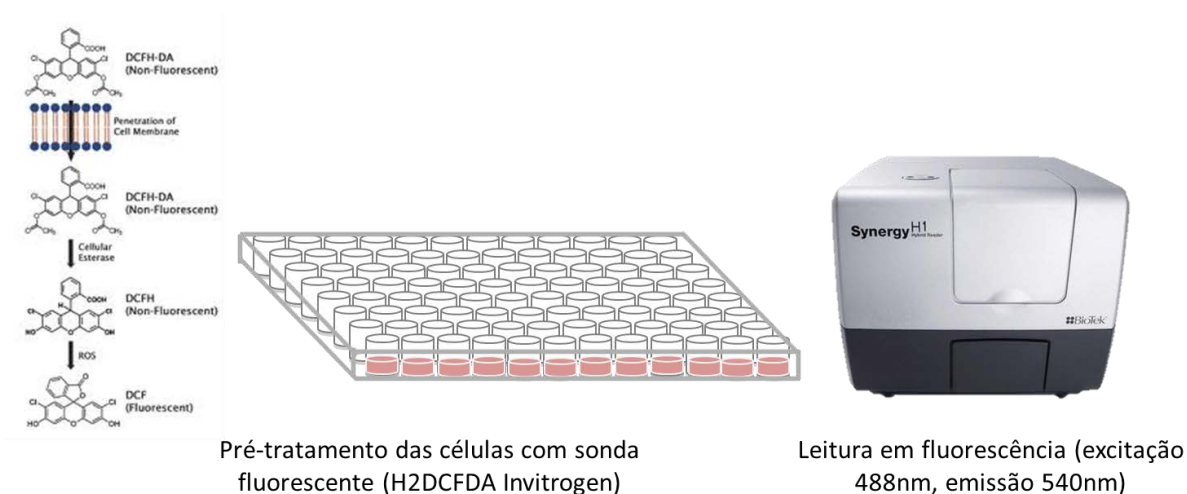
A produção de espécies reativas de oxigênio está diretamente relacionada ao estresse oxidativo, causando a peroxidação de moléculas e organelas celulares, que podem levar a danos irreversíveis⁹⁸. Porém, em baixas concentrações, estas moléculas podem estimular a proliferação e migração celulares, auxiliando o processo de reparo e homeostasia tecidual³. Na cavidade oral, o aumento da síntese de espécies reativas de oxigênio está relacionada à progressão da doença periodontal³¹.

Para a determinação da produção de espécies reativas de oxigênio pelos fibroblastos de gengiva obtidos de pacientes jovens e idosos, uma sonda fluorescente (H2DCFDA Invitrogen, San Francisco, CA, EUA), foi utilizada. Essa sonda permite a detecção destes EROs intracelularmente, uma vez que a mesma é permeável à membrana celular, sendo capaz de se ligar às espécies reativas de oxigênio permanentemente.

Esta sonda foi adicionada ao meio de cultura previamente à aplicação do LPS, para permitir a identificação imediata das EROs, uma vez que estas são moléculas altamente reativas e instáveis⁹⁹, e a mesma foi mantida por 24 h, em associação ao tratamento.

Após 24 h, o meio de cultura foi aspirado e foram adicionados 500 µL de PBS a cada amostra. A quantidade de produção de EROs foi determinada pela intensidade de fluorescência da sonda em cada amostra por varredura de cada compartimento (excitação 488 nm, emissão 540 nm), em fluorímetro (Synergy H1 – Biotek) transformada em porcentagem em função do grupo das células dos indivíduos jovens, considerado como controle (Figura 5).

Figura 5 - Esquema representativo do ensaio de produção de EROs.



4.2.5 Avaliação da produção de Óxido Nítrico (NO)

O óxido nítrico também é um importante mediador inflamatório na resposta celular e tecidual, pois também é capaz de promover a proliferação celular³⁰. Porém, assim como as EROs, o efeito deste mediador está relacionado a sua concentração tecidual, sendo que em altas concentrações, o NO pode causar intenso dano tecidual⁶².

A quantificação de óxido nítrico (NO) produzido pelas células em cultura foi determinada utilizando o acúmulo de nitrito no sobrenadante da cultura de células por meio da reação de diazotação com o reagente de Griess (Sigma-Aldrich)^{21, 48}.

Alíquotas de 50 µL do meio de cultura que foi mantido em contato com as células durante o tratamento proposto foram transferidas para outra placa de cultura de 96 compartimentos e o reagente de Griess adicionado na mesma proporção. Após 10 minutos de incubação em temperatura ambiente na ausência de luz, a concentração de NO foi determinada por meio da absorbância da solução, determinada em espectrofotômetro a 540 nm (Synergy H1-Biotek). A absorbância foi transformada em porcentagem em função do grupo das células dos indivíduos jovens, considerado como controle (Figura 6).

Figura 6 - Esquema representativo do ensaio de produção de NO.



4.2.6 Avaliação da síntese de quimiocina CCL5

A quimiocina CCL5 é altamente expressas durante o processo inflamatório e está relacionada à migração de outras células inflamatórias³³.

A avaliação da síntese de quimiocina consiste num teste de imunoensaio ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay), baseado em uma reação antígeno-anticorpo, o qual foi realizado segundo recomendações do fabricante (R&D Systems, EUA, Minneapolis MN, EUA). Para tanto, o meio de cultura em contato com as células foi coletado e armazenado a -20°C até o momento da realização do ensaio.

Para o ensaio ELISA, as placas de 96 compartimentos foram tratadas com anticorpos primários específicos (2 $\mu\text{g/mL}$ – CCL5) e incubadas overnight. A seguir, foram realizadas lavagens (wash solution 2,5%), seguido de incubação com solução de bloqueio (BSA 1% em PBS - R&D Systems) por 1 h a temperatura ambiente. Após lavagem, foram adicionados 100 μL de cada amostra e curva padrão, com concentrações pré-determinadas de cada quimiocina e as placas foram incubadas por 2 h a temperatura ambiente, seguido de nova lavagem. A seguir, foi adicionado o anticorpo secundário (400 ng/mL – CCL5) e foram incubados por 2 h adicionais. Após lavagem, a streptavidina (1:400 em BSA 1% – R&D Systems) foi então adicionada às

amostras por 20 minutos na ausência de luz. Novas lavagens foram realizadas, e a substrate solution (R&D Systems) foi adicionada e mantida por 20 minutos. Por fim, a Stop solution foi adicionada para cessar a reação e a densidade óptica obtida das amostras mensurada por espectrofotômetro (Synergy H1-Biotek) no comprimento de onda de 450 nm⁸. As concentrações de CCL5 foram determinadas por meio de transformação dos valores da absorbância em porcentagem em função do grupo das células dos indivíduos jovens, considerado como controle (Figura 7).

Figura 7 - Esquema representativo do ensaio de síntese protéica de quimiocina CCL5 pelo teste de ELISA.



4.3 Estudo 3 - Efeito da laserterapia de baixa potência ou do fator de crescimento epidérmico sobre a atividade de fibroblastos obtidos da gengiva de indivíduos jovens e idosos

4.3.1 Grupos experimentais

Os grupos experimentais e controle para essa pesquisa estão representados na Tabela 3. Sendo os mesmos grupos experimentais e controle utilizados tanto para jovens quanto para idosos.

Tabela 3 - Divisão dos grupos experimentais dos fibroblastos gengivais obtidos dos indivíduos jovens e idosos

Tratamentos	
EGF 100 μ M	LBP (3 irradiações de 3,0 J/cm ²)
-	-
+	-
-	+

*Cada grupo experimental foi composto de 2 amostras de 3 indivíduos distintos, em duplicata, totalizando n=12

**Todos os grupos foram avaliados nos períodos de 72 h após os tratamentos propostos, de acordo com as metodologias descritas posteriormente

Para cada experimento realizado, foram utilizadas 2 amostras de cada linhagem primária, sendo o experimento realizado em duplicata.

4.3.2 Cultivo Celular

Para a avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de Alamar Blue® e síntese do fator de crescimento VEGF (ELISA), as células foram cultivadas por 24 h em placas de 24 compartimentos (TPP) na densidade de 3×10^4 células/compartimento em meio de cultura contendo 10% de SFB. Para o desenvolvimento do experimento de migração pelo ensaio de Wound Healing e síntese de colágeno (Sirius Red), as células foram cultivadas da mesma maneira que para os testes descritos acima, porém numa densidade de 8×10^4 células/compartimento. Foram utilizadas células entre as passagens 3 a 6 sendo que para cada experimento foram utilizadas as mesmas passagens para todos os pacientes.

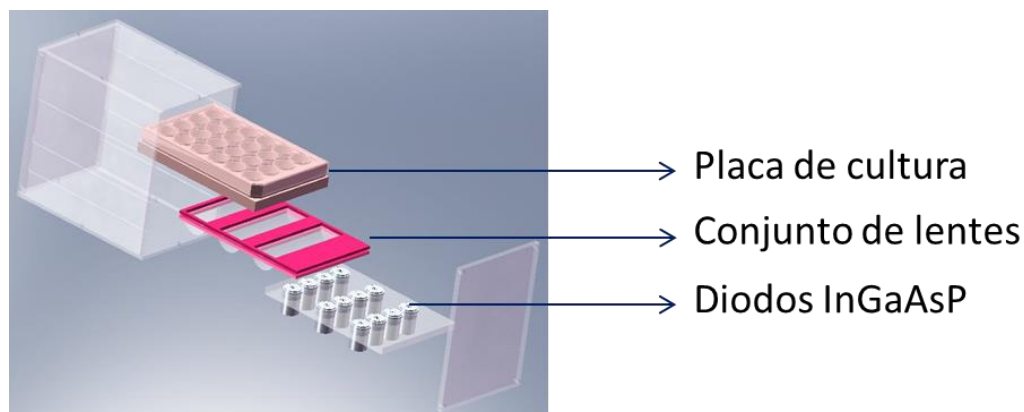
4.3.3 Irradiação

Para a irradiação das células, foi utilizado o dispositivo LASERTable (Figura 8), desenvolvido pelo Grupo de Óptica (GO) do Centro de Pesquisa em Óptica e Fotônica (CePOF) do Instituto de Física de São Carlos (IFSC) da Universidade de São Paulo (USP), sob orientação do Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato^{12-15, 85-87}. Este dispositivo é composto por 12 diodos que emitem um comprimento de onda de 780 nm. Este comprimento de onda foi selecionado baseado em estudos anteriores, nos quais foi determinado que o mesmo é capaz de promover aumento da proliferação celular e da síntese de fatores de crescimento em culturas de fibroblastos^{14, 15, 32, 43, 87}.

Diodos do tipo InGaAsP (arseneto de índio gálio e fosfato) estão posicionados na LASERTable de maneira a irradiar homogeneamente e de maneira individual, um total de 12 dos 24 compartimentos da placa de cultura celular (TPP). Esta disposição dos diodos evita a sobreposição da irradiação para outros compartimentos. Cada irradiação foi feita a uma distância padronizada das células em cultura (2,5 cm), sendo que lentes específicas direcionaram o feixe de luz de tal maneira a irradiar toda base de cada compartimento onde as células foram cultivadas. Assim, a área irradiada

corresponde à área de cada compartimento da placa de 24 compartimentos ($2,0 \text{ cm}^2$).

Figura 8 - Esquema representativo do dispositivo para irradiação (LASERTable) das células em cultura.



Para este experimento foram realizadas 3 irradiações com intervalos de 24 h entre cada irradiação com a densidade de energia de $3,0 \text{ J/cm}^2$ (Tabela 4). Esta densidade foi determinada considerando resultados obtidos por estudos anteriores, os quais demonstraram que estes parâmetros são capazes de promover aumento da proliferação, bem como metabolismo e expressão gênica de células de diferentes linhagens^{13-15, 37, 43, 64, 65, 87}.

Tabela 4 - Parâmetros de irradiação estabelecidos para o experimento.

Potência (W)	Comprimento de onda (nm)	Densidade de Energia (DE) (J/cm^2)	Distância (cm)	Área de Irradiação (cm^2)	Tempo de acordo com DE (s)
0,025	780	3,0	2,5	2,0	240

4.3.4 Adição do fator de crescimento EGF

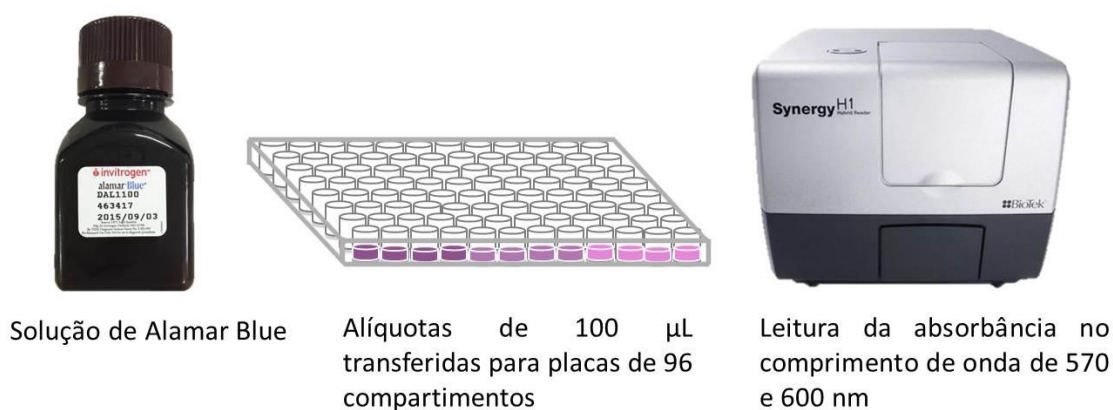
O fator de crescimento EGF (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi diluído em meio de cultura DMEM sem SFB ($100 \text{ }\mu\text{M}$), sendo esta

concentração estabelecida após estudo piloto, e esta solução foi aplicada sobre as células de acordo com os grupos estabelecidos e mantida em contato com as células conforme os grupos e períodos de avaliação.

4.3.5 Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de Alamar Blue®

O ensaio Alamar Blue® foi realizado para detectar a atividade metabólica celular através de indicador fluorimétrico. Este ensaio permite a avaliação da viabilidade das células em cultura, sem prejuízo para as mesmas, permitindo análises pareadas, de acordo com os períodos estabelecidos. Para isso, foi utilizado o reagente Alamar Blue® (Invitrogen), o qual se baseia na incorporação de um indicador de oxirredução que apresenta alteração de cor em resposta a redução química do meio de cultura em decorrência da respiração aeróbica. Assim, foi adicionado às células o equivalente a 10% do volume de cultura da solução de Alamar Blue® conjuntamente ao meio de cultura sem SFB (100 µL de solução de Alamar Blue® em 900 µL de meio de cultura). As células permaneceram em contato com a solução em incubadora em condições adequadas (37°C e 5% de CO₂) por 4 h. Após este período, 2 alíquotas de cada compartimento foram transferidas para uma placa de 96 compartimentos e a fluorescência das amostras foi avaliada em fluorímetro (Synergy – H1 – Biotek Winooski, VT, EUA) no comprimento de onda de 570 e 600 nm, no período de 72 h após os tratamentos (Figura 9).

Figura 9 - Esquema representativo do ensaio de viabilidade celular pelo teste de Alamar Blue®.



4.3.6 Avaliação da Migração Celular – Wound Healing

A capacidade de migração de fibroblastos de gengiva submetidos ou não ao tratamento com LBP ou EGF foi realizada através de um protocolo *in vitro* de cicatrização de feridas⁵⁵. Após 24 h do cultivo celular, uma “ferida” *in vitro* foi criada, utilizando-se para isto, a ponta de uma ponteira de 5 mL. A presença da “ferida” foi confirmada em microscópio de luz invertido (TS 100, Nikon, Tokyo, Japão).

A seguir, as células foram irradiadas utilizando o protocolo de irradiação (Tabela 4) e o fator de crescimento foi adicionado conforme descrito anteriormente. A migração celular foi avaliada nos períodos de 24, 48 e 72 h após estes tratamentos.

A análise da migração dos fibroblastos de gengiva para a área central da ferida foi determinada por fotografias obtidas através de câmera acoplada a microscópio de luz invertida de cada compartimento da placa nos períodos de avaliação propostos. Tal como anteriormente descrito por Basso et al.¹³ (2012), as áreas das feridas foram analisadas em microscópio óptico (Olympus BX51, Miami, FL, EUA) equipado com câmera fotográfica (Olympus c 5060) e submetidas à análise por software Image J (Wayne Rasband, National Institute of Mental Health, EUA) através da mensuração da área da “ferida” (Figura 10).

Figura 10 - Esquema representativo do ensaio de migração celular pelo teste de Wound Healing.



4.3.7 Análise da síntese de colágeno pelo ensaio de Sirius Red

Este ensaio foi realizado conforme descrito anteriormente no Estudo 1. No entanto, o volume de meio de cultura coletado para realização desse teste assim como o volume de solução de Direct Red foram de 400 μ L. Além da determinação da concentração de síntese de colágeno ser determinada por meio de curva padrão com concentrações pré-determinadas de colágeno.

4.3.8 Análise da síntese do fator de crescimento VEGF

A avaliação da síntese de VEGF foi realizada por meio do imunoensaio ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay), da mesma maneira que foi avaliado a expressão da quimiocina CCL5 no Estudo 2. No entanto, a concentração dos anticorpos primários e secundários específicos utilizados para essa análise foi de 1,0 μ g/mL – VEGF e 100 ng/mL – VEGF, respectivamente.

4.4 Análise dos resultados

Devido a não aderência à curva normal, todos os dados referentes aos três estudos independentes foram analisados estatisticamente por meio dos testes não paramétricos de Kruskal-Wallis complementados por testes de Mann-Whitney, ao nível de significância de 5%, ou seja, grupos foram considerados estatisticamente diferentes quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Estudo 1 - Diferenças funcionais envolvidas na capacidade de reparo de fibroblastos obtidos da gengiva de indivíduos jovens e idosos

5.1.1 Análise da viabilidade celular pelo ensaio de MTT

Os resultados obtidos a partir da avaliação comparativa da viabilidade dos fibroblastos obtidos da gengiva de pacientes jovens (J) e idosos (I), através do ensaio de MTT, estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Viabilidade celular (% J 24 horas) por fibroblastos obtidos do tecido gengival de pacientes jovens e idosos, avaliada em 24, 48 ou 72 h

Período	Idade	
	JOVENS	IDOSOS
24 h	103,9 (90,7-114,5) A b*	182,7 (173,8-200,9) A a
48 h	108,0 (88,5-117,7) A b	115,9 (111,1-131,2) B a
72 h	102,0 (92,1-117,7) A a	81,1 (78,7-92,5) C b

Valores são medianas (percentil 25-percentil 75), n=36. *Letras minúsculas permitem comparação nas linhas e letras maiúsculas permitem comparação nas colunas. Valores com letras iguais não diferem estatisticamente entre si (Mann-Whitney, $p > 0,05$).

Quando realizada a comparação da viabilidade celular no grupo composto por células obtidas de tecido gengival de indivíduos jovens, não foi observada diferença estatística nos diferentes períodos avaliados ($p > 0,05$). No entanto, para o grupo de células de indivíduos idosos houve uma redução gradativa da viabilidade celular com o decorrer dos períodos de incubação ($p < 0,05$). Comparados os fibroblastos J e I para cada período avaliado, observa-se maior viabilidade para as células I nos períodos de 24 e 48 horas, ($p < 0,05$).

5.1.2 Análise da produção de proteína total pelo método de Lowry

Os resultados obtidos a partir da avaliação comparativa da produção de proteína total pelos fibroblastos de gengiva obtidos de pacientes jovens e idosos estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Produção de proteína total (% J 24 horas) por fibroblastos obtidos do tecido gengival de pacientes jovens e idosos, avaliada em 24, 48 ou 72 h

Período	Idade	
	JOVENS	IDOSOS
24 h	97,5 (78,0-122,4) A b*	122,4 (103,4-168,6) A a
48 h	96,1 (82,5-109,9) A a	89,0 (79,1-100,2) B a
72 h	89,6 (75,9-106,1) A a	89,2 (80,3-107,0) B a

Valores são medianas (percentil 25-percentil 75), n=36. *Letras minúsculas permitem comparação nas linhas e letras maiúsculas permitem comparação nas colunas. Valores com letras iguais não diferem estatisticamente entre si (Mann-Whitney, $p > 0,05$).

Quando comparados os grupos de fibroblastos gengivais dos indivíduos jovens nos diferentes períodos de avaliação não foi observada diferença estatística na produção de proteína total ($p > 0,05$). No grupo dos fibroblastos gengivais dos indivíduos idosos nota-se uma maior produção de proteína total ocorreu no período de 24 horas ($p > 0,05$). Comparando-se os grupos de células dos indivíduos jovens e idosos dentro de cada período avaliado, a produção de proteína total foi maior apenas no período de 24 h pelas células dos indivíduos idosos.

5.1.3 Análise da síntese de colágeno pelo método de Sirius Red

Os resultados obtidos a partir da avaliação comparativa da síntese de colágeno pelos fibroblastos de gengiva obtidos de pacientes jovens e idosos estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Produção de colágeno (% J 24 horas) por fibroblastos obtidos do tecido gengival de pacientes jovens e idosos, avaliada 24, 48 ou 72 horas

Período	Idade	
	JOVENS	IDOSOS
24 h	99,7 (98,0-103,0) A a*	97,8 (94,5-101,6) A a
48 h	100,1 (97,3-103,8) A a	90,2 (83,9-97,6) B b
72 h	103,6 (100,0-107,3) A a	103,0 (97,4-106,8) A a

Valores são medianas (percentil 25-percentil 75), n=36. *Letras minúsculas permitem comparação nas linhas e letras maiúsculas permitem comparação nas colunas. Valores com letras iguais não diferem estatisticamente entre si (Mann-Whitney, $p > 0,05$).

De acordo com os resultados obtidos, pode-se observar que não houve diferença estatística na síntese de colágeno no grupo de células dos indivíduos jovens independente do período avaliado ($p > 0,05$). Para o grupo de células dos indivíduos idosos, uma redução da síntese de colágeno foi observada no período de 48 h, apresentando-se também inferior à produção de colágeno pelas células dos indivíduos jovens quando comparados dentro deste mesmo período ($p > 0,05$).

5.2 Estudo 2 – Capacidade de resposta dos fibroblastos obtidos da gengiva de indivíduos jovens e idosos frente ao TNF alfa

5.2.1 Análise da produção de Óxido Nítrico (NO)

Os resultados obtidos a partir da avaliação comparativa da produção de NO pelos fibroblastos de gengiva obtidos de pacientes jovens e idosos na presença de TNF- α estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Produção de óxido nítrico (% controle jovens) por fibroblastos obtidos do tecido gengival de pacientes jovens e idosos, em função da presença de TNF- α

Tratamento	Idade	
	JOVENS	IDOSOS
Controle	99,79 (97,94 - 102,64) B a*	99,03 (95,08 - 105,56) B a
TNF- α	174,43 (172,47 - 175,82) A a	169,63 (168,11 - 171,12) A b

Valores são medianas (percentil 25-percentil 75), n=36. *Letras minúsculas permitem comparação nas linhas e letras maiúsculas permitem comparação nas colunas. Valores com letras iguais não diferem estatisticamente entre si (Mann-Whitney, $p > 0,05$).

De acordo com os resultados obtidos os fibroblastos da gengiva obtidos dos indivíduos jovens apresentaram aumento na produção de NO quando expostos ao TNF- α , sendo esse aumento maior nas células dos indivíduos jovens se comparado aos idosos ($p > 0,05$).

5.2.2 Análise da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

Os resultados obtidos a partir da avaliação comparativa da produção de EROs pelos fibroblastos de gengiva obtidos de pacientes jovens e idosos na presença de TNF- α estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Produção de EROs (% Controle jovens), por fibroblastos obtidos do tecido gengival, em função da presença de TNF- α

Tratamento	Idade	
	JOVENS	IDOSOS
Controle	77,35 (66,41 - 102,54) A a*	68,21 (59,30 - 119,37) A a
TNF- α	82,44 (62,34 - 118,07) A a	63,12 (54,21 - 107,15) A a

Valores são medianas (percentil 25-percentil 75), n=36. *Letras minúsculas permitem comparação nas linhas e letras maiúsculas permitem comparação nas colunas. Valores com letras iguais não diferem estatisticamente entre si (Mann-Whitney, $p > 0,05$).

Quando realizada a avaliação da produção de EROs pelos fibroblastos de gengiva obtidos de pacientes jovens e idosos, não foi observada diferença estatística quando estes estiveram em presença do TNF- α ($p > 0,05$)

5.2.3 Análise da expressão de quimiocina inflamatória CCL5

Os resultados obtidos a partir da avaliação comparativa da síntese de CCL5 pelos fibroblastos de gengiva obtidos de pacientes jovens e idosos na presença de TNF- α estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Síntese protéica de CCL5 (% Controle jovens), por fibroblastos obtidos do tecido gengival, em função da presença de TNF- α

Tratamento	Idade	
	JOVENS	IDOSOS
Controle	100,02 (96,10 - 106,34) Ba*	99,24 (92,07 - 108,63) Ba
TNF- α	1700,23 (1552,22 - 1790,45) Aa	1446,08 (1103,35 - 2221,46) Aa

Valores são medianas (percentil 25-percentil 75), n=12. *Letras minúsculas permitem comparação nas linhas e letras maiúsculas permitem comparação nas colunas. Valores com letras iguais não diferem estatisticamente entre si (Mann-Whitney, $p > 0,05$).

Quanto à síntese protéica de CCL5, foi observado um aumento desta síntese pelas células quando estas foram expostas ao TNF- α independente da idade, sem diferença estatística entre eles ($p < 0,05$).

5.3 Estudo 3 - Efeito da laserterapia de baixa potência ou do fator de crescimento epidérmico sobre a atividade de fibroblastos obtidos da gengiva de indivíduos jovens e idosos

5.3.1 Análise da viabilidade celular pelo ensaio de Alamar Blue®

Os resultados obtidos a partir da avaliação da viabilidade dos fibroblastos de gengiva obtidos de pacientes jovens e idosos, submetidos aos diferentes tratamentos propostos através do ensaio de Alamar Blue®, estão apresentados nas Tabelas 11 e 12, respectivamente.

Tabela 11 - Viabilidade celular (% do controle) dos fibroblastos obtidos do tecido gengival dos indivíduos jovens em função da terapia utilizada

Tratamento	Viabilidade Celular (%)
Controle	100,00 (80,21 -118,01) B*
EGF	123,61 (95,43 -144,68) AB
LBP	160,71 (125,93 -189,85) A

Valores são medianas (percentil 25-percentil 75), n=12. *Valores com letras iguais não diferem estatisticamente entre si (Mann-Whitney, $p > 0,05$).

Tabela 12 - Viabilidade celular (% do controle) dos fibroblastos obtidos do tecido gengival dos indivíduos idosos em função da terapia utilizada

Tratamento	Viabilidade Celular (%)
Controle	100,00 (91,11 -109,83) B*
EGF	110,32 (99,30 -118,98) AB
LBP	115,31 (105,83 -122,66) A

Valores são medianas (percentil 25-percentil 75), n=12. *Valores com letras iguais não diferem estatisticamente entre si (Mann-Whitney, $p > 0,05$).

A irradiação dos fibroblastos gengivais obtidos de indivíduos jovens e idosos com laser de baixa potência, caracterizada pela aplicação tripla na dose de $3,0 \text{ J/cm}^2$, resultou em aumento da viabilidade celular quando comparados ao grupo controle ($p < 0,05$).

5.3.2 Análise da migração celular pelo ensaio de Wound Healing

Os resultados obtidos da avaliação da migração dos fibroblastos dos pacientes jovens e idosos, através do ensaio de Wound Healing, estão apresentados nas Tabelas 13 e 14, respectivamente.

Tabela 13 - Área da lesão (área em $\text{mm}^2 \times 10^4$) em função da terapia utilizada e do período de avaliação, para fibroblastos obtidos do tecido gengival dos indivíduos jovens

Período	Tratamento		
	Controle	EGF	LBP
24	20,05(17,71- 32,82) B b*	12,87(2,17-16,52) A a	7,96(6,94-12,70) A a
48	20,04(13,95-25,49) B b	11,12(6,50-14,33) A a	6,11(3,66-11,38) A a
72	12,63(9,67-16,97) A b	9,39(2,97-12,51) A ab	4,47(2,55-8,56) A a

Valores são medianas (percentil 25-percentil 75), n=12. *Letras minúsculas permitem comparação nas linhas e letras maiúsculas permitem comparação nas colunas. Valores com letras iguais não diferem estatisticamente entre si (Mann-Whitney, $p > 0,05$).

Tabela 14 - Área da lesão (área em $\text{mm}^2 \times 10^4$) em função da terapia utilizada e do período de avaliação, para fibroblastos obtidos do tecido gengival dos indivíduos idosos

Período (h)	Tratamento		
	Controle	EGF	LBP
24	33,39(16,09- 39,66) A b*	25,96(8,64-39,08) A ab	7,64(2,86-21,96) A a
48	21,58(13,29-28,39) A b	11,45(6,14-18,66) A ab	10,17(5,98-14,66) A a
72	21,78(9,42-25,45) A c	13,35(9,93-16,33) A b	8,14(4,27-12,68) A a

Valores são medianas (percentil 25-percentil 75), n=12. *Letras minúsculas permitem comparação nas linhas e letras maiúsculas permitem comparação nas colunas. Valores com letras iguais não diferem estatisticamente entre si (Mann-Whitney, $p > 0,05$).

Maior migração de células, ou seja, redução da área da “ferida” *in vitro*, ocorreu no grupo dos fibroblastos obtidos dos indivíduos jovens não submetidos a qualquer tratamento, no período mais tardio de 72 h. Quando estas células foram submetidas às terapias propostas (aplicação de EGF ou

irradiação com laser de baixa potência), independente do período de avaliação; nota-se aumento da migração das mesmas não havendo diferença entre os tratamentos propostos ($p < 0,05$).

Para as células do tecido gengival dos indivíduos idosos, nos períodos de 24 e 48 h, foi observada maior migração quando fibroblastos foram irradiados com o laser de baixa potência ($p < 0,05$). No período de 72 h, ambas as terapias se mostraram efetivas, promovendo maior migração celular quando comparado ao grupo controle, no entanto a irradiação com LBP exerceu maior efeito sobre as células ($p < 0,05$).

5.3.3 Análise da síntese de colágeno pelo método Sirius Red

Os resultados obtidos para avaliação da síntese de colágeno pelos fibroblastos dos indivíduos jovens e idosos, tratados com EGF ou LBP, através do ensaio de Sirius Red, estão apresentados nas Tabelas 15 e 16, respectivamente.

Tabela 15 - Síntese de colágeno (% do controle) dos fibroblastos obtidos do tecido gengival dos indivíduos jovens em função da terapia utilizada

Tratamento	Síntese de colágeno (% do controle)
Controle	97,61 (82,81 - 116,35) B*
EGF	168,20 (138,01 - 200,94) A
LBP	137,24 (100,79 - 171,90) A

Valores são medianas (percentil 25-percentil 75), $n=12$. *Valores com letras iguais não diferem estatisticamente entre si (Mann-Whitney, $p > 0,05$).

Tabela 16 - Síntese de colágeno (% do controle) dos fibroblastos obtidos do tecido gengival dos indivíduos idosos em função da terapia utilizada

Tratamento	Síntese de colágeno (% do controle)
Controle	98,24 (80,88 - 110,54) B*
EGF	141,38 (126,49 - 146,19) A
LBP	121,95 (110,37 - 130,74) A

Valores são medianas (percentil 25-percentil 75), n=12. *Valores com letras iguais não diferem estatisticamente entre si (Mann-Whitney, $p > 0,05$).

Aumento na síntese de colágeno ocorreu quando fibroblastos gengivais obtidos de indivíduos jovens e idosos foram submetidos a ambas modalidades terapêuticas propostas (fator de crescimento EGF ou 3 irradiações com laser de baixa potência na dose de $3,0 \text{ J/cm}^2$), quando comparados aos respectivos fibroblastos controle ($p < 0,05$).

5.3.4 Análise da síntese protéica do fator de crescimento VEGF pelo ensaio de ELISA

Os resultados obtidos para avaliação da síntese protéica do fator de crescimento VEGF pelos fibroblastos obtidos do tecido gengival dos pacientes jovens e idosos, através do ensaio de ELISA, estão representados nas Tabelas 17 e 18, respectivamente.

Tabela 17 - Síntese protéica de fator de crescimento VEGF, detectado pelo método ELISA (% do controle) dos fibroblastos obtidos do tecido gengival dos indivíduos jovens em função da terapia utilizada

Tratamento	Produção de VEGF (% do controle)
Controle	109,45 (60,91 - 126,37) B*
EGF	234,17 (148,50 - 323,88) A
LBP	120,59 (80,67 - 171,78) B

Valores são medianas (percentil 25-percentil 75), n=12. *Valores com letras iguais não diferem estatisticamente entre si (Mann-Whitney, $p > 0,05$).

Tabela 18 - Síntese protéica de fator de crescimento VEGF, detectado pelo método ELISA (% do controle) dos fibroblastos obtidos do tecido gengival dos indivíduos idosos em função da terapia utilizada

Tratamento	Produção de VEGF (% do controle)
Controle	100,91 (94,03 - 113,75) B*
EGF	122,03 (110,71 - 130,05) A
LBP	61,23 (50,25 - 87,26) C

Valores são medianas (percentil 25-percentil 75), n=12. *Valores com letras iguais não diferem estatisticamente entre si (Mann-Whitney, $p > 0,05$).

Quando comparados os tratamentos aplicados sobre as células obtidas de indivíduos jovens e idosos, observou-se maior síntese de VEGF quando as células foram expostas ao fator de crescimento EGF ($p < 0,05$), sendo que a laserterapia de baixa potência não causou estímulo significativo sobre as células em cultura. Para os fibroblastos provenientes de indivíduos idosos, também foi observado aumento significativo na síntese de VEGF após tratamento com EGF, sendo que esta atividade celular foi reduzida quando os estes fibroblastos foram irradiados com o laser nos parâmetros propostos neste estudo.

6 DISCUSSÃO

O reparo tecidual é um processo contínuo no qual moléculas e células se organizam de maneira a reestabelecer a homeostasia do tecido injuriado^{51, 92}. Para tanto, é necessário que eventos coordenados, tais como a liberação de fatores de crescimento e proteínas da matriz extracelular ocorram, de forma que as fases do processo de reparo (hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação do tecido) evoluam, promovendo a restauração do tecido^{47, 92}.

A capacidade de reparo da mucosa oral se deve, em grande parte, aos fatores intrínsecos deste tipo de tecido, tais como a presença de células estruturais com potencial de regeneração, intensa vascularização e alta taxa de renovação do tecido conjuntivo e do epitélio⁵¹. No entanto, é evidente que o fluido salivar também apresenta um papel importante durante este evento, proporcionando um ambiente propício para a rápida reparação da mucosa oral⁵¹.

Dentre os diferentes tipos celulares, os fibroblastos participam ativamente do processo de reparo tecidual, através da proliferação, migração e preenchimento da ferida, além de sintetizarem fatores de crescimento e moléculas da matriz extracelular⁵¹. Porém, a função e estrutura destas células podem ser alteradas por diferentes fatores, como a idade do indivíduo. Como observado por alguns pesquisadores, o processo de envelhecimento pode causar inibição da síntese de fatores de crescimento e de proteínas estruturais básicas, como o colágeno, bem como diminuição da expressão de fibronectina^{39, 103}, glicoproteína diretamente ligada à capacidade de adesão celular. Assim, a baixa quantidade de fibronectina expressa por células senescentes causa redução da capacidade de adesão celular, inibindo a migração e proliferação das células, os quais são processos interdependentes que apresentam papel fundamental no reparo tecidual³⁹.

Alguns pesquisadores têm comparado as propriedades de fibroblastos de pele adultos e fibroblastos gengivais adultos com fibroblastos fetais. Os resultados indicam que, ao contrário dos fibroblastos da pele de adultos, fibroblastos gengivais adultos apresentam muitas propriedades semelhantes com fibroblastos fetais, incluindo morfologia, crescimento, capacidade de migração, produção de fator estimulante de migração e de citocinas⁵¹. Dessa

maneira, é possível que fibroblastos gengivais sejam fenotipicamente únicos nos tecidos adultos, o que pode contribuir para a rápida cicatrização de feridas orais, com mínima formação de cicatrizes⁵¹.

Na presente pesquisa, quando avaliadas as funções celulares representadas pela viabilidade (MTT), produção de proteína total e síntese de colágeno pelos fibroblastos de gengiva dos indivíduos jovens e idosos, observou-se que as células J não foram afetadas pelo tempo em que permaneceram em cultura (24, 48 e 72 h). Já para os fibroblastos I, notou-se uma redução tempo-dependente. Além disso, foi observada uma maior viabilidade nos fibroblastos I quando comparados aos J nos períodos de 24 e 48 horas. Essa maior viabilidade nos períodos iniciais de avaliação pode ser resultado de uma adesão precoce das células senescentes⁵⁷, o que permite a estas células iniciar o processo mitótico de forma mais precoce quando comparadas às células dos indivíduos jovens. Entretanto, num estudo recente de Cáceres et al.²² (2014), foi demonstrado que fibroblastos da gengiva de indivíduos jovens apresentaram maior viabilidade, capacidade de remodelação do colágeno e de migração quando comparados à células obtidas de indivíduos idosos. Assim, os autores relataram que a senescência pode interferir negativamente em algumas funções dos fibroblastos gengivais humanos.

Também foi verificado no presente estudo que com o decorrer do tempo (48 e 72 horas), os fibroblastos I passam a reduzir sua produção de proteína total, o que pode sugerir alterações nas funções celulares dos indivíduos idosos como um processo de envelhecimento. As alterações nas funções celulares entre indivíduos jovens e idosos encontrados nesse estudo, juntamente com os dados já descritos na literatura estreitam a relação entre senescência e redução da capacidade de reparo.

Além da idade do indivíduo, o processo de reparo tecidual também pode ser influenciado por outros fatores, como a condição sistêmica e presença de inflamação^{40, 49}. No processo inflamatório, as elevadas concentrações de quimiocinas e mediadores inflamatórios podem induzir a formação local de espécies reativas de oxigênio (EROs) por diversas células^{27, 96}. A produção de EROs em baixas concentrações pode acelerar o processo de reparo; porém, em concentrações elevadas ou em exposições prolongadas, as EROs podem causar dano tecidual através da peroxidação lipídica de diferentes organelas,

como a membrana celular^{30, 71, 96}. No presente estudo, o TNF- α não exerceu influência sobre a produção de EROs; todavia, houve um aumento na formação de NO, o qual apresenta diversas funções fisiológicas tal como a propriedade bactericida. Tal como para as EROs, o NO em grandes concentrações também pode promover efeitos citotóxicos⁵⁰.

Nesta pesquisa *in vitro*, observamos a ocorrência de aumento significativo na produção de NO pelos fibroblastos J e I expostos ao TNF- α , o que corrobora com o estudo de Chung et al.²⁷ (2011), os quais demonstraram a elevação na síntese de NO relacionada à resposta inflamatória frente ao envelhecimento. Estes autores relacionaram este aumento de NO à maior ativação da via NFKb, a qual também regula positivamente a síntese de algumas citocinas inflamatórias, tais como o TNF- α , interleucina 1 beta (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6) e ciclooxigenase 2 (COX-2). Ainda segundo os autores, este fato pode estar relacionado à maior incidência de doenças inflamatórias crônicas em indivíduos idosos, como a periodontite.

Na inflamação dos tecidos da mucosa oral, a quimiocina CCL5, sintetizada por diferentes tipos celulares, como células T e fibroblastos, está presente em altas concentrações⁹⁷. Esta proteína participa ativamente no processo de reparo tecidual, induzindo a migração de diferentes tipos de células inflamatórias, como os leucócitos, para o sítio da inflamação^{33, 82}. No entanto, a manutenção da expressão desta citocina, com consequente manutenção do processo inflamatório, pode levar a cronificação da ferida, podendo estar relacionada também a perda de tecido ósseo¹⁰⁹, resultando no atraso do processo de reparo em tecidos lesionados da cavidade oral.

Foi demonstrado, no presente estudo, aumento na expressão de CCL5 pelos fibroblastos J e I expostos ao TNF- α , sem diferença estatística entre eles. Este dado científico confirmou que, independente da idade, os fibroblastos de gengiva de seres humanos apresentam capacidade de resposta inflamatória e ativação da migração de células envolvidas no processo de reparo.

A resposta inflamatória celular, representada pela capacidade de resposta a traumas ou a patógenos está diretamente relacionada a um processo de reparo eficaz. Durante o processo de reparo tecidual, a fase inflamatória promove a proliferação e migração das células através da síntese de mediadores inflamatórios^{72, 92}. Esta síntese, todavia, deve ser regulada, pois

o aumento da concentração local de mediadores inflamatórios ou ainda a manutenção destes mediadores por períodos prolongados nos tecidos orais também pode levar a um atraso do processo de reparo⁵⁴. Desta maneira, diferentes modalidades terapêuticas com o objetivo de acelerar o processo de reparo em cavidade oral têm sido amplamente propostas e estudadas^{26, 66, 93}. Na presente pesquisa, foi demonstrado que fibroblastos J e I submetidos à laserterapia apresentaram aumento de viabilidade quando comparados àqueles sem tratamento (controle). Este resultado indica que esse tipo de tratamento nos parâmetros utilizados pode acelerar a capacidade proliferativa dessas células, tal como previamente relatado por Basso et al.¹³ (2012). Estes pesquisadores verificaram que a laserterapia é capaz de estimular a proliferação e migração de células do epitélio oral.

Tem sido demonstrado que a migração celular é uma resposta biológica fundamental para o processo de reparo tecidual⁷⁸. A liberação de fatores de crescimento e proteínas no plasma faz com que as células modifiquem seu fenótipo e iniciem sua migração para o local da ferida⁷⁸. Durante este evento, protrusões citoplasmáticas e retração controlada dos focos de adesão são produzidos pelas células como resultado da expressão das proteínas envolvidas nesse processo e que podem influenciar no reparo das feridas^{19, 35}.

Estudos prévios com fibroblastos da mucosa gengival mostraram a alta capacidade dessas células em reorganizar sua matriz extracelular, sendo este fato diretamente relacionado à sua elevada capacidade de migração^{41, 70}. No presente estudo, foi observado que os fibroblastos J não tratados apresentaram maior migração no período de 72 horas. Uma possível explicação para isto seria o fato de que logo após a confecção mecânica da “ferida”, as células adjacentes tenham que se recuperar da agressão e então se aderir ao substrato, sendo que os períodos de 24 e 48 horas talvez não sejam suficientes para que ocorra este evento celular *in vitro*.

Também foi observado, neste estudo, que, de maneira geral, as terapias propostas promoveram maior migração celular, observada pelo ensaio de Wound Healing. Para os fibroblastos J, ambos os tratamentos resultaram em efeito bioestimulatório, enquanto que para as células I a laserterapia exerceu maior efeito sobre as células nos diferentes períodos de avaliação (24, 48 e 72 h). Nos últimos anos, a laserterapia de baixa potência (LBP) tem sido utilizada

para acelerar a reparação tecidual, uma vez que induz o aumento da vascularização local, síntese de colágeno e da proliferação celular^{34, 101}. Foi demonstrado que a absorção do laser pelas células promove aumento de seu metabolismo, caracterizado pela estimulação dos fotorreceptores da cadeia respiratória mitocondrial, alterações nos níveis de ATP celular, liberação de fatores crescimento, e síntese de colágeno^{67, 89}. AlGhamdi et al.² (2012) realizaram uma revisão de literatura, sendo que para isto os autores selecionaram e discutiram artigos onde a LBP foi utilizada para estimular a proliferação de células de diferentes linhagens. Os autores concluíram que a LBP estimula células em cultura. Todavia, os autores ressaltaram que a resposta à irradiação com laser é dose-dependente, sendo que este tipo de luz pode estimular ou inibir a proliferação celular.

Assim como previamente relatado por outros pesquisadores^{13, 32, 87}, o presente estudo demonstrou bioestimulação celular quando realizada a irradiação da cultura primária dos fibroblastos de gengiva com laser de baixa intensidade. Este dado corroborou com os achados prévios de Basso et al.¹³ (2012), os quais aplicaram os mesmos parâmetros de irradiação sobre fibroblastos.

Os fatores de crescimento são moléculas que regulam diversos eventos celulares capazes de promover a reparação dos tecidos através de sua ligação a receptores específicos expressos na superfície da membrana celular¹¹. Estes autores demonstraram que fibroblastos apresentam funções coordenadas por diversos fatores de crescimento, tais como EGF, fator de crescimento fibroblástico 2 (FGF-2), fator de crescimento transformador β (TGF- β), fator de crescimento plaquetário (PDGF) e fator de crescimento vascular endotelial (VEGF). Esses fatores podem atuar localmente, de maneira autócrina ou parácrina, exercendo seus efeitos biológicos e consequentemente participando efetivamente do amplo processo de regeneração tecidual⁸⁸. No entanto, os mecanismos de sinalização pelos quais esses fatores de crescimento regulam as funções dos fibroblastos permanecem pouco conhecidos.

Yeo et al.¹¹² (2002) relataram que células envelhecidas apresentam redução na expressão de receptores de superfície, o que pode ser um dos fatores responsáveis pela diminuição da resposta destas células a fatores de crescimento e agentes mitogênicos, mesmo na presença de altas

concentrações destas moléculas biologicamente ativas. Shiraha et al.¹⁰⁰ (2000) também demonstraram a redução na proliferação de fibroblastos dérmicos senescentes devido a discreta expressão de receptores de membrana sensíveis ao fator de crescimento epidérmico (EGF).

Johnson et al.⁵⁸ (1986) observaram que a diminuição da produção de colágeno nas culturas de fibroblastos gengivais estava diretamente relacionada com a idade do doador. Aumento na produção de collagenases, como já descrito por alguns autores, também pode induzir uma degradação ou inibição na síntese de colágeno pelos fibroblastos em cultura^{103, 104}. No presente estudo, foi observado, para os fibroblastos J e I, um aumento na síntese de colágeno quando estas células foram submetidas às diferentes terapias propostas (aplicação de fator de crescimento EGF ou LBP na dose de 3,0 J/cm²). Estes dados podem indicar que estas terapias talvez sejam capazes de inibir a produção de collagenases e estimular a produção de colágeno, principalmente nas células senescentes.

Acredita-se que o VEGF apresente papel fundamental na reparação dos tecidos, visto que a revascularização é um evento dinâmico necessário para que o processo cicatricial seja completo¹⁶. Durante o processo de angiogênese, diversos fatores de crescimento são expressos e regulados; porém sabe-se que o VEGF é o principal deles, capaz de promover migração endotelial, proliferação celular e aumento da permeabilidade vascular regulando a neovascularização e o reparo tecidual¹⁶. No presente estudo, foi verificado aumento na expressão de VEGF pelos fibroblastos expostos ao EGF, independente da idade do doador, o que indica que essa terapia pode auxiliar no processo de angiogênese e reparação tecidual. Todavia, quando os fibroblastos I foram irradiados, houve redução na síntese protéica desse fator de crescimento, indicando que os parâmetros de laser utilizados neste estudo talvez não sejam os mais indicados para estimular a produção desse tipo de fator de crescimento.

Os resultados obtidos de estudos in vitro devem ser avaliados de maneira cautelosa, visto que os dados científicos podem não representar efetivamente os amplos eventos observados durante o envelhecimento in vivo⁵⁷. Além disso, deve-se levar em consideração que cada indivíduo pode responder de maneira específica e única quando da ocorrência de uma lesão

tecidual. Desta maneira, o período de recuperação do tecido lesionado, a expressão de proteínas, moléculas e fatores de crescimento pode variar de acordo com cada indivíduo. Assim, estudos futuros devem ser realizados com o objetivo de explorar mais profundamente os efeitos celulares e moleculares envolvidos no processo de reparo tecidual e a influência do envelhecimento no mesmo.

7 CONCLUSÃO

7.1 Conclusão geral

Os resultados demonstraram que os fibroblastos de gengiva de indivíduos idosos apresentaram viabilidade e metabolismo reduzidos ao longo do tempo de cultivo; porém, mantiveram a capacidade de resposta frente ao estímulo. Além disso, a LBP, nos parâmetros avaliados, e o EGF, na concentração específica testada, foram eficazes na bioestimulação dos fibroblastos obtidos de pacientes jovens e idosos, sendo que ambas terapias parecem ser promissoras para a aceleração do reparo da mucosa oral.

7.2 Conclusões específicas

7.2.1 Estudo 1 - Diferenças funcionais envolvidas na capacidade de reparo de fibroblastos obtidos da gengiva de indivíduos jovens e idosos

Quanto às diferenças funcionais envolvidas na capacidade de reparo:

Os indivíduos idosos apresentaram maior viabilidade nos períodos iniciais de cultura; porém, redução gradativa desta viabilidade foi observada de acordo com os períodos avaliados. Estas células também apresentaram redução da produção de proteína total e de colágeno no período de 48 horas de cultura quando comparadas às células de indivíduos jovens.

7.2.2 Estudo 2 – Capacidade de resposta dos fibroblastos obtidos da gengiva de indivíduos jovens e idosos frente ao TNF alfa

Quanto à resposta dos fibroblastos da gengiva expostos ao Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α):

Os fibroblastos de gengiva apresentaram aumento da síntese de mediadores inflamatórios após a exposição ao TNF- α , independente da idade dos pacientes; porém, as células obtidas de pacientes jovens apresentaram maior síntese de NO.

7.2.3 Estudo 3 - Efeito da laserterapia de baixa potência ou do fator de crescimento epidérmico sobre a atividade de fibroblastos obtidos da gengiva de indivíduos jovens e idosos

- A LBP promoveu aumento da viabilidade celular nos fibroblastos da gengiva obtidos de pacientes jovens e idosos.

- A LBP e o EGF promoveram maior migração dos fibroblastos gengivais de pacientes jovens. Para os fibroblastos obtidos dos pacientes idosos apenas a LBP induziu aumento da migração celular.

- Ambos os tratamentos (LBP e EGF) promoveram aumento da síntese de colágeno pelos fibroblastos da gengiva obtidos de pacientes jovens e idosos.

- O tratamento com EGF promoveu aumentou a síntese protéica de fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) pelos fibroblastos da gengiva obtidos de pacientes jovens e idosos; porém, houve redução na síntese de VEGF quando as células foram submetidas à irradiação com laser.

REFERÊNCIAS*

1. Albin A, Pontz B, Pulz M, Allavena G, Mensing H, Muller PK. Decline of fibroblast chemotaxis with age of donor and cell passage number. *Cell Rel Res.* 1988; 8 (1): 23-37.
2. AlGhamdi KM, Kumar A, Moussa NA . Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. *Lasers Med Sci.* 2012; 27 (1): 237-49.
3. Allen RG, Tresini M. Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic Biol Med.* 2000; 28 (3): 463-99.
4. Almeida-Lopes L, Rigau J, Zângaro RA, Guidugli-Neto J, Jaeger MMM. 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.
5. Altay MA, Tasar F, Tosun E, Kan B. Low-level laser therapy supported surgical treatment of bisphosphonate related osteonecrosis of jaws: a retrospective analysis of 11 cases. *Photomed Laser Surg.* 2014; 32 (8): 468-75.
6. Anders JJ, Borke RC, Woolery SK, Van de Merwe WP. Low power lasers irradiation alters the rate of regeneration of the rat facial nerve. *Lasers Surg Med.* 1993; 13 (1): 72-82.
7. Andreescu CF, Mihai LL, Raescu M, Tuculina MJ, Cumpata CN, Ghergic DL. Age influence on periodontal tissues: a histological study. *Rom J Morphol Embryol.* 2013; 54 (3 Suppl): 811–5.
8. Aranha AM, Zhang Z, Neiva KG, Costa CAS, Hebling J, No JE. Hypoxia enhances the angiogenic potential of human dental pulp cells. *J Endod.* 2010; 36 (10): 1633-7.
9. Azevedo LH, Eduardo FP, Moreira MS, Eduardo CP, Marques MM. Influence of different power densities of LILT on cultured human fibroblast growth. *Lasers Med Sci.* 2006; 21 (2): 86-9.

*De acordo com o manual da FOAr/UNESP, adaptadas das normas Vancouver.
Disponível no site: <http://www.foar.unesp.br/#!/biblioteca/manual>

10. Balbino CA, Pereira LM, Curi R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Braz J Pharm Sci.* 2005; 41: 27-51.
11. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Rep Reg.* 2008; 16 (5): 585–601.
12. Basso FG, Oliveira CF, Fontana F, Bagnato VS, Hebling J, de Souza Costa CA. In vitro effect of low level laser therapy on typical oral microbial biofilms. *Braz Dent J.* 2011; 22 (6): 502-10.
13. Basso FG, Pansani TN, Turrioni APS, Bagnato VS, Hebling J, de Souza Costa CA. In vitro wound healing improvement by low-level laser therapy application in cultured gingival fibroblasts. *Int J Dent.* 2012; 2012:719452. Epub ahead of print (doi:10.1155/2012/719452).
14. Basso FG, Oliveira CF, Kurachi C, Hebling J, Costa CAS. Biostimulatory effect of low-level laser therapy on keratinocytes in vitro. *Lasers Med Sci.* 2013; 28 (2): 367-74.
15. Basso FG, Pansani TN, Oliveira CF, Turrioni AP, Soares DG, Hebling J, Costa CAS. Cytotoxic effects of zoledronic acid on human epithelial cells and gingival fibroblasts. *Braz Dent J.* 2013; 24 (6): 551-8.
16. Bates DO, Jones ROP. The roles of vascular endothelial growth factor in wound healing. *Int J Low Extrem Wounds.* 2003; 2 (2): 107–20.
17. Baxter GD. Therapeutic lasers: theory and practice. Livingstone: Churchill; 1997.
18. Beckerman H, De Bie R, Bouter I, De Cuyper H, Oostendorp R. The efficacy of laser therapy for musculoskeletal and skin disorders: a criteria based meta-analysis of randomized clinical trials. *Phys Ther.* 1992; 72 (7): 483-91.
19. Beurden HEV, Snoek PAM, Von den Hoff JW, Torensma R, Maltha JC, Kuijpers-Jagtman AM. In vitro migration and adhesion of fibroblasts from different phases of palatal wound healing. *Wound Rep Reg.* 2006; 14 (1): 66–71.
20. Bisht D, Gupta SC, Misra V, Mital VP, Sharma P. Effect of low intensity lasers radiation on healing of open skin wounds in rats. *Indian J Med Res.* 1994; 100: 43-6.

21. Bryan NS, Grishem MB. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. *Free Rad Biol Med*. 2007; 43 (5): 645 – 57.
22. Cáceres M, Oyarzun A, Smith PC. Defective wound-healing in aging gingival tissue. *J Dent Res*. 2014; 93 (7): 691-7.
23. Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. *J Biol Chem*. 1990; 265 (14): 7709–12.
24. Chen JD, Kim JP, Zhang K, Sarret Y, Wynn KC, Kramer RH, et al. Epidermal growth factor (EGF) promotes human keratinocytes locomotion on collagen by increasing the $\alpha 2$ integrin subunit. *Exp Cell Res*. 1993; 209 (2): 216-23.
25. Choi JK, Jang JH, Jang WH, Kim J, Bae IH, Bae J, et al. The effect of epidermal growth factor (EGF) conjugated with low-molecular-weight protamine (LMWP) on wound healing of the skin. *Biomaterials*. 2012; 33 (33): 8579-90.
26. Chor A, Azevedo AM, Nucci M. Successful treatment of oral lesions of chronic lichenoid grafts-vs.-host disease by the addition of low-level laser therapy to systemic immunosuppression. *Eur J Haematol*. 2004; 72 (3): 222–4.
27. Chung HY, Le EK, Choi YJ, Kim JM, Kim DH, Zou Y, et al. Molecular inflammation as an underlying mechanism of the aging process and age-related diseases. *J Dent Res*. 2011; 90 (7): 830 – 40.
28. Cochran DL, Wozney JM. Biological mediators for periodontal regeneration. *Periodontol 2000*. 1999; 19: 40-58.
29. Cristofalo VJ, Lorenzini A, Allen RG, Torres C, Tresini M. Replicative senescence: a critical review. *Mech Ageing Dev*. 2004; 125 (10-11): 827–48.
30. Daghigh F, Borghaei RC, Thornton RD, Bee JH. Human gingival fibroblasts produce nitric oxide in response to proinflammatory cytokines. *J Periodontol*. 2002; 73 (4): 392-400.
31. Dahiya P, Kamal R, Gupta R, Bhardwaj R, Chaudhary K, Kaur S. Reactive oxygen species in periodontitis. *J Indian Soc Periodontol*. 2013; 17 (4): 411-6.

32. Damante CA, De Micheli G, Miyagi SPH, Feist IS, Marques MM. Effect of laser phototherapy on the release of fibroblast growth factors by human gingival fibroblasts. *Lasers Med Sci.* 2009; 24 (6): 885-91.
33. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res.* 2009; 29 (6): 313-26.
34. Desmet KD, Paz DA, Corry JJ, Eells JT, Wong-Riley MT, Henry MM. Clinical and experimental applications of NIR-LED photobiomodulation. *Photomed Laser Surg.* 2006; 24 (2): 121-8.
35. Dunlevy JR, Couchman JR. Controlled induction of focal adhesion disassembly and migration in primary fibroblasts. *J Cell Sci.* 1993; 105 (2): 489–500.
36. Ebisawa K, Kato R, Okada M, Sugimura T, Latif MA, Hori Y, et al. Gingival and dermal fibroblasts: Their similarities and differences revealed from gene expression. *J Biosci Bioeng.* 2011; 111 (3): 255–8.
37. Eduardo FP, Mehnert DU, Monezi TA, Zezell DM, Schubert MM, Eduardo CP, et al. Cultured epithelial cells response to phototherapy with low intensity laser. *Lasers Surg Med.* 2007; 39 (4): 365-72.
38. Efendiev AI, Toslykh PI, Dadashev AI, Azimov SA. Increasing the scar strength after preventive skin irradiation with low-intensity lasers. *Klin Khir.* 1992; 1: 23-5.
39. Eleftheriou CS, Trakas NB, Tzartos SJ. Cellular ageing related proteins secreted by human fibroblasts. *Mutat Res.* 1991; 256 (2-6): 127-38.
40. Engeland CG, Bosch JA, Cacioppo JT, Marucha PT. Mucosal wound healing. *Arch Surg.* 2006; 141 (12): 1193-7.
41. Enoch S, Peake MA, Wall I, Davies L, Farrier J, Giles P, et al. 'Young' oral fibroblasts are geno/phenotypically distinct. *J Dent Res.* 2010; 89 (12): 1407-13.
42. Ejiri K, Aoki A, Yamaguchi Y, Ohshima M, Yzumi Y. High-frequency low-level diode laser irradiation promotes proliferation and migration of primary cultured human gingival epithelial cells. *Lasers Med Sci.* 2014; 29 (4): 1339-47.

43. Fujihara NA, Hiraki KRN, Marques MM. Irradiation at 780 nm increases proliferation rate of osteoblasts independently of dexamethasone presence. *Lasers Surg Med.* 2006; 38 (4): 332-6.
44. Fujisawa K, Miyamoto Y, Nagayama M. Basic fibroblast growth factor and epidermal growth factor reverse impaired ulcer healing of the rabbit oral mucosa. *J Oral Pathol Med.* 2003; 32 (6): 358-66.
45. Gao X, Xing D. Molecular mechanisms of cell proliferation induced by low power laser irradiation. *J Biomed Sci.* 2009; 16: 4.
46. Gibbs S, Silva ANP, Murli S, Huber M, Hohl D, Ponec M. Epidermal growth factor and keratinocyte growth factor differentially regulate epidermal migration, growth, and differentiation. *Wound Rep Reg.* 2000; 8 (3): 192–203.
47. Gosain A, DiPietro LA. Aging and wound healing. *World J Surg.* 2004; 28 (3): 321–6.
48. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.* 1982; 126 (1): 131-8.
49. Guo S, DiPietro LA. Factors affecting wound healing. *J Dent Res.* 2010; 89 (3): 219-29.
50. Gutiérrez-Venegas G, Kawasaki-Cárdenas P, Arroyo-Cruz SR, Maldonado-Frías S. Luteolin inhibits lipopolysaccharide actions on human gingival fibroblasts. *Eur J Pharmacol.* 2006; 541 (1-2): 95–105.
51. Häkkinen L, Uitto VJ, Larjava H. Cell biology of gingival wound healing. *Periodontol 2000.* 2000; 24: 127–52.
52. Hardwicke J, Schmaljohann D, Boyce D, Thomas D. Epidermal growth factor therapy and wound healing — past, present and future perspectives. *Surgeon.* 2008; 6 (3): 172-7.
53. Hawkins DH, Abrahamse H. The role of lasers fluence in cell viability, proliferation, and membrane integrity of wounded human skin fibroblasts following helium-neon lasers irradiation. *Lasers Surg Med.* 2006; 38 (1): 74-83.
54. Henry G, Garner WL. Inflammatory mediators in wound healing. *Surg Clin N Am.* 2003; 83 (3): 483–507.

55. Hoang AM, Oates TW, Cochran DL. In vitro wound healing responses to enamel matrix derivative. *J Periodontol.* 2000; 71 (8): 1270 – 7.
56. Huang YY, Chen AC, Carroll JD, Hamblin MR. Biphasic dose response in low level light laser. *Dose Response.* 2009; 7 (4): 358-83.
57. Hwang ES, Gyesoon Y, Kang HT. A comparative analysis of the cell biology of senescence and aging. *Cell Mol Life Sci.* 2009; 66 (15): 2503–24.
58. Johnson BD, Page RC, Narayanan AS, Pieters HP. Effects of donor age on protein and collagen synthesis in vitro by human diploid fibroblast. *Lab Invest.* 1986; 55 (4): 490-6.
59. Karu TI. Photobiological fundamentals of low level power laser therapy. *IEEE J. Quantum Eelectron.* 1987; 23: 1703-17.
60. Karu TI. Photobiology of low power lasers effects. *Health Phys.* 1989; 56: 691-704.
61. Karu TI. Multiple Roles of cytochrome c oxidase in mammalian cells under action of red and IR-radiation. *Life.* 2010; 62 (8): 607–10.
62. Kendall HK, Marshall RI, Bartold PM. Nitric oxide and tissue destruction. *Oral Dis.* 2001; 7 (1): 2–10.
63. Kim SJ, Chung YK, Chung TW, Kim JR, Moon SK, Kim CH, et al. Regulation of matrix metalloproteinase-9 expression between gingival fibroblast cells from old and young rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009; 378 (2): 152-6.
64. Khadra M, Lyngstadaas SP, Haanaes HR, Mustafa K. Determining optimal dose of laser therapy for attachment and proliferation of human oral fibroblasts cultured on titanium implant material. *J Biomed Mater Res.* 2005; 73 (1): 55 – 62.
65. Khadra M, Lyngstadaas SP, Haanæs HR, Mustafa K. Effect of laser therapy on attachment, proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells cultured on titanium implant material. *Biomaterials.* 2005; 26 (17): 3503-9.
66. Kreisler M, Christoffers AB, Al-Haj H, Willershausen B, d’Hoedt, B. Lowlevel 809-nm diode laser-induced in vitro stimulation of the proliferation of human gingival fibroblasts. *Lasers Surg Med.* 2002; 30 (5): 365-9.

67. Kreisler M, Christoffers AB, Willershausen B, d'Hoedt B. Effect of low-level GaAlAs laser irradiation on the proliferation rate of human periodontal ligament fibroblasts: an in vitro study. *J Clin Periodontol*. 2003; 30 (4): 353-8.
68. Kondo H, Yonezawa Y. Changes in the migratory ability of human lung and skin fibroblasts during in vitro aging and in vivo cellular senescence. *Mech Ageing Develop*. 1992; 63 (3): 223-33.
69. Kong Q, Majeska RJ, Vazquez M. Migration of connective tissue-derived cells is mediated by ultra-low concentration gradient fields of EGF. *Exp Cell Res*. 2011; 317 (11): 1491-502.
70. Lallier TE, Miner Jr QW, Sonnier J, Spencer A. A simple cell motility assay demonstrates differential motility of human periodontal ligament fibroblasts, gingival fibroblasts, and pre-osteoblasts. *Cell Tissue Res*. 2007; 328 (2): 339–54.
71. Lamont RJ, Jenkinson HF. Life below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998; 62 (4): 1244-63.
72. Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clin Dermatol*. 2007; 25 (1): 9– 18.
73. Loevschall H, Arenholt-Bindslev D. Effect of low level diode laser irradiation of human oral mucosa fibroblasts in vitro. *Lasers Surg Med*. 1994; 14 (4): 347 – 54.
74. Low L, Reed A. Eletroterapia explicada: principios e pratica. 3ed. Barrier: Manole; 2001.
75. Lubart R, Wollman Y, Fiedmann H, Rochkind S, Laulicht I. Effects of visible and near-infrared lasers on cell cultures. *J Photochem Photobiol B*. 1992; 12 (3): 305-10.
76. Magalhães JP. From cells to ageing: a review of models and mechanisms of cellular senescence and their impact on human ageing. *Exp Cell Res*. 2004; 300 (1): 1–10.
77. Marques MM, Pereira NA, Fujihara NA, Nogueira FN, Eduardo CP. Effect of low-power laser irradiation on protein synthesis and ultrastructure of human gingival fibroblasts. *Lasers Surg Med*. 2004; 34 (3): 260 –5.

78. Martin P. Wound healing – aiming for perfect skin regeneration. *Science*. 1997; 276 (5309): 75-81.
79. Menke NB, Ward KR, Witten TM, Bonchev DG, Diegelmann RF. Impaired wound healing. *Clin Dermatol*. 2007; 25 (1): 19-25.
80. Mimura Y, Ihn H, Jinnin M, Asano Y, Yamane K, Tamaki K. Epidermal growth factor affects the synthesis and degradation of type I collagen in cultured human dermal fibroblasts. *Matrix Biol*. 2005; 25 (4): 202-12.
81. Moore P, Ridgway TD, Higbee RG, Howard EW, Lucroy MD. Effect of wavelengths on low-intensity laser irradiation-stimulated cell proliferation in vitro. *Lasers Surg Med*. 2005; 36 (1): 8 – 12.
82. Nebel D, Jönsson D, Norderyd O, Bratthall G, Nilsson BO. Differential regulation of chemokine expression by estrogen in human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res*. 2010; 45 (6): 796-802.
83. Noguchi S, Ohba Y, Oka T. Effect of salivary epidermal growth factor on wound healing of tongue in mice. *Am J Physiol*. 1991; 260 (4 Pt 1): E620–5.
84. Ohshima M, Sato M, Ishikawa M, Maeno M, Otsuka K. Physiologic levels of epidermal growth factor in saliva stimulate cell migration of and oral epithelial cell line, HO-1-N-1. *Eur J Oral Sci*. 2002; 100 (2): 130-6.
85. Oliveira CF, Hebling J, Souza PPC, Sacono NT, Lessa FR, Lizareli RFZ, et al. Effect of low level laser irradiation on odontoblast-like cells. *Laser Phys Lett*. 2008; 1: 14-8.
86. Oliveira CF, Basso FG, Lins ECCC, Kurachi C, Hebling J, Bagnato VS, et al. In vitro effect of low level laser on odontoblast-like cells. *Laser Phys Lett*. 2011; 8: 155-63.
87. Pansani TN, Basso FG, Turirioni AP, Kurachi C, Hebling J, de Souza Costa CA. Effects of low-level laser therapy on the proliferation and apoptosis of gingival fibroblasts treated with zoledronic acid. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2014; 43 (8): 1030-4.
88. Pratsinis H, Kletsas D, Stathakos D. Autocrine growth regulation in fetal and adult human fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997; 237 (2): 348–53.

89. Posten W, Wrone DA, Dover JS, Arndt KA, Silapunt S, Alam M. Low-level laser therapy for wound healing: mechanism and efficacy. *Dermatol Surg.* 2005; 31 (3): 334-9.
90. Read SM, Northcote DH. Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie blue dye-binding assay for protein. *Anal Biochem.* 1981; 116 (1): 53-64.
91. Reed MJ, Ferrara NS, Vernon RB. Impaired migration, integrin function, and actin cytoskeletal organization in dermal fibroblasts from a subset of aged human donors. *Mech Ageing Dev.* 2001; 122 (11): 1203–20.
92. Reinke JM, Sorg H. Wound repair and regeneration. *Eur Surg Res.* 2012; 49 (1): 35-43.
93. Ryu S, Moon SY, Yang Y, Moon SR, Hong JP, Choi J, et al. Recombinant human epidermal growth factor accelerates the proliferation of irradiated human fibroblasts and keratinocytes in vitro and in vivo. *J Radiat Res.* 2009; 50 (6): 545–52.
94. Schindl A, Schindl M, Pernerstorfer-Schion H, Schindl L. Low-intensity lasers therapy: a review. *J Investig Med.* 2000; 48 (5): 312-26.
95. Schulze C, Wetzel F, Kueper T, Malsen A, Muhr G, Jaspers S, et al. Stiffening of human skin fibroblasts with age. *Biophysical J.* 2010; 99 (8): 2434–42.
96. Sculley DV, Langley-Evans SC. Salivary antioxidants and periodontal disease status. *Proc Nutr Soc.* 2002; 61 (1): 137-43.
97. Silva TA, Garlet GP, Fukada SY, Silva JS, Cunha FQ. Chemokines in oral inflammatory disease: apical periodontitis and periodontal disease. *J Dent Res.* 2007; 86 (4): 306-19.
98. Shackelford RE, Kaufmann WK, Paules RS. Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. *Free Radic Biol Med.* 2000; 28 (9): 1387-404.
99. Shaikh S, Nicholson LFB. Advanced glycation and products induce in vitro cross-Linking of α -Synuclein and accelerate the process of intracellular inclusion body formation. *J Neurosci Res.* 2008; 86 (9): 2071–82.

100. Shiraha H, Gupta K, Drabik K, Wells A. Aging fibroblasts present reduced epidermal growth factor (EGF) responsiveness due to preferential loss of EGF receptors. *J Biol Chem.* 2000; 275 (25): 19343-51.
101. Smith KC. Laser (and LED) therapy is phototherapy. *Photomed Laser Surg.* 2005; 23 (1): 78-80.
102. Solmi R, Tietz C, Zucchini C, Gualandib G, Pagnaloni A, Talass O, et al. In vitro study of gingival fibroblasts from normal and inflamed tissue: age-related responsiveness. *Mech Ageing Develop.* 1996; 92 (1): 31-41.
103. Sottile J, Hoyle M, Millis AJT. Differential response of early and late passage fibroblasts to collagenase stimulatory factor in conditioned media. *Coll Relat Res.* 1988; 8 (4): 361-74.
104. Sottile J, Mann DM, Diemer V, Millis AJT. Regulation of collagenase and collagenase mRNA production in early- and late-passage human diploid fibroblasts. *J Cell Physiol.* 1989; 138 (2): 281-90.
105. Stephens P, Davies KJ, al-Khateeb T, Shepherd JP, Thomas DW. A comparison of the ability of intra-oral and extra-oral fibroblasts to stimulate extracellular matrix reorganization in a model of wound contraction. *J Dent Res.* 1996; 75 (6): 1358-64.
106. Stephens P, Davies KJ, Occleston N, Pleass RD, Kon C, Daniels J. Skin and oral fibroblasts exhibit phenotypic differences in extracellular matrix reorganization and matrix metalloproteinase activity. *Br J Dermatol.* 2001; 144 (2): 229-37.
107. Swift ME, Burns AL, Gray KL, DiPietro LA. Age-related alterations in the inflammatory response to dermal injury. *J Invest Dermatol.* 2001; 117 (5): 1027-35.
108. Szpaderska AM, Zuckerman GD, DiPietro LA. Differential injury responses in oral mucosal and cutaneous wounds. *J Dent Res.* 2003; 82 (8): 621-6.
109. Terheyden H, Stadlinger B, Snaz M, Garbe AI, Meyle J. Inflammatory reaction – communication of cells. *Clin Oral Implants Res.* 2013; 25 (4): 399-407.

110. Tullberg-Reinert H, Jundt G. In situ measurement of collagen synthesis by human bone cells with a sirius red-based colorimetric microassay: effects of transforming growth factor beta 2 and ascorbic acid 2-phosphate. *Histochem Cell Biol.* 1999; 112 (4): 271-6.
111. Wagner VP, Meurer L, Danilevycz CK, Magnusson AS, Marques MM, Sant' Ana Filho M, Squarize CH, Martins MD. Influence of different energy densities of laser phototherapy on oral wound healing. *J Biomed Opt.* 2013; 18 (12): 128002-7.
112. Yeo E, Jang I, Lim H, Ha K, Park SC. Agonist-specific differential changes of cellular signal transduction pathways in senescent human diploid fibroblast. *Exp Gerontol.* 2002; 37 (7): 871-83.

Anexo 1

Aprovação do Projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr/UNESP

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE
ARARAQUARA - UNESP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EFEITO DA LASERTERAPIA DE BAIXA POTÊNCIA E FATORES DE CRESCIMENTO SOBRE A ATIVIDADE DE FIBROBLASTOS DE GENGIVA OBTIDOS DE PACIENTES JOVENS E IDOSOS

Pesquisador: Carlos Alberto de Souza Costa

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 13514813.6.0000.5416

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 278.678

Data da Relatoria: 21/05/2013

Apresentação do Projeto:

Os pesquisadores pretendem avaliar, in vitro, a influência do envelhecimento celular sobre a capacidade de reparo de fibroblastos de gengiva quando o tecido é submetido a laserterapia de baixa intensidade e a aplicação de fatores de crescimento. Para isso, deverão obter amostras de tecidos gengivais expostos após a extração de dentes, que tenham indicação clínica para extração, de 3 adultos jovens e 3 idosos.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo desse estudo será avaliar o metabolismo, proliferação e migração celular, determinados como indicativos da capacidade de reparo de fibroblastos de gengiva jovens e idosos, submetidos a laserterapia de baixa intensidade e fatores de crescimento.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os pesquisadores informam que não há risco adicional àquele a que o paciente estará submetido na extração dentária, dado que as amostras serão obtidas de pacientes com indicação clínica para tal procedimento. Não há benefícios imediatos aos pacientes da amostra, entretanto o conhecimento obtido com a pesquisa poderá trazer benefícios tanto a eles quanto a outros pacientes que necessitem melhorar sua capacidade de reparo dos fibroblastos de gengiva.

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

CEP: 14.801-903

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: 1633-0164

Fax: 1633-0164

E-mail: cep@foar.unesp.br; mnagle@foar.unesp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE
ARARAQUARA - UNESP



Continuação do Parecer: 278.678

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é oportuna e, apesar de não trazer benefícios imediatos aos participantes, poderá gerar conhecimento fundamental para futuras pesquisas que visem desenvolver métodos para melhorar a capacidade de reparo de fibroblastos de gengiva.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O pesquisador apresenta nova versão do TCLE com os ajustes solicitados anteriormente. Nele fica adequadamente esclarecido que a amostra de tecido a ser retirada do paciente é um fragmento de gengiva obtido a partir de papila dental exposta durante um procedimento de extração dentária clinicamente indicada. Também é informado que o fragmento deverá apresentar aproximadamente 1 milímetro, o que não trará qualquer risco adicional ao processo de cicatrização no local da extração dentária.

O pesquisador também corrigiu o cronograma apresentado no projeto de pesquisa.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O pesquisador apresentou nova versão do TCLE e do projeto de pesquisa corrigindo ou adequando seu texto em acordo com as solicitações da relatora. Meu parecer é favorável à aprovação do projeto de pesquisa no termos apresentados em 22 de abril de 2013.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado em sessão de 21 de maio de 2013.

ARARAQUARA, 21 de Maio de 2013

Assinador por:
Maurício Meirelles Nagle
(Coordenador)

Endereço: HUMAITA 1680
Bairro: CENTRO
UF: SP
Município: ARARAQUARA
Telefone: 1633-0164
CEP: 14.801-903
Fax: 1633-0164
E-mail: cep@foar.unesp.br; mnagle@foar.unesp.br

Autorizo a reprodução deste trabalho.

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 18 de março de 2015.

TAISA NOGUEIRA PANSANI